



Université de Montréal

**Rôle des récepteurs aux protéines G (GPR55, GPR91 et GPR99) dans la croissance et le guidage axonal au cours du développement du système visuel**

par  
Hosni Cherif

École d'optométrie,  
Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en sciences de la vision  
Option Biologie cellulaire et moléculaire

Septembre 2015

© Hosni Cherif, 2015

Cette thèse intitulée :

Rôle des récepteurs aux protéines G (GPR55, GPR91 et GPR99) dans la croissance et le guidage axonal au cours du développement du système visuel

Présentée par :

Hosni Cherif

a été évaluée par le jury composé suivant :

Dr Claude Giasson

Président rapporteur & Représentant du Doyen de la FESP

Dr Jean-François Bouchard

Directeur de recherche

Dr Maurice Ptito

Membre du jury

Dr Berthot François

Examineur externe

## Résumé

Lors de l'attribution du prix Nobel de chimie aux docteurs Robert Lefkowitz et Brian Kobika pour leurs travaux essentiels sur les récepteurs couplés à des protéines G (RCPGs), Sven Lindin, membre du comité Nobel, a affirmé que « jusqu'à la moitié » des médicaments « reposent sur une action ciblant les RCPG ». En raison de leurs rôles importants, leurs mécanismes d'activation et l'action de leurs ligands, les RCPG demeurent les cibles potentielles de la majorité des recherches pour le développement de nouveaux médicaments et de leurs applications cliniques. Dans cette optique, nous avons concentré nos recherches à travers cette thèse pour élucider les rôles, les mécanismes d'action et les effets des ligands de trois RCPG : GPR55; GPR91 et GPR99 au cours du développement des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). Les résultats de nos études confirment l'expression des récepteurs lors du développement embryonnaire, postnatal et adulte des CGRs ainsi qu'au cours de l'établissement de la voie rétinothalamique. *In vitro*, la modulation pharmacologique et génétique de l'activité de ces RCPGs réorganise la morphologie du cône de croissance des CGRs, celle des neurones corticaux et elle modifie la croissance axonale globale. De plus, les effets de la stimulation avec des ligands des ces trois RCPGs sur le guidage axonal varient d'aucun effet (GPR91 et GPR99) à la répulsion ou l'attraction (GPR55). La voie de signalisation MAPK-ERK1/2 joue un rôle essentiel dans la médiation des effets des ligands de ces récepteurs avec une implication de la voie de RhoA à hautes concentrations pour l'agoniste endogène de GPR55. *In vivo*, cette recherche démontre également l'implication de GPR55 dans les processus de sélection des cibles thalamiques et de raffinement au cours du développement du système nerveux visuel.

**Mots-clés :** Récepteur couplé aux protéines G (GPCR); GPR55; GPR91; GPR99; cône de croissance; guidage axonal; cellule ganglionnaire de la rétine (CGR); ERK1/2; RhoA; LPI; CBD; O-1602; Succinate;  $\alpha$ -cétoglutarate; développement; régénération.

## **Abstract**

During the ceremony of Nobel Prize award in Chemistry to Drs Robert Leftkowitz and Brian Kobika for their essential work on G proteins coupled receptors (GPCRs), Sven Lindin, member of the Nobel committee, said that "up to half" of medicines "are based on an action targeting GPCRs." Because of their important roles, their mechanisms of activation and their ligand activity, GPCRs remain the potential target of most of the research in the development of new drugs and their clinical applications. In this perspective, we have focused our research through this thesis to clarify the roles, mechanisms of action and ligand effects of three GPCRs: GPR55; GPR91 and GPR99 during the development of the retinal ganglion cells (RGCs) axons. The results of our studies confirm the expression of the receptors during embryonic, postnatal and adult ages of RGCs and during the establishment of the retino-thalamic pathway. *In vitro*, pharmacological and genetic modulation of the activity of the GPCR reorganizes the morphology of the growth cone of RGCs, the cortical neurons and alters the global axon growth. In addition, the effects of stimulation with the three GPCR ligands on axonal guidance vary from no effect (GPR91 and GPR99) to repulsion and attraction (GPR55). Signaling pathway MAPK-ERK1/2 plays an essential role in mediating the effects of the ligands of these receptors. RhoA pathway is involved at higher concentrations to mediate the effect of the endogenous GPR55 agonist. *In vivo*, this research also demonstrates the involvement of GPR55 in the processes of target selection and refinement during the development of the neurovisual system.

**Keywords** : G-Protein-coupled receptors (GPCR) ; GPR55 ; GPR91 ; GPR99 ; growth cone ; axon guidance ; retinal ganglion cells (RGCs); ERK1/2 ; RhoA ; LPI; CBD; O-1602; succinate;  $\alpha$ -ketoglutarate; development; regeneration.

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des sigles et des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xxii
CHAPITRE 1.....	1
1.1 Introduction.....	2
1.2 Les récepteurs des protéines G.....	5
1.2.1 La membrane cellulaire.....	5
1.2.2 Les différentes familles de récepteurs couplés à la protéine G.....	7
1.2.2.1 La famille glutamate.....	8
1.2.2.2 La famille rhodopsine.....	9
1.2.2.3 Les RCPGs d'adhérence.....	10
1.2.2.4 La famille frizzled.....	11
1.2.2.5 La famille sécrétine.....	12
1.2.2.6 Autres types de RCPGs.....	13
1.2.3 Rôle des protéines G hétérotrimériques dans la signalisation cellulaire.....	14
1.3 GPR55, GPR91 et GPR99.....	18
1.3.1 GPR55.....	18
1.3.1.1 Structure.....	18
1.3.1.2 Distribution.....	19
1.3.1.3 Pharmacologie et voies de signalisations.....	21
1.3.1.4 Rôles physiologiques.....	24
1.3.2 GPR91.....	31
1.3.2.1 Structure.....	31
1.3.2.2 Distribution.....	32



1.3.2.3 Pharmacologie et voies de signalisation .....	34
1.3.2.4 Rôles physiologiques .....	36
1.3.3 GPR99 .....	41
1.3.3.1 Structure .....	41
1.3.3.2 Distribution .....	42
1.3.3.3 Pharmacologie et voies de signalisations.....	42
1.3.3.4 Rôles physiologiques .....	44
1.4 Les ligands de GPR55 - GPR91 et GPR99.....	46
1.4.1 LPI.....	46
1.4.2 O-1602 .....	47
1.4.3 CBD .....	49
1.4.4 Succinate .....	51
1.4.4 L'α-cétoglutarate .....	55
1.5 Le cône de croissance et la chimiotaxie.....	56
1.5.1 Structure du cône de croissance.....	56
1.5.2 Les molécules de guidage .....	59
1.5.2.1 Diversité des signaux de guidage pour les processus de développement neuronaux.....	60
1.5.2.2 Nétrines .....	61
1.5.2.3 Slits .....	63
1.5.2.4 Sémaphorines .....	64
1.5.2.5 Éphrines .....	66
1.5.2.6 Morphogènes et facteurs de croissance.....	67
1.5.2.7 Les molécules d'adhésion cellulaire (MAC).....	69
1.5.3 La chimiotaxie .....	72
1.5.3.1 Détection directionnelle .....	73
1.5.3.2 Motilité.....	76
1.5.3.3 Polarisation .....	79
1.6 Guidage axonal et établissement du système visuel .....	82
1.6.1 Le système visuel des mammifères.....	82
1.6.2 Différenciation et axonogenèse des cellules ganglionnaires de la rétine.....	85

1.6.3 Croissance et guidage axonal dans la rétine et à la sortie de l'œil .....	90
1.6.4 Guidage axonal au niveau du chiasma.....	95
1.6.5 Navigation axonale à travers le tractus optique et reconnaissance des cibles .....	104
1.6.6 Raffinement dans les cibles visuelles .....	107
1.7 Objectifs de la recherche.....	119
CHAPITRE 2 .....	120
2.1 Abstract.....	122
2.2 Introduction.....	123
2.3 Materials and methods .....	125
2.3.1 Animal experimentation.....	125
2.3.2 Reagents.....	126
2.3.3 Tissue preparation for immunohistochemistry .....	127
2.3.4 Immunohistochemistry .....	127
2.3.5 Fluorescent in situ hybridization (FISH) .....	128
2.3.6 Retinal explant culture: .....	129
2.3.7 Purified retinal ganglion cell culture.....	129
2.3.8 Primary neuron culture .....	130
2.3.9 Growth cone behavior assay .....	131
2.3.10 Immunocytochemistry .....	131
2.3.11 Western blot analysis: .....	132
2.3.12 Intraocular injections .....	133
2.3.13 Quantification method: .....	135
2.3.14 Genotyping:.....	136
2.4 Results.....	137
2.4.1 GPR55 expression in the developing retina.....	137
2.4.2 GPR55 ligands reorganize GC morphology and modulate axon growth .....	138
2.4.3 At low concentrations, GPR55 agonists modulate GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway .....	140
2.4.4 At a higher concentration, LPI activates RhoA kinase .....	141
2.4.5 Pharmacological manipulation of GPR55 affects RGC turning .....	142

2.4.6 GPR55 plays an important role during retinal projection growth and target innervation .....	143
2.5 Discussion.....	145
2.5.1 GPR55 expression in the retina.....	145
2.5.2 Effects of the GPR55 ligands on the GC morphology and axon growth.....	146
2.5.3 Axon growth and GC morphology reorganization are mediated by GPR55 via the ERK1/2 or RhoA/ROCK1 pathways .....	148
2.5.4 Effects of GPR55 ligands on RGC turning.....	149
2.5.5 GPR55 affects target selection during development <i>in vivo</i> .....	150
2.6 Acknowledgements:.....	152
2.7 References:.....	153
2.8 Table and figure legends:.....	163
CHAPITRE 3 .....	180
3.1 Abstract.....	182
3.2 Introduction.....	183
3.3 Methods.....	186
3.3.1 Reagents.....	186
3.3.2 Tissue preparation for immunohistochemistry .....	187
3.3.3 Immunohistochemistry .....	187
3.3.4 Retinal explant culture .....	188
3.3.5 Purified retinal ganglion cell culture.....	188
3.3.6 Primary neuron culture .....	190
3.3.7 Growth cone behavior assay .....	190
3.3.8 Immunocytochemistry .....	191
3.3.9 Western blot analysis .....	191
3.3.10 Lipophilic Dye Tracing and Tissue Clearing.....	192
3.3.11 Intraocular injections .....	193
3.3.12 Quantification Method.....	193
3.4 Results.....	194
3.4.1 GPR91-GPR99 expression in the developing and adult mice retina .....	194

3.4.2 Krebs cycle intermediates, succinate and $\alpha$ -ketoglutarate, reorganize GC morphology and modulate axon growth .....	195
3.4.3 GPR91/GPR99 agonists modulate GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway .....	196
3.4.4 GPR91 and GPR99 ligands have no effect on RGC axon turning .....	197
3.4.5 Role of GPR91 and GPR99 in vivo .....	197
3.5 Discussion .....	199
3.6 References .....	207
3.7 Authors contributions .....	216
3.8 Figure legends .....	217
CHAPITRE 4 .....	229
4.1 Discussion générale .....	230
4.2 Expression des récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 dans la rétine .....	231
4.3 Les récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 modulent la morphologie des CC et la croissance axonale globale .....	234
4.4 La voie de signalisation ERK-1/2 médie les effets des récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 .....	240
4.5 Les récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 dans le guidage axonal .....	242
4.6 Rôle du récepteur GPR55 dans le raffinement des projections rétiniennes et le choix des cibles thalamiques .....	244
4.7 Les limitations de notre étude .....	248
Conclusion et perspectives .....	251
Bibliographie .....	xxii
Annexe I. Publications CB1R et CB2R .....	lxxxiv
Annexe II. Publications, présentations, bourses et prix .....	clxxxiii

# Liste des tableaux

Table 2.1 Statistical Table..... 163

## Liste des figures

Figure 1.1 Représentation schématique des composantes du RCPG.....	17
Figure 1.2 Représentation hélicoïdale du récepteur GPR55 humain.....	19
Figure 1.3 LPI.....	46
Figure 1.4 O-1602.....	47
Figure 1.5 Le cannabidiol (CBD).....	49
Figure 1.6 Le succinate.....	51
Figure 1.7 L'α-cétoglutarate.....	55
Figure 1.8 Cytosquelette d'un cône de croissance interprétant un environnement chimiotactique diversifié.....	58
Figure 1.9 La diversité des mécanismes du guidage axonal agissant à court et à long terme pour médier un guidage attractif ou répulsif.....	59
Figure 1.10 Schéma de quelques molécules de guidage attractives et répulsives ainsi que leurs principaux récepteurs.....	71
Figure 1.11 Cadre conceptuel de la chimiotaxie avec ses trois étapes l'orientation directionnelle, la motilité et la polarisation.....	73
Figure 1.12 Exemple de transduction, adaptation et réduction du bruit.....	74
Figure 1.13 Le regroupement des récepteurs liés au sein de la bicouche lipidique offre un mécanisme d'amplification.....	76
Figure 1.14 Processus de portusion, engorgement et consolidation permettant la motilité du CC.....	78
Figure 1.15 Deux modèles de polarisation «avant-arrière» et «gauche –droite».....	81
Figure 1.16 Différentes couches de la rétine.....	83
Figure 1.17 Représentation schématique de différentes molécules de guidage impliquées dans l'établissement des voies neurovisuelles.....	113
Figure 1.18 Le guidage axonal et les protéines du guidage axonal.....	118
Figure 2.1 GPR55 protein and mRNA expression in the retina.....	164
Figure 2.2 GPR55 protein expression in retinal explants and primary cortical neurons.....	166

Figure 2.3 GPR55 ligands reorganize the morphology of the GC and modulate axon growth via a cannabinoid independent pathway. ....	168
Figure 2.4 GPR55 mediates the reorganization of the GC morphology and the modulation of axon growth. ....	170
Figure 2.5 At low concentration, GPR55 ligand modulates GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway .....	172
Figure 2.6 At a higher concentration, LPI activates RhoA pathway and produces growth cone collapse and neurite repulsion.....	174
Figure 2.7 Pharmacological modulation of GPR55 affects RGC turning <i>in vitro</i> .....	176
Figure 2.8 GPR55 plays an important role during retinal projection growth and target selection <i>in vivo</i> .....	178
Figure 3.1 GPR91 and GPR99 expression within the mouse retina.....	217
Figure 3.2 GPR91 and GPR99 protein expression in retinal explants during the development .....	219
Figure 3.3 Succinate and $\alpha$ -ketoglutarate modulate the GC morphology and the total neurite outgrowth. ....	221
Figure 3.4 GPR91 or GPR99 agonists modulate GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway.....	223
Figure 3.5 GPR91 and GPR99 ligands had no effect on RGC turning <i>in vitro</i> .....	225
Figure 3.6 Role of GPR91/GPR99 in RGC guidance and target selection <i>in vivo</i> .....	227

## Liste des sigles et des abréviations

$\Delta^9$ -THC:  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol.

$[Ca^{2+}]_i$ : concentration d'ion calcique intracellulaire.

2-AG: 2-arachidonylglycérol

2-HG: 2-hydroxyglutarate.

5-HT: 5-hydroxytryptamine.

A1R: récepteur adénosine-A1.

ABN-CBD: «abnormal-cannabidiol».

AC1: adénylate cyclase 1.

ADCY8: adénylcyclase 8.

AEA: arachidonylethanolamine (anandamide).

AMPC: adénosine monophosphate cyclique.

Asn: Asparagine.

ATF2: «activating transcription factor 2».

ATP: adénosine triphosphate.

BDNF: «Brain-derived neurotrophic factor», facteur neurotrophique dérivé du cerveau.

BMP: protéines morphogénétiques osseuses.

BOC: «biregional Cdon-biding protein».

BPL: peptides liés au glucagon.

C. elegans: «Caenorhabditis elegans».

CB1R: récepteur aux cannabinoïdes CB1

CB2R: récepteur aux cannabinoïdes CB2

CB3R: récepteur aux cannabinoïdes CB3

CBD: cannabidiol

CC: cône(s) de croissance.

CCR4: récepteur-4 chimiokine CC: protéine codée par le gène CCR4 chez l'humain.

CD: cellule dendritique.

CE : cellule endothéliale.



CGR: cellule ganglionnaire de la rétine.

COX: cyclo-oxygénase.

CREB: « C-AMP Response Element-binding protein».

CRF: «corticotropin-releasing factor», corticolibérine.

CSN5: Le cinquième composant du complexe signalosome COP9 des mammifères.

CSPG: chondroïtine sulfate protéoglycanes.

CTGF: facteur de croissance du tissu conjonctif.

CXCR4: gène CXCR4 code pour la molécule SDF-1.

DAG: diacylglycérol

DCC: «deleted in colorectal cancer»

DE: domaine extracellulaire.

DEC: domaine extracellulaire.

DiI : "dialkyleindocarbocyanine.

DN: dominant négatif.

DRC: domaine riche en cystéine.

DSCAM: «Down Syndrome Cell Adhesion Molecule.

DTM: domaines transmembranaires.

DTN: «dorsal terminal nucleus»

E14/15: 14/15e jour de développement embryonnaire.

EC50: concentration efficace médiane.

EGF: «epidermal growth factor», facteur de croissance de l'épiderme.

Eph: Récepteur aux éphrines.

ERK: «extracellular signal-regulated kinase».

EVSA-T: type de cellules du cancer du sein.

FA: filaments d'actine.

FCT: fragment transmembranaire / cytoplasmique.

FGF: «fibroblast growth factor», facteurs de croissance des fibroblastes.

FH: le fumarate hydratase.

FOXG1: «forkhead box protein G1».

FSN: fragment N-terminal extracellulaire.

FZD: famille des récepteurs Frizzled.

GABA: l'acide gamma aminobutyrique.

GABABRs: récepteurs de l'acide gamma aminobutyrique.

GAIN: N. terminal des RCPG induisant l'autoprotéolyse.

GAP: «GTPase-activating protein».

Gdf11: facteur de croissance et différenciation 11.

GHRH: «growth-hormone-releasing hormone», hormone libération de l'hormone de croissance.

GN: gène normalisé.

GPS: GPCR qui englobe le site protéolytique.

GRH: «growth hormone receptor».

GT-1b: trisialoganglioside-1b.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène.

HEK 293: «Human embryonic kidney 293 cells», cellules rénales embryonnaires humaines

Hfe: «High Fe».

Hh: Hedgehog.

HIF: «hypoxia-inducible factor», facteur induit par l'hypoxie.

HSC: cellules hépatiques étoilées.

HSPG: héparane sulfate protéoglycanes.

HSS: sulfatation endogène.

IDH: isocitrate déshydrogénase

Ig: l'immunoglobuline.

IgCAM: la superfamille des molécules d'adhésion immunoglobulines.

IP3: Inositol trisphosphate.

IRF: «interferon regulatory factor

ITR: récepteur lié à l'épaisseur de l'intima.

IUPHAR: «International union of basic and clinical pharmacology»

JGA: juxtaglomérulaire.

JNK: «c-Jun N-terminal kinase».

KO: «knockout».

LGN: «lateral geniculate nucleus», noyau géniculé latéral.

LIM: facteur de transcription Islet-1 (Lin11/Isl1/Mec3).

LMA: leucémie myéloïde aiguë.

LPI: lysophosphatidylinositol.

LRP1: «low density lipoprotein receptor-related protein 1.

LTE4: leucotriène E4.

LysoPtdGlc: lyso-phosphatidyl-b-D-glucoside.

MAC: molécules d'adhésion cellulaire.

MAG: «myelin associated glycoprotein», glycoprotéine associée à la myéline.

MAPK: «mitogen activated protein kinase», protéine kinase activée par des agents mitogènes.

MAST : cellules dérivées du sang du cordon ombilical.

MCH: «melanin concentrating hormone»

MD: «macula densa»

MDA-MB-231: «M.D. Anderson -metastatic breast 231»

MDCK: «Madin-Darby canine kidney».

MECA: mélanocortine, endothéline, cannabinoïde et adénosine.

MoDCs: CD humaines immatures dérivées de monocytes.

MT: microtubules.

Mz-chA-1: lignée cellulaire du cholangiocarcinome humain.

NADP<sup>+</sup>: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NCAM: molécule d'adhérence cellulaire neuronale

NEL: «neural epidermal growth factor (EGF)-like molecule».

NFAT: «nuclear factor of activated T-cells».

NF-κB: «nuclear factor-kappa B».

NGF: facteur de croissance neurotrophique.

NogoR/ NgR1: récepteur Nogo.

NRP: neuropiline.

NT3/4: neurotrophine-3/4.

OVCAR3: lignées de cellules cancéreuses de l'ovaire.

OXGR1: récepteur de l'oxoglutarate.

P10: 10<sup>e</sup> jour postnatal.

P2Y: purinergic G protein-coupled receptors.

p38: «p38 member of the mitogen-activated protein kinase family».

PAX2: «paired box gene 2»,  
PC12: pheochromocytome 12.  
PC-3 et DU145: lignées de cellules cancéreuses de la prostate.  
PCR: réaction en chaîne par polymérase.  
PE: phosphatidyléthanolamine.  
PEA: palmitoyléthanolamine.  
PI: phosphatidylinositol.  
PI3K: phosphoinositide 3-kinase.  
PIG: polypeptide inhibiteur gastrique.  
PIV: peptide intestinal vasoactif.  
PKA: protéine kinase A.  
PKB: protéine kinase B.  
PLA1/2: phospholipase A1/2.  
PLC: phospholipase C.  
PLXN: Pléxine.  
POU /Brn3b: «Brain-Specific Homeobox/POU Domain Protein 3B».  
PPAR $\gamma$ : «peroxisome proliferator-activated receptor», récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes.  
PRF: protéines Frizzled connexes.  
RCPG: récepteurs couplés aux protéines G.  
RhoA: "Ras homolog gene family, member A".  
RPE: "retinal pigment epithelium", épithélium pigmentaire rétinien.  
RSCA: récepteur sensible au calcium.  
RT-PCR: «reverse transcriptase polymerase chain reaction».  
Ryk: «receptor-like tyrosine kinase».  
S1PR2: récepteur sphingosine-1-phosphate 2;  
SDF-1: «stromal cell-derived factor 1».  
SDH: succinate déshydrogénase.  
SEMA/ Sema : sémaphorines.  
SFRP1: «secreted frizzled-related protein 1».  
Shh: sonic hedgehog.

SNC: système nerveux central.

SOG: somatostatine, opiacés et galanine.

SP1: sphingosine-1-phosphate.

STAT1/3: «signal Transducers and Activators of Transcription 1/3».

GPR91/GPR91: «succinate receptor 1», récepteur au succinate1, GPR91

TAS1R: «taste receptor, type 1».

Ten-m: "tenascin major".

TGFβ: «transforming growth factor beta».

TOR: « target of rapamycin».

TrkA-C: récepteurs tropomyosine kinase A–C,

TRPV2: transient receptor potential vanilloid 2.

TYK2: tyrosine Kinase 2.

UNC: récepteur de nétrine.

VEGF-A: «vascular endothelial growth factor-A», facteur de croissance endothélial vasculaire-A.

VFD: domaine «Venus-Flytrap».

VGLUT2: «vesicular glutamate transporter 2», transporteur vésiculaire 2 du glutamate.

WNT: «wingless».

WT: «wildtype», souche sauvage».

ZIC2: «zinc finger protein of the cerebellum 2, facteur de transcription à doigt de zinc.

α-KG: α- «ketoglutarate». Cétooglutarate.

*À tous les membres de ma famille*

## Remerciements

Mes sentiments de reconnaissance vont en premier lieu à l'endroit de mon directeur de thèse Pr Jean-François Bouchard, qui m'a donné l'opportunité de rejoindre son laboratoire et m'a fait confiance dès le début. À cet égard, je le remercie tout particulièrement pour l'appui, le soutien, les encouragements et l'encadrement continus tout au long de mes recherches et de ma formation doctorale. Je le remercie également de m'avoir enrichi avec ses connaissances, sa détermination, son perfectionnisme, son attention aux détails, son enthousiasme contagieux pour la recherche ainsi que ses nombreuses qualités humaines. J'aimerais simplement lui dire : « Merci infiniment de m'avoir montré les clés du succès ! ».

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire de Jean-François Bouchard qui ont été aussi un soutien constant et d'excellents partenaires de travail durant toutes ces années.

-Merci à Anteneh pour toutes les techniques que tu m'as appris et pour ta disponibilité malgré la distance. C'était un plaisir de travailler avec toi.

-Merci à Bruno pour ton aide à réaliser mon projet. Sache que tu m'as aidé bien plus que tu ne le penses et je te suis très reconnaissant. Merci du fond du cœur.

- Merci à Alex de ta participation et ton implication dans ce projet de recherche. Ton travail fut plus qu'appréciable.

- Merci à Pasha de ton aide pour l'expérience FISH, ce fut enrichissant.

- Merci à Joseph pour ta collaboration et ta disponibilité à aider, merci d'être là.

- Merci à Florence et à Sophie pour leur soutien technique et leur gestion du laboratoire qui m'ont permis de réaliser mes expériences dans les meilleures des conditions.

- Merci à tous mes stagiaires qui ont participé à la réalisation de mes travaux : Alexandre Talbot, Natacha Chainé, Anne Sophie Blais, Jonathan Gagnon, Alex Bouchard, Éric Lortie-Milner et Ariane Quintal. Tout simplement merci pour votre aide précieuse.

Je tiens également à remercier le Pr Ken Mackie pour son hospitalité, son accueil chaleureux dans son laboratoire, les souris transgéniques qu'il nous a offert et son apport scientifique. J'ai grandement apprécié son soutien, son implication et son expérience.

Je suis reconnaissant à nos collaborateurs des laboratoires des Pr Ptito, Pr Casanova et Pr Vaucher pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoigné durant ces années de dur labeur. Merci à Geneviève pour ton temps et ta gentillesse grandement appréciés.

Je tiens à remercier le réseau vision/FRQS, la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) et l'école d'optométrie de l'Université de Montréal pour leurs soutiens financiers.

J'aimerais aussi remercier ma femme. Tu as toujours su être là quand j'en avais besoin avec ton soutien, ta compréhension et ta patience. Je ne te le dirai jamais assez fort: merci d'être la meilleure femme à mes yeux !



# **CHAPITRE 1**

## 1.1 Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de molécules de signalisation transmembranaire régulant une panoplie de processus physiologiques et pathologiques. Avec moins de 2% des protéines qui sont codées par le génome et près de 1000 membres, les RCPGs constituent le plus grand groupe des protéines impliquées dans la transduction du signal à la surface cellulaire. (Flower et coll., 1999). Ces récepteurs sont activés par un large éventail de ligands, de peptides, de neurotransmetteurs non peptidiques, de chimiokines et des nucléotides (Marinissen et coll., 2001 et Pierce et coll., 2002) et ils participent à une grande variété de fonctions physiologiques, y compris la neurotransmission, l'exocytose et l'angiogenèse. (Marinissen et coll., 2001). Ils sont également impliqués dans un certain nombre de maladies humaines, ce qui se traduit par le fait qu'elles sont la cible, directement ou indirectement, d'environ 50% de tous les agents thérapeutiques (Flower et coll., 1999).

Les cellules des mammifères détectent une myriade de signaux dans leur environnement via les RCPG. Étant la plus grande famille des molécules de signalisation transmembranaire, elle peut être divisée en deux groupes: les odorants / sensoriels et les non odorants. Les récepteurs odorants / sensoriels sont limités à des cellules spécialisées qui détectent les odeurs, les goûts et régulent les comportements dans l'organisme tels que l'alimentation et l'accouplement. Les récepteurs non odorants sont exprimés de manière différente dans l'organisme, ils répondent à divers ligands endogènes, et régulent plusieurs fonctions physiologiques y compris les procédés immunitaires, l'hématopoïèse, l'hémostase, le métabolisme, la neurotransmission, la reproduction, la fonction cardiaque et le tonus

vasculaire. En conséquence, ces récepteurs sont les cibles d'environ un tiers de tous les médicaments approuvés (Muller, 2000 et Hopkins and Groom, 2002).

Bien que les rôles *in vivo* ont été définis pour un grand nombre de RCPG non odorant, environ 370 chez la souris et chez l'humain, l'expression et la fonction de bon nombre de ces récepteurs ne sont pas complètement caractérisées et une fraction significative de ces récepteurs demeure orpheline (Hill et coll., 2002; Joost; Methner, 2002; Vassilatis et coll., 2003; Fredriksson et et coll., 2003 et Fredriksson et Schiöth, 2005). Une grande partie de la physiologie des vertébrés est basée sur la transduction du signal par les RCPGs. Cependant et malgré leurs similitudes, les RCPGs peuvent avoir des combinaisons uniques d'activités de transduction impliquant plusieurs sous-types de protéine G, ainsi que des voies de signalisation indépendantes de la protéine G et des processus de régulation complexes.

En effet, la diversité biologique des réponses suite à l'activation des RCPGs repose probablement sur l'intégration de l'activité fonctionnelle d'un complexe réseau de voies de signalisation intracellulaire, qui inclut des systèmes générateurs de seconds messagers, des familles de petites GTPases Ras et Rho et de leurs cibles ainsi que les membres de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) et la famille des sérines / thréonine kinases (Gutkind et coll., 2000). L'efficacité du ligand, qui se traduit par son effet sur la structure et les propriétés biophysiques du récepteur, module la réponse biologique. Les ligands naturels et les ligands synthétiques peuvent être complets, donc capables d'une stimulation maximale des récepteurs. Les agonistes partiels sont incapables de déclencher une activité complète, même à concentrations saturées alors que les antagonistes neutres n'ont aucun effet sur l'activité de signalisation, mais peuvent empêcher d'autres ligands de se lier au récepteur. Enfin, les agonistes inverses réduisent le niveau de base ou d'activité constitutive du récepteur.

Dans cette thèse nous tenterons d'identifier et élucider les différents mécanismes moléculaires et les effets de trois récepteurs couplés à la protéine G (GPR55, GPR91 et GPR99) sur la croissance et le guidage axonal des axones des cellules ganglionnaires de la rétine au cours du développement du système visuel.

## **1.2 Les récepteurs des protéines G**

### **1.2.1 La membrane cellulaire**

La membrane cellulaire agit comme une barrière entre le milieu intra et extracellulaire ce qui lui permet de définir la structure et le fonctionnement de la cellule (Robertson et coll., 1959). Elle est composée d'une bicouche phospholipidique. Chaque phospholipide est composé de deux unités: la première est une tête polaire contenant du glycérol et une molécule de phosphate. La seconde est la queue hydrophobe formée par deux chaînes d'acides gras. Une liaison covalente relie la queue de l'acide gras non polaire à une molécule de glycérol de la région polaire de tête (Van Meer et coll., 2008). Dans un milieu aqueux, l'agencement spontané de ces phospholipides emballe la région de la queue hydrophobe à l'intérieur de la cellule et exhibe la tête hydrophile à l'extérieur (Van Meer et coll., 2008). En plus de ces lipides, la membrane cellulaire constituée de proportion substantielle de protéines membranaires qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement d'une cellule (Von Heijne et al., 2006 and Engel et coll., 2008). Parmi ces fonctions, on cite le transport de molécules à travers la membrane plasmique, l'entretien des interactions stables cellule-cellule et le déclenchement des réponses cellulaires suite à la réception des signaux extra et intracellulaires (Muller et coll., 2008).

Selon la nature de leur interaction avec la membrane cellulaire, les protéines membranaires sont classées en deux catégories principales: les périphériques et les intégrées. Les protéines membranaires périphériques sont associées ou adhérentes à la surface de la membrane de façon temporaire. Elles sont attachées à la membrane cellulaire principalement par une hélice alpha amphipathique ou grâce à une liaison covalente avec une chaîne lipidique.

En revanche, les protéines membranaires intégrales sont noyées dans la bicouche phospholipidique. La plus grande classe structurelle de toutes les protéines transmembranaires est l' $\alpha$ -hélicoïdale. En fonction du nombre d'hélices couvrant la membrane, on distingue les protéines transmembranaires à un seul passage ou à passages multiples. Les hélices couvrant la membrane sont formées par des acides aminés à chaînes latérales non polaires pour faciliter leur interaction avec la membrane hydrophobe, et les boucles qui relient ces hélices sont hydrophiles et se trouvent dans le cytosol.

Les récepteurs couplés à la protéine G RCPG sont des protéines transmembranaires responsables de l'initiation de la signalisation intracellulaire en réponse à une grande variété de stimuli extracellulaires. Ces récepteurs, qui sont considérés comme présentant 2% des gènes humains, constituent une famille avec plus de 800 types de récepteurs, ~ 300 qui correspondent à des récepteurs non sensoriels (Takeda et coll., 2002 and Overington et et coll., 2006). Cette diversité permet aux RCPGs de répondre aux signaux exogènes et endogènes comprenant la lumière, l'odorat, les hormones, les neurotransmetteurs, les peptides, les ions et les lipides. La polyvalence de ces récepteurs permet de comprendre comment les RCPGs peuvent réguler l'homéostasie de la plupart des processus physiologiques et, explique la raison pourquoi ils représentent à ce jour, la plus importante famille de cible pharmacologique pour plusieurs médicaments (Fredriksson et coll., 2003).

À l'heure actuelle, jusqu'à 50% des médicaments approuvés agissent à travers ces récepteurs (Hopkins et coll., 2002) et, entre 2010 et 2012, 19% de nouvelles entités moléculaires approuvées par la Food and Drug Administration ciblaient les RCPGs. Et encore, seulement 10% des RCPGs chargés de la détection des signaux endogènes sont ciblés par un médicament approuvé (Audet et coll., 2012).

Pris ensemble, ces données mettent en évidence l'importance des RCPGs comme cibles courantes de médicaments, mais également en tant que récepteurs d'intérêt pour la découverte de nouvelles interventions pharmacologiques.

## **1.2.2 Les différentes familles de récepteurs couplés à la protéine G**

Les RCPGs constituent l'une des plus grandes familles de protéines membranaires. Ils jouent un rôle crucial dans la transduction du signal dans les cellules eucaryotes (Rosenbaum et coll., 2009 and Venkatakrishnan et coll., 2013). Chez les humains et autres animaux, les RCPGs médient la plupart des réponses cellulaires à travers les hormones, les neurotransmetteurs et les stimulants de l'environnement. Compte tenu de leurs importants rôles physiologiques, ils servent de cibles majeures des médicaments cliniques actuels (Lappano et coll., 2011; Rask-Andersen et coll., 2011; Rask-Andersen et coll., 2014 et Civelli et coll., 2013). Les RCPGs sont caractérisés par la présence de sept segments (également connu sous le nom de domaine transmembranaire (TM)  $\alpha$ -hélicoïdal couvrant la membrane, d'une extrémité N-terminale extracellulaire, une intracellulaire C-terminale, en alternant des boucles extracellulaires et intracellulaires qui connectent les hélices. L'analyse des séquences montre que les segments de domaine TM sont relativement conservés dans les familles Grafts, tandis que les extrémités N-terminales et les boucles alternantes affichent une grande diversité en longueur et en composition de la séquence. Cette diversité dans leurs extrémités N-terminales et extracellulaires contribue à leur remarquable capacité à se lier à des ligands de différentes formes, tailles et propriétés chimiques.

Après la liaison du ligand, le RCPG subit des changements de conformation qui conduisent à l'activation de la protéine G hétérotrimérique, en résultant une réponse

intracellulaire (Oldham et coll., 2008). Les RCPG constituent la superfamille d'environ 800 gènes dans le génome humain et plusieurs systèmes de classification ont été proposés, y compris A-F (Kolakowski et coll., 1994), la 1-5 (Bockaert et coll., 1999) ou le système de classification Grafts (Fredriksson et coll., 2003). Parmi ceux-ci, la classification A-F et le système Grafts sont largement utilisés.

Le système de classification Grafts classe le répertoire des RCPGs humains en cinq grandes familles: glutamate (G), rhodopsine (R), l'adhérence (A), Frizzled / Taste2 (F), et la sécrétine (S) sur la base de la similarité de séquence et l'inférence phylogénétique (Fredriksson et coll., 2003). En dehors de ces cinq grandes familles, il y a d'autres petites familles comme la famille de GPR108, la famille des récepteurs reliés à l'épaisseur de l'intima, la famille des récepteurs de l'albinisme oculaire et la famille des récepteurs d'AMPC (Fredriksson et coll., 2003). Toutefois, ces familles de RCPGs sont généralement considérées comme faisant partie de la catégorie "autres".

### **1.2.2.1 La famille glutamate**

La famille glutamate (également connu sous le nom de classe C) comprend les récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (GABARs), les récepteurs sensibles au calcium (RSCA), les récepteurs du goût sucré (TAS1Rs) et d'autres récepteurs orphelins (Lagerstrom et coll., 2008). La famille glutamate des RCPGs joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques: y compris la transmission synaptique, l'homéostasie du calcium.

Le domaine extracellulaire (DEC) de la famille glutamate des RCPGs est caractérisé par un domaine Venus-Flytrap (VFD) qui agit comme un site de liaison orthostérique pour les



ligands natifs et un domaine riche en cystéine (DRC) (Lagerstrom et coll., 2008 and Chun et coll., 2012). Le domaine de VFD constitue une fente globulaire formée par l'architecture bilobée, ce qui permet la liaison des ligands dans la fente et la commutation entre les conformations fermées et ouvertes (Cao et coll., 2009; Dore et coll., 2014; Wu et coll., 2014). Ce mécanisme ressemble au piège à mouche de certaines plantes carnivores qui est capable de fermer autour de sa proie. Le domaine DRC est connu pour servir de médiateur de communication entre les DE et les domaines TM. Cette interaction est stabilisée par des ponts disulfures formés par des cystéines présentes dans les domaines DRC, et l'un de ces ponts facilite également l'interaction entre les domaines DRC et VFD (Lagerstrom et coll., 2008).

### **1.2.2.2 La famille rhodopsine**

La famille rhodopsine des RCPGs (aussi connu comme la classe «A») est la plus grande de toutes les familles des RCPGs constituant environ 700 des 800 RCPGs humains (Fredriksson et coll., 2003). Chez l'humain, la famille rhodopsine peut être subdivisée en quatre groupes principaux ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) et 13 sous-groupes / familles (Fredriksson et coll., 2003). L'inférence phylogénétique de groupement en 13 familles distinctes est largement corrélée avec leur différence dans les fonctions et les propriétés chimiques de leurs ligands. Les familles de récepteurs ou les principaux groupes de branchement dans l'arbre généalogique des récepteurs apparentés à la rhodopsine sont: les récepteurs cluster de prostaglandine, les récepteurs du pôle amine, les récepteurs du pôle d'opsine, les récepteurs cluster de la mélatonine, les récepteurs en grappe MECA (mélancortine, endothéline, cannabinoïde et adénosine) (formant le groupe  $\alpha$ ); les récepteurs en grappe de peptides (formant le groupe  $\beta$ ); les récepteurs cluster SOG (somatostatine, opiacés et la galanine), les récepteurs du pôle MCH (hormone de concentration de la mélanine), les récepteurs du pôle

chimiokine (formant le groupe  $\gamma$ ); les récepteurs cluster-MAS liés, les récepteurs du pôle glycoprotéine, les récepteurs du pôle purine, et les récepteurs du pôle olfactif (formant le groupe  $\delta$ ) (Fredriksson et coll., 2003). Parmi ces familles, les récepteurs olfactifs constituent le composant principal de la grande famille des récepteurs à la rhodopsine, et sont responsables de discriminer des milliers de molécules d'odeurs différentes (Nei et coll., 2008). La famille des récepteurs olfactifs est considérée comme la plus évolutivement dynamique entre toutes les familles de protéines (Nei et coll., 2008). Parmi toutes les grandes familles de RCPGs, la famille rhodopsine est la cible du plus grand spectre de ligands (Venkatakrisnan et coll., 2013) La plupart des récepteurs de cette famille sont caractérisés par une courte extrémité N-terminale et la liaison du ligand à ces récepteurs est largement confinée dans les sept régions transmembranaires (Venkatakrisnan et coll., 2013).

### **1.2.2.3 Les RCPGs d'adhérence**

La famille des RCPGs d'adhérence est la deuxième plus grande de toutes les familles RCPGs avec 33 et 31 membres chez l'humain et la souris, respectivement (Fredriksson et coll., 2003 et Bjarnadottir et coll., 2006). Les membres de cette famille sont caractérisés par une longue extrémité N-terminale avec un large répertoire de domaines, y compris les domaines d'adhésion cellulaire classiques comme l'EGF (le facteur de croissance épidermique) et les domaines de cadhérine (Schioth et coll., 2010). En outre, l'extrémité N-terminale des RCPGs d'adhérence contient le domaine induisant l'autoprotéolyse (GAIN), le RCPG qui englobe le site protéolytique (GPS) hautement conservé et riche en cystéine (Promel et coll., 2013 et Arac et coll., 2012). Le site d'environ 50 acides aminés est situé immédiatement avant la première hélice TM. L'autoprotéolyse sur le site de GPS clive les récepteurs en un fragment N-terminal extracellulaire (FSN) et un fragment transmembranaire / cytoplasmique C-terminal (FCT)

(Langenhan et coll., 2013). Actuellement, il est entendu que la majorité des RCPGs d'adhérences matures existe non attachée de manière covalente, mais sous forme de complexe FSN-FCT. Le processus de clivage et le motif GPS sont essentiels pour la signalisation, le trafic et la stabilité du récepteur (Langenhan et coll., 2013). L'analyse phylogénétique basée sur les domaines TM a montré que les RCPGs d'adhérence peuvent être subdivisés en neuf familles distinctes (Bjarnadottir et coll., 2004). Notamment, chaque famille a un schéma unique de l'architecture du domaine N-terminal et ces modèles sont utilisés en tant que signature moléculaire pour distinguer les sous-familles ainsi qu'identifier leurs homologues dans les organismes éloignés (Nordstrom et coll., 2011 et Arac et coll., 2012). Contrairement à d'autres familles majeures de RCPGs qui interagissent principalement avec des petites molécules ou peptides comme ligands, les RCPGs d'adhésion interagissent avec plusieurs ligands de la matrice cellulaire (Langenhan et coll., 2013).

#### **1.2.2.4 La famille frizzled**

Les gènes Frizzled ont été identifiés chez la drosophile melanogaster. L'origine du terme "Frizzled» vient de son phénotype mutant qui affiche une perturbation dans la polarité des cellules épidermiques (Adler et coll., 2002 et Schulte et coll., 2010). La famille des récepteurs Frizzled est activée par les lipoglycoprotéines sécrétées de la famille Wingless/Int-1 (WNT), et ces récepteurs sont essentiels pour le développement embryonnaire, le tissu et la polarité cellulaire, le développement neuronal et de nombreux autres processus au cours du développement de l'organisme adulte (Huang et coll., 2004).

Au cours des années, les récepteurs Frizzled ont été identifiés dans divers organismes, y compris l'humain (Nordstrom et coll., 2011; Schulte et coll., 2007 et Schulte et coll., 2010).

Chez la plupart des mammifères, la famille Frizzled comprend dix récepteurs nommés FZD1-10 selon la nomenclature de l'International union of basic and clinical pharmacology» (IUPHAR nomenclature) (Schulte et coll., 2010). Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine comprenant sept régions transmembranaires, une région extracellulaire qui contient un domaine riche en cystéine (DRC), et un segment intracellulaire qui interagit avec les protéines de signalisation en aval (Janda et coll., 2012). Le domaine extracellulaire DRC agit comme un ligand de liaison pour la plupart des récepteurs Frizzled (Janda et coll., 2012). Les ligands connus du récepteur Frizzled sont Wnts, R-spondines, Norrins, les PRF (protéines Frizzled connexes) et CTGF (facteurs de croissance du tissu conjonctif) (Schulte et coll., 2007). L'IUPHAR classe les récepteurs de la famille Frizzled comme une famille séparée des autres RCPGs. La présence d'un segment à sept domaines transmembranaires caractéristique des RCPGs, et d'autres éléments de preuve indirects pointent vers leurs interactions avec des protéines G (Schulte et coll., 2007 et Schulte et coll., 2010). Toutefois, aucune preuve expérimentale directe pour leur couplage avec la protéine G (Schulte et coll., 2007). Plutôt, une caractéristique notable des récepteurs de la famille Frizzled est qu'ils interagissent avec plusieurs autres protéines intracellulaires pour induire leur signalisation intracellulaire.

### **1.2.2.5 La famille sécrétine**

La famille des RCPGs sécrétine est constituée des récepteurs qui servent comme des cibles moléculaires pour les hormones peptidiques, y compris l'hormone sécrétine (Lagerstrom et coll., 2008 et Poyner et coll., 2012). Ces récepteurs jouent un rôle crucial dans l'homéostasie hormonale chez l'humain et d'autres animaux et servent de cibles pour des médicaments importants pour plusieurs troubles endocriniens (Poyner et coll., 2012). Les RCPGs de la famille sécrétine sont généralement caractérisés par un domaine N-terminal extracellulaire

(DEC) contenant le récepteur de l'hormone de croissance (GRH), sept segments transmembranaires contenant les hélices membranaires et des boucles intra et extracellulaires reliant les hélices, et un domaine intracellulaire C-terminal. Le DEC joue un rôle important dans la liaison de ces hormones polypeptidiques. L'analyse de séquence montre également que les résidus situés à la région N-terminale, à proximité de l'hélice TM1 sont conservés et sont également impliqués dans les mécanismes de liaison du ligand (Siu et coll., 2006; Miller et coll., 2007 et Bortolato et coll., 2014). Certains ligands de ces récepteurs comprennent les hormones: sécrétine, peptide intestinal vasoactif (PIV), polypeptide cyclase activant la cyclase hypophysaire, glucagon, hormone libérant l'hormone de croissance (GHRH), peptides liés au glucagon 1 et 2 (BPL 1 et 2), polypeptide inhibiteur gastrique (PIG), corticolibérine (CRF), et l'hormone parathyroïdienne (Poyner et coll., 2012 and Bortolato et coll., 2014). Compte tenu du rôle important de ces ligands et leurs réponses de signalisation induites, cette famille de récepteurs sert de cibles pour des médicaments dans plusieurs maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète, la migraine, les troubles osseux (Lagerstrom et coll., 2008; Archbold et coll., 2011 et Watkins et coll., 2012). L'analyse phylogénétique basée sur les segments TM suggère que les RCPGs de la famille de la sécrétine sont étroitement liés à des GPCRs de la famille d'adhérence et sont considérés comme des RCPGs d'adhésion évolués (Nordstrom et coll., 2009).

#### **1.2.2.6 Autres types de RCPGs**

Les autres familles de gènes des RCPGs qui ne se classent pas dans les familles majeures Grafts, comprennent principalement le récepteur de l'albinisme oculaire (GPR143) (Palmisano et coll., 2008), le récepteur lié à l'épaisseur de l'intima (ITR), GPR108 (autrement connu comme le récepteur poumon à sept domaines transmembranaires) et les récepteurs

dictyostelium discoideum de l'AMP cyclique. Ces gènes de RCPGs sont des gènes à copie unique dans la plupart des organismes et ont une longue histoire d'évolution (Nordstrom et coll., 2011 et De Mendoza et coll., 2014). Les rôles fonctionnels de certains de ces gènes de RCPGs semblables ne sont pas bien compris. Cependant, GPR143 est connu pour être impliqué principalement dans la pigmentation de la rétine et il est également exprimé dans les cellules épidermiques. En outre, des mutations de GPR143 sont la cause de l'albinisme oculaire de type 1, une condition qui affecte gravement l'acuité visuelle chez les humains (Shen et coll., 2001; Palmisano et coll., 2008 et Fukuda et coll., 2015). Les récepteurs de D. discoideum de l'AMP cyclique sont bien étudiés et sont connus pour être impliqués dans le développement de D. discoideum.

### **1.2.3 Rôle des protéines G hétérotrimériques dans la signalisation cellulaire**

Les protéines G hétérotrimériques jouent un rôle essentiel en tant que commutateurs moléculaires responsables de transformer le signal induit en cascades de signalisation intracellulaire par les voies de signalisation du RCPG (Figure 1.1) (Oldham et coll., 2008). Les protéines G hétérotrimériques sont composées de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . Ces protéines existent normalement dans un état actif/inactif de  $G\alpha$ -PIB lié aux sous-unités  $G\beta\gamma$  (Oldham et coll., 2006 et Johnston et coll., 2007). L'activation d'un GPCR par stimuli (ligand) extracellulaires induit un changement de conformation des sous-unités  $G\alpha\beta\gamma$  du récepteur ce qui résulte à la communication avec le PIB et la liaison de GTP par  $G\alpha$ . La liaison de GTP à la sous-unité  $G\alpha$  induit des changements de conformation avec les trois segments souples de  $G\alpha$ , appelés les régions "switch" (I-III), et ce complexe hétérotrimérique la déstabilise conduisant à

la dissociation de G $\beta\gamma$  (Oldham et coll., 2007 et Johnston et coll., 2007). Cela permet à la fois à la G $\alpha$  GTP liée et la G $\beta\gamma$  dissociée de réguler davantage les molécules effectrices en aval et de moduler divers aspects de la physiologie cellulaire (Koelle et coll., 2006). Ce système revient à son état actif/inactif lors de l'hydrolyse intrinsèque de GTP au PIB par la sous-unité G $\alpha$  (Kleuss et al 1994), et ce processus est probablement renforcé par le régulateur de la signalisation des protéines G (RGS) qui interagit avec la sous-unité G $\alpha$  (Hollinger et coll., 2002 and De Vries et coll., 2000). Après la libération de GTP, le PIB lié à G $\alpha$  est prêt à s'associer avec les sous-unités G $\beta\gamma$  formant un complexe hétérotrimère inactif de protéines G pour lancer une nouvelle fois le cycle de la protéine G (Oldham et coll., 2008).

En ce qui concerne la structure des sous-unités protéiques G, la sous-unité G $\alpha$  est la plus grande des trois sous-unités et contient un domaine de GTPase toute alpha hélicoïdale (Sprang et coll., 1997 et Oldham et coll., 2006). Le domaine GTPase contient une poche de liaison nucléotidique. Ce domaine est également caractérisé par la présence de trois boucles souples, nommées les commutateurs I, II et III (Noel et coll., 1993 et Lambright et coll., 1994). La sous-unité G $\beta$  est caractérisée par sept répétitions de séquences et ces sept segments individuels forment un  $\beta$  : la structure de l'hélice (Wall et coll., 1995 et Sondek et coll., 1996). La plus petite sous-unité G $\gamma$  contient deux régions  $\alpha$ -hélicoïdales reliées par une boucle, et ils forment une interaction superhélice avec l'extrémité N-terminal G $\beta$  (Wall et coll., 1995 et Sondek et coll., 1996). Le G $\beta$  et G $\gamma$  forment un dimère fort G $\beta\gamma$  qui ne peut se dissocier que dans des conditions dénaturantes.

En dépit de la taille, de la diversité de la superfamille des RCPGs et de leur capacité de sentir un large éventail de signaux extracellulaires, ces récepteurs interagissent avec,

relativement, un petit nombre de protéines G pour lancer la cascade de signalisation intracellulaire (Wettschureck et coll., 2005 et Oldham et coll., 2006). Par exemple, le génome humain contient environ 800 RGPGs, mais seulement 16  $G\alpha$ , cinq  $G\beta$  et 12 gènes  $G\gamma$  (Downes et coll., 1999; Hurowitz et coll., 2000 et Wettschureck et coll., 2005). Ce répertoire limité de protéines G, cependant, forme un large éventail de complexes hétérotrimère  $G\alpha\beta\gamma$ , car plusieurs combinaisons de dimères  $G\beta\gamma$  sont capables d'interagir avec la même protéine  $G\alpha$ . Sur la base de l'homologie de séquence et le regroupement phylogénétique, il existe différentes familles de protéines G (Downes et coll., 1999; Hurowitz et coll., 2000). La sous-unité  $G\alpha$  est généralement classée en quatre catégories principales ( $G\alpha_{i/O}$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12/13}$ ), et chacune de ces classes est constituée de deux à quatre gènes (Wilkie et coll., 1992). Récemment, une cinquième classe de  $G\alpha$  a été identifiée dans les poissons et les invertébrés (Oka et coll., 2009<sup>a</sup> et Oka et coll., 2009<sup>b</sup>). Les gènes des sous-unités  $G\beta$  dans les génomes de mammifères peuvent être classés en cinq grandes familles de gènes ( $GN\beta$  1-5). Les séquences de  $GN\beta$ 1-4 sont hautement conservées, tandis que  $GN\beta$ 5 est divergente (Wilkie et coll., 1992 et Hildebrandt et coll., 1997). La sous-unité  $G\gamma$  est la plus petite des trois sous-unités d'une longueur de séquence de protéine d'environ 65 à 75 acides aminés. Chez les humains, il existe 12 gènes qui codent pour les séquences de protéines de la sous-unité  $G\gamma$  et ils varient considérablement les uns des autres, à l'exception de trois gènes qui constituent la famille de transducine ( $GNG11$ ,  $GNGT1$ , et  $GNGT2$ ) (Downes et coll., 1999; Hurowitz et coll., 2000).



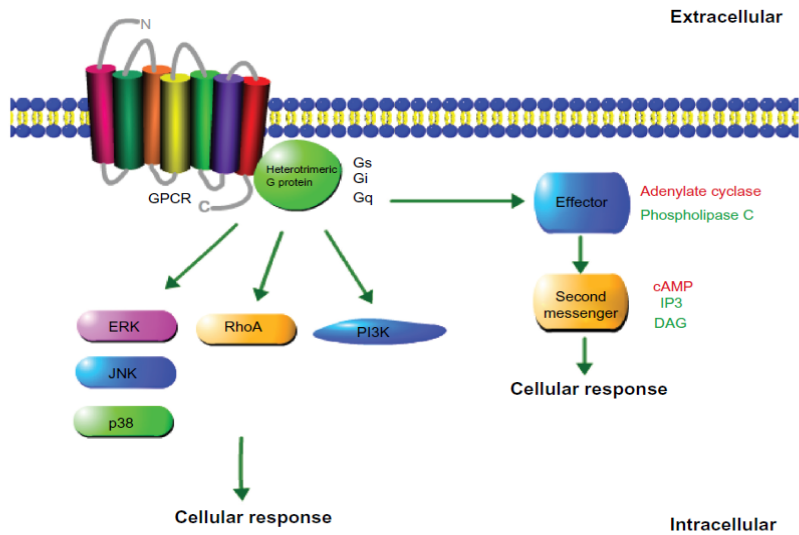


Figure 1.1 Représentation schématique des composants du RCPG

Abbreviations: GPCR, G protein-coupled receptor; cAMP, cyclic-adenosine monophosphate; DAG, diacylglycerol; IP3, Inositol trisphosphate; ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; RhoA, Ras homolog gene family, member A; p38, p38 member of the mitogen-activated protein kinase family; P13K, phosphoinositide 3-kinase. (Tirée de Leyva-Illades et coll., 2013)

Dans cette thèse, nous nous concentrons sur la distribution et le rôle dans le guidage axonal des cellules ganglionnaires de la rétine au cours du développement du système visuel, de trois récepteurs de la superfamille des protéines transmembranaires intégrale et  $\alpha$ -hélicoïdale: Les récepteurs couplés aux protéines G (GPR55, GPR91 et GPR99) comme étant des cibles pharmacologiques potentielles lors du développement et la régénération du système nerveux central.

## 1.3 GPR55, GPR91 et GPR99

### 1.3.1 GPR55

#### 1.3.1.1 Structure

Le clonage du GPR55 humain a été effectué initialement en 1999 où il a été décrit comme un RCPG d'introns classiques, localisé sur le chromosome 2q37. Le GPR55 est une protéine intégrée à la membrane cellulaire qui se compose de 319 acides aminés et qui partage avec d'autres RCPGs la caractéristique de sept domaines transmembranaires et la plupart des autres motifs connus d'acides aminés (Figure 1.2). Phylogénétiquement, GPR55 appartient au groupe des purines  $\delta$  de la famille des rhodopsines qui comprend des récepteurs pour les nucléotides adénosine et uridine, ainsi que d'autres récepteurs orphelins (Fredriksson et coll., 2003 et Oh et coll., 2006). Il affiche une homologie limitée de séquence d'acides aminés avec GPR23 (30%), P2Y5 (29%), GPR35 (27%) et CCR4 (23%), les homologies avec les récepteurs CB1 (13%) et CB2 (14%) étant beaucoup plus faibles (Sawzdargo et coll., 1999). Récemment, une étude de modélisation d'homologie sur la structure et le profil pharmacologique de GPR55 a permis de mieux comprendre la structure tridimensionnelle du récepteur ainsi que les sites de liaisons de ses ligands. Le modèle d'homologie 3D de GPR55 a été construit et analysé en se basant sur la structure cristalline du récepteur  $A_{2A}$  de l'adénosine et les interactions ligands-protéine de plusieurs composés considérés comme ligands de GPR55. À la lumière des résultats, *Elbegdorj et coll.*, ont rapporté que la plupart des ligands se lient au niveau du domaine transmembranaire supérieur commun du modèle GPR55. De plus, les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes contribuent à la reconnaissance des ligands (Elbegdorj et coll., 2013). En l'absence de toutes les données structurales concernant

GPR55, ce modèle comparatif représente une validation indirecte de la structure de GPR55 qui permet de développer des composés sélectifs capables de mieux atteindre les cibles thérapeutiques de GPR55, d'expliquer sa pharmacologie énigmatique et ses rôles physiologiques.

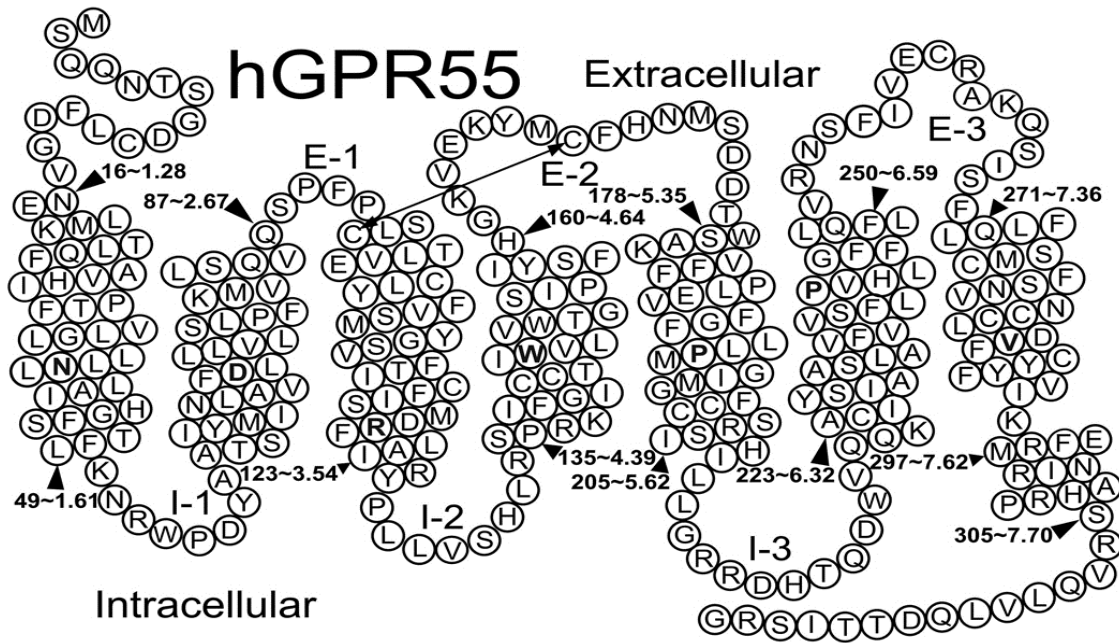


Figure 1.2 Représentation hélicoïdale du récepteur GPR55 humain.

(Tirée de haleli et coll., 2010)

### 1.3.1.2 Distribution

Le profil d'expression de GPR55 dans les tissus provient principalement des études utilisant l'analyse par transfert de Northern ou les réactions quantitatives de polymérase en chaîne pour détecter le récepteur.

Des niveaux élevés de transcrits d'ARNm GPR55 humains ont été trouvés dans les régions du cerveau impliquées dans le contrôle de la mémoire, l'apprentissage et les fonctions motrices, telles que le striatum dorsal, le noyau caudé et putamen, et dans plusieurs tissus

périphériques, y compris l'iléon, les testicules, la rate, les amygdales, la poitrine et le tissu adipeux épiploïque (Brown et coll., 2007 et Sawzdargo et coll., 1999), ainsi que dans des lignées de cellules endothéliales (Waldeck-Weiermair et coll., 2008).

L'ARNm de GPR55 a également été détecté dans d'autres régions du cerveau (cortex frontal, l'hippocampe, les noyaux thalamiques, les régions du cerveau comme le tronc cérébral et le mésencéphale) et dans les tissus périphériques chez le rat et la souris. En effet, un niveau élevé d'expression de l'ARNm de GPR55 a été trouvé dans les îlots pancréatiques, et l'expression de la protéine dans les cellules  $\beta$  sécrétant de l'insuline (Romero-Zerbo et coll., 2009) aussi, dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon des rongeurs (Brown et coll., 2007; Ryberg et coll. 2007; Schicho et coll 2011 et Lin et coll, 2011).

On le trouve aussi dans les muqueuses et des préparations longitudinales de plexus myentérique du côlon, ce qui suggère qu'il est présent dans les deux cellules épithéliales gastro-intestinales et les neurones entériques (Lin et coll., 2011). L'expression de GPR55 a été démontrée dans les ostéoblastes et les ostéoclastes humains et de souris (Whyte et coll., 2009), dans les cellules du système immunitaire (Balenga et coll., 2009). L'expression de l'ARNm et de la protéine GPR55 a été observée chez l'humain dans des lignées de cellules cancéreuses de l'ovaire (OVCAR3 et A2780) et de la prostate (PC-3 et DU145) (Piñeiro et coll., 2011). Ils ont été détectés aussi dans la lignée cellulaire de cancer du sein humain hautement métastatique MDA-MB-231 (Ford et coll., 2010). Un lien a été établi entre les niveaux de GPR55 élevés et des stades avancés de l'adénocarcinome pancréatique et d'autres glioblastomes humains (Andradas et coll., 2011). De même, des études récentes ont montré que GPR55 est régulé positivement dans les tumeurs de la peau humaine et d'autres carcinomes spino-cellulaires (Pérez-Gómez et coll., 2013). L'expression de GPR55 a également été signalée dans les lignes

cellulaires lymphoblastoïdes, les astrocytomes humain, les mélanomes et le lymphoblastome B (Oka et coll., 2010 et Andradas et coll., 2011), dans les neurones primaires sensoriels en culture de souris ainsi que dans la rétine du singe vervet (Lauckner et coll., 2008 et Bouskila et coll., 2013).

### **1.3.1.3 Pharmacologie et voies de signalisations**

Après son clonage, la liaison de certains cannabinoïdes radiomarqués, y compris CP 55940, SR141617 et AM251, mais pas WIN55212-2, à des membranes de cellules HEK-293 surexprimant GPR55 (Wise et coll., 2001; Drmota et coll., 2004; Henstridge et coll., 2009; Kapur et coll., 2009), a conduit à spéculer que GPR55 pourrait être le troisième récepteur cannabinoïde (CBR3). Par la suite, plusieurs études ont concentré leurs intérêts à mieux définir le lien entre GPR55 et ses ligands afin de caractériser la signalisation de GPR55. Les molécules ciblant GPR55 peuvent être regroupées en deux catégories principales: les ligands actifs sur les récepteurs CBR1 et CBR2 (naturels (endogènes / dérivés de plante) et synthétiques) et les ligands inactifs sur les deux récepteurs cannabinoïdes. Ce dernier groupe comprend lui aussi les deux sous-groupes de ligands naturels et synthétiques (Gasperi et coll., 2013).

Le premier groupe comprend: les endocannabinoïdes (AEA, 2-AG, virodhamine, l'éther noladin) et leurs congénères (PEA et OEA), identifiés comme agonistes de GPR55 (Lauckner et coll., 2008; Drmota et coll., 2004; Ryberg et coll. 2007; Waldeck-Weiermair et coll., 2007); les phytocannabinoïdes, comme  $\Delta^9$ -THC, capable d'activer GPR55 (Lauckner et coll., 2008 et Ryberg et coll. 2007); les agonistes synthétiques de CB1 et CB2, y compris CP 55940, qui active ou inhibe l'activité de GPR55 (Wise et coll., 2001; Drmota et coll., 2004 et

Ryberg et coll. 2007) les antagonistes / les agonistes inverses synthétiques de CB1, comme SR141716 (un agoniste de GPR55 / antagoniste de CB1), et AM251 (un agoniste du GPR55) (Ryberg et coll. 2007; Lauckner et coll., 2008; Kapur et coll., 2009 et Yin et coll. 2009); les agonistes synthétiques de CB2 (JHW015, un agoniste de GPR55) (Drmota et coll., 2004 et Lauckner et coll., 2008).

Le deuxième groupe comprend: le phytocannabinoïde non psychoactif CBD, un antagoniste de GPR55 (Drmota et coll., 2004; Kapur et coll., 2009; Ryberg et coll. 2007 et Lauckner et coll., 2008); les analogues synthétiques du CBD, tels que ABN-CBD et O-1602 (deux agonistes de GPR55) (Drmota et coll., 2004; Ryberg et coll. 2007; Ohns et coll. 2007 et Lauckner et coll., 2008); le lysophosphatidylinositol (LPI), un lysophospholipide acide dérivé du phosphatidylinositol, qui active efficacement GPR55 et dont le LPI contenant le 2-arachidonoyl représente un ligand naturel de ce récepteur (Oka et coll. 2007 et 2009).

Malgré la pharmacologie controversée de GPR55, autant de ligands, de types cellulaires et des résultats incompatibles (Ross et coll., 2009), plusieurs approches ont été utilisées afin d'étudier la signalisation dépendante de GPR55. Par exemple, les ligands mentionnés ci-dessus ont été testés pour leur capacité à activer des protéines G monomères hétérotrimériques, à moduler la libération du calcium et à induire la phosphorylation de kinases spécifiques (Gasperi et coll., 2013). Les résultats ont montré une pharmacologie complexe de GPR55 étant donné que les voies de signalisation activées par GPR55 pourraient varier de manière dépendante de l'hôte et du ligand (Ross et coll. 2009).

Le couplage de GPR55 aux protéines G a été confirmé par l'utilisation d'AbnCBD et son analogue structurel, O-1602 tous deux capables de stimuler la liaison [<sup>35</sup>S] GTPγS avec un

EC<sub>50</sub> de 2,5 nM et 13 μM, respectivement. L'implication des protéines G dans l'activité de GPR55 a également été rapportée par Oka et ses collègues (Oka et coll. 2007), qui ont montré que le LPI de façon dose-dépendante stimule la liaison de [<sup>35</sup>S] GTPγS aux membranes cellulaires exprimant GPR55. L'utilisation de peptides spécifiques de blocage Gαs et Gαi, ainsi que des inhibiteurs de chaque sous-type de protéines G a permis de démontrer l'association de GPR55 à Gα<sub>12/13</sub> et Gαq (Ryberg et coll. 2007).

D'autres résultats font un lien entre le GPR55 et les endocannabinoïdes. Par exemple, l'activation de GPR55 par l'AEA augmente le niveau de phosphorylation ERK dans les cellules endothéliales (Waldeck-Weiermair et coll., 2008). La signalisation en aval du GPR55 reste à être totalement élucidée; cependant, il est connu que GPR55 utilise Gα13 pour la transduction du signal et active PLC, RhoA, ROCK, la protéine kinase ERK, p38 mitogen activé, et libère du Ca<sup>2+</sup> ce qui peut induire des facteurs de transcription en aval tels que NFAT, NF-kB, CREB, et ATF2 (Lauckner et coll. 2008; Kapur et coll. 2009; Henstridge et coll. 2009; Oka et coll. 2010 et Henstridge et coll. 2010).

Gαq ou Gα<sub>12</sub> activent les petites GTPases, y compris RhoA, Rac1 et Cdc42. De manière cohérente l'AEA, LPI et O-1602, à des EC<sub>50</sub> respectives de 3, 13 et 75 nM, ont été en mesure d'activer ces petites protéines G dans plusieurs lignées cellulaires, y compris de manière transitoire dans des cellules HEK 293 transfectées par GPR55, des neurones ganglionnaires de la racine dorsale, des ostéoclastes, des cellules du cancer de la prostate et du cancer de l'ovaire (Ryberg et coll. 2007; Lauckner et coll. 2008; Whyte et coll., 2009 et Piñeiro et coll., 2011). Bien que les voies de signalisation de RhoA et du Ca<sup>2+</sup> soient classiquement distinctes, Henstridge et ses collaborateurs (Henstridge et coll. 2009) ont

démontré que GPR55 déclenche la mobilisation de  $Ca^{2+}$  des réserves intracellulaires par une  $G\alpha_{13}$  dépendante de l'activation de RhoA, qui à son tour augmente l'activation du facteur de transcription NFAT (Gasperi et coll., 2013).

Parmi les effecteurs en aval de GPR55, on retrouve également les kinases spécifiques, telles que ERK, PKB / Akt et p38 MAPK. Par exemple, LPI et O-1602 activent ERK dans les ostéoclastes et les cellules surexprimant GPR55 (Oka et coll. 2007 et Whyte et coll., 2009), et augmentent les niveaux de phospho-ERK dans les cellules PC12 traitées à l'aide du LPI (Obara et coll. 2011). De même, sur des cellules de cancer ovarien et de la prostate, le traitement avec le LPI augmente à la fois la phosphorylation d'AKT et d'ERK (Piñeiro et coll., 2011). Enfin, il a été rapporté qu'AEA et O-1602 augmentent l'activité de JNK dans la lignée cellulaire Mz-chA-1 du cholangiocarcinome humain, à travers un mécanisme dépendant du GPR55 (Huang et coll., 2011).

#### **1.3.1.4 Rôles physiologiques**

##### *Le système nerveux central (SNC)*

Rares sont les études sur les effets de GPR55 sur le comportement et la physiologie neuronale. Dans le cerveau humain, l'ARNm de GPR55 a été trouvé dans le noyau caudé et le putamen. L'abondance de GPR55 dans les noyaux gris centraux suggère un possible rôle dans le contrôle du mouvement. L'expression de GPR55 dans les tissus de souris a révélé l'ordre d'expression suivant: cortex frontal > striatum > hypothalamus > tronc cérébral > cervelet = hippocampe > moelle épinière. En utilisant l'immunohistochimie Lauckner et coll., ont démontré la présence de GPR55 dans les neurones de la racine dorsale du ganglion (DRG) ce qui possiblement les impliquerait dans la proprioception (Lauckner et coll., 2008). Cependant,



ces neurones peuvent aussi être recrutés pour des fonctions nociceptives dans certains états douloureux chroniques (Neumann et coll., 1996 et Ruscheweyh et coll. 2007). Donc leur réelle fonction au niveau des DRGs reste à être confirmée.

De nouvelles preuves soutiennent un rôle de GPR55 dans l'amélioration de l'excitabilité neuronale (Lauckner et coll., 2008; Jensen et al 2011 et Sylantyev et coll., 2011). Comparé à la souris *gpr55* KO où l'effet est absent, une variété d'agonistes, y compris LPI stimulent GPR55, provoquant une libération lente de calcium des réserves intracellulaires. L'augmentation transitoire de la probabilité de libération au niveau des synapses individuelles CA3-CA1 suite à l'activation de GPR55 dévoile le rôle de GPR55 dans la signalisation des circuits synaptiques du cerveau (Sylantyev et coll., 2013).

Enfin, Wu et al ont effectué une caractérisation détaillée des souris *gpr55* knock-out en utilisant différents tests moléculaires, anatomiques, électrophysiologiques et comportementaux. Selon les résultats obtenus, ils suggèrent que GPR55 joue un rôle important dans la coordination motrice. Les souris *gpr55* knockout ont montré de la faiblesse dans la coordination des tâches nécessitant des réponses motrices plus difficiles (Wu et coll., 2013). Malgré ces avancées sur le rôle de GPR55, d'autres études sont nécessaires pour évaluer pleinement son importance dans le système nerveux central.

### Le système vasculaire

Le rôle de GPR55 dans le système vasculaire a été déterminé par des évidences indirectes de sa présence ou de l'effet de ses ligands. Les cellules endothéliales peuvent réguler l'action proangiogénique médiée par GPR55 à travers la libération autocrine de LPI suite à l'hydrolyse intracellulaire des lipides par la phospholipase A2 (PLA2). L'inactivation

génétique de GPR55 dans les cellules endothéliales microvasculaires primaires de l'épiderme humain induit une décroissance de l'angiogenèse, ce qui suggère la présence d'agonistes endogènes de GPR55 (Zhang et coll., 2010). L'anandamide peut être libérée par les cellules endothéliales vasculaires : dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, elle augmente la libération de  $Ca^{2+}$  (Waldeck-Weiermair et coll., 2008). Des études sur le système cardiovasculaire par les chercheurs d'Astra Zeneca ont montré une hypertension significative chez l'animal *gpr55* KO. De plus, O-1602 exerce un effet hypotensif en fonction de la dose administrée aux rats. Cet effet est bloqué en présence du CBD, un antagoniste de GPR55 (Greasley et coll., 2008). Cependant selon des chercheurs de GlaxoSmithKline, la souris ayant le gène codant pour GPR55 muté présente une pression sanguine et une fréquence cardiaque similaires à celles de la souris de souche sauvage. De plus, l'effet de bradycardie induit par Abn-CBD est similaire chez les deux souches (Jhons et coll., 2007).

### L'inflammation

Des expériences réalisées chez des souris déficientes en GPR55 ont montré qu'il joue également un rôle dans la douleur neuropathique. Ces souris KO étaient très résistantes à l'hyperalgésie mécanique provoquée par 1) l'adjuvant complet de Freund qui induit l'inflammation ou 2) par la ligature partielle du nerf. Le profilage aux cytokines des souris KO a montré des différences par rapport aux souris de souche sauvage, ce qui peut expliquer le manque d'hyperalgésie mécanique inflammatoire (Staton et coll., 2008). GPR55 est exprimé dans les cellules du système immunitaire. Des études récentes suggèrent que GPR55 régule la fonction CB2 dans les neutrophiles humains. La coactivation du GPR55 par le LPI et CB2 par le 2-AG a conduit à une migration accrue des neutrophiles et une polarisation de leur morphologie, alors que 2-AG seul seulement montre une élongation des neutrophiles

(Kurihara et coll., 2006 et Balenga et coll., 2011). Un effet protecteur de l'agoniste de GPR55 dans l'inflammation intestinale a également été suggéré dans un modèle de colite induite par le sulfate de sodium (Schicho et coll., 2011). Dans un modèle murin de pancréatite aiguë (AP), l'administration d'O-1602, un agoniste de GPR55, a amélioré les changements pathologiques de la souris avec AP et a diminué les niveaux de l'interleukine 6 et des niveaux alpha de la nécrose tumorale, ce qui suggère l'effet anti-inflammatoire d'O-1602 (Li et coll., 2013).

### La formation des os

Les ostéoblastes et les ostéoclastes humains et murins expriment GPR55. L'expression de GPR55 est plus élevée dans les ostéoclastes humains que dans les progénitures de macrophages. O-1602 et LPI inhibent la formation des ostéoclastes de la souris, stimulent leur polarisation et augmente la réabsorption du calcium. Ces effets ne sont pas observés dans les macrophages isolés de souris *gpr55* KO. Malgré que la formation osseuse ne soit pas affectée, les souris *gpr55* KO ont une masse osseuse augmentée (Whyte et coll., 2009). Ces observations suggèrent que GPR55 peut jouer un rôle dans la physiologie osseuse par la régulation du nombre et de la fonction des ostéoclastes.

### Le pancréas

L'ARNm de GPR55 est exprimé dans les îlots pancréatiques à des niveaux très élevés. La présence de la protéine a été démontrée seulement dans les cellules  $\beta$  sécrétant l'insuline. L'activation de GPR55 avec O-1602, un agoniste, a entraîné l'augmentation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. Le taux d'insuline est réduit chez les souris *gpr55* KO. En outre, des expériences *in vivo* ont montré que l'activation du GPR55

augmente les niveaux de tolérance au glucose et à l'insuline plasmatique (Romero-Zerbo et coll., 2011). Ces données suggèrent un possible rôle de GPR55 dans l'homéostasie du glucose.

### Le système gastro-intestinal

GPR55 a été détectée par immunohistochimie dans les neurones entériques de l'iléon du rat en plus des diverses structures de l'intestin énumérées ci-dessus (distribution du récepteur). L'expression de GPR55 était plus élevée chez les rats traités avec un lipopolysaccharide. Ceci indique à la fois un rôle potentiel dans la réponse de l'intestin à l'inflammation et la capacité d'O-1602 à réduire les contractions spontanées de l'iléon de rat, mais pas celles du colon ou du jéjunum (Schicho et coll., 2011).

### Le cancer humain

Les cellules néoplasiques sont souvent détournées de leur fonction physiologique normale pour survivre, proliférer, échapper au système immunitaire, induire l'angiogenèse et ainsi promouvoir l'invasion cellulaire et les métastases. L'expression aberrante et la mutation de nombreux GPCRs ont été liées à divers cancers (Dorsam et coll., 2007). LPI, un ligand endogène de GPR55, est maintenant reconnu comme sécrété par les fibroblastes, les cellules cancéreuses épithéliales et des cellules transformées de la thyroïde, ce qui conduit à des effets mitogènes (Falasca et coll., 1994 et 1998). En effet, les patientes atteintes du cancer de l'ovaire ont des niveaux plasmatiques augmentés de LPI par rapport aux témoins sains (Xiao et coll., 2000). Sachant que le LPI est un puissant agoniste du GPR55, de nombreuses études ont évalué le rôle de GPR55 dans le cancer. Le GPR55 est également impliqué dans le cholangiocarcinome qui résulte de la transformation néoplasique des cellules épithéliales qui tapissent les voies biliaires.

Avec l'identification de GPR55 en tant que récepteur à l'AEA, il est devenu possible d'expliquer les effets apoptotiques de l'AEA (Petitet et coll., 2006). L'AEA a un effet suppresseur sur la croissance des cholangiocarcinomes à la fois *in vitro* et *in vivo*. La diminution de l'expression de GPR55 empêcherait l'action anti-proliférative de l'AEA. Les effets suppresseurs de la croissance en réponse à l'activation de GPR55 par AEA nécessitent Gα12, l'activation de la kinase Jun N-terminal et la translocation subséquente de Fas dans les structures de la bicouche lipidique. Ainsi, GPR55 offre une cible potentielle pour la conception d'agents chimiothérapeutiques.

Dans le cancer du sein, le traitement des cellules MDA-MB-231 à l'aide de LPI augmente considérablement la chimiotaxie cellulaire, et la transfection avec un petit ARN interférant GPR55 (siRNA) bloque cette amélioration (Ford et coll., 2010). Les niveaux les plus élevés du récepteur GPR55 corrélaient avec les tumeurs mammaires humaines avec le pire pronostic. De plus, il y a une association entre les niveaux accrus de GPR55 et les index de prolifération élevés, mais pas avec la taille des tumeurs ou métastases (Andradas et coll., 2011). Une diminution de l'expression de GPR55 dans les cellules EVSA-T du cancer du sein diminue la viabilité cellulaire et la phosphorylation d'ERK. À l'opposé, la surexpression de GPR55 augmente la viabilité cellulaire et la phosphorylation d'ERK. Les effets prolifératifs médiés par GPR55 sont considérés comme un résultat de l'activation des ERK et de l'expression en aval de c-Fos.

Le traitement par LPI des cellules cancéreuses de l'ovaire (OVCAR3 et A2780) ou de la prostate (PC-3 et DU145) a induit une augmentation transitoire du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et de la phosphorylation d'ERK et de la protéine kinase B (Akt). L'inhibition de l'expression de GPR55 par un siRNA spécifique inverse ces effets, ce qui suggère que les effets de LPI dans

les cellules cancéreuses de l'ovaire et de la prostate sont médiés par GPR55. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de ROCK a déterminé que la signalisation ROCK est impliquée en aval du GPR55 et en amont d'ERK. La régulation à la baisse de GPR55 inhibe également la prolifération cellulaire indépendante du LPI exogène, ce qui suggère que ces cellules cancéreuses libèrent LPI et favorisent leur prolifération dans une boucle autocrine par l'intermédiaire GPR55 (Piñeiro et coll., 2011).

L'expression accrue de GPR55 a été signalée lors de glioblastomes humains. Dans un modèle de xéno greffe de glioblastomes, la désactivation de GPR55 diminue le nombre de cellules prolifératrices dans la tumeur et ralentit sa croissance (Andradas et coll., 2011). La présence de GPR55 a également été signalée dans d'autres types de cancers comme l'adénocarcinome canalaire du pancréas chez l'humain (Andradas et coll., 2011), les tumeurs de la peau humaine, les carcinomes spinocellulaires dans les lignées de cellules lymphoblastoïdes (Pérez-Gómez et coll., 2013), des astrocytomes humains, des mélanomes et des lymphoblastomes B. (Oka et coll., 2010 et Andradas et coll., 2011).

## 1.3.2 GPR91

### 1.3.2.1 Structure

Le récepteur à la protéine G-91 (GPR91) de la famille des RCPG fonctionne comme un récepteur pour le succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs. Le récepteur GPR91 chez l'humain porte le symbole génétique *gpr91*, il est localisé sur le chromosome 3q24-3q25.1. Pour la souris et le rat, le récepteur est identifié génétiquement *GPR91* et se localise sur les chromosomes 3 D et 2q31 respectivement. Selon les bases de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information), le GPR91 humain (Acc. No. EAW78789) code pour une protéine de 334 acides aminés avec un résidu méthionine en position 5 dans cette séquence. L'analyse de Kozak sur cette séquence a converti la seconde méthionine en un site de début réel, ce qui a entraîné un récepteur de 330 acides aminés (Wittenberger et coll., 2001). Le degré d'homologie est élevé entre les séquences GPR91 de l'humain, du rat (Acc. No. NP\_001001518) et de la souris (Acc. N ° NP\_115776). La seule exception est l'extrémité C-terminale qui est plus courte de 12 acides aminés chez les rongeurs. Il n'y a pas d'études détaillées sur les effets de cette différence sur la signalisation de GPR91, mais il semble qu'elle cause une légère diminution de la puissance du récepteur des rongeurs comparé au GPR91 humain (He et coll., 2004). À l'heure actuelle, il est clair que GPR91 est un récepteur de la membrane plasmique (He et coll., 2004; Robben et coll., 2009), où il agit comme un capteur pour le succinate extracellulaire. Comme tous les GPCRs, le GPR91 a une extrémité N-terminale extracellulaire qui contient une séquence consensus pour la N-glycosylation liée à Asn4. Une deuxième séquence consensus pour la N-glycosylation est contenue dans la boucle extracellulaire 2 à la position 164.

GPR91 est soumis au complexe de N-glycosylation (Robben et coll., 2009), mais le rôle précis de cette modification post-traductionnelle reste à être déterminé. Afin d'éviter la signalisation prolongée, la plupart des RCPG sont soumis à une désensibilisation puis une séquestration suivie par le recyclage ou la dégradation (Kohout et Lefkowitz, 2003). En effet, dans les cellules HEK293, GPR91 peut être internalisé dans endosomes / lysosomes lors d'une stimulation avec le succinate (He et coll., 2004). En revanche, dans les cellules rénales polarisées du rein canin Madin-Darby (MDCK), le succinate induit la désensibilisation temporelle du récepteur, mais l'internalisation du récepteur n'est pas importante. Dans cette optique, le lavage du succinate resensibilise rapidement le récepteur (Robben et coll., 2009).

### **1.3.2.2 Distribution**

Chez l'humain, le *gpr91* a été détecté dans les reins par Northern Blot (Wittenberger et coll., 2001). Utilisant deux techniques différentes, la RT-PCR et le Western blot, *Macaulay et coll* ont démontré la présence de *gpr91* dans les mégacaryocytes humains, les plaquettes, les monocytes, les cellules T, les cellules B et les monocytes et son absence dans les granulocytes. (Macaulay et coll., 2007). Ces résultats ont été reproduits par Rubic et coll dans les CD humaines immatures dérivées de monocytes (MoDCs), les macrophages, les lymphocytes T, les cellules B exprimant *gpr91* (Rubic et coll., 2008). Il a été détecté aussi dans les cellules CD34+ souches hématopoïétiques, les mégacaryocytes, les cultures progénitrices érythroïdes, les cultures de cellules stromales dérivées de la moelle osseuse humaine par RT-PCR et par immunotransfert (Hakak et coll., 2009), les cellules de la membrane apicale de la macula densa par immunohistochimie (Vargas et coll., 2009) et les plaquettes humaines par RT-PCR, western blot et immunofluorescence (Aguiar et coll., 2010). Cependant, aucune des transcriptions de *gpr91* n'a été détectée dans le cerveau lorsqu'il est étudié par analyse par



transfert de Northern (Cantagrel et coll., 2004). GPR91 est fonctionnellement exprimé par les cellules dendritiques immatures après différenciation des monocytes et il est régulé à la baisse après la maturation des cellules dendritiques (Rubic et coll., 2008). *Gpr91* est surexprimé dans les cellules progénitrices hématopoïétiques précoces et à un stade avancé (Hakak et coll., 2009).

Chez la souris, *gpr91* a été détecté dans les reins par Northern Blot (Wittenberger et coll., 2001) et dans la région corticale du rein, y compris les tubules proximaux, les tubules distaux et l'appareil juxtaglomérulaire par hybridation *in situ* (He et coll., 2004). Aussi, des analyses par RT-PCR révèlent la présence de *gpr91* dans les adipocytes isolés, le tissu adipeux blanc, le foie, la rate, la vésicule biliaire, la veine cave, la peau, la rate, la thyroïde, les cellules endothéliales vasculaires dans l'artériole afférente et le glomérule (He et coll., 2004; Regard et coll., 2008 et Hakak et coll., 2009). Par contre, aucune transcription de ce récepteur n'a été détectée dans les cellules musculaires lisses et la cellule juxtaglomérulaire (Toma et coll., 2008). Enfin par hybridation *in situ* et immunohistochimie, *gpr91* a été détecté dans la membrane apicale de l'épithélium pigmentaire rétinien, dans les corps cellulaires de la couche de cellules ganglionnaires de la rétine et dans les cellules de la couche nucléaire interne de la rétine externe (Gnana-Prakasam et coll., 2011).

Les transcriptions de *Sunr1* n'ont pas été détectés dans les hépatocytes, les cellules de Küppfer, les cholangiocytes, les cellules endothéliales sinusoidales et les fibroblastes chez le rat par immunofluorescence et RT-PCR (Correa et coll., 2007). Aucune expression de *gpr91* n'a été détectée dans les cellules juxtaglomérulaires du rat par immunohistochimie (Toma et coll., 2008 et Vargas et coll., 2009). Récemment, une étude a révélé que le *sunr1* est exprimé dans les cardiomyocytes ventriculaires du rat et à la suite du traitement au succinate, les taux

de  $\text{Ca}^{2+}$  transitoires et l'apoptose sont augmentés, ce qui pourrait les impliquer dans l'hypertrophie cardiaque (Aguiar et coll., 2010).

### 1.3.2.3 Pharmacologie et voies de signalisation

L'expression dans un grand nombre de tissus et dans une multitude de types cellulaires de *gpr91* suggère un mécanisme de signalisation hautement spécifique en aval de l'activation de GPR91. En effet, dans des lignées de cellules rénales, comme HEK293 et MDCK, les voies de signalisation de GPR91 impliquent Gq et Gi. Qui à leur tour, induisent la mobilisation du calcium intracellulaire, l'augmentation de l'accumulation de l'inositol phosphate, l'activation de ERK1/2 et l'inhibition de l'accumulation d'AMPc d'une manière dépendante de la dose (He et coll., 2004). Une signalisation en aval similaire a été identifiée dans les adipocytes exprimant *gpr91*. Le succinate inhibe la lipolyse par un mécanisme dépendant de la toxine *pertussique*. Ceci implique une protéine Gi/o dans la signalisation GPR91 (Regard et coll., 2008). De même, dans des cellules progénitrices hématopoïétiques, le GPR91 activé agit via la protéine Gi/o pour induire la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de l'ERK1/2 (Hakak et coll., 2009).

Bien que l'identité des protéines G associées reste à élucider dans les cellules DCs, GPR91 agit en synergie avec les récepteurs Toll via l'activation d'ERK1/2 (Rubic et coll., 2008). Dans les myocytes cardiaques, la stimulation de GPR91 par le succinate entraîne une augmentation de l'activité PKA qui déclenche le passage du calcium intracellulaire. De plus, l'activation du GPR91 affecte la hauteur de pic maximal et la fréquence des passages calciques. L'apoptose induite par le succinate observé dans les myocytes cardiaques est probablement orchestrée par cette combinaison de l'activation de la PKA et de l'augmentation

des niveaux de calcium intracellulaire (Aguiar et coll., 2010). L'activation de la voie de PKA suggère une signalisation par la voie Gs/AMPC de GPR91. En effet, cette voie est également impliquée dans l'activation des plaquettes médiée par GPR91 (Hogberg et coll., 2011). Contrairement aux adipocytes ou aux cellules rénales, l'administration de succinate dans les cellules étoilées du foie n'a pas réussi à induire une réponse du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, ni à diminuer les taux d'AMPC basaux ou induits par la forskoline ou d'augmenter les taux d'AMPC par lui-même (Correa et coll., 2007).

En plus des voies intracellulaires, le GPR91 est un initiateur important de la transactivation des signaux en induisant la libération de facteurs extracellulaires ou d'hormones. L'activation du GPR91 augmente la libération intracellulaire de l'acide arachidonique via la cyclooxygénase (COX)-2. Ceci conduit à la production et la libération de la prostaglandine E2 (Robben et coll., 2009) qui par conséquent va transactiver les récepteurs sur les cellules granulaires EP2 et/ou EP4 (Toma et al, 2008 et Vargas et al, 2009).

Dans l'œil, l'activation GPR91 libère le VEGF et d'autres facteurs angiogéniques (Sapieha et coll., 2008). Pendant une longue période, la production de VEGF a été liée à l'augmentation des niveaux intracellulaires de succinate qui conduisent à la stabilisation du facteur d'induction de l'hypoxie (HIF1 $\alpha$ ) (Taylor, 2008). Fait intéressant, le succinate extracellulaire via son récepteur déclenche l'expression et la libération accrue de VEGF dans des conditions hypoxiques indépendamment de HIF1 $\alpha$  (Sapieha et coll., 2008). Ceci présente une nouvelle analyse critique du rôle des HIF1 $\alpha$  dans les réponses adaptatives des tissus dans des conditions hypoxiques cellulaires ou tissulaires avec possibilité de la régulation de ses actions, en partie, par le GPR91.

### 1.3.2.4 Rôles physiologiques

Le récepteur GPR91 est un détecteur des perturbations dans l'équilibre énergétique du corps. Lorsque le corps est dans un état d'hypoglycémie, des hormones telles que le glucagon déclenchent la dégradation des triglycérides en acides gras libres pour la production d'énergie par les adipocytes du tissu adipeux blanc. Dans les adipocytes GPR91-positifs, le succinate inhibe la lipolyse (Regard et coll., 2008) et peut donc empêcher la libération des acides gras à partir des adipocytes. Puisque des niveaux élevés de succinate se trouvent dans des modèles de rongeurs pour le diabète sucré et le syndrome métabolique (Sadagopan et coll., 2007; Toma et coll., 2008), les niveaux de succinate élevés peuvent empêcher la lipolyse dans des états où les molécules énergétiques telles que le glucose et les acides gras libres sont en abondance.

Le foie est essentiel pour réguler le métabolisme du corps en stockant des molécules sources d'énergie telles que le glycogène, pour convertir ou faire la synthèse des acides aminés et des lipides et dégrader des composés toxiques. Dans le foie, le GPR91 est exclusivement exprimé dans les cellules hépatiques étoilées (HSC). L'application de l'ischémie dans un modèle de foie perfusé a augmenté les niveaux de succinate dans le perfusé de l'ordre de 14 fois à environ 1 mM (Correa et coll., 2007). Par ailleurs, les cellules HSC traitées avec du succinate ont montré des niveaux accrus des marqueurs myofibroblastiques comparés aux cellules témoins activés, indiquant que le succinate renforce l'activation des cellules HSC de manière indépendante. Cependant, lors de l'activation des HSCs, l'expression du GPR91 diminue rapidement (Correa et al, 2007 et De Minicis et coll, 2007), ce qui suggère que le GPR91 sert de détecteur précoce de stress ou des lésions hépatiques. Selon l'ensemble de ces résultats la signalisation associée au GPR91 joue un rôle dans l'amélioration de l'activation des

cellules HSC pour restaurer les tissus endommagés dans le foie ischémique, mais peut également contribuer ainsi à la formation d'une fibrose.

Dans les cardiomyocytes, l'administration de succinate peut affecter la contraction des cellules. Fait important, l'incubation prolongée de cardiomyocytes à forte concentration (10 mM) induit de l'apoptose (Aguilar et coll., 2010). Ainsi, le GPR91 peut réguler l'apoptose dans le cœur dans les états d'ischémie et d'hypoxie.

Il est maintenant évident que le GPR91 est également exprimé dans les cellules précurseurs hématopoïétiques et de multiples types de cellules sanguines et immunitaires (Macaulay et coll, 2007 et Hakak et coll, 2009). Lorsqu'il est administré à des plaquettes, le succinate potentialise leur activation et leur agrégation de manière dose-dépendante augmentant les taux d'agrégation par rapport aux témoins sans succinate (Macaulay et coll, 2007 et Hogberg et coll., 2011). Cela suggère un rôle pour le succinate dans l'athéromatose, dans lequel les niveaux de succinate peuvent être augmentés secondairement à une hypoxie locale. Dans les cellules progénitrices hématopoïétiques, l'activation du GPR91 induit la prolifération des cellules et protège les cellules érythroleucémiques de l'apoptose. Ce qui explique l'augmentation des niveaux d'hémoglobine, de plaquettes et de neutrophiles lors de l'administration du succinate dans un modèle de souris de myélosuppression induite par la chimiothérapie (Hakak et coll., 2009). L'administration de succinate peut être potentiellement bénéfique pour les patients qui se remettent d'une chimiothérapie.

Rubic et coll. (2008) ont détecté l'ARNm du GPR91 dans des cellules dendritiques immatures (DC), mais pas dans les monocytes, les lymphocytes B ou en T, ce qui suggère que

l'expression de *gpr91* est induite au cours du développement des monocytes en DC immatures. Dans les DC immatures, le succinate stimule la migration des cellules d'une manière dépendante de la concentration, donc d'une façon chimiotaxique. Des souris provoquées avec la toxine tétanique accumulent des niveaux plus élevés de DC matures dans leurs ganglions lymphatiques par rapport aux souris *gpr91<sup>-/-</sup>*. Des greffes de *gpr91<sup>-/-</sup>* montrent une amélioration des résultats de transplantation de la peau (Rubic et coll., 2008).

Dans la rétine, GPR91 est principalement exprimé dans les corps cellulaires de la couche des cellules ganglionnaires (CGRs) (Sapieha et coll., 2008). Pour étudier le rôle de GPR91 dans la rétine en développement, un siRNA du *gpr91* a été injecté dans l'œil de rats nouveau-nés, ce qui a diminué la vascularisation de la rétine au jour 4 après l'injection par rapport aux témoins. Dans cette optique, l'injection du succinate a entraîné une augmentation du nombre de vaisseaux dans la rétine, ce qui démontre clairement un rôle prolifératif de GPR91 dans la vascularisation rétinienne. GPR91 régule la croissance des vaisseaux par la production et la libération d'hormones proangiogéniques. Ensemble, ces données ont révélé que l'expression du GPR91 par les CGRs est essentielle pour une bonne vascularisation de l'œil. À cet égard, il a été suggéré que l'élévation des niveaux de succinate peut provoquer une augmentation de la néovascularisation dans le diabète sucré ou lors d'ischémie rétinienne, conduisant à la rétinopathie (Rubic et coll., 2008). Le cas échéant, des inhibiteurs du GPR91 pourraient fournir un traitement potentiel. GPR91 est exprimé dans la membrane apicale de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE). Sachant que le RPE exprime VEGF et l'excès des niveaux de fer favorisent l'angiogenèse, le rôle de GPR91 dans l'angiogenèse dépendante du fer a été évaluée dans des souris *hfe<sup>-/-</sup>*, un modèle d'hémochromatose héréditaire qui entraîne une augmentation de l'absorption du fer et son accumulation (Gnana-Prakasam et coll, 2011).

En effet, l'expression de GPR91 dans toute la rétine et dans le RPE de souris *hfe<sup>-/-</sup>* est plus élevée par rapport aux animaux de souche sauvage. Ceci a également été observé dans une lignée cellulaire humaine ARPE19 de l'EPR qui imite la carence en Hfe.

Dans le rein, les travaux récents du groupe Peti-Peterdi ont démontré la libération de rénine de l'appareil JGA via le GPR91 situé dans la membrane luminale vasculaire (Toma et coll., 2008) et dans la membrane apicale des cellules de la Macula Densa (Robben et coll., 2009 et Vargas et coll, 2009). Selon des études de micro perfusion combinée à l'imagerie en direct de glomérules isolés, la perfusion avec un tampon induit la libération de rénine contenant du succinate des cellules granulaires de l'appareil JGA et induit, aussi, une vasodilatation rapide de l'artériole afférente. Ces résultats suggèrent un rôle central de GPR91 dans le développement de l'hyperfiltration glomérulaire et l'activation du système rénine-angiotensine rénal.

De manière analogue à l'induction d'hypertension à la suite d'une administration de succinate à des souris (He et coll., 2004), les taux plasmatiques de succinate sont élevés dans plusieurs modèles de rongeurs avec hypertension et maladies métaboliques. Toutefois, dans le sérum des patients hypertendus ou diabétiques, les niveaux de succinate étaient semblables à ceux des témoins en bonne santé appariés pour l'âge (Sadagopan et coll., 2007). La cause de cette différence entre les modèles de rongeurs et les patients reste à établir. Les mesures ci-dessus indiquent que le succinate via le GPR91 peut jouer un rôle dans le diabète et le syndrome métabolique. La relation entre le diabète et l'hypertension a été également démontrée en utilisant des souris *gpr91<sup>-/-</sup>*.

La région JGA et tout le contenu rénal en rénine des souris diabétiques est élevé par rapport aux témoins non diabétiques. La libération de rénine est stimulée par la perfusion de l'artériole afférente (Toma et coll., 2008). La libération de rénine observée, combinée avec la dilatation précitée de l'artériole afférente entraînant une hyperfiltration, sont des caractéristiques de la néphropathie diabétique.

Aujourd'hui, il est bien établi que la production et la libération de rénine ne se limitent plus à la région JGA. Les composants individuels du système rénine-angiotensine ont été détectés tout au long du néphron (Rohrwasser et coll., 1999), ce qui a permis d'en éclaircir le rôle (Suzaki et coll., 2006; Schweda et al, 2007 et Robben et al, 2009). Dans le rein des souris diabétiques, l'activation du GPR91 dans le CD entraîne une augmentation de la phosphorylation des kinases extracellulaires 1 et 2 (ERK1/2), alors que cet effet est absent chez les souris *GPR91<sup>-/-</sup>*. La phosphorylation soutenue d'ERK1/2 est associée à la prolifération des cellules tubulaires et au développement de fibrose interstitielle tubulaire (Sakai et coll, 2005 et Steckelings et coll., 2009). Il a été proposé que GPR91 jouerait un rôle dans le développement de la fibrose dans la néphropathie diabétique et l'hypertension induite par le diabète (Peti-Peterdi et coll., 2008).



### 1.3.3 GPR99

#### 1.3.3.1 Structure

Le récepteur GPR99 (également appelé GPR80) codant pour une protéine de 337 acides aminés, est un récepteur orphelin couplé à la protéine G. Une recherche des récepteurs nucléotidiques connus dans les bases de données génomiques humaines indique une homologie de GPR99 avec la sous-famille des récepteurs P2Y nucléotidiques. Son activation, par l'AMP et l'adénosine, augmente l'accumulation d'AMP cyclique et la mobilisation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Inbe et coll., 2004). GPR99 humain partage 36% d'acides aminés identiques avec les deux récepteurs de l'ATP, P2Y1 et avec GPR91. La séquence d'acides aminés de GPR99 chez la souris est identique à 85% à celle de l'humain. Il y a une homologie de 33% entre les deux récepteurs GPR91 et GPR99 de la souris. Le motif YXVTRPL qui est unique à la sous-famille de P2Y1 et le motif HXX (R/K) qui se trouve dans tous les RCPG liant des nucléotides sont conservés dans GPR99 de souris et d'humain. La conservation d'acides aminés spécifiques dans GPR99 qui sont responsables de l'activation de GPR91 par le succinate confère au récepteur GPR99 la possibilité de lier les ligands de l'acide dicarboxylique. En effet, à une concentration micromolaire élevée, le 2-oxoglutarate ( $\alpha$ -cétoglutarate), un intermédiaire du cycle de l'acide citrique, active GPR99 via la voie médiée par Gq (He et coll., 2004). Cette association de GPR99 avec l' $\alpha$ -cétoglutarate a été confirmée à des valeurs de stimulations similaires dans un dosage avec  $\beta$ -arrestine (Southern et coll., 2013). Le comité de nomenclature et classification des drogues (NC-IUPHAR) a identifié GPR99 comme le récepteur de l'oxoglutarate (Davenport et coll., 2013). Cependant, des

données récentes classifient GPR99 comme un récepteur supplémentaire pour LTE4 (Kanaoka et coll., 2013).

### **1.3.3.2 Distribution**

L'analyse par Northern Blot avec des tissus humains a révélé que l'ARNm de GPR99 est exprimé dans les reins et le placenta (Wittenberger et coll., 2004). À l'aide de la RT-PCR quantitative, l'ARNm GPR99 humain a été détecté de manière prédominante dans la trachée, les glandes salivaires, les reins, le cerveau fœtal, les poumons et dans les mastocytes dérivés du sang du cordon ombilical (Inbe et coll., 2004). Une analyse RT-PCR quantitative chez la souris a révélé que l'ARNm de GPR99 est fortement exprimé dans les reins, les testicules et les muscles lisses (He et coll., 2004). Cependant les transcrits du récepteur de l'oxoglutarate (OXGR1) n'ont pas été détectés par Northern Blot dans les tissus cérébraux humains, y compris le cortex frontal, le putamen caudé, le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe (Lee et coll., 2001).

### **1.3.3.3 Pharmacologie et voies de signalisations**

L'internalisation du récepteur induite par le ligand est souvent caractéristique de l'activation d'un RCPG et de l'atténuation du signal (Von Zastrow et coll., 1994). La coloration par immunofluorescence de cellules exprimant GPR99 par *He et al* a révélé que le récepteur GPR99 est localisé à la membrane plasmique et que sa stimulation par le ligand induit son internalisation. L' $\alpha$ -cétoglutarate stimule la formation du phosphate inositol d'une manière dépendante du GPR99. Cette activation du récepteur n'affecte pas les taux d'AMPc.

La formation du phosphate inositol et le flux  $[Ca^{2+}]_i$  sont tous deux insensibles à la toxine pertussique, ainsi GPR99 semble agir exclusivement par la voie médiée par Gq (He et coll., 2004). Deux nouvelles voies de signalisation en aval des récepteurs de GPR99 ont été identifiées (Ameh et coll., 2014). Tout d'abord, GPR99 forme un complexe moléculaire avec TYK2, un régulateur en amont de facteurs prohypertrophiques, STAT1 et STAT3. La surexpression de GPR99 dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés médiée par des adénovirus réduit significativement la phosphorylation de TYK2 et STAT 1 et 3. Inversement, cette voie est suractivée chez la souris *gpr99*<sup>-/-</sup> après une constriction transversale aortique. De plus, selon *Ameh et ses collaborateurs*, l'interaction de CSN5 (le cinquième composant du complexe signalosome COP9 des mammifères) avec GPR99 régule l'ubiquitination de l'interféron des facteurs de régulation 5 (IRF5) et 8 (IRF8). Ces facteurs de régulation sont reconnus comme facteurs prohypertrophiques. La surexpression de GPR99 augmente l'ubiquitination des deux interférons IRF5 et IRF8; sa suppression réduit l'ubiquitination d'IRF5/8. Ainsi GPR99 module la réponse cardiaque éventuellement, en régulant la voie STAT et l'ubiquitination d'IRF.

La sous-unité bêta de l'ATP synthétase (connue aussi sous le nom du complexe V de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie) est identifiée comme une nouvelle protéine de liaison de l' $\alpha$ -cétoglutarate. En utilisant une stratégie d'identification de cible à petites molécules, *Randall et ses collaborateurs* ont montré que l' $\alpha$ -cétoglutarate inhibe l'ATP synthétase. Ceci conduit à une concentration réduite d'ATP, une diminution de la consommation d'oxygène, et une augmentation de l'autophagie dans les *C. elegans* et les cellules de mammifères. L'augmentation de la longévité des *C.elegans* par l' $\alpha$ -cétoglutarate

nécessite la sous-unité bêta de l'ATP synthétase et dépend de (TOR) en aval (Randall et coll., 2014).

#### **1.3.3.4 Rôles physiologiques**

Tenant compte de sa récente découverte GPR99 n'a pas une fonction encore définie. Par contre, il est activé par l' $\alpha$ -cétoglutarate. GPR99 est exprimé dans le cœur et, selon des études antérieures, son ligand, l' $\alpha$ -cétoglutarate, est présent à des niveaux élevés dans le sérum des patients atteints d'insuffisance cardiaque. Dans les cardiomyocytes, *Ameh et ses collaborateurs* ont démontré le rôle fonctionnel du récepteur de l' $\alpha$ -cétoglutarate (GPR99) dans la pathologie d'hypertrophie cardiaque en utilisant à la fois des approches *in vivo* et *in vitro* (Ameh et coll., 2014). L'ablation génétique de GPR99 chez la souris (*gpr99<sup>-/-</sup>*) a entraîné une nette augmentation de l'hypertrophie et de la fibrose interstitielle comparée à la souris de type sauvage en réponse à une constriction transversale aortique. Ce qui suggère que GPR99 module l'hypertrophie pathologique dans le cœur (Ameh et coll., 2014).

Selon l'étude récente de Randall et ses collaborateurs, l'intermédiaire du cycle tricarboxylique, l' $\alpha$ -cétoglutarate, prolonge la durée de vie des adultes *C. elegans* suggérant ainsi de nouvelles stratégies pour la prévention et le traitement du vieillissement et les maladies liées à l'âge (Randall et coll., 2014). Par ailleurs, l' $\alpha$ -cétoglutarate peut réduire le flux sanguin dans les reins de sorte que la réduction du débit sanguin des reins fournit un moyen de rediriger le sang vers d'autres organes pendant les crises d'hypotension (He et coll., 2004). D'autre part, le même mécanisme pourrait contribuer de manière significative à l'hypertension, médiée par la rénine, qui est associée à une constriction de l'artère rénale par les plaques de

cholestérol (Feldkamp et coll., 2004). Ces effets sont similaires à ceux observés dans les cas de diabète, les maladies rénales et d'autres conditions pathologiques.

L' $\alpha$ -cétoglutarate joue un rôle dans la réduction de la lésion mitochondriale, dans les reins et autres tissus. Ces lésions sont causées par les diminutions et les augmentations successives des concentrations d'oxygène. Cet intermédiaire du cycle de Krebs est utilisé aussi dans les reins, le foie et des solutions de préservation d'organes pour transplantation (St Peter et coll., 2002). Enfin, GPR99 présent dans le placenta a été associé aux perturbations dans l'activité RAS placentaire réduisant le flux de sang placentaire pendant la grossesse, souvent avec complications sévères (Nielsen et coll., 2000).

## 1.4 Les ligands de GPR55 - GPR91 et GPR99

### 1.4.1 LPI

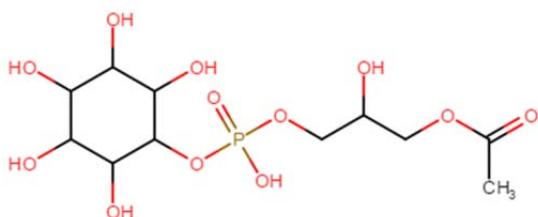


Figure 1.3 LPI

Le lysophosphatidyl inositol (LPI) était identifié comme un agoniste endogène de GPR55 par Takayuki Sugiura et ses collègues sur la base de sa capacité à promouvoir la phosphorylation de ERK1/2 dans des cellules HEK293 exprimant GPR55 (Oka et coll., 2007). Ils ont également constaté qu'il augmente le calcium intracellulaire dans des cellules HEK293 exprimant GPR55, mais pas dans les cellules non transfectées. Il est important de noter que "LPI" n'est pas un composé unique, mais c'est une famille de glycérolipides, contenant une seule chaîne acyle estérifiée soit à la position 1 ou 2 du glycérol avec du phosphate d'inositol en position 3 (Figure 1.3). Compte tenu de la diversité des chaînes acyles possibles qui composent la famille de LPI, il est possible que les différentes LPI varient dans leur capacité à activer GPR55. En examinant l'effet de la fraction d'acide gras sur l'activité de GPR55 par LPI, le groupe Sugiura a signalé que le 2-arachidonoyl LPI, contenant des acides gras courts ou moins saturés, était plus puissant (Oka et coll., 2009).

Dans le cerveau, les formes les plus abondantes de LPI comportent des chaînes acyles d'acide stéarique ou palmitique (Oka et coll., 2009). Il peut y avoir une régulation considérable

de l'activité du LPI par le contrôle de sa synthèse enzymatique via la phospholipase 1 (PLA 1) vs PLA 2. Par exemple, puisque l'acide arachidonique est estérifié principalement à la deuxième position dans le glycérol, alors l'activation de la PLA 1 produira sn-2 arachidonoyl LPI. Il est important d'identifier de façon minutieuse les différentes formes de LPI présentes chez les mammifères et les régulations possibles de leur synthèse. En résumé, à l'heure actuelle, LPI est l'agoniste de GPR55 le plus largement accepté, tant en raison de sa capacité à activer la gamme complète de ses voies de signalisation qu'en raison de sa puissance élevée relativement aux autres agonistes endogènes. Cependant, des recherches plus poussées sont nécessaires pour comprendre les formes de LPI les plus pertinentes pour l'activation de GPR55, leur synthèse et les métabolismes qui contrôlent selon les tissus et les cellules.

### 1.4.2 O-1602

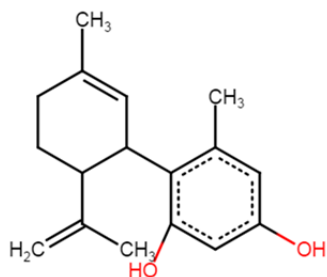


Figure 1.4 O-1602

O-1602 est un analogue du cannabidiol qui n'a pas une forte affinité pour les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 ou CB2 (Figure 1.4). O-1602 a des effets fonctionnels significatifs sur le système nerveux central ainsi que des effets anti-inflammatoires ou pro-nociceptifs à travers un certain nombre de récepteurs distincts. Par exemple, GPR18 pourrait

être une cible alternative d'O-1602 (McHugh et coll., 2010), bien que ce ligand n'agit pas comme un agoniste de GPR18 exprimé dans les neurones sympathiques de rat (Lu et coll., 2013). Cependant, O-1602 cause des effets non médiés par CB1 et CB2 comme la vasodilatation *in vitro* (Jarai et coll., 1999 et Johns et coll., 2007), la diminution de la tension artérielle *in vivo* (Johns et coll., 2007), la protection contre la colite et l'inhibition du recrutement des neutrophiles (McHugh et coll., 2008 et Schicho et coll., 2011), la stimulation de la polarisation et la résorption *in vitro* des ostéoclastes chez la souris et l'humain (Whyte et coll., 2009). De plus, l'administration centrale et périphérique d'O-1602 stimule la prise alimentaire de façon aiguë, et augmente chroniquement l'adiposité. L'action hyperphagique d'O-1602 est médiée par la régulation à la baisse des niveaux de l'ARNm et de la protéine du neuropeptide anorexigène dont la transcription est régulée par la cocaïne et l'amphétamine (Kun et coll., 2013). O-1602 joue aussi un rôle anti-inflammatoire et produit un effet protecteur sur les tissus pancréatiques de souris avec pancréatite aiguë induite par la céruléine (Kun et coll., 2013). Selon plusieurs rapports, O-1602 active GPR55 (Sawzdargo et coll., 1999). Cependant, la pharmacologie de GPR55a souvent fourni des résultats contradictoires, probablement en raison du fait que l'activité des ligands de GPR55 est influencée par le dosage fonctionnel utilisé (Petitet et coll., 2006 et Pertwee et coll., 2007).



### 1.4.3 CBD

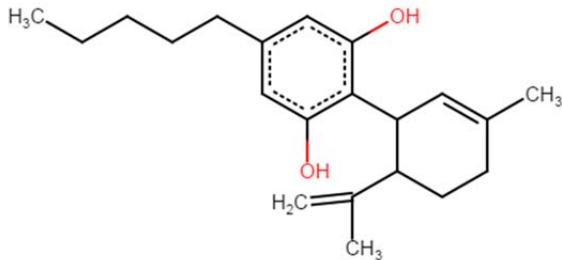


Figure 1.5 Le cannabidiol (CBD)

Le cannabidiol (CBD) était identifié comme un antagoniste de GPR55 dans la caractérisation initiale du récepteur (Ryberg et coll., 2007). CBD a également été impliqué dans l'activation d'une gamme de récepteurs, notamment TRPV2 (Qin et coll, 2008), 5-HT1A (Campos & Guimaraes, 2008; De Petrocellis et coll, 2008 et Resstel et coll., 2009) et PPAR $\gamma$  (O'Sullivan et coll., 2009). C'est le composant majeur non psychoactif du cannabis sativa, constituant jusqu'à 40 pour cent de son extrait, et dont la structure a été décrite par *Mechoulam et Shvo* (1963) (Figure 1.5); Le CBD a récemment attiré de l'intérêt pour son potentiel thérapeutique dans un certain nombre d'états pathologiques (Pertwee, 2008). Il pourrait posséder des propriétés anticonvulsives, neuroprotectrices et anti-inflammatoires chez l'humain. Bien que les effets pharmacologiques précis du CBD n'aient pas été encore complètement élucidés, des études ont démontré qu'il médie une pléiade d'actions qui pourraient conférer aux tissus des propriétés protectrices.

Par exemple, le CBD exerce un effet immunosuppresseur en diminuant le facteur onconécrosant grâce à une meilleure signalisation de l'adénosine endogène (Malfait et coll.,

2000) et il empêche les dommages oxydatifs induits par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Hampson et coll., 1998). Encore, le CBD inhibe l'absorption des mastocytes par l'anandamide (Rakhshan et coll., 2000), ce qui suggère un rôle anti-inflammatoire supplémentaire pour le CBD. Toutes ces actions anti-inflammatoires du CBD seraient prédictives d'un rôle protecteur dans les événements pathologiques impliquant l'inflammation, telles que l'ischémie et les lésions cérébrales. En effet, lors d'une lésion cérébrale, le CBD joue un rôle protecteur par un mécanisme dépendant du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (Mishima et coll., 2005).

Selon *Durst et coll.* (2007), l'administration chronique du CBD réduit considérablement la taille de l'infarctus du myocarde mesurée plusieurs jours après une ischémie. Cet effet est corrélé avec un effet anti-inflammatoire marqué (Durst et coll., 2007). Selon des études antérieures, l'administration prolongée du CBD exerce un rôle neuroprotecteur et cardioprotecteur grâce à ses effets anti-inflammatoires, antioxydants et antinécrotiques (Mechoulam et coll., 2007).

Dans le système nerveux central, le CBD a un effet protecteur contre l'épilepsie, l'anxiété et la psychose et peut améliorer la condition de patients souffrant de maladies des ganglions de la base, tels que la maladie de Parkinson et de Huntington. Ceci en réduisant les symptômes et en retardant la progression de la maladie (Iuvone et coll., 2009 et Scuderi et coll., 2009). Les effets neuroprotecteurs du CBD peuvent être augmentés par des propriétés antioxydantes (Hampson et coll., 1998 et Sagredo et coll., 2007). Les premières études ont suggéré que le CBD avait un potentiel anticonvulsif à petite échelle dans un essai clinique de phase I (Cunha et coll., 1980). Le CBD est extrêmement bien toléré chez l'humain; par exemple, à des doses de 600 mg il n'engendre aucun des symptômes psychotiques associés à  $\Delta^9$ -THC (Bhattacharyya et coll., 2009).

À l'heure actuelle, le CBD est utilisé en thérapeutique dans Sativex (1: 1 Δ 9-THC / CBD; GW Pharmaceuticals, Porton Down, Royaume-Uni) pour soulager les symptômes de la douleur dans la sclérose en plaques et le cancer. En conclusion, CBD est un composé sûr avec un large éventail d'applications thérapeutiques, y compris le traitement des troubles psychiatriques (Izzo et coll., 2009 et Hill et coll., 2012). Ces données font du CBD un candidat prometteur pour une utilisation clinique à venir. Son utilisation thérapeutique, cependant, présente des facteurs limitants. En plus de sa faible et variable biodisponibilité orale chez l'humain (Agurell et coll., 1981), il provoque des courbes dose-réponse en forme de cloche. Selon les études avec des animaux de laboratoire, la marge dans sa dose thérapeutique est étroite. Un objectif clair de la recherche future, par conséquent, serait d'essayer de mieux comprendre et élucider les mécanismes responsables des propriétés du CBD afin de développer des composés avec une sécurité clinique et avec des plages d'efficacité de la dose plus grandes.

#### 1.4.4 Succinate

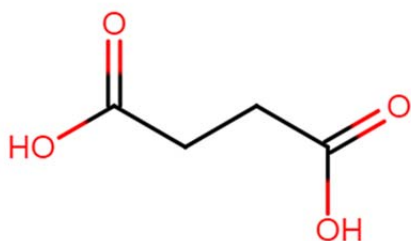


Figure 1.6 Le succinate

Le succinate est une molécule métabolique importante qui constitue l'un des intermédiaires du cycle de l'acide citrique (Figure 1.6). Il est synthétisé dans les mitochondries

par l'oxydation du succinyl-CoA qui est lui-même converti en fumarate par l'enzyme succinate déshydrogénase (Hakak et coll., 2009). Le succinate a été purifié à partir d'extraits de reins de cochons par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Il a été identifié comme ligand pour GPR91 par spectrométrie de masse. Les valeurs d'EC50 pour l'activation du récepteur étaient de l'ordre de 20 à 50 pM, en fonction du test utilisé. Il a été clairement démontré que le succinate est un ligand endogène pour GPR99 en testant 800 composés pharmacologiquement actifs et des ligands connus des RCPGs connus, ainsi que les 200 acides carboxyliques et les composés structurellement apparentés au succinate, y compris les intermédiaires du cycle de l'acide citrique: l' $\alpha$ -cétoglutarate, le citrate, l'isocitrate, le malate et l'oxaloacétate, et plusieurs composés purinergiques. (He et coll., 2004). Comme c'est attendu pour un composant du cycle de l'acide citrique, le succinate présent dans les mitochondries, peut être libéré dans l'espace extracellulaire suite à des perturbations locales du métabolisme énergétique (Krebs, 1970).

Les concentrations plasmatiques de succinate mesurées par chromatographie liquide en tandem avec la spectrométrie de masse chez les rongeurs varient de 6 à 20  $\mu$ M, tandis que des niveaux de succinate humains ont été détectés à partir de 2 à 3  $\mu$ M (Sadagopan et coll., 2007) et de 2 à 20  $\mu$ M (Kushnir et coll., 2001) dans le sérum et le plasma, respectivement. En outre, la concentration en succinate dans l'urine de souris est de l'ordre de 20 à 30  $\mu$ M en conditions physiologiques (Toma et coll., 2008). On a rapporté d'autres fonctions de cet intermédiaire en plus de son rôle classique dans le métabolisme énergétique. Des études antérieures ont indiqué que le succinate stabilise le facteur de transcription-1 $\alpha$  induit par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ) dans les tumeurs spécifiques et dans les macrophages activés et qu'il stimule les cellules dendritiques (Pearce et coll., 2013 et Mills et coll., 2014). En outre, l'implication du succinate a été

démontrée pour sa modification post traductionnelle des protéines (Tannahill et coll., 2013). Ce répertoire de fonctions du succinate suggère un rôle plus large dans l'activation cellulaire.

On a également impliqué le succinate dans des modèles animaux de diabète sucré (Toma et coll., 2008), des maladies métaboliques (Sadagopan et coll., 2007), et de dommages au foie (Correa et coll., 2007). Dans l'hyperglycémie, comme le diabète sucré et le syndrome métabolique, une activité élevée du cycle de Krebs en raison de la disponibilité élevée du substrat peut augmenter le gradient  $H^+$  sur la membrane mitochondriale, ce qui conduit à l'inhibition d'étapes enzymatiques médiées par des complexes au sein de la chaîne de transport d'électrons, y compris la succinate déshydrogénase (Brownlee, 2005). Cela peut alors conduire à l'accumulation intracellulaire, et finalement, la libération du succinate dans le flux sanguin.

Comme le complexe succinate déshydrogénase est impliqué dans la chaîne de transport d'électrons sur la membrane mitochondriale, son activité dépend indirectement de la disponibilité de l'oxygène. Ainsi, dans des situations où la pression d' $O_2$  est faible, le succinate s'accumule à cause de la faible activité du succinate-déshydrogénase ou d'autres enzymes de la chaîne de transport d'électrons qui affectent son activité (Weinberg et coll., 2000; Jassem et Heaton, 2004 et Brownlee, 2005). En outre, la formation de succinate peut se produire de façon non enzymatique (Fedotcheva et coll., 2006). En effet, les taux circulants de succinate augmentés ont été détectés dans des états de faibles teneurs en oxygène, tels que l'ischémie (Hems et Brosnan, 1970) ou l'exercice (Hochachka et Dressendorfer, 1976 et Lewis et coll., 2010). L'effet de faibles pressions d'oxygène sur l'augmentation des niveaux de succinate était également évidents chez des rats exposés à 100% de  $CO_2$  au lieu d'isoflurane

oxygéné, les niveaux de succinate ont augmenté de 7 à 40  $\mu\text{M}$  dans le ventricule gauche, et ont atteint 173  $\mu\text{M}$  dans la veine cave (Sadagopan et coll., 2007).

À un pH physiologique normal, le succinate est une molécule chargée qui est incapable de diffuser efficacement à travers les membranes. Ainsi, suite à l'accumulation du succinate à l'intérieur de la matrice mitochondriale, des transporteurs ou des échangeurs spécifiques sont nécessaires pour en faciliter le transport de l'intérieur de la mitochondrie vers le cytosol, et ensuite à travers la membrane plasmique vers l'environnement extracellulaire. La membrane mitochondriale interne contient un certain nombre de transporteurs de dicarboxylate et des échangeurs, dont le transporteur succinate-fumarate / malate SLC25A10 (Oswald et coll., 2007) qui est le candidat le plus probable pour faciliter le transport du succinate accumulé. Le transport du succinate à travers la membrane mitochondriale externe se produit probablement par l'intermédiaire des porines, qui sont de grands canaux perméables à la plupart des molécules sous 1,5 kDa. Des protéines candidates pour le transport du succinate à travers la membrane plasmique seront probablement spécifiques au type de cellule ou du tissu, étant donné qu'il n'existe aucun des transporteurs dicarboxylate de la membrane plasmique exprimés de manière ubiquitaire. Parmi les candidats potentiels possibles, il y a les membres des familles de transporteurs d'anions organiques, les protéines multirésistantes aux médicaments, et les échangeurs sodium-dicarboxylate (Markovich et Murer, 2004 et Pajor, 2006). Toutefois, aucune donnée n'est actuellement disponible au sujet de leur rôle dans l'accumulation de succinate en conditions de stress oxydatif ou métabolique. À l'avenir, l'utilisation d'antagonistes spécifiques ou de souris knock-out pour ces co-transporteurs pourra révéler les voies impliquées dans les états pathologiques causés par l'accumulation du succinate.

### 1.4.4 L' $\alpha$ -cétoglutarate

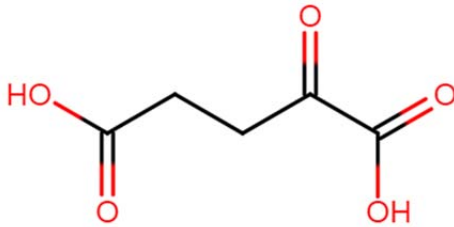


Figure 1.7 L' $\alpha$ -cétoglutarate

Dans la cellule, l' $\alpha$ -cétoglutarate (ou 2-oxoglutarate ou  $\alpha$ -KG) est produit à partir de l'isocitrate par décarboxylation oxydative catalysée par l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Il est décarboxylé en succinyl-CoA et en CO<sub>2</sub> par l' $\alpha$ -KG déshydrogénase, un point de contrôle clé dans le cycle de Krebs (Figure 1.7).

L' $\alpha$ -KG peut également être produit à partir de la désamination oxydative du glutamate à l'aide de l'enzyme glutamate déshydrogénase, et en tant que produit des réactions de transamination de phosphate dépendant du pyridoxal où le glutamate est un donneur du groupe amino commun (Randall et coll., 2014). L' $\alpha$ -KG (mais pas isocitrate ou citrate) retarde le vieillissement et prolonge la durée de vie de *C. elegans* de ~ 50% (Gems et coll., 2000). Il joue aussi un rôle physiologique dans les cellules comme premier transporteur d'azote, et comme intermédiaire entre deux neurotransmetteurs antagonistes, le glutamate excitateur et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) inhibiteur. Plusieurs éléments de preuve, y compris l'identification récente de mutations affectant l'isocitrate déshydrogénase (IDH), le fumarate hydratase (FH) et la succinate déshydrogénase (SDH), ont démontré que des mutations dans

certaines enzymes métaboliques peuvent jouer un rôle causal dans la tumorigenèse. Les gènes de l'IDH1 et IDH2 dépendant du  $\text{NADP}^+$  sont fréquemment mutés dans > 75% des gliomes (Parsons et coll., 2008), ~ 20% de la leucémie myéloïde aiguë (LMA) (Mardis et coll., 2009), et plusieurs autres tumeurs à différentes fréquences (Hemerly et coll., 2010; Murugan et coll., 2010; Amary et coll., 2011; Damato et coll., 2012 et Oermann et coll., 2012). Ces mutations dans IDH1/2 sont le résultat d'une perte dans la production d' $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) et un gain d'activités de la 2-hydroxyglutarate (2-HG) simultanés (Dang et coll., 2009; Yan et coll., 2009 et Zhao et coll., 2009).

L' $\alpha$ -KG joue un rôle critique dans quatre voies métaboliques et cellulaires différentes: comme intermédiaire dans le cycle de Krebs pour le métabolisme de l'énergie, en tant que précurseur de la formation de la glutamine pour la synthèse d'acides aminés, en tant que transporteur d'azote pendant le cycle de l'urée et la désintoxication de l'ammoniac, et un cosubstrat pour la Fe (II) / dioxygénase dépendante de l' $\alpha$ -KG. L'accumulation des données génétiques et biochimiques soutient l'idée que les altérations de la Fe (II)/dioxygénase dépendante de l' $\alpha$ -KG contribuent à la tumorigenèse (Oermann et coll. 2012).

## **1.5 Le cône de croissance et la chimiotaxie**

### **1.5.1 Structure du cône de croissance**

À la fin du XIX siècle, Santiago Ramón y Cajal a découvert que l'extrémité distale des axones de croissance contenait une structure qu'il a appelée le cône de croissance (CC). Il a proposé que cette structure soit la responsable de l'orientation de la croissance de l'axone en réponse à des attractifs, maintenant connu comme les molécules chimiotactiques. Aussi, il a proposé que les propriétés physiques des tissus environnants puissent influencer la croissance



et direction du CC (Cajal et coll., 1890). Cette découverte fondamentale a offert une explication plausible à la direction de la croissance axonale. Elle a aussi conduit à la découverte des mécanismes de guidage axonal qui comprennent les signaux diffusibles attractifs et répulsifs et ceux qui sont ancrés à la membrane cellulaire ou à la matrice extracellulaire (Figure 1.8).

L'observation de la croissance de fibres neuronales n'est devenue possible qu'à la première décennie du XXe siècle, lorsque Ross Harrison a développé une méthode de culture d'explants de neurones (Harrison et coll., 1910). Il a observé que le processus d'allongement à partir de la pointe du cône de croissance est impliqué dans la motilité de la structure. Il a décrit deux phénomènes dans le développement du nerf : (1) Le mouvement protoplasmique qui consiste à former la fibre nerveuse primitive par l'extension du protoplasme neuroblastique en un filament et (2) la différenciation tissulaire formant la neurofibrille sans le filament (Harrison, 1910 et Keshishian, 2004). Ces observations ont confirmé que 1) l'axone se projette à partir d'un seul corps cellulaire et 2) le cône de croissance est l'acteur principal de la croissance axonale. Les dernières études sur des cultures de tissus nerveux permettaient la croissance des axones seulement sur des substrats solides alors qu'ils baignent dans un milieu liquide, ce qui a poussé les chercheurs en guidage axonal à diriger leurs recherches dans l'analyse d'interactions entre axones et les CC avec le substrat.

Le premier postulat «Guidage par contact» de *Weiss et al* stipulait que les axones ont besoin d'un minimum d'appariement avec leur substrat situé dans la matrice intracellulaire immédiatement adjacente aux cellules, mais pas à une certaine distance (Weiss et coll., 1941). Plusieurs études ont par la suite renforcé l'hypothèse de la croissance neuronale utilisant diverses techniques comme la microscopie à contraste de phases et l'imagerie en temps réel

(Pomerat et coll., 1951). Par ailleurs, la microscopie électronique a révélé la première distribution détaillée des composants du cytosquelette au sein du cône de croissance, avec les neurofilaments d'actine (FA) dans sa zone centrale et dans les filopodes et les microtubules (MT) principalement dans l'axone et quelque peu dans le CC (Yamada et coll., 1970). Suite à des expériences utilisant des inhibiteurs de la polymérisation des composants du cytosquelette comme la cytochalasine B et la colchicine, Yamada *et al* ont montré l'importance de la polymérisation des FA et MT pour la formation du cône de croissance et l'extension des neurites (Yamada et coll., 1970 et Yamada & Wessells, 1971). Ceci représente une première explication moléculaire de la motilité du cône de croissance.

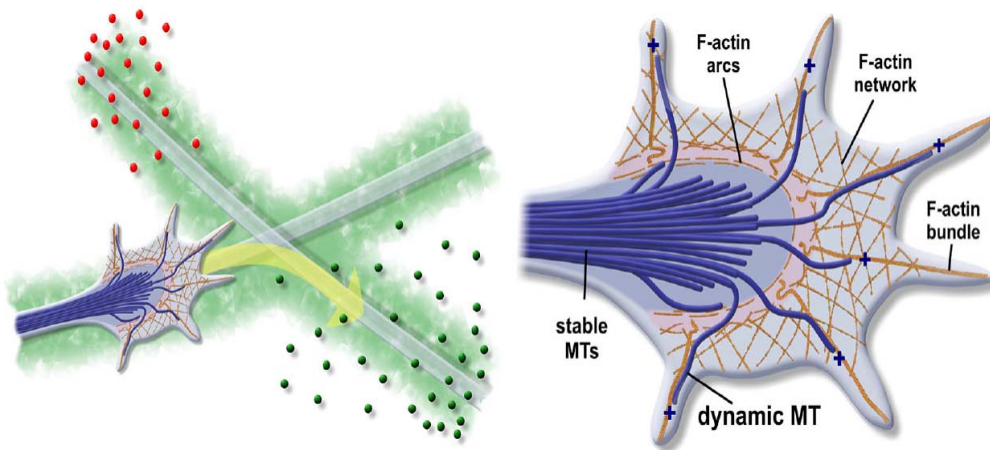


Figure 1.8 Cytosquelette d'un cône de croissance interprétant un environnement chimiotactique diversifié

(Tirée de Bearce et coll., 2015)

## 1.5.2 Les molécules de guidage

Le jeune neurone est confronté à un voyage complexe. Le prolongement d'un seul axone, correctement guidé dans l'embryon en développement implique une orchestration complexe de la croissance, de la rétraction, et des événements de guidage. Pour naviguer dans ce paysage, l'axone est équipé d'un véhicule répondant : le cône de croissance. Afin de choisir la bonne voie, l'axone est exposé à une multitude d'indices externes chimiotactiques, qui doivent être détectés et effectivement traduits par une réponse mécanique appropriée (Figure 1.9). Au cours des 15 dernières années, des progrès spectaculaires ont été réalisés dans l'identification de certaines de ces molécules. Ils sont organisés en plusieurs familles, notamment les nétrines, sémaphorines, slits, éphrines et certains morphogènes et neurotrophines pour n'en nommer que quelques unes (Tessier-Lavigne et coll., 1996; Song et coll., 2001; Dickson et coll., 2002; Guan et coll., 2003; Charron et coll., 2005 et Plachez et coll., 2005).

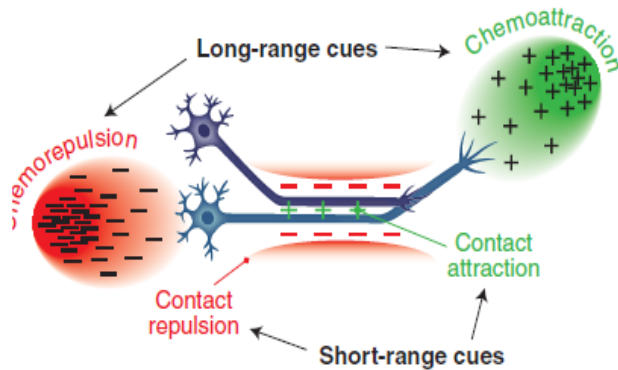


Figure 1.9 La diversité des mécanismes du guidage axonal agissant à court et à long terme pour médier un guidage attractif ou répulsif

(Tirée de Tessier-Lavigne and Alex L. Kolodkin., 2011)

### 1.5.2.1 Diversité des signaux de guidage pour les processus de développement neuronal

Les modalités d'établissement de la connectivité neuronale pendant le développement et sa régulation chez l'adulte dépendent de l'identification des molécules de signalisation et de l'observation des événements cellulaires sous-jacents du guidage neuronal. Trois approches expérimentales ont été utilisées pour identifier diverses molécules de guidage et leurs récepteurs: la première consiste à jumeler des tests biochimiques et la culture de tissus *in vitro* pour détecter les protéines attractives ou répulsives. La seconde en identifiant, *in vivo*, les mutations qui affectent les trajectoires de l'axone à l'aide de la génétique avancée. Finalement, des approches génétiques et de culture tissulaire permettent de caractériser les fonctions de molécules ayant des distributions ou des structures moléculaires susceptibles d'être des molécules de guidage (Tessier-Lavigne et coll. 2011).

Grâce à ces stratégies, quatre grandes familles de signaux de guidage avec des rôles très bien établis dans le guidage neuronal ont été identifiées: les nétrines, les slits, les sémaphorines et les éphrines. D'autres classes de molécules, plus connues dans différents contextes sont également désormais reconnues comme molécules de guidage neuronales. Elles comprennent certains morphogènes et facteurs de croissance (Figure 1.10). Les molécules d'adhésion cellulaire (MAC) de différentes classes ont longtemps été impliquées dans le guidage neuronal. Les membres de la famille des immunoglobulines (Ig) et de la superfamille des cadhérines jouent un rôle clé dans la régulation de différents aspects du câblage neuronal. L'identification et la caractérisation de ces signaux et leurs récepteurs ont permis d'élucider les mécanismes du guidage comme l'existence de molécules de guidage de courte et de longue portée, leurs rôles, le caractère multifonctionnel de plusieurs molécules de guidage et la

conservation durant l'évolution de nombreuses molécules de guidage (Tessier-Lavigne et Goodman 1996 et Dickson, 2002). Dans la partie suivante de ce chapitre, il sera question des familles de molécules de guidage les plus connues, des morphogènes, des facteurs de croissance et de certaines MACs.

### 1.5.2.2 Nétrines

C'est une petite famille de molécules de guidage phylogénétiquement conservées d'environ 70-80 kDa qui comprend : la nétrine-A et la nétrine-B de la drosophile, une nétrine chez *caenorhabditis elegans* (UNC-6), la nétrine-2, présente chez les poussins, mais pas chez les mammifères et deux nétrines étroitement liés chez les mammifères (nétrine-1 et la nétrine-3). La nétrine-4 (Orb-nétrine), est la troisième nétrine des mammifères ayant la même structure d'ensemble, mais avec plus grande homologie avec la chaîne  $\beta$  des laminines (Koch et coll., 2000) tandis que les nétrines G1 et G2 sont des protéines attachées à la membrane par des queues de glycoposphatidylinositols (Rajasekharan et coll., 2009).

Les nétrines ont été initialement identifiés par des études convergentes dans *C. elegans* et chez les vertébrés. Chez *C. elegans*, le gène *unc-6* est nécessaire pour le guidage des axones le long de l'axe dorso-ventral (Hedgecock et coll., 1990). Ce gène code pour la nétrine (Ishii et coll., 1992) qui se trouve à la ligne médiane ventrale (Wadsworth et coll., 1996). Chez les vertébrés, l'effet de la croissance et l'activité chimiotactique sur les axones commissuraux de la moelle par la plaque de plancher (floorplate) de la ligne médiane ventrale (Tessier-Lavigne et coll., 1988) sont médiés par la nétrine-1 (Kennedy et coll. 1994 et Serafini et coll. 1994) qui est requise pour le guidage *in vivo* (Serafini et coll., 1996). Les nétrines sont bifonctionnelles,

capables d'attirer des axones et d'en repousser d'autres (Colamarino et Tessier- Lavigne 1995 et Wadsworth et coll., 1996).

Les nétrines ont été localisées sur la ligne médiane du système nerveux de la drosophile, où elles contribuent à attirer les axones vers la ligne médiane (Harris et coll., 1996; Mitchell et coll. 1996); en effet, le rôle des nétrines dans le guidage axonal dans le règne animal, a été décrit en détail (Moore et coll. 2007). Cette description comprenait surtout, leur double fonction à «longue portée», diffusant à quelques centaines de micromètres de leur source (Kennedy et coll., 1994 et 2006) et à "courte portée" dans d'autres systèmes en restant immobilisées sur les cellules qui les a produites (Deiner et coll. 1997; Brankatschk et Dickson 2006).

Dans toutes les espèces, les effets attractifs des nétrines sont médiés par la famille des récepteurs DCC (Deleted in Colorectal Cancer), caractérisée par quatre domaines immunoglobulines (Ig) et six domaines fibronectines (Fn) de type III à leur extrémité extracellulaire. Le rôle des membres de cette famille est bien documenté dans l'attraction par exemple, UNC-40 chez *C. elegans* (Chan et coll., 1996), DCC chez les vertébrés (Keino-Masu et coll., 1996), et Frizzled chez la drosophile (Kolodziej et coll., 1996). Un deuxième membre de la famille DCC, la néogénine, se lie à nétrine-1 (Keino-Masu et coll., 1996), mais elle n'a pas encore été clairement impliquée dans l'attraction axonale médiée par la nétrine. On a proposé DSCAM, membre de la superfamille des Igs, en tant que corécepteur de l'activité médiée par la nétrine dans certains systèmes (Andrews et coll. 2008; Ly et coll. 2008). Les membres de la famille UNC5 sont les responsables des effets répulsifs des nétrines. Ce sont des protéines qui possèdent deux Igs et deux thrombospondines (Leung- Hagesteijn et al.

1992; Leonardo et coll. 1997; Hong et coll. 1999 et Keleman et Dickson 2001). Il existe un UNC5 chez *C. elegans*, un chez la drosophile, et quatre (UNC5A-D) chez les mammifères.

### 1.5.2.3 Slits

Les slits sont de grandes protéines sécrétées qui sont impliquées dans la répulsion des axones chez la drosophile et les vertébrés (Brose et al 1999; Kidd et coll. 1999 et Li et coll. 1999). Elles sont isolées aussi à partir d'un facteur de ramification pour les axones sensoriels chez les vertébrés (Wang et coll., 1999). Les slits sont constituées des répétitions de quatre terminaisons amines, riches en leucine, ainsi que des répétitions d'EGF et d'autres motifs. Parmi les espèces, il existe un slit chez la drosophile, trois (Slit1-3) chez les vertébrés; un chez *C. elegans* avec fonction de répulsion axonale (Hao et coll. 2001). Les récepteurs de la famille Robo, membres de la superfamille des immunoglobulines avec une ressemblance à DCC et UNC5, médient la répulsion des Slits (Kidd et coll., 1998 et Zallen et coll., 1998). On énumère trois Robos chez les mammifères, trois chez la drosophile et une (SAX-3) chez *C. elegans*. L'activité de ramification des axones et des dendrites par les slits, est également médiée par Robo (Whitford et coll. 2002 et Ma & Tessier-Lavigne 2007). Il est à noter que les slits peuvent être clivés pour donner des fragments de 140 kDa avec une terminaison amine capable de se lier à Robo (Wang et coll., 1999). Chez les vertébrés, le membre de la famille Robo3 possède un isoforme d'épissage, Robo3.1, qui peut inhiber les actions répulsives de Robo1 et Robo2 (Sabatier et coll., 2004 et Chen et coll., 2008). De même, des analyses génétiques ont inféré une fonction similaire "anti-Robo" à Robo2 chez la drosophile (Spitzweck, 2010).

#### 1.5.2.4 Sémaphorines

Les sémaphorines forment une grande famille de protéines, phylogénétiquement conservées, qui comprend à la fois les molécules de guidage sécrétées et transmembranaires (Yazdani et Terman 2006). La première sémaphorine identifiée fut la protéine transmembranaire sémaphorine 1a chez la sauterelle, appelée à l'origine "fascicline IV" d'après le nom de l'anticorps monoclonal qui définit son motif d'expression neuronal". Son rôle est primordial dans la correction de la trajectoire des axones sensoriels au cours du développement des membres de la sauterelle (Kolodkin et coll. 1992).

Sema3A, sémaphorine sécrétée initialement appelée "collapsin-1," a été la première sémaphorine identifiée chez les vertébrés. Elle a été découverte suite à une purification biochimique des facteurs extraits du cerveau qui sont capables de repousser des axones *in vitro* (Luo et coll., 1993). Chez les vertébrés supérieurs, il existe environ 20 différentes sémaphorines. Chacune d'elles contient une signature d'environ 500 acides aminés qui jouent un rôle clé dans la médiation de l'association de ces protéines avec les récepteurs de signalisation appartenant à la famille des pléxines. Les sémaphorines peuvent agir à la fois à longue et à courte portée. La majorité des sémaphorines peuvent fonctionner comme de puissantes molécules d'inhibition dans une variété d'essais tant *in vitro* qu'*in vivo* au cours du développement neuronal (Kitsukawa et coll., 1997 et Tran et coll., 2007). Les sémaphorines transmembranaires peuvent être répulsives, soit par leur action dans leur environnement soit lorsqu'elles sont exprimées sur les faisceaux d'axones pour faciliter la dissociation ou la défasciculation des processus axonaux individuels. Les principaux récepteurs pour les sémaphorines sont les membres de la famille des pléxines qui comprennent neuf différentes protéines chez les vertébrés supérieurs. Ce sont de grandes protéines transmembranaires



phylogénétiquement conservées qui ont une parenté lointaine avec les sémaphorines (Tamagnone et Comoglio 2000). Plusieurs sémaphorines se lient directement aux pléxines par leurs co-récepteurs neuropiline 1 ou 2. D'autres chez les vertébrés, comme les sema3A sécrétées, forment un complexe holorécepteur actif : les neuropilines avec le récepteur pléxine. Différentes sémaphorines sécrétées nécessitent des combinaisons spécifiques de neuropiline-1 ou -2 et une pléxine spécifique pour leurs réponses de guidage dans des sous-types neuronaux distincts (Tran et coll., 2007). L'activation du récepteur pléxine initie une série d'événements de signalisation intracellulaire qui aboutissent au démontage des composantes locales du cytosquelette du cône de croissance et des substrats attachés (Zhou et coll., 2008). Cependant, de nombreuses sémaphorines partagent avec des protéines appartenant à d'autres familles de molécules de guidage la capacité à fonctionner à la fois comme attractifs et répulsifs. Les sémaphorines peuvent en certaines circonstances agir ainsi. Cette bifonctionnalité peut être dirigée par l'utilisation de différents complexes d'holorécepteurs ou par l'activation des voies de signalisation intracellulaires distinctes. Comme les molécules de guidage éphrines, les sémaphorines transmembranaires sont également capables de servir de récepteurs dans la régulation des événements de ciblage dendritique dans le système olfactif de la drosophile. Elles sont aussi impliquées dans le guidage des photorécepteurs dans le système visuel de la drosophile, le développement cardiaque embryonnaire du poulet et le guidage des axones thalamiques chez les mammifères (Tran et coll., 2007).

Les sémaphorines facilitent la formation des voies axonales centrales et périphériques en régulant le guidage et la fasciculation axonale. Cependant, ils régulent également le ciblage des axones aux endroits spécifiques de leurs partenaires synaptiques, le raffinement des projections exubérantes et la régulation de la morphologie neuronale et de la synaptogenèse

(Tran et coll., 2007). Ainsi, la signalisation des sémaphorines via de multiples récepteurs au cours de l'établissement et du maintien de la connectivité neuronale démontre la polyvalence et la diversité de cette famille de molécules.

### **1.5.2.5 Éphrines**

La quatrième famille des molécules de guidage canoniques est la famille des éphrines. Ce sont des molécules de signalisation à la surface cellulaire qui jouent un rôle important dans plusieurs événements au cours du développement, y compris le guidage axonal (Klein 2004). Il existe deux sous-familles; les cinq classes d'éphrines A attachées à la surface de la cellule par l'intermédiaire de liens GPI, et les trois classes de molécules transmembranaires, les éphrines B.

Pour activer leurs récepteurs et pour apparaître inactives lors de leur sécrétion à la surface de la cellule, les éphrines doivent être regroupées ce qui leur attribue l'action exclusive à courte portée des molécules de guidage. Ces ligands se lient aux récepteurs tyrosine kinases de la famille Eph. La classe A des éphrines interagit avec huit classes de récepteurs EphA à divers degrés de sélectivité, tandis que la classe éphrines B interagit avec six classes de récepteurs EphB. Les éphrines jouent un rôle essentiel dans l'organisation des projections topographiques comme les cellules ganglionnaires de la rétine avec leurs cellules cibles dans le tectum optique chez vertébrés inférieurs, ou le noyau genouillé latéral du thalamus chez les vertébrés supérieurs (Feldheim et O'Leary 2010). Ces fonctions de cartographie montrent la polyvalence des éphrines, qui peuvent être attractifs pour certains axones et répulsifs pour d'autres, ou être des régulateurs positifs ou négatifs de la ramification axonale.

En plus de la cartographie topographique, les éphrines sont impliquées comme attractifs et répulsifs à courte portée à l'égard d'une variété d'axones centraux et périphériques. Ils jouent aussi des rôles dans le raffinement des projections axonales. Des études plus récentes indiquent que les éphrines et leurs récepteurs jouent un rôle clé dans la régulation de la morphologie dendritique et de la synaptogenèse dans le SNC, ce qui les implique avec leurs récepteurs tyrosine kinases dans la plasticité synaptique (Shen et Cowan 2010). Les éphrines peuvent également participer à la signalisation inverse en fonctionnant comme des récepteurs pour réguler la cartographie topographique, le guidage axonal et la synaptogenèse. Ceci met en évidence le rôle de la grande famille des éphrines et de leurs récepteurs apparentés dans la régulation du guidage et de la morphologie cellulaire dans un éventail croissant de types cellulaires.

#### **1.5.2.6 Morphogènes et facteurs de croissance**

Les études conduites en parallèle avec l'identification des molécules de guidage canoniques ont montré l'implication d'autres types de molécules dans le guidage comme les morphogènes de la voie Wnt, Hedgehog (Hh), et le facteur de croissance b (TGFb) / les familles des protéines morphogénétiques osseuses (BMP), ainsi qu'une variété d'autres facteurs de croissance. Wnts sont les morphogènes les plus reliés aux fonctions du guidage axonal. Des études initiales ont montré un rôle de Wnt dans la répulsion chez la drosophile et l'attraction chez les mammifères: *Drosophila* Wnt5, agit par l'intermédiaire du récepteur Derailed, l'homologue du récepteur tyrosine kinase Ryk (Yoshikawa et coll. 2003), alors que chez les mammifères Frizzled 3 est le récepteur de Wnt4 (Lyuksyutova et coll., 2003). Les Wnts ont plusieurs rôles différents dans l'attraction et la répulsion des axones dans des systèmes et des organismes neuronaux divers. Parmi ces rôles : le guidage de la migration des

cellules neuronales, l'orientation de la cartographie topographique du système visuel des vertébrés et la régulation de la formation des synapses (Salinas et Zou 2008). On a également attribué des rôles de guidage à Sonic Hedgehog (Shh) chez les vertébrés (Charron et Tessier-Lavigne 2007) dont un rôle répulsif pour un ensemble de cellules ganglionnaires de la rétine (Trousse et coll., 2001) et attractif pour les axones commissuraux de la colonne vertébrale (Charron et coll., 2003). Dans les deux cas, les fonctions de guidage impliquent le complexe formé de la protéine de liaison Shh (BOC), un membre de la superfamille des Ig et la composante de signalisation de Shh (Smoothened) (Okada et coll., 2006; Sanchez-Camacho et Bovolenta 2008 et Fabre et coll. 2010).

Les membres de la famille TGF $\beta$  / BMP ont été impliqués comme chimiorépulsifs pour les axones commissuraux de la moelle en les repoussant de la ligne médiane dorsale via l'activation des récepteurs BMP canoniques (Augsburger et coll., 1999; Yamauchi et coll., 2008). Dans *C. elegans*, le gène UNC-129 code pour un membre divergent de la famille TGF $\beta$  qui est requis pour certaines migrations axonales dorsales (Colavita et Culotti 1998). Il n'agit pas directement comme une molécule de guidage, mais plutôt comme modulateur de la réponse des axones vers la nétrine UNC-6 en interagissant directement avec le récepteur de la nétrine UNC-5 (Mac Neil et coll. 2009). D'autres études sont nécessaires pour bien définir le rôle des protéines TGF $\beta$  / BMP dans le guidage axonal.

Plusieurs facteurs de croissance ont été également impliqués dans l'attraction des populations spécifiques d'axones dans les systèmes nerveux central et périphérique des vertébrés. Ils comprennent le facteur de croissance des hépatocytes, les neurotrophines BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), la neurotrophine-3, les facteurs de croissance des fibroblastes, le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales, la neuréguline, et le facteur

des cellules souches (Ebens et coll. 1996; O'Connor et Tessier-Lavigne 1999; Kramer et coll. 2006; Lopez-Bendito et coll. 2006; Shirasaki et coll. 2006 et Gore et coll. 2008). Cependant, l'importance des facteurs de croissance dans le guidage axonal demeure mal comprise à ce jour. Les effets sur le guidage de seulement un ensemble d'axones ont été démontrés pour chaque facteur de croissance, mais ces effets sont uniquement attractifs, pas répulsifs. *In vivo*, les effets ont surtout été documentés chez les vertébrés. D'autres études seront nécessaires pour étoffer les rôles de facteurs de croissance dans le guidage axonal en général.

### **1.5.2.7 Les molécules d'adhésion cellulaire (MAC)**

Les superfamilles des molécules d'adhésion cellulaire (MAC) de l'immunoglobuline ou de la cadhérine jouent un rôle dans le guidage axonal. En effet, un rôle pour l'adhésion homophile dans la régulation de la fasciculation axonale a été documenté pour la superfamille des Ig MAC fascicline II (Harrelson et Goodman, 1988; Lin et coll. 1994 et Lin et Goodman, 1994). Cependant, quand on s'intéresse au guidage plutôt qu'à la fasciculation, l'idée que ces molécules guident à travers l'adhésion a été remplacée par la possibilité émergente que les membres de ces familles pourraient stimuler la croissance ou l'attraction en fonctionnant comme des molécules de signalisation dans des combinaisons hétérophiliques plutôt qu'homophiliques.

D'autres Ig CAM, y compris NrCAM et L1, ont été impliqués dans le guidage dans un rôle indirect comme corécepteurs dans les complexes de récepteurs sémaphorine (Mann et coll., 2007). Une des plus fascinantes CAM est l'IG de la drosophile DSCAM (Grueber et Sagasti 2010). Grâce à l'épissage alternatif, plus de 19 000 isoformes de DSCAM peuvent être générés (Schmucker et coll., 2000). Chaque isoforme peut se lier à lui-même, mais se lie

faiblement aux isoformes qui ne lui ressemblent pas. Étonnamment, la liaison des isoformes semblables médie la répulsion, plutôt que l'adhérence ou l'attraction; elle est utilisée par les axones et les dendrites pour s'autoéviter (Wojtowicz et coll. 2007 et Hattori et coll. 2009). Ces études sur les CAMs illustrent la polyvalence des membres de la superfamille des Igs, et suggèrent que d'autres paires ligand-récepteur de cette famille restent à identifier. Dans le cas des cadhérines, malgré beaucoup de spéculations sur leurs fonctions potentielles en matière de guidage, il y a peu de preuves tangibles de leurs rôles. Par contre, un exemple vient de la drosophile, où N-cadhérine régleme plusieurs étapes de ciblage des axones dans les membres, bien que le mode de fonctionnement demeure mal compris (Nern et coll., 2008).

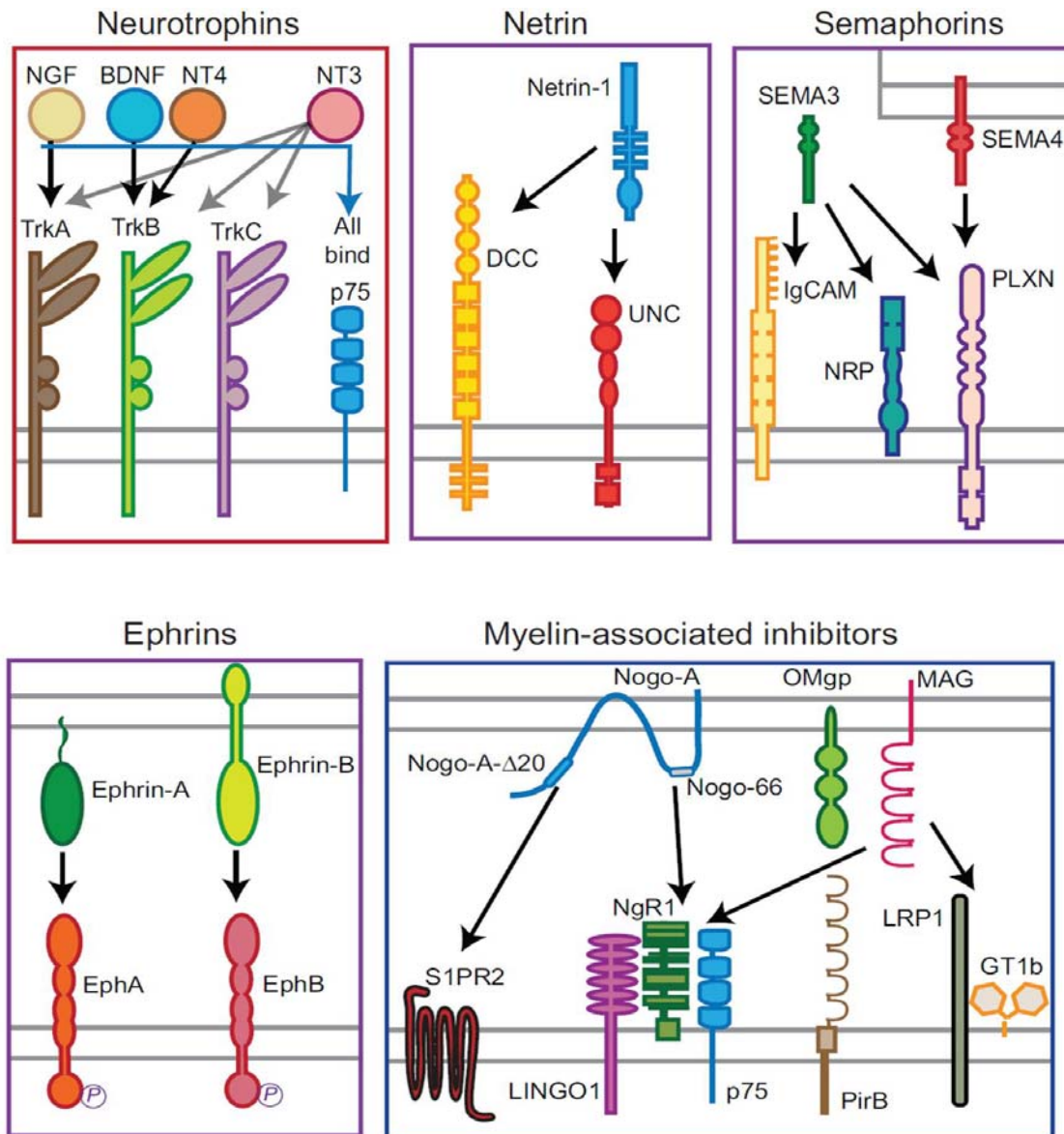


Figure 1.10 Schéma de quelques molécules de guidage attractives et répulsives ainsi que leurs principaux récepteurs.

BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor; DCC, Deleted Colorectal Cancer; Eph, Récepteur Éphrines; GT1b, Ganglioside; IgCAM, la superfamille des molécules d'adhésion immunoglobulines; LRP1, Récepteur lipoprotéine; MAG, Glycoprotéine associée à la myéline; NGF, facteur de croissance neurotrophique; NgR1, Récepteur Nogo; NRP; Neuropiline; NT3, Neurotrophine-3; NT4, neurotrophine-4; PLXN, Pléxine; S1PR2, Récepteur sphingosine-1-phosphate 2; SEMA, sémaphorines; Trk, Récepteur tropomyosine kinases A–C, UNC; (membres de la famille UNC des vertébrés et les récepteurs de Nétrine UNC5A–D) (Tirée de Nina et coll., 2015).

### 1.5.3 La chimiotaxie

Le câblage du système nerveux dépend de la précision du guidage des cônes de croissance à leurs cibles. Un mécanisme clé qui régit le guidage est la chimiotaxie, dans lequel les cônes de croissance détectent et suivent les gradients moléculaires. Les axones s'étendent à la recherche de leurs cibles appropriées, souvent sur de longues distances. Les cônes de croissance sont très mobiles, changeant constamment leur morphologie en étendant ou rétractant leurs filopodes pour sonder leur environnement. En absence de molécules de guidage, les cônes de croissance progressent le long d'un chemin relativement simple, portant sur les voies de l'axone derrière eux, à travers une série d'étapes bien définies. Tout d'abord, la membrane se prolonge, ce processus est connu sous le nom de la protrusion. Cette région naissante s'engorge par la suite avec le flux d'organelles provenant de la région centrale du cône de croissance. Enfin, les composants moléculaires à l'arrière du cône de croissance viennent la consolider pour former le segment stabilisé de l'axone (Mortimer et coll., 2008).

Par analogie à la cellule eucaryote, une chimiotaxie efficace des cônes de croissance suggère trois étapes clés : la détection directionnelle, la polarisation et la motilité (Figure 1.11) (Devreotes et coll., 2003 et Van Haastert et coll., 2004).

La détection directionnelle est la capacité d'une cellule à transduire un gradient externe de facteur chimiotactique en un gradient intracellulaire d'activité plus prononcée afin de transmettre sa réponse spatialement. La motilité est la génération de mouvement par une coordination spatiotemporelle de la dynamique du cytosquelette et de l'adhérence au substrat (Mortimer et coll., 2008). Ces deux processus se produisent dans le contexte de la polarisation, qui représente la capacité d'une cellule à organiser les composants clés de la signalisation en



deux régions persistantes et distinctes : «avant» et «arrière». Ces procédés, importants pour toutes les cellules eucaryotes exposées à un stimulus chimiotaxique (Song et coll., 2001), jouent des rôles similaires dans les cônes de croissance (Van Haastert et coll., 2004 et Von Philipsborn et coll., 2007). Nous discutons maintenant de ces phénomènes en les reliant à la chimiotaxie des cônes de croissance.

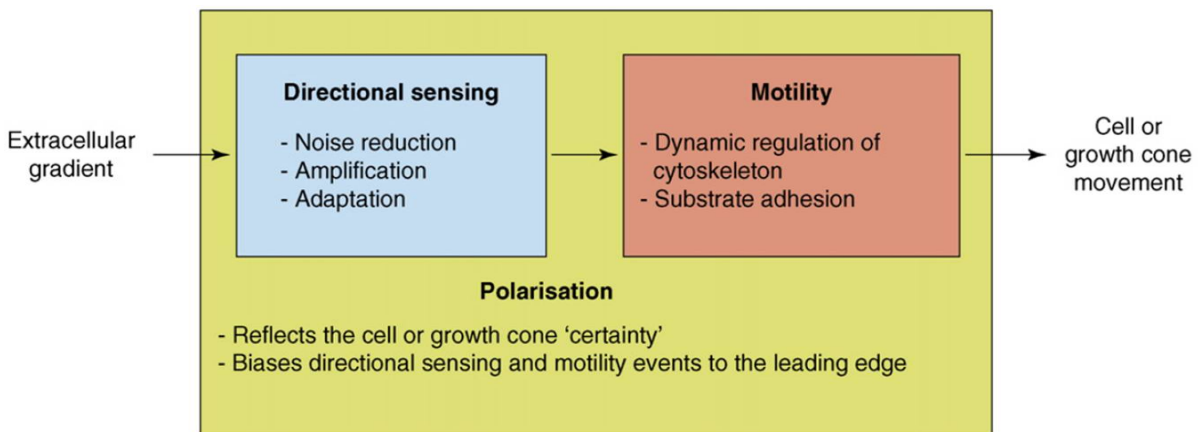


Figure 1.11 Cadre conceptuel de la chimiotaxie avec ses trois étapes l'orientation directionnelle, la motilité et la polarisation

(Tirée de Mortimer et coll., 2008)

### 1.5.3.1 Détection directionnelle

Au cours de la détection directionnelle, les cônes de croissance sont confrontés à des défis de réduction du bruit (Xu et coll., 2005), d'amplification (Goodhill et coll., 2004) et d'adaptation (Von Philipsborn et coll., 2007) pour raffiner le signal externe. Tout d'abord, à quelques points superficiels externes le gradient doit être «amplifié» en une asymétrie intracellulaire plus forte (Parent et coll., 1998). En amplifiant ce gradient externe en une

réponse intrinsèque essentielle, la cellule peut être capable de neutraliser les effets du bruit (Shibata et coll., 2005).

La capacité de détecter plusieurs ordres de grandeur des concentrations de ligand est la propriété de l'adaptation. La réduction du bruit permet de détecter fidèlement le gradient malgré les contraintes importantes dues aux fluctuations inhérentes à la liaison au récepteur et à la diffusion du ligand (Figure 1.12) (Berg et coll., 1977; Van Haastert et coll., 2007 and Mortimer et coll., 2008).

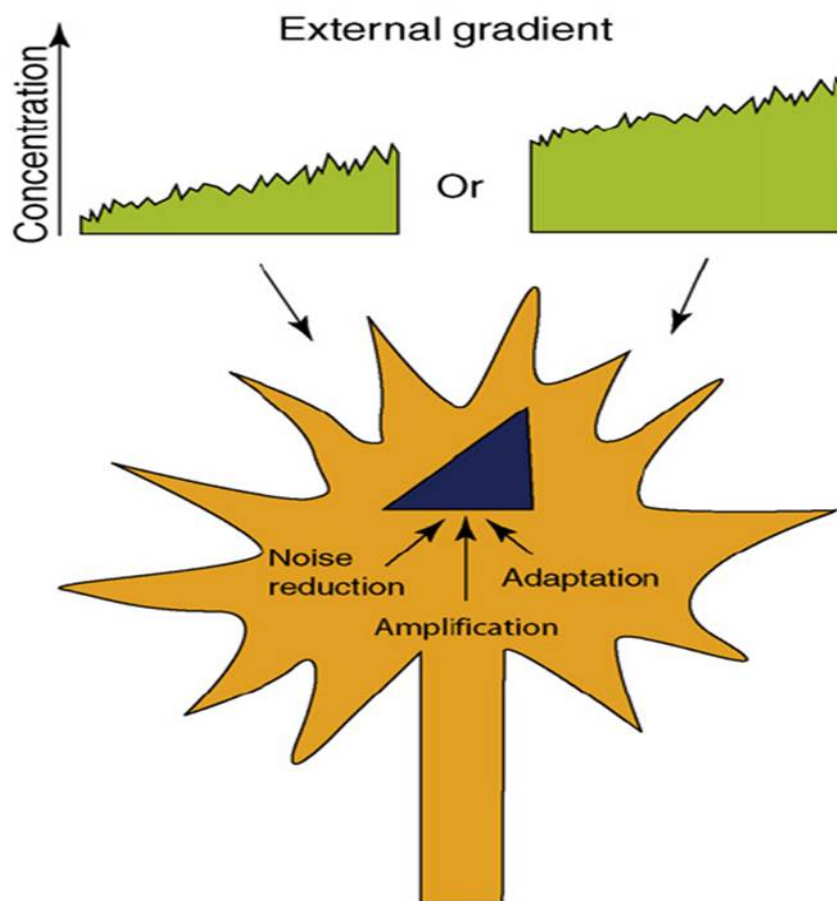


Figure 1.12 Exemple de transduction, adaptation et réduction du bruit

d'un signal externe (vert) bruyant en un signal interne (bleu) actif permettant ainsi au CC de répondre à un éventail plus grand de concentrations de signaux externes (*tirée de Mortimer et coll., 2008*)

Le regroupement asymétrique des microtubules axé sur les récepteurs activés dans les microdomaines lipidiques de la membrane plasmique peut entraîner le développement d'un gradient prononcé dans le cône de croissance (Bouzigues et coll., 2007). Une distribution asymétrique des récepteurs activés à son tour renforce toute signalisation intracellulaire asymétrique. Les microdomaines lipidiques de la membrane plasmique sont connus pour leurs rôles important dans la signalisation par plusieurs molécules de guidage, y compris NGF, BDNF, la nétrine-1, la sémaphorine 3a et la signalisation inverse par l'éphrineB (Bruckner et coll., 1999; Guirland et coll., 2004 et Fujitani et coll., 2005).

La dynamique lente des microtubules basée sur la redistribution et la diffusion des récepteurs représente un filtre temporel pour réduire le bruit (Bouzigues et coll., 2007). L'adaptation des cônes de croissance à des changements dans la concentration absolue de ligand semble impliquer l'internalisation du récepteur et la synthèse locale des protéines (Ming et coll., 2002 et Piper et coll., 2005). L'endocytose des récepteurs pourrait fonctionner comme une forme d'inhibition globale, alors que l'excitation locale et l'amplification peuvent être atteintes par un changement de mécanisme dans lequel la signalisation en aval ne se produit que lorsque la densité locale des récepteurs activés dépasse un seuil spécifique. Le réglage de l'endocytose des récepteurs et leur recyclage, de telle sorte que la densité moyenne des récepteurs liés sur la surface du cône de croissance est maintenue légèrement au-dessous de ce seuil, pourraient améliorer la détection d'un gradient faible (Figure 1.13) (Mortimer et coll., 2008).

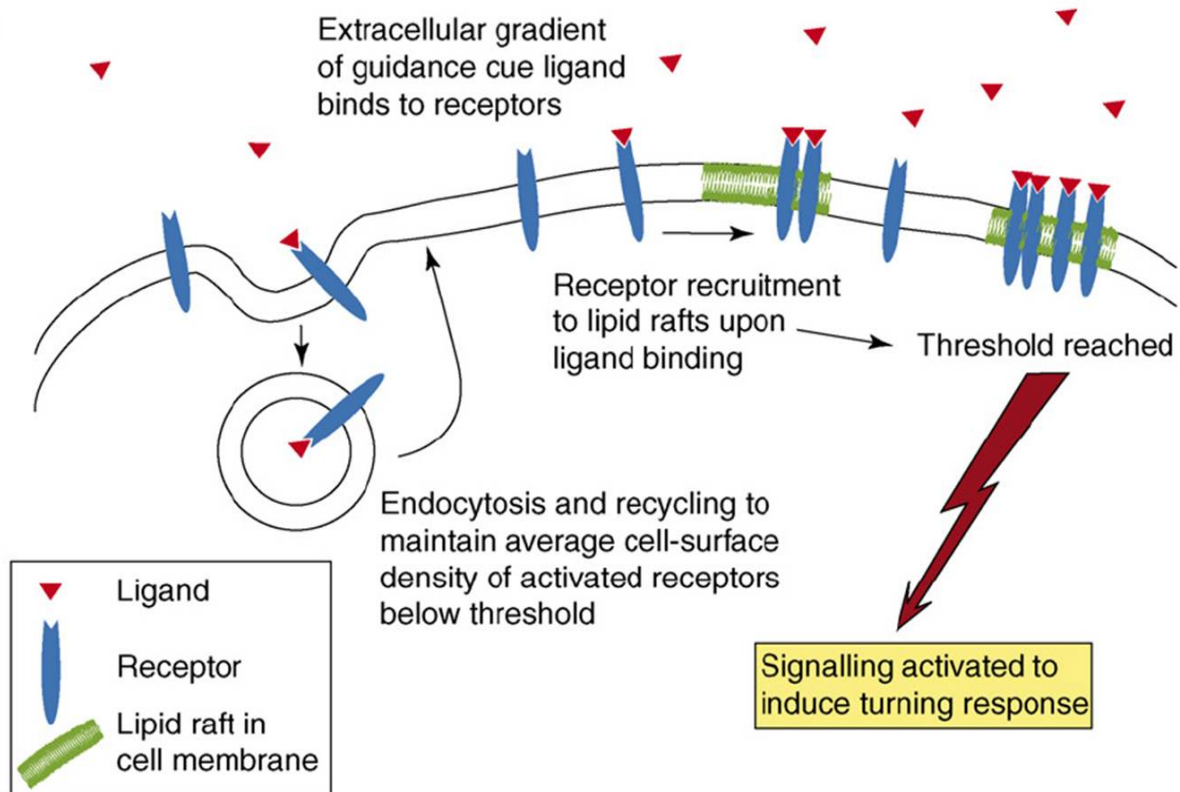


Figure 1.13 Le regroupement des récepteurs liés au sein de la bicouche lipidique offre un mécanisme d'amplification

Si un seuil de densité des récepteurs liés est nécessaire dans la bicouche lipidique avant le début de la signalisation, le faible gradient de liaisons de ligands qui franchit ce seuil pourrait être converti en un plus fort gradient de signalisation. Pour que ce mécanisme puisse fonctionner sur une grande plage de concentrations, la densité moyenne des récepteurs liés doit être maintenue en dessous du seuil d'activation, ce qui est déterminé par l'endocytose et le recyclage des récepteurs. (*Tirée de Mortimer et coll., 2008*)

### 1.5.3.2 Motilité

La motilité du cône de croissance est réglée par la régulation coordonnée de la dynamique du cytosquelette - spécifiquement l'actine et la tubuline - et l'adhérence au substrat.

Le cytosquelette d'actine se présente sous deux formes structurelles primaires: un maillage de filaments d'actine réticulés et fortement ramifiés, qui soutient les lamellipodes, et de longs faisceaux de fascine liés à des filaments d'actine regroupés côte à côte, orientés en parallèle et soutenant les filopodes (Ishikawa et coll., 2007).

La dynamique de l'actine est régulée par diverses protéines qui clivent ou réticulent des filaments d'actine existants ou qui induisent la nucléation de nouveaux filaments (Ishikawa et coll., 2007). De plus, des protéines motrices aident à faire avancer un filament d'actine polymérisée (Medeiros et coll., 2006). La motilité du cône de croissance est conduite en partie par l'incorporation des sous-unités d'actine à l'extrémité - (*pointed end*) du cytosquelette d'actine filamenteuse (F-actine), et par la rétraction continue subie par le maillage de F-actine vers le centre du cône de croissance où il sera dépolymérisé (Dent et coll., 2003).

Le couplage de f-actine avec un substrat permissif via les récepteurs d'adhésion permet au cône de croissance de développer une force de traction, et conduit à la protrusion de la membrane. Le cône de croissance est attaché avec l'axone en arrière, de telle sorte que pour avancer, l'axone doit s'allonger. Cela implique la livraison de nouveaux segments de microtubules au cône de croissance et la consolidation des microtubules plus ou moins organisés dans la zone centrale en un faisceau serré caractéristique de l'axe de l'axone (Mortimer et coll., 2008). La polymérisation des microtubules joue à la fois un rôle permissif pour l'extension de l'axone et un rôle instructif dans le guidage axonal (Figure 1.14) (Buck et coll., 2002).

Les microtubules sondent de façon continue la région périphérique du cône de croissance grâce à leur instabilité dynamique qui aide à résister au flux rétrograde de f-actine

provenant des protéines motrices (Grabham et coll., 2007). Au cours de ces excursions, ils s'associent de manière transitoire avec les faisceaux d'actine des filopodes (Zhou et coll., 2004). Ces associations dans la zone périphérique peuvent devenir stables conduisant l'axone à avancer et à tourner (Dent et coll., 2003).

Ainsi, la motilité du cône de croissance implique une intégration progressive d'événements moins définis qui à leur tour informe la stabilisation et l'extension des microtubules. Les boucles de rétroaction impliquant la livraison des protéines de liaison à l'actine via les microtubules pourraient alors stabiliser ou déstabiliser les interactions entre les éléments du cytosquelette d'actine et de tubuline, ou elles peuvent conduire à l'amplification d'une réponse dans une région particulière (Andersen et coll., 2005).

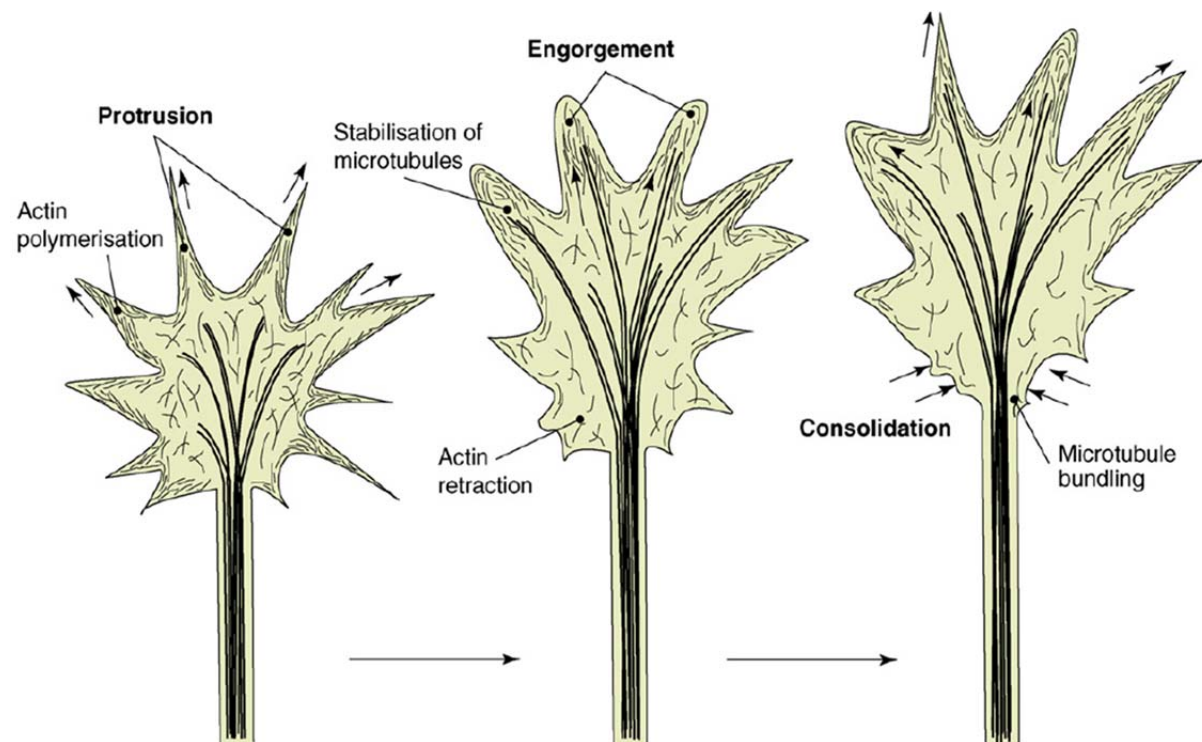


Figure 1.14 Processus de portusion, engorgement et consolidation permettant la motilité du CC

(Tirée de Mortimer et coll., 2008)

### 1.5.3.3 Polarisation

Pour maintenir le mouvement vers l'avant, les événements de motilité doivent se produire préférentiellement à l'extrémité négative pointue du filament d'actine. Généralement, les cônes de croissance ont une polarité intrinsèque «avant-arrière» exercée par l'axe de l'axone (Figure 1.15). Ils peuvent, toutefois, afficher différents degrés de polarisation avant-arrière (Mason et coll., 2000).

Les cônes de croissance «en pause» prennent des formes plus complexes, et déploient les microtubules en boucle dans leur région centrale – de tels comportements se produisent lorsque le cône de croissance doit prendre une décision de guidage complexe (Mason et coll., 1997). Cependant, les cônes de croissance qui s'étendent le long d'une voie bien définie s'organisent et prennent la forme d'une balle, une morphologie qui est en corrélation avec une sensibilité réduite et une croissance rapide (Mason et coll., 1997).

Les cônes de croissance possèdent un ensemble de composants moléculaires spécifiques qui marquent leur avant et leur arrière et qui maintiennent un arrangement régional approprié du cytosquelette. L'extrémité frontale du cône de croissance est enrichie de molécules qui favorisent la polymérisation et le regroupement de l'actine. Pour maintenir le mouvement antérograde, le cône de croissance doit réguler également son adhérence au substrat en développant une forte adhérence à son extrémité comparée à la zone centrale et à l'axe de l'axone pour extraire les forces mobiles des bandes d'actine (Mortimer et coll., 2008). Le contrôle exercé par la bicouche lipidique sur l'endocytose et le trafic des molécules d'adhésion cellulaire à partir de la zone centrale jusqu'à l'extrémité est crucial pour l'extension axonale (Kamiguchi et coll., 2006).

L'avancement du cône de croissance implique un processus de consolidation axonale qui consiste à convertir l'arrière du cône de croissance en un segment d'axone bien défini. Cela nécessite l'activation des protéines de translocation qui induisent le regroupement des microtubules (Bielas et coll., 2007) et la déstabilisation du cytosquelette d'actine (Loudon et coll., 2006).

Au moment de tourner, les cônes de croissance développent une polarité gauche-droite qui coordonne l'extension du cytosquelette dans la direction du virage et la rétraction dans le côté opposé (Figure 1.15). La traduction des protéines locales est nécessaire pour plusieurs réponses du cône de croissance (Wu et coll., 2005; Piper et coll., 2006 and Lin et coll., 2007). La traduction locale des ARNm à l'intérieur des cônes de croissance contribue directement au processus de rotation à la fois attractif et répulsif. La signalisation autocrine et l'addition focale de protéines transmembranaires par exocytose ciblée pourraient également jouer un rôle dans la polarisation gauche-droite (Tojima et coll., 2007). La polarisation gauche-droite peut être stabilisée par la capture de microtubules dynamiques à l'aide des protéines associées aux microtubules et l'alignement des microtubules le long des faisceaux d'actine dans la zone périphérique du cône de croissance. La livraison simultanée des protéines liées à l'actine, médiée par les microtubules, ainsi que la régulation positive de la stabilité des microtubules par les filaments d'actine, pourrait agir comme une boucle de rétroaction positive pour maintenir la polarité gauche-droite pendant que le cône de croissance complète un tour (Andersen et coll., 2005). En plus de la protrusion dans la direction du tour, le cône de croissance doit aussi se replier du côté opposé (Loudon et coll., 2006).

Le défi de détecter et de répondre à un gradient demeure omniprésent en biologie. Déterminer comment les événements moléculaires sont régulés temporellement et



spatialement dans le cône de croissance est crucial pour approfondir notre compréhension de la chimiotaxie de cône de croissance.

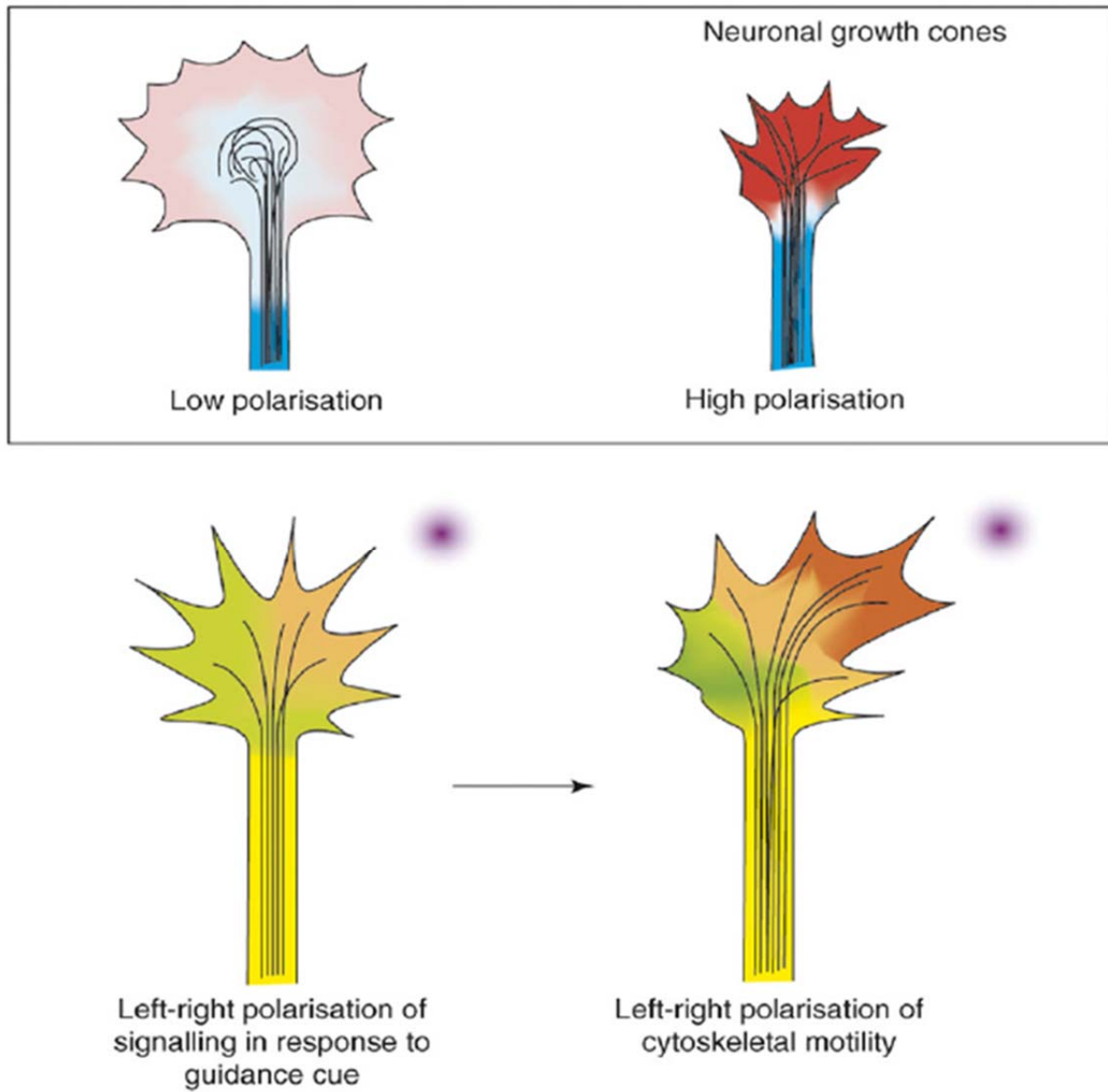


Figure 1.15 Deux modèles de polarisation «avant-arrière» et «gauche –droite»  
(Tirée de Mortimer et coll., 2008)

## **1.6 Guidage axonal et établissement du système visuel**

Le système visuel est l'unique moyen de traitement visuel et cognitif des informations du monde extérieur dans le cerveau. La cellule ganglionnaire est le seul type de cellules neuronales dans la rétine qui envoie des axones de la rétine vers le cerveau. Le guidage axonal représente l'ensemble d'événements par lesquels l'axone sortira de l'œil et atteindra ses cibles dans le cerveau.

Au cours des dernières décennies, les connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du système visuel se sont multipliées grâce à des avancées génétiques et moléculaires majeures. Dans ce chapitre, il sera question des mécanismes contrôlant le guidage axonal dès leur sortie de l'œil jusqu'aux centres visuels primaires, les molécules de guidage impliquées, la différenciation des CGRs, et les processus essentiels de raffinement pour l'établissement de cartes topographiques et la ségrégation axonale.

### **1.6.1 Le système visuel des mammifères**

Le système visuel est formé des yeux et des voies qui les relient au cerveau. La rétine traduit la lumière en signaux nerveux. Elle permet de voir dans des conditions qui vont de l'obscurité à la lumière intense du soleil, de distinguer les couleurs, les formes, le mouvement et de fournir un degré élevé de précision visuelle. La rétine est constituée de trois couches de cellules nerveuses séparées par deux couches contenant des synapses établies entre les axones et les dendrites de ces cellules. La rétine comporte des photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes. La couche de la rétine interne contient trois types de cellules nerveuses, les cellules bipolaires, horizontales et amacrines (Figure 1.16).

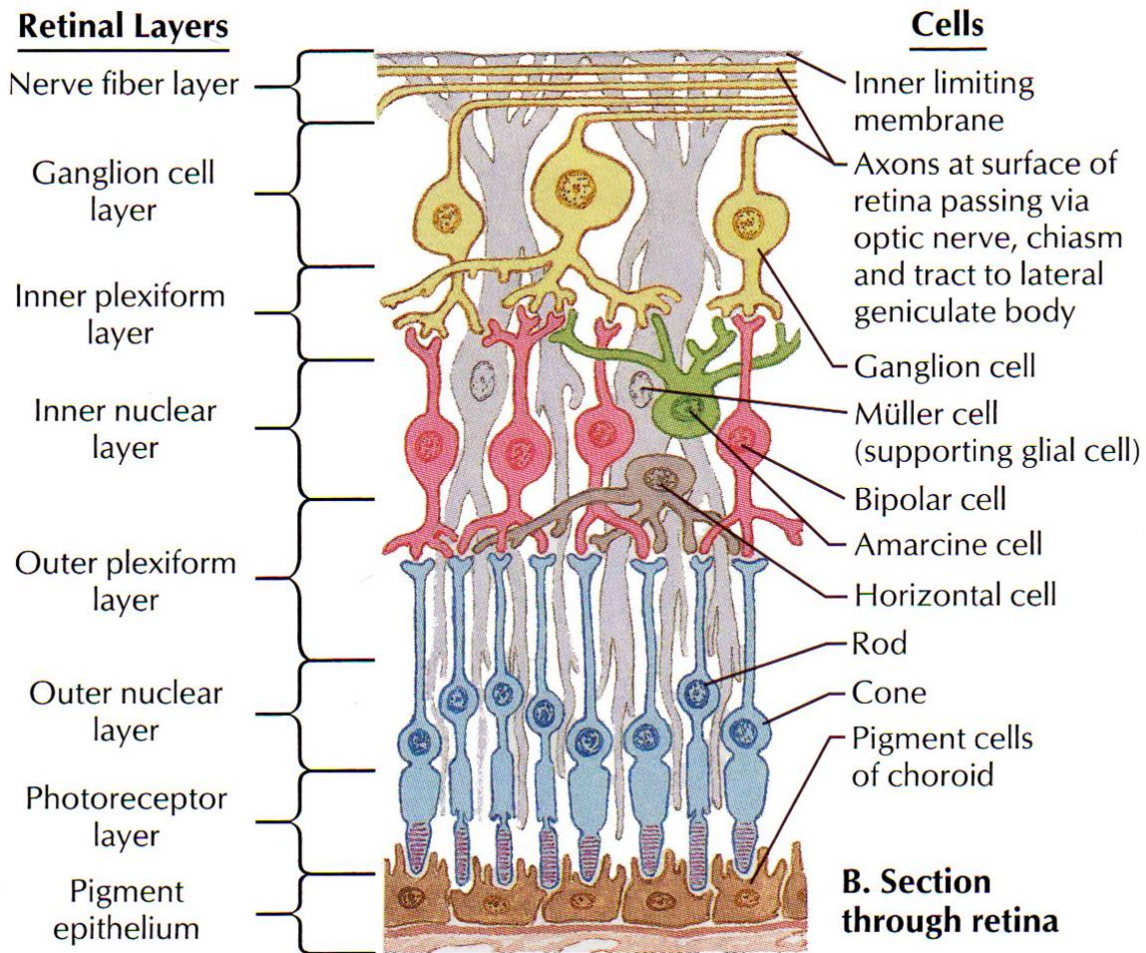


Figure 1.16 Différentes couches de la rétine

(Tirée de [http:// www.corpshumain.ca/en/Vue\\_en.php](http://www.corpshumain.ca/en/Vue_en.php))

Les cellules bipolaires reçoivent le stimulus nerveux des photorécepteurs, et la majorité d'entre elles le transmettent directement aux cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). Les cellules horizontales relient les récepteurs et les cellules bipolaires par des connexions relativement longues qui sont parallèles aux couches rétinienne. Les cellules amacrine lient les cellules bipolaires et les CGRs. Les axones des CGRs passent à la surface de la rétine et se réunissent au niveau du disque optique pour quitter l'œil et former le nerf optique. On

distingue 20 types de CGRs classés selon la morphologie et des critères moléculaires et fonctionnels. Chaque type participe à des circuits distincts de la rétine et projette à un ensemble spécifique de cibles dans le cerveau (Coombs et coll, 2007; Schmidt et coll., 2011). Ces cibles comprennent les principaux noyaux de formation d'image tels que le corps genouillé latéral (CGL), la partie visuelle du thalamus, et le colliculus supérieur (SC), situé dans le toit du mésencéphale, qui coordonne les mouvements rapides de l'œil.

Les axones provenant des deux yeux se rencontrent au chiasma, qui est situé à la base de l'hypothalamus. Chez les primates, les axones des CGRs de la rétine nasale croisent du côté opposé de la tête (controlatérale ou axones commissuraux), tandis que les axones de la rétine temporale envoient des projections à l'hémisphère ipsilatéral (axones ipsilatéraux). L'importance de la vision binoculaire et la position frontale des deux yeux ont été, durant l'évolution, en constante corrélation avec la proportion des axones ipsilatéraux (Jeffery et Erskine, 2005). Chez les primates, le pourcentage d'axones des CGRs ipsilatérales et controlatérales est à peu près égal (60% vs 40%) tandis que dans la souris, seulement environ 3% à 5% de tous les axones des CGRs sont ipsilatéraux. Ceci peut être dû à la position des yeux plus latérale chez ces rongeurs ce qui réduit le degré de chevauchement dans le champ binoculaire. Chez des espèces comme le poussin, les poissons et les têtards xenopus aucun chevauchement ne se produit dans le champ visuel binoculaire et les projections ipsilatérales chez ces animaux sont absentes.

Les voies optiques sont formées de la combinaison des axones ipsilatéraux avec les axones controlatéraux de l'autre œil après le passage du chiasma optique. Un grand nombre d'axones du tractus optique se terminent au corps genouillé latéral (CGL). Le CGL droit reçoit des informations du champ visuel gauche (côté nasal gauche et côté temporal droit de la

rétine), tandis que le CGL gauche reçoit des informations à partir du champ visuel droit (côté nasal droit et côté temporal gauche de la rétine. Chez les carnivores et les primates, le CGL se compose de six couches. Les couches 1, 4, et 6 traitent l'information provenant des fibres du champ visuel temporal de la rétine; les couches 2, 3, et 5 correspondent à l'information des fibres issues du champ visuel nasal de la rétine. Le CGL des rongeurs ne présente aucun motif de stratification évident (Van Hooser et Nelson, 2006). Ainsi, les projections de la rétine sont organisées dans des territoires complémentaires qui ne se chevauchent pas appelés domaines spécifiques oculaires (Godement et coll., 1984). Les relations spatiales entre les CGRs de la rétine sont maintenues afin de former l'image comme une représentation ordonnée (carte) de l'espace visuel. En effet, les cellules ganglionnaires voisines dans la rétine projettent à des cellules voisines dans le CGL et le SC pour former une carte topographique continue qui reflète l'image visuelle perçue par la rétine (Rakic, 1976; Godement et coll, 1984 et Chalupa et Snider, 1998). Du CGL dorsal, les neurones de relais de second ordre, appelés neurones thalamocorticaux, transmettent l'information visuelle vers le cortex, où elle est intégrée avec d'autres modalités sensorielles pour permettre au cerveau d'élaborer les réponses motrices appropriées.

## **1.6.2 Différenciation et axonogenèse des cellules ganglionnaires de la rétine**

### **1.6.2.1 Spécification des cellules ganglionnaires de la rétine**

Les cellules progénitrices rétiniennes multipotentes donnent naissance à la majorité des types cellulaires de la rétine. Chez tous les vertébrés, les CGRs sont les premières à être générées (Young., 1985; Holt et coll., 1988; Wetts et Fraser, 1988 et Turner et coll., 1990).

Chez la souris, la période de naissance des CGRs s'étale du jour embryonnaire (E11) au premier jour postnatal (P0) avec un pic à E14.5 (Drager, 1985 et Hufnagel et coll., 2010). Dans la rétine humaine, la genèse des CGRs commence autour de la cinquième semaine fœtale et se termine autour de la dix-huitième (Pacal et Bremner, 2014), alors que dans les poissons et les amphibiens, ce processus est continu tout au long de la vie.

La transformation des cellules progénitrices en CGRs se produit pendant ou juste après la division finale de la cellule (McLoon et Barnes, 1989; Waid et McLoon, 1995; Prasov et Glaser, 2012; Pacal et Bremner, 2014) sous l'influence de plusieurs facteurs intrinsèques et des signaux de cellule à cellule. La différenciation des CGRs commence dans la rétine centrale et se propage de manière périphérique suivant un mode concentrique (Drager, 1985; Hu et de Pâques, 1999; McCabe et coll., 1999; Neumann et Nuesslein-Volhard, 2000; Martinez-Morales et coll., 2005 et Hufnagel et coll., 2010).

La première différenciation centrale des CGRs est déclenchée par les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF3 et FGF8) libérés par les centres organisateurs de la tige optique et de la rétine neurale (Masai et coll., 2000 et Martinez-Morales et coll., 2005).

La signalisation Delta-Notch joue un rôle important dans la différenciation des cellules progénitrices réiniennes. Le blocage de cette signalisation entraîne une différenciation prématurée et une augmentation ultérieure du nombre des CGRs suite à la polarisation vers une production de CGRs au début de la rétino-genèse (Austin et coll., 1995 et Henrique et coll., 1997).

Les protéines sécrétées reliées à frizzled (Sfrps) régulent de façon négative la signalisation de Notch dans la rétine, par inhibition de la métalloprotéase ADAM10 essentielle

pour l'activité de Notch. Ainsi, les mutants de souris composites pour SFRP1 et SFRP2 ont une neurogenèse rétinienne perturbée (Esteve et coll., 2011).

La signalisation Notch régule la neurogenèse rétinienne en partie par le contrôle de l'expression de gènes essentiels pour spécifier la destinée des cellules, comme *Atoh7* (Maurer et coll., 2014). Le gène bHLH proneural *Atoh7* (précédemment connu sous le nom *Math5*) est essentiel pour la différenciation en CGRs. *Atoh7* est exprimé dans les progéniteurs rétiens coïncidant avec le début de la différenciation CGRs. Chez les souris dépourvues du gène *Atoh7*, quelques CGRs sont générées, mais la majorité des cellules progénitrices optent pour une différenciation en cellule amacrine ou en cône photorécepteur (Brown et coll, 2001 et Wang et coll, 2001). En aval, les cibles d'*Atoh7* sont le domaine POU du facteur de transcription *Brn3b* (POU4F2) et l'homéodomaine LIM du facteur de transcription *Islet-1* (Wang et coll., 2001 et Yang et coll., 2003).

*Brn3b* et *Islet-1* (*Isl1*) sont exprimés par les CGRs pendant ou peu après leur division cellulaire terminale (Prasov et Glaser, 2012; Pacal et Bremner, 2014). Ils agissent dans des voies parallèles, pour activer des gènes essentiels à la différenciation morphologique et à la survie des CGRs (Erkman et coll., 2000; Pan et coll., 2008). *Brn3b* est exprimé dans environ 80% des CGRs naissantes. Les facteurs liés *Brn3a* (*Pou4f1*) et *Brn3c* (*Pou4f3*) sont respectivement exprimés dans environ 80% et 20% des CGRs. Chez la souris, l'expression de *Brn3a* et *Brn3c* dans CGRs commence environ 1 jour après l'expression de *Brn3b* (Xiang et coll., 1995 et Pan et coll, 2005). Bien qu'initialement pensée pour être fonctionnellement équivalente (Pan et coll., 2005), l'utilisation de souris *Brn3a* et *Brn3b* conditionnées a démontré des rôles distincts pour *Brn3a* et *Brn3b* dans le contrôle de l'identité des sous-types de CGRs (Badea et coll., 2009 et Shi et coll., 2013).

Une combinaison de signaux intrinsèques et extrinsèques joue aussi un rôle important dans la conduite de la différenciation des CGRs dans la rétine. Neurog2, un facteur de transcription fortement lié à *Atoh7*, est un facteur clé de la régulation de la progression spatiale et temporelle des CGRs au cours de la neurogenèse de la rétine. FGF1 et le morphogène classique sonic hedgehog (Shh) sont également impliqués dans la propagation de l'onde de différenciation des CGRs dans la rétine (McCabe et coll., 1999; Neumann et Nüsslein-Volhard, 2000). Cependant, le rôle de Shh reste controversé et peut être spécifique à l'espèce. Dans toutes les espèces, Shh, libéré par les CGRs nouvellement générées, peut agir sur les cellules progénitrices neurales indifférenciées pour réguler leur différenciation. La perturbation génétique ou pharmacologique de la signalisation Hedgehog de rétines de poisson zébré n'a pas d'impact sur la première différenciation centrale des CGRs, mais la neurogenèse ne parvient pas à se propager plus loin, démontrant un rôle positif pour la signalisation shh dans la propagation de la différenciation des CGRs chez ces poissons (Neumann et Nüsslein-Volhard, 2000). Cependant, des études chez le poussin et la souris n'ont pas réussi à reproduire cette observation. Elles indiquent plutôt que Shh est un régulateur négatif de la genèse des CGRs chez ces espèces (Zhang et Yang, 2001 et Wang et coll, 2005). Cette différence inter-espèce dans la fonction de Shh lors de la différenciation des CGRs peut être attribuée à des différences de signalisation de Shh ou dans la durée de la neurogenèse.

D'autres facteurs libérés par CGRs modulent la production et la survie des nouvelles CGRs, agissant ainsi par une boucle de rétroaction pour contrôler le nombre de CGRs (Waid et McLoon, 1998 et Gonzalez-Hoyuela et coll., 2001). La liste de ces facteurs n'est pas exhaustive, mais elle comprend le facteur de croissance endothéliale vasculaire-A (VEGF-A), le facteur de croissance analogue épidermique neural (NEL), et le facteur de croissance et



différenciation 11 (Gdf11) (Kim et coll., 2005; Hashimoto et coll., 2006 et Nakamoto et coll., 2014). D'autres études seront nécessaires pour identifier le répertoire complet de signaux extrinsèques essentiels pour la genèse des CGRs.

### **1.6.2.2 Différenciation morphologique des CGRs**

Adjacentes à la surface de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), les CGRs naissantes procèdent à leur division finale, formant des cellules sphériques sans polarité évidente. Dans la rétine jusqu'à la surface vitréenne, ces cellules apolaires génèrent des cellules de morphologie bipolaire. Ces cellules sont fixées aux membranes limitantes interne et externe de la rétine. Le noyau de la CGR migre ensuite vers la surface interne de la rétine. Au cours de cette migration, un axone se prolonge dans la couche de fibre optique. Enfin, la forme cellulaire bipolaire rompt la liaison de son processus apical avec la surface ventriculaire, ce qui produit des CGRs morphologiquement distinctes dans la couche interne de la rétine. La formation de dendrites survient après l'initiation des axones, mais avant l'innervation des cibles (Hinds et Hinds, 1974; Holt, 1989; McLoon et Barnes, 1989; Neige et Robson, 1994 et Zolessi et coll., 2006).

La signalisation Slit-Robo joue un rôle essentiel dans la régulation du processus de retrait apical chez les CGRs en différenciation. L'imagerie confocale en temps réel de la différenciation des CGRs chez des embryons du poisson zébré a démontré que l'émergence de l'axone se produit rapidement de façon très dirigée (Zolessi et coll., 2006). Contrairement à la culture cellulaire où de multiples processus transitoires se déroulent avant le développement de l'axone, *in vivo* les axones apparaissent en l'absence d'autres neurites. L'initiation de l'axone qui se produit indépendamment du processus de rétraction apical (Zolessi et coll.,

2006) est régie par une gamme de signaux extrinsèques. Le blocage de la NFprotocadhérine, ou de la signalisation  $\beta$ -intégrine, chez les CGRs du *Xenopus*, compromet l'initiation et la croissance axonale, démontrant un rôle important dans l'extension de l'axone initial de l'adhésion cellulaire et de la signalisation de l'intégrine (Lilienbaum et coll., 1995, Riehl et coll., 1996 et Piper et coll., 2008). Le réarrangement du cytosquelette est également important comme en témoigne le blocage de la Rho GTPase Rac1 qui inhibe l'axogenèse (Ruchhoeft et coll., 1999).

La polarité initiale de la croissance axonale est contrôlée, du moins en partie, par des signaux de la couche basale de la rétine. Chez le poisson zébré mutant présentant une perturbation de la polarité neuroépithéliale et dans le développement de la lame basale, de nombreuses CGRs ne se polarisent pas normalement et étendent leurs axones de façon aberrante le long de la surface externe du (RPE) de la rétine (Zolessi et coll., 2006). De même, la digestion des composants de la lamina basale de la rétine par la chondroïtine sulfate protéoglycane (CSPG) ou l'ajout de chaînes exogènes CS libres dans une culture de rétines de rat induisent un renversement complet dans la polarité des CGRs, avec des corps cellulaires et des axones situés à côté du RPE (Brittis et coll., 1992 et Brittis et Silver, 1994).

## **1.6.3 Croissance et guidage axonal dans la rétine et à la sortie de l'œil**

### **1.6.3.1 Croissance dans la couche fibre optique**

Après leur initiation, les axones des CGR s'étendent vers leur point de sortie de l'œil, le disque optique, dans une zone étroite de la surface intérieure de la rétine : la couche de fibres optiques. Les propriétés inhibitrices des couches externes de la rétine et la présence de facteurs

de croissance dans les terminaisons des cellules gliales de cette région, limitent la croissance des axones de la rétine à la couche des CGRs (Schlosshauer et Stier, 1995). Le guidage des axones des CGRs au cours de leurs allongements le long de la couche la plus profonde de la rétine a été perdu lorsque les terminaisons gliales radiales ont été éliminées de façon sélective dans les cryo-sections rétiniennes. Ainsi, les terminaisons gliales radiales fournissent un excellent substrat de croissance lorsque les préparations pures de ces terminaisons ont été employées dans les cultures d'explants (Schlosshauer et Stier, 1995).

La molécule d'adhésion cellulaire, NCAM (molécule d'adhésion cellulaire neurale), qui est localisée dans les terminaisons des cellules gliales stimule leur croissance (Halfter et coll., 1987 et Brittis et coll., 1995). Inversement, les protéines Slit sont une composante de l'activité inhibitrice de la rétine externe (Thompson et coll., 2006b). Les axones des CGRs qui expriment le récepteur de Slit : Robo2 (Plachez et al, 2008 et Thompson et al, 2009) sont sensibles à la signalisation inhibitrice de Slit peu de temps après l'axogénèse (Thompson et coll., 2006b).

Chez les souris, Slit1 et Slit2 sont les seuls membres murins de la seule famille Slit qui sont exprimés dans la rétine en développement (Erskine et coll., 2000 et Niclou et coll., 2000). Leur absence ou celle de leur récepteur robo2 induit une projection aberrante des axones des CGRs dans les couches externes de la rétine (Thompson et coll., 2006<sup>b</sup> et 2009). Cependant le faible nombre d'axones dans la rétine externe en absence de la signalisation Robo-Slit implique d'autres facteurs inhibiteurs supplémentaires pourraient prévenir la croissance en dehors de la couche de fibres des CGRs.

### 1.6.3.2 Croissance vers le disque optique

La croissance dans la couche de fibres des CGRs est très organisée et dès le début, elle est dirigée vers le disque optique. Cependant, les axones aberrants des CGRs dans la rétine externe dans les souris mutantes Slit 1, Slit2 ou Robo2 (Thompson et coll., 2006<sup>b</sup>) ou ceux du poisson zébré nok de polarité rétinienne défectueuse (Zolessi et coll., 2006) continuent leurs prolongements vers le disque optique et quittent l'œil. Ceci suggère que les signaux responsables de la croissance dirigée dans le disque ne sont pas restreints à la couche des fibres des CGRs.

Avant l'axogenèse, le neuro-épithélium rétinien inhibe la croissance axonale (Halfter, 1996). Parce que la neurogenèse de la rétine est initiée dans la rétine centrale et se propage en périphérie, les CGRs nouvellement différenciées sont bordées par une zone d'inhibition périphérique et une région permissive centrale, qui aidera à assurer que la croissance de l'axone soit dirigée vers le centre depuis le début. Chez les rongeurs, les propriétés inhibitrices du neuro-épithélium rétinien corrélerent avec une vague de recul centre-périphérie des CSPGs. La vague des CSPGs qui passe sur les cellules du neuro-épithélium indifférencié aide à contrôler le moment de la genèse des CGRs et la signalisation inhibitrice dirige la croissance des axones loin de la périphérie de la rétine, directement vers le disque optique (Brittis et coll., 1992).

Les facteurs inhibiteurs, tels que Slit2 sécrétée par le cristallin, aident également à ce que la croissance des axones des CGRs soit dirigée centralement depuis le début (Ohta et coll., 1999 et Thompson et coll., 2006b). Dans les rétines de poussin et sous le contrôle du facteur de transcription ZIC3, des facteurs inhibiteurs s'assurent de la croissance des axones en

direction centrale (Zhang et coll., 2004). Une gamme des molécules d'adhésion cellulaire tels que L1, NrCAM, et BEN (également appelé DM-GRASP/ SCI/ Neurolin) agissent de concert avec les forces inhibitrices poussant les axones des CGRs de la périphérie de la rétine, entraînant leur croissance centrale. Le blocage de la fonction de ces molécules dans les rétines de poussin, de poissons ou de rongeurs altère le regroupement étroit des axones des CGRs et la croissance dirigée vers le disque de certains axones (Brittis et coll., 1995, Ott et coll., 1998 et Weiner et coll., 2004).

Shh est un autre facteur impliqué dans la promotion de la croissance dirigée vers le disque. Comme mentionné ci-dessus, Shh est exprimé dans un gradient rétinien élevé au centre et faible en périphérie, ce qui correspond au modèle de différenciation des CGRs. *In vitro*, Shh peut agir directement sur les axones des CGRs en fonction de sa concentration afin de promouvoir ou inhiber leur croissance (Kolpak et coll., 2005). La surexpression ou la perte de fonction de Shh dans les rétines de poussins entraîne une perte complète de la croissance dirigée vers le disque (Kolpak et coll., 2005). De même, chez la souris, le blocage de signalisation de Shh dans les CGRs par électroporation compromet la croissance des axones dans la région du disque optique induisant la croissance de nombreux axones parallèlement au disque ou dans la rétine périphérique (Sanchez-Camacho et Bovolenta, 2008).

Les facteurs de transcription tels que Brn3b et Pax6 jouent aussi un rôle dans la différenciation des CGRs. Ils sont également impliqués dans le contrôle de la croissance des axones des CGRs vers le disque optique (Erkman et coll., 2000 et Manuel et coll., 2008). Chez les souris dépourvues de Brn3b ou exprimant des copies multiples de PAX6 humain, la fasciculation axonale est altérée, avec des trajectoires axonales anormales à l'intérieur de la rétine à défaut d'atteindre le disque optique (Erkman et coll., 2000 et Manuel et coll., 2008).

### 1.6.3.3 La croissance hors de l'œil

Arrivés au disque optique, les axones changent de 90° leur sens de croissance pour quitter l'œil. Le développement normal et la structuration du disque optique sont essentiels pour la croissance de l'œil. Chez certaines souris mutantes où le développement du disque optique est perturbé, de nombreux axones des CGRs ne parviennent pas à sortir de l'œil. Cela se produit chez le mutant hétérozygote KRD (avec des défauts rétiniens et rénaux, Otteson., et al, 1998) ou le mutant BST (spot du ventre et de la queue; Rice et coll., 1997), les mutants conditionnels ayant une carence en shh au niveau des CGRs (Dakubo et coll., 2003) ou les mutants de TBX2 (Behesti et coll., 2009). De même, les souris avec récepteur BMP 1B muté ont une expression perturbée des signaux de guidage au niveau du disque optique, ce qui altère la sortie des axones des CGRs de l'œil (Liu et coll., 2003).

La nétrine-1, agissant avec son récepteur DCC, est la molécule de signalisation clé essentielle pour la croissance hors de l'œil des axones des CGRs (Deiner et coll., 1997). La nétrine-1 se localise dans la glie du disque optique. En stimulant la croissance, elle exerce un effet attractif sur les axones des CGRs (Deiner et coll., 1997 et De la Torre et coll., 1997). Les axones rétiniens des souris dépourvues de nétrine-1 ou de son récepteur DCC, poussent normalement vers le disque optique, mais ne parviennent pas à sortir de l'œil, entraînant une hypoplasie du nerf optique (Deiner et coll., 1997). Contrairement à la moelle épinière où l'effet attractif sur les axones commissuraux est de longue portée (Kennedy et coll., 1994), la nétrine-1 agit localement dans la rétine pour diriger l'orientation vers le disque optique.

Malgré son effet attracteur, les axones des CGRs se détournent du taux élevé de nétrine-1 à la surface du disque optique vers le nerf optique. Hopker et al ont démontré que

chez le *Xenopus*, les changements au niveau des taux d'AMPc des cônes de croissance provoqués par le contact, avec la laminine-1, protéine de la matrice extracellulaire, convertissent l'attraction médiée par la nétrine-1 en répulsion véhiculant ainsi le cône de croissance hors de l'œil (Hopker et coll., 1999). À l'entrée du disque optique, la laminine-1 est localisée à la surface de la rétine. La diminution des taux d'AMPc du cône de croissance induit une signalisation inhibitrice de la nétrine-1 colocalisée dans cette région, entraînant la conduite des axones dans les régions les plus profondes du disque optique.

La localisation et la fonction de la nétrine-1 dans l'œil peuvent être également modulées par les héparane sulfate protéoglycanes (HSPG). *In vitro*, l'activité de croissance favorisée par la nétrine-1 est réduite dans les axones des CGRs déficients en HSPG. De même, les souris avec une synthèse défectueuse de HSPG dans la rétine affichent une gamme d'erreurs dans le guidage axonal des CGRs, y compris un retard de croissance hors de l'œil (Ogata-Iwao et coll., 2011). La signalisation inversée par EphBs agissant comme molécules de guidage inhibitrices peut guider les axones dorsaux des CGRs, mais pas les ventraux vers le disque optique et hors de l'œil (Figure 1.17-A). (Birgbauer et coll., 2000).

## **1.6.4 Guidage axonal au niveau du chiasma**

### **1.6.4.1 Les déterminants cellulaires et moléculaires du trajet général vers et à travers le chiasma**

Une fois que les axones des CGRs quittent l'œil, ils s'allongent parmi les cellules gliales intrafasciculaires du nerf optique (Silver, 1984). Sema5A et Slit2 sont exprimés par les cellules gliales du nerf optique. Grâce à une signalisation inhibitrice, ils aident à limiter les

axones des CGRs au sein du nerf optique et en assurent le regroupement (Plump et coll., 2002 et Oster et coll., 2003).

Le facteur de transcription Vax1 est également exprimé par les cellules gliales du nerf optique ainsi que dans le diencephale ventral. Il est nécessaire à la croissance des axones rétiniens du nerf optique pour former le chiasma. Chez les souris dépourvues de Vax1, les axones des CGRs ne parviennent pas à former le chiasma (Bertuzzi et coll., 1999).

La protéine Vax1 est sécrétée par les cellules du diencephale ventral et, indépendamment de l'activité de son facteur de transcription, peut favoriser la croissance axonale des CGRs, d'où cette possibilité étonnante : Vax1 pourrait agir directement sur les cônes de croissance des axones des CGRs comme un signal d'orientation essentiel pour la formation du chiasma (Kim et coll., 2014).

Une fois que les axones atteignent le chiasma, l'organisation des cellules gliales change d'intrafasciculaire à radiale (Colello et Guillery, 1992 et Marcus et coll, 1995). Une population de neurones diencephaliques exprimant l'antigène SSEA-1 de surface cellulaire (antigène-1 spécifique au stade embryonnaire) et CD44 sont également présents dans le chiasma murin (Figure 1.17-B). Ces neurones constituant un réseau en forme de V inversé qui définit le bord postérieur du chiasma. Ces neurones s'étendent le long de la ligne médiane (Sretavan et coll., 1994; Marcus et coll., 1995). L'ablation de ces neurones induit un décrochage des axones des CGRs à leur entrée dans le cerveau ce qui résulte en un échec dans la formation du chiasma (Sretavan et coll., 1995).

Comme ils s'étendent vers et à travers le chiasma optique, les axones CGRs sont délimités par des signaux inhibiteurs Slit qui jouent un rôle essentiel dans la définition de la



trajectoire précise suivie par les axones (Figure 1.17-B). Chez la souris ou le poisson zébré, le manque de signalisation Slit-Robo cause l'errance de nombreux axones loin de leur voie normale (Fricke et coll., 2001; Plump et coll., 2002 et Plachez et coll., 2008).

La signalisation Slit au chiasma est modulée par HSPG et les taux d'AMPC intracellulaires. HSPG sert à la fois à localiser les Slits dans la matrice extracellulaire (Wright et coll., 2012). Ils sont aussi nécessaires pour les réponses des cônes de croissance des axones des CGRs à Slits (Piper et coll., 2006 et Pratt et coll., 2006). Chez la souris ou le poisson zébré mutants où la biosynthèse des HSPG est perturbée (EXT1: Inatani et coll., 2003; Hs6st1, Hs2st: Pratt et coll., 2006; Conway et coll., 2011; dak / ext2; boîte / extl3: composé mutants Lee et coll., 2004), les axones des CGRs commettent des erreurs de guidage au chiasma optique qui ressemblent, en partie, au phénotype observé chez les mutants Slit et Robo2.

La chimiokine SDF-1 n'a pas d'effet sur la croissance axonale par elle-même. Cependant, SDF-1 réduit l'activité inhibitrice de multiples signaux de guidage, y compris Slit, en agissant avec son récepteur CXCR4 pour élever les niveaux d'AMPC du cône de croissance (Chalasanani et coll., 2003). SDF-1 peut moduler la signalisation Robo-Slit. *In vivo*, le blocage soit de SDF-1 ou de son aval de signalisation, l'ADCY8 (adénylcyclase 8), préserve les axones des CGRs des erreurs de guidage des mutants de poissons zébrés avec une perte partielle de la fonction de Robo2 (Chalasanani et al, 2007 et Xu et al, 2010).

La modulation des réponses de guidage induite par les métalloprotéases, y compris la signalisation de Slit, est également impliquée dans le guidage axonal des axones des CGRs dans le chiasma (Webber et coll., 2002 et Hehr et coll., 2005). En plus de Slit et de leurs

modulateurs, d'autres facteurs y compris Shh et CSPG sont impliqués dans la délimitation de la trajectoire suivie par les axones des CGR au cours de leur croissance à travers le chiasma.

Shh est exprimé dans l'ensemble du système nerveux central (SNC) médian, à l'exception du petit espace où le chiasma optique se développe. Ainsi, les axones des CGRs s'étendent normalement à travers la ligne médiane dans la région exempte de Shh, avec des niveaux élevés de Shh en bordure antérieure et postérieure du chiasma (Marcus et coll., 1999 et Trousse et coll., 2001). Cet écart dans l'expression de Shh est indispensable pour que l'axone de la CGR progresse normalement à travers la ligne médiane. Chez les mutants PAX2, ou des mutants de poisson zébré de FGF8/ace avec une expression de Pax2 perturbée, Shh est exprimé tout le long de la ligne médiane du CNS sans espace dans la région du chiasma. Dans ces mutants, les axones des CGRs ne peuvent plus croître à travers la ligne médiane, mais projettent ipsilatéralement (Torres et coll, 1996; Macdonald et coll., 1997 et Shanmugalingam et coll., 2000).

Le blocage de la signalisation de Shh dans des embryons de souris *in vivo* au cours de la période où le développement du chiasma n'a pas d'impact grave sur les motifs de la rétine ou du diencephale. Par contre, il peut en résulter plusieurs défauts de guidage des axones des CGRs : la défasciculation, une augmentation de la surface occupée par les axones controlatéraux ayant franchi la ligne médiane, une augmentation du nombre d'axones s'étendant ipsilatéralement et dans la partie controlatérale du nerf optique (Sanchez-Camacho et Bovolenta, 2008). Ainsi, comme Slits bordant le chiasma, Shh aide à contraindre les axones des CGRs à suivre la voie appropriée lorsqu'ils s'allongent dans le chiasma Les CSPGs sont exprimées par les neurones qui définissent la frontière postérieure du chiasma. Le traitement de la culture de tranches du diencephale-ventral de la rétine avec chondroïtinase ABC aboutit

à une désorganisation de la croissance au chiasma, y compris des axones traversant à des endroits aberrants, et errant loin de leur voie normale (Chung et coll., 2000). Reste à déterminer si les CSPGs agissent directement sur la croissance des axones des CGRs au chiasma, ou grâce à la modulation d'autres signaux de guidage comme Slit ou Shh.

#### **1.6.4.2 Mécanismes moléculaires pour traverser la ligne médiane du chiasma**

Dans toutes les espèces, la majorité des axones des RGCs projettent controlatéralement au chiasma. Malgré l'absence de molécules chimioattractives telles que, la nétrine-1 (Kennedy et coll., 1994) et Shh (Charron et coll., 2003) sur la ligne médiane diencephalique de la moelle épinière (Deiner et Sretavan, 1999; Marcus et coll., 1999 et Trousse et coll., 2001) et l'inhibition par Shh de la croissance des axones controlatéraux des CGRs (Trousse et coll., 2001 et Sanchez-Camacho et Bovolenta, 2008), l'action de nombreuses molécules est essentielle pour assurer le passage à la ligne médiane du chiasma.

La molécule d'adhésion cellulaire NrCAM, une des premières protéines essentielles à la traversée de la ligne médiane au chiasma, est exprimée à la fois par les CGRs projetant controlatéralement et par les cellules gliales de la ligne médiane ventrale (Williams et coll., 2006). Chez les souris dépourvues de NrCAM, un petit nombre d'axones de CGRs générés tardivement projetant controlatéralement ne parviennent pas à traverser la ligne médiane alors que la majorité des axones contralatéraux traversent normalement. De plus, des expériences *in vitro* ont montré que, lorsqu'agissant seul, NrCAM est nécessaire exclusivement dans la rétine pour promouvoir la croissance des axones des CGR dans le chiasma (Williams et coll., 2006). Toutefois, des expériences ultérieures ont démontré que NrCAM, au niveau du chiasma, agit

en association avec Sema6D et Plexin-A1 sur les neurones exprimant SSEA-1 pour favoriser la croissance des axones controlatéraux des CGRs (Kuwajima et coll., 2012).

La neuropiline-1 (NRP1), un isoforme de liaison du facteur de croissance vasculaire classique VEGF-A, est le premier facteur de la ligne médiane présentée comme agent chimioattractif et promouvant la croissance des axones controlatéraux au chiasma (Erskine et coll., 2011). Chez les souris mutées pour NRP1 ou exprimant seulement l'isoforme VEGF120 qui ne peut pas signaler avec NRP1, la taille des projections ipsilatérales est augmentée sensiblement. Cette augmentation est due à une défaillance des axones controlatéraux à franchir la ligne médiane. NRP1 est également important pour la croissance axonale des CGRs controlatérales du poisson zébré (Dell et coll., 2013). Cependant, dans cette espèce, le ligand identifié est un partenaire classique de NRP1 lors de la signalisation dans le système nerveux, la sémaphorine (Sema) 3D (Sakai et Halloran, 2006).

Contrairement aux souris, où la signalisation des sémaphorines par les neuropilines n'est pas indispensable pour le développement du chiasma (Erskine et coll., 2011), la désactivation génétique de sema3d chez le poisson zébré aboutit à un décrochage des axones dans le tractus optique proximal et à des projections ipsilatérales aberrantes (Sakai et Halloran, 2006). Les Sema3d sont exprimées dans les parties antérieure, postérieure, et dorsale du chiasma en développement. Elles ne sont pas nécessaires pour la traversée de la ligne médiane, mais pour la croissance du chiasma dans le tractus optique proximal (Sakai et Halloran, 2006).

Les souris dépourvues de GAP-43 (protéine associée à la croissance-43) affichent un défaut de guidage des axones des CGRs du chiasma au tractus optique proximal (Strittmatter et coll., 1995). La GAP-43 est une protéine intracellulaire abondante du cône de croissance qui

est phosphorylée par la PKC en réponse à des molécules de guidage extracellulaires, ce qui entraîne la modulation du cytosquelette d'actine du cône de croissance. Bien exprimée à la fois par les cônes de croissance des CGRs et par les cellules le long de la voie optique, sur la base d'expériences de transplantation, GAP-43 est nécessaire pour l'interaction autonome normale des cônes de croissance des CGRs avec les cellules d'encéphaliques qui tapissent le tractus optique proximal. Ainsi, la formation appropriée du tractus optique contralatéral nécessite des facteurs à la fois promouvant le passage de la ligne médiane, comme le VEGF-A, ainsi que des molécules qui permettent la croissance du chiasma dans le tube proximal.

L'expression de NRP1 dans différents types de neurones, y compris les CGRs du poisson zébré et les neurones sensoriels et olfactifs de mammifères, est réglementée au niveau transcriptionnel par les taux d'AMPc intracellulaire (Imai et coll., 2006 et Dell et coll., 2013). La baisse des niveaux d'AMPc chez le poisson zébré par expression d'un dominant négatif (DN) de la sous-unité de la protéine G (DN<sub>G</sub> / OLF) réduit les niveaux d'ARNm de *Nrp1a* et *Nrp1b* dans les CGRs. Il en résulte des erreurs de guidage des axones des CGRs qui copient le phénotype observé chez l'animal ayant *Nrp1a* muté, ou son ligand au chiasma *sema3d* et *sema3e* chez le poisson zébré (Dell et coll., 2013). Ainsi, l'AMPc peut agir en deux volets distincts pour moduler le guidage axonal des CGRs. Tout d'abord, l'AMPc peut agir rapidement pour modifier la réponse des cônes de croissance des signaux de guidage, en changeant des réponses d'attraction en répulsion et vice versa (Song et coll., 1998; Hopker et coll., 1999; Chalasani et coll., 2003; Chalasani et coll., 2007 et Xu et coll., 2010). D'autre part, l'AMPc peut agir sur une période de temps plus longue afin de réguler la transcription de gènes codant pour les récepteurs impliqués dans le guidage axonal, tels que NRP1. Contrôlant

ainsi la capacité du cône de croissance pour répondre à des signaux environnementaux spécifiques (Dell et coll., 2013).

#### **1.6.4.3 Mécanismes moléculaires pour éviter la ligne médiane du chiasma**

Chez les mammifères et d'autres espèces ayant une vision binoculaire, tels que le *Xenopus* post métamorphique, une population de CGRs projette à l'hémisphère ipsilatéral au lieu de traverser la ligne médiane au chiasma optique. Les axones ipsilatéraux des CGRs atteignent la ligne médiane, mais arrivés là, ils sont repoussés par les effets répulsifs provenant de cellules gliales et d'autres cellules du diencephale ventral. Une des familles de molécules de guidage impliquées dans cet évitement de la ligne médiane sont les éphrines et leurs récepteurs tyrosine kinase, les Ephs. Les axones ipsilatéraux des CGRs expriment des niveaux élevés d'EphB1, tandis que les cellules gliales à la ligne médiane expriment son ligand, l'éphrineB2 (Williams et coll., 2003).

Lorsque les axones ipsilatéraux s'approchent des cellules gliales du chiasma, la liaison de EphB1 à l'éphrineB2 médie une réponse répulsive qui provoque le guidage des axones ipsilatéraux loin de la ligne médiane (Williams et coll., 2003 et Petros et coll, 2009).

Des analyses poussées de souris knockout EphB et éphrine-B ont démontré que, en dépit de la co-expression de l'EphB2 dans les axones des CGRs projetant ipsilatéralement, l'éphrine-B2 préfère l'EphB1 comme récepteur (Chenau et Henkemeyer, 2011). L'expression de l'EphB1 dans les CGRs ipsilatéraux est contrôlée par le facteur de transcription à doigt de zinc ZIC2 (Garcia-Frigola et coll., 2008), un des principaux déterminants de l'évitement, par les axones, de la ligne médiane dans le SNC (Herrera et coll., 2003 et Escalante et coll., 2013). Le facteur de transcription Islet-2 (ISL2) est exprimé par un ensemble de CGRs controlatérales

à travers la rétine, mais il est nécessaire dans la région de chevauchement binoculaire dans le champ visuel pour réprimer l'expression de ZIC2 / EphB1 (Pak et coll., 2004).

La signalisation médiée par Shh, à travers l'un de ses récepteurs Boc, est également impliquée dans la génération des projections ipsilatérales. Boc est exprimé dans les CGRs ipsilatérales, mais pas dans les controlatérales. De son côté, Shh est sécrété par les CGRs controlatérales et aussi par le diencephale ventral médian à l'exception d'où se développe le chiasma (Trousse et coll., 2001 et Sanchez-Camacho et Bovolenta, 2008).

Alors que la signalisation Shh au niveau du chiasma semble être importante pour inhiber le guidage axonal des axones ipsilatéraux (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008 et Fabre et coll., 2010), l'activation de Boc dans la rétine module la spécification des CGRs ipsilatérales. En absence du récepteur Boc, les CGRs ipsilatérales ne se différencient pas proprement et par conséquent, il se produit une diminution, dépendante du temps, du nombre des CGRs positives pour Zic2 et une augmentation du nombre des CGRs exprimant Isl2 dans la rétine ventrotemporale (Sanchez-Arrones et coll., 2013).

Les teneurines (Ten-m/Odz) composent une famille de protéines transmembranaires de type II médiant l'adhésion par reconnaissance homophile (Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2006 et Tucker et coll., 2011). Tenm3, un membre de cette famille, a été proposé comme modulateur de la génération de circuits visuels binoculaires chez la souris (Leamey et coll., 2007 et Dharmaratne et coll., 2012). Les souris *Ten-m3* KO montrent des anomalies dans la cartographie des projections ipsilatérales ce qui entraîne des défauts d'alignement de la carte binoculaire et des déficits en exerçant des tâches comportementales nécessitant la vision.

Récemment, *Antinucci et coll.*, ont décrit le rôle de Ten-m3 dans la spécification et la lamination des CGRs (*Antinucci et coll.*, 2013).

Nogo, un inhibiteur potentiel de la croissance des neurites est exprimé par les cellules gliales radiales de la ligne médiane. Il participe au guidage des axones dans la voie ipsilatérale. Le blocage de la fonction du récepteur Nogo (NogoR) dans une préparation semi-intacte du système visuel en développement a pour résultat la réduction de la taille des projections ipsilatérales. Suite à une régulation à la baisse de Nogo, aucun effet n'est observé sur les projections controlatérales *in vivo*; *in vitro* la croissance des projections présomptives ipsi et contro est inhibée (*Wang et coll.*, 2008). NogoR est exprimé dans les CGRs ipsilatérales et controlatérales. Considérant la difficulté de distinguer entre les axones qui ont navigué dès le début à travers le chiasma et ceux qui l'ont traversé pendant la période du traitement, il est juste possible que l'effet sur les projections controlatérales ne soit pas détecté. D'autres études sont nécessaires pour élucider le rôle de la signalisation Nogo dans le développement du chiasma optique.

### **1.6.5 Navigation axonale à travers le tractus optique et reconnaissance des cibles**

À la sortie du chiasma, les axones des CGRs se prolongent de façon dorso-caudale dans le tractus optique sur la surface du diencephale afin d'atteindre leurs principales cibles : le noyau géniculé latéral (LGN) et le collicule supérieur (SC) chez les mammifères et le tectum chez les vertébrés inférieurs. Malgré leur extension adjacente au télencéphale quand ils projettent dans le tractus optique, les axones des CGR de toutes les espèces ne pénètrent pas dans ce tissu. La signalisation Slit-Robo, comme au niveau du chiasma, joue un important rôle



de garde-fou aidant à définir de façon précise la voie suivie par les axones des CGRs lors de leur prolongement à travers le tractus optique.

Les Slits sont exprimées au diencephale et dans le télencéphale bordant le tractus optique (Ringstedt et coll., 2000; Hutson and Chien, 2002 et Thompson et coll., 2006a). Chez la souris ou le poisson zébré avec délétion de Slit-Robo, plusieurs axones s'éloignent de leur voie normale et projettent dans le télencéphale et dans d'autres régions aberrantes du cerveau (Fricke et coll., 2001; Thompson et coll., 2006<sup>a</sup> et Plachez et coll., 2008).

La  $\beta$ 1-intégrine et la N-cadhérine, des modulateurs de la voie Slit-Robo (Rhee et coll., 2002 et Stevens & Jacobs, 2002), sont également importants pour restreindre le trajet des axones des CGRs aux voies optiques (Stone et Sakaguchi, 1996). D'autres facteurs inhibiteurs comme Shh (Gordon et coll., 2010), CSPGs (Ichijo et Kawabata, 2001 et Walz et coll., 2002), et la ténascine-R (Becker et coll., 2003) maintiennent les axones des CGRs dans la voie normale et le blocage de l'expression ou de la fonction d'une de ces molécules, *in vivo*, entraîne une déviation des axones des CGRs du tractus optique.

*Sfrp-1* est aussi impliqué dans le guidage de la croissance dans le tractus optique. Il est exprimé dans la région du développement du tractus optique et peut agir directement sur les axones des CGRs, via une protéine G et l'AMPc, soit pour stimuler ou inhiber la croissance axonale. La surexpression de *sfrp-1* chez le *Xenopus* induit de graves erreurs de guidage dans le tractus optique, par exemple, des axones s'étendant loin du tractus et des aberrations dans la direction de la croissance (Rodriguez et coll., 2005).

La signalisation FGF joue également un rôle important dans l'orientation des axones des CGRs vers et dans leurs cibles. Le FGF-2 peut agir directement sur les axones en

promouvant la croissance axonale (McFarlane et coll., 1995). Le niveau de croissance des axones des CGRs chez le *Xenopus* exprimant le dominant négatif du FGFR est plus lent que la normale et les projections évitent le tectum au lieu d'y entrer (McFarlane et coll., 1996). La signalisation FGF agit aussi indirectement pour contrôler le développement du tractus optique à travers la régulation de l'expression d'autres molécules de guidage. Chez le *xenopus*, la *Slit1* et la *Sema3A* sont exprimés dans le mi-diencephale, dans la région où les CGRs tournent caudalement vers le tectum (Campbell et coll, 2001 et Atkinson-Leadbeater et coll, 2010). L'inhibition de la fonction de FGFR dans le neuroépithélium du tractus optique induit une baisse rapide de *Slit1* et des niveaux d'expression de *Sema3A* : les axones des CGRs n'arrivent pas à dépasser le mi-diencephale. La double délétion de *Slit1* et *Sema3A*, mais pas la simple, induit des défauts de guidage axonal similaires à la perte de la signalisation FGF dans le neuroépithélium (Atkinson-Leadbeater et coll., 2010).

La reconnaissance de la cible peut également dépendre de la signalisation de la sphingosine-1-phosphate (SP1) dans les cônes de croissance des CGRs (Strochlic et coll., 2008). La SP1 est exprimée à travers le tractus optique du *xenopus* en développement et peut agir directement sur les cônes de croissance des CGRs pour induire des réponses de répulsion. Le blocage de la synthèse de la SP1 dans la zone du tractus optique en développement induit le contournement du tectum par plusieurs axones.

Les HPSGs sont également des modulateurs clés de la signalisation de *Slit*, FGF et SP1 et jouent des rôles importants dans le développement du tractus optique. L'ajout d'HSS exogènes, le traitement par l'enzyme héparitinase, ou l'inhibition de la sulfatation endogène de l'HSS induisent des défauts d'extension des axones des CGRs et des défauts de guidage tectal (Walz et coll., 1997 et Irie et coll., 2002).

Chez la souris et le poisson zébré, NRP1 se localise dans les axones des CGRs, dès les premiers stades de développement, jouant un rôle dans l'orientation exacte au chiasma (Erskine et coll, 2011 et Dell et coll, 2013). Le xenopus exprime NRP1 seulement dans les cônes de croissance et devient réactif à Sema3A seulement à des stades ultérieurs, correspondant au moment où les axones des CGRs atteignent le tractus optique (Campbell et coll., 2001).

Les cônes de croissance des CGRs du xenopus affichent des réponses très dynamiques à des signaux importants pour le guidage et la croissance le long du tractus optique, modulés par des changements intrinsèques des niveaux d'AMPc (Shewan et coll., 2002). Le calendrier d'expression du récepteur étant contrôlé par des microARNs (Baudet et coll., 2012), et la traduction locale des protéines induite par les molécules de guidage (Leung et coll., 2013).

### **1.6.6 Raffinement dans les cibles visuelles**

Arrivés au SC, avant la naissance chez les rongeurs, les premiers cônes de croissance des axones des CGR entrent dans la cible et projettent postérieurement en bombardant de projections leur future zone terminale (Nakamura et O'Leary, 1989 et Simon et O'Leary, 1992). Puis les branches interstitielles commencent à se former le long de l'axone. Les branches néoformées projettent, préférentiellement le long de l'axe latéral médian vers leur future zone terminale (Nakamura et O'Leary, 1989 et Simon et O'Leary, 1992; Charnières et coll., 2002 et McLaughlin et coll., 2003<sup>a</sup>). Dans une deuxième phase, les segments d'axones de CGR qui sont en position distale par rapport à la zone terminale appropriée sont éliminés. Parallèlement, des arborisations complexes continuent de croître dans la zone terminale appropriée. Par conséquent, les cartes topographiques et les couches spécifiques de l'œil dans

les cibles visuelles émergent en totalité avant le début de l'expérience visuelle (Chapman et Stone, 1996; Chapman et coll., 1996a; Issa et coll., 1999 et White et coll., 2001). La maturation de ces cartes topographiques et des cartes spécifiques de l'œil prend graduellement place au cours des deux premières semaines suivant la naissance de la souris.

### **1.6.6.1 Mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la carte topographique et des arborisations axonales**

Selon plusieurs études indépendantes, les éphrines et leurs récepteurs Ephs contrôlent majoritairement la formation de la carte rétinotopique des principales cibles visuelles. EphrinAs et ephrinBs sont exprimés dans la rétine et les cibles visuelles. Les CGRs expriment les récepteurs EphA dans un gradient temporal élevé / nasal faible. Leurs ligands éphrinesA, liés à la membrane cellulaire par une ancre glycosylphosphatidylinositol, sont fortement exprimés dans la partie caudale du collicule supérieur et faiblement dans les aires rostrales. Les axones exprimant des niveaux élevés d'EphAs sont incapables de poursuivre dans la partie postérieure du SC à cause de la répulsion produite par les éphrines qui les forcent à continuer dans la partie antérieure du SC (Figure 1.17-C). (Frisen et coll., 1998; Feldheim et coll., 2000 et Carreres et coll., 2011). L'expression ectopique du récepteur EphA3 dans le locus Isl2 démontre que la cartographie topographique rostro-caudale est générée par des niveaux relatifs, plutôt qu'absolus, des récepteurs EphA dans les CGRs (Brown et coll., 2000). La répulsion par l'éphrineA5 du collicule exercée sur les axones temporaux semble être accentuée par le facteur de transcription Engrailed (Brunet et coll., 2005). Engrailed, exprimé dans le SC (Wizenmann et coll., 2009), stimule le récepteur adénosine-A1 (A1R) présent en concentrations élevées dans la région temporale et faible dans la région nasale du cône de croissance. A1R est couplé à une protéine G. Sa stimulation par Engrailed inhibe l'activité de

l'adénylate cyclase 1 (AC1; Stettler et coll., 2012), ce qui est nécessaire à l'émergence de zones terminales cibles et l'élimination du ciblage imprécis au niveau individuel des axones (Dhande et coll., 2012). L'activation de l'AC1 diminue l'accumulation d'AMPc et stimule la synthèse et la sécrétion rapide d'ATP à partir des cônes de croissance. Suivant le gradient (élevé-nasal/ bas temporal), l'éphrineAs est exprimée dans la rétine (Marcus et coll., 1996). Les EphAs sont exprimés dans le SC dans le sens opposé au gradient d'éphrineAs (Rashid et coll., 2005). Cette signalisation inverse, éphrinesA rétiniennes agissant comme récepteur et EphA du collicule agissant comme ligands, peut jouer un rôle dans l'établissement de la carte topographique. Ceci est renforcé par la surexpression de l'éphrineA5 dans la rétine centrale qui entraîne la projection erronée de ces neurones dans la partie caudale du SC (Carreres et coll., 2011). Cependant la perturbation de la cartographie topographique de souris mutées pour l'EphA7, exprimé dans le SC et non dans le tissu rétinien (Rashid et coll., 2005), et l'augmentation des niveaux d'EphAs dans le SC provoquant des erreurs de projection des axones nasaux vers des positions plus postérieures (Yoo et coll., 2011) démontrent que les éphrineAs ne possèdent pas un domaine intracellulaire. Elles sont cependant capables de déclencher la signalisation intracellulaire par l'association avec d'autres protéines transmembranaires. Par exemple, la neurotrophine BDNF favorise le branchement interstitiel *in vitro* par un mécanisme dépendant de TrkB (Marler et coll., 2008). Sur les axones des CGRs, les éphrineAs interagissent également avec un autre récepteur de BDNF, le p75 (Lim et coll., 2008). Aussi, le BDNF contrôle la ramification axonale des CGRs via le microARN (miARN-132), qui inhibe la p250GAP, une GTPase qui supprime la fonction Rac. La signalisation de BDNF peut ainsi contrôler à la fois la capacité de ramification globale et la

formation locale de branches à l'aide des voies respectives miRNA-132-dépendantes et indépendantes (Marler et coll., 2013).

Il a également été proposé que les éphrinesA rétiniennes désensibilisent les récepteurs EphA grâce à des interactions *cis* dans les mêmes cellules, créant ainsi un gradient décroissant de temporal à nasal de récepteurs sensibles aux EphA (Hornberger et coll., 1999; Carvalho et coll., 2006). Cette interaction *cis* pourrait créer un gradient pour les deux récepteurs EphA (EphA3 chez le poussin et EphA4 chez la souris) qui au lieu d'être exprimés selon un gradient, sont détectés dans la couche des CGRs de façon homogène (Feldheim et coll., 1998; Brown et coll., 2000 et Reber et coll., 2004). Ces deux mécanismes proposés pour la fonction des éphrineAs dans la rétine, à savoir la signalisation inverse et la désensibilisation des récepteurs d'EphA, pourraient ne pas être mutuellement exclusifs et agir en parallèle lors de l'établissement des cartes topographiques.

Les EphBs/éphrineBs sont impliqués dans la cartographie le long de l'axe latéral médian du collicule (Hindges et coll., 2002; Mann et coll., 2002 et Thakar et coll., 2011). Les récepteurs EphB1/B2/B3 sont tous exprimés dans la rétine dans un gradient croissant dorso-ventral, tandis que l'éphrinB1/B2 sont exprimés selon un gradient croissant latéral médian dans le SC (Figure 1.17-A et C). Le rôle individuel de chaque récepteur EphB dans la rétine est similaire. Le niveau total d'EphBs est plus important que l'identité de chaque EphBs dans l'établissement de la cartographie latéro-médiane (McLaughlin et coll., 2014). EphB/éphrinBs peuvent agir bifonctionnellement en médiant en même temps l'attraction et en repoussant des branches lorsqu'elle est exprimée à des niveaux élevés (McLaughlin et coll., 2003<sup>b</sup>). Similaires aux éphrinAs, les éphrinBs sont exprimés dans la rétine et la signalisation inverse éphrinB /

EphB, contribue également à la cartographie latéro-médiane au niveau du SC (Hindges et coll., 2002 et Thakar et al, 2011). (Figure 1.17-C).

D'autres facteurs, agissant pour moduler la signalisation de l'éphrineB ou dans des voies parallèles sont importants pour la cartographie latéro-médiane. L'interaction de la molécule d'adhésion cellulaire L1 avec l'adaptateur ankyrine du cytosquelette interfère avec la signalisation Eph durant le développement de la cartographie latéro-médiane. Les souris porteuses de mutations dans le motif de liaison L1-ankyrine affichent une cartographie latéro-médiane anormale des axones des CGRs qui ressemble au phénotype des souris mutantes pour l'EphB.

Wnt3 est fortement exprimé dans les zones médianes du SC, présentant un profil d'expression semblable à l'éphrineB1. Le récepteur Ryk de Wnt3 qui est fortement exprimé dans la rétine ventrale de la souris, induit la répulsion des axones ventraux en présence de Wnt3. De plus Wnt3, à très haute concentration, attire les axones dorsaux des CGRs. La stimulation de Wnt3 semble être médiée par le récepteur Frizzled-5, exprimé dans la couche des CGRs d'une manière homogène (Schmitt et coll., 2006). Dans ce modèle proposé, la signalisation répulsive Wnt-Ryk compétitionne avec l'interaction attractive Wnt-Frizzled pour générer une réponse au gradient d'expression de Wnt3. L'expression graduée d'EphA/Bs et des éphrineA/Bs le long de la rétine temporale, nasale-dorsale et ventrale, requise pour définir des modèles de projection spécifiques et des arborisations dans les cibles, est le résultat de l'action de facteurs définissant la polarité de la rétine à des étapes précoces du développement de la rétine.

Les facteurs de transcription FOXG1 et Foxd1 précisent respectivement, l'identité nasale et temporale de la rétine. En plus d'être essentiel à l'expression correcte de ZIC2, d'EphB1 et de FOXG1, Foxd1 est requis pour l'expression rétinienne graduelle et tardive de EphA/éphrineAs (Herrera et coll., 2004; Pratt et coll., 2004; Tian et coll., 2008 et Carreres et coll., 2011).

Les protéines osseuses morphogénétiques (PGB), en particulier BMP4, définissent la polarité de la rétine en contrôlant l'expression des facteurs de transcription T-Box: Tbx5 et TBX2 (Chapman et coll, 1996<sup>b</sup>; Sowden et coll, 2001 et Behesti et coll., 2006), et Vax2, qui sont importants pour spécifier respectivement, l'identité dorsale et ventrale de la rétine (Koshiba-Takeuchi et coll., 2000; Barbieri et coll., 2002; Mui et coll., 2002 et Gross et Dowling, 2005). Des études de perte de fonction chez la souris démontrent que Vax2 est requise pour l'expression de EphA5, EphBs et éphrineBs le long de l'axe dorso-ventral de la rétine, ce qui entraîne la désorientation des axones rétinotectales le long de l'axe latéro-médian du SC (Barbieri et coll., 2002 et Mui et coll, 2002). L'absence de Tbx5 induit l'expression d'éphrinesB1/B2 dans la moitié antérieure de la rétine, ce qui conduit à des erreurs de projection dans les cibles pour les axones des CGRs (Koshiba-Takeuchi et coll., 2000).



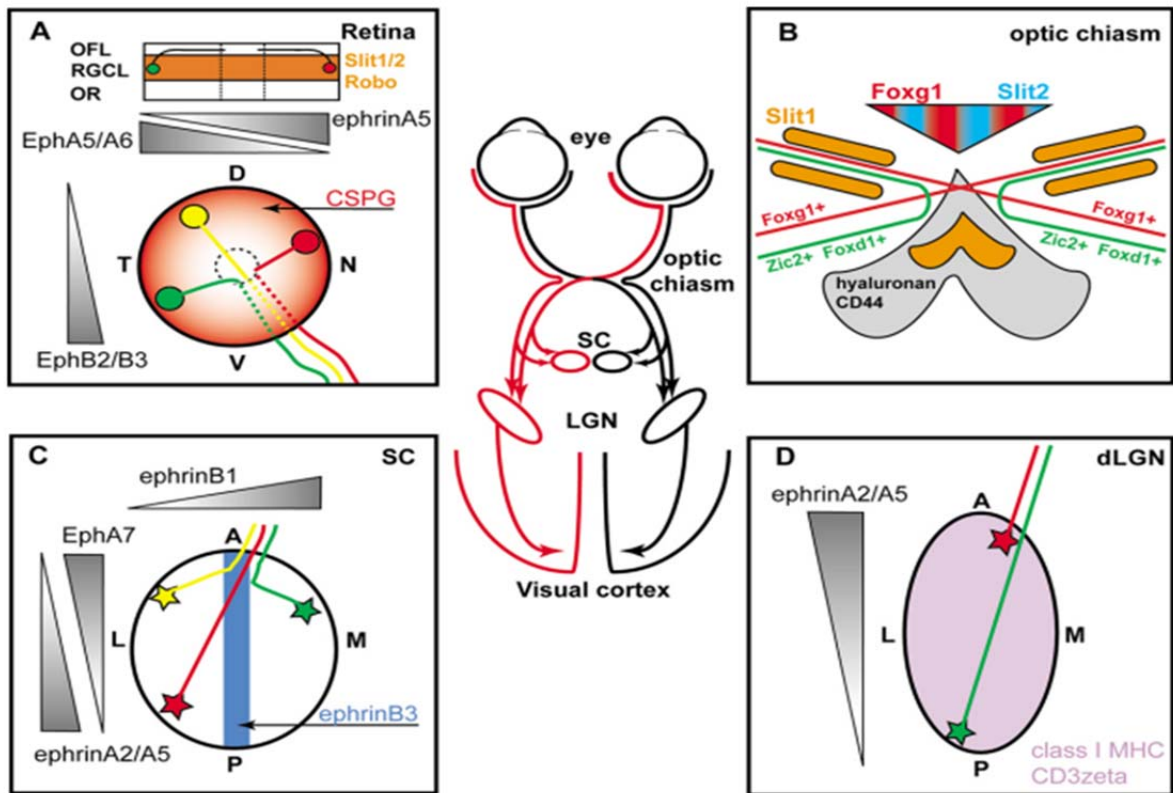


Figure 1.17 Représentation schématique de différentes molécules de guidage impliquées dans l'établissement des voies neurovisuelles.

Illustration des projections rétino-fugales (noir et rouge) en direction du SC et du LGN ainsi que des projections thalamocorticales. (A) Rétine. Coupe coronale (en haut) vue de face (en bas) de la rétine et affichage des molécules impliquées dans le guidage intra-rétinien. Le disque optique est représenté comme un cercle en pointillés dans le centre de la rétine. (B) Chiasma. Représentation des axones ipsilatéraux (vert) et des projections traversant la ligne médiane (rouge) ainsi que des molécules impliquées dans l'acheminement et de guidage des axones des CGRs au niveau du chiasma. (C) collicule supérieur. Projection rétino-topique temporale (vert), nasale (rouge), et dorsale (jaune) des axones des CGRs et des molécules impliquées dans l'initiation de la carte rétino-topique dans le SC. Le profil d'expression d'éphrinA2 décrit ici est vrai pour le tectum de poulet tandis que l'expression d'éphrineA2 au SC de souris affiche la plus haute expression à mi-chemin à travers la moitié postérieure du SC (D) Noyau genouillé latéral dorsal. Cartographie topographique du nez (rouge) et temporale (vert) des axones des CGRs dans le noyau genouillé latéral. A, antérieure; CSPG, protéoglycane sulfate de chondroïtine; L, latérale; dLGN, noyau genouillé latéral dorsal; M, médiale; N, nasale; OFL, couche de fibre optique; OR, rétine externe; P, postérieure; CGRs, cellules ganglionnaires de la rétine; SC, collicule supérieur; T, temporal; V, ventral.

(Tirée de Haupt C. et Huber A. B., 2008).

### 1.6.6.2 Mécanismes du raffinement axonal

Suite aux mécanismes moléculaires décrits ci-dessus, la carte formée est approximative et le système sera soumis à un raffinement plus localisé et à la génération d'ondes rétinienne spontanées. Autour de la naissance, des ondes électriques spontanées sont initiées par une classe d'interneurones cholinergiques dans la rétine: les cellules amacrines en forme d'étoile éclatée. La dépolarisation spontanée de ces cellules chaque 15s provoque un afflux de  $Ca^{2+}$  conduisant à l'activation des CGRs voisines (Feller et coll, 1996; Zheng et coll, 2004). Une vague est initiée quand un certain nombre de cellules amacrines s'activent dans un endroit particulier de la rétine. Chez la souris et au cours de la maturation du système visuel (entre P10 et P14), les vagues rétinienne deviennent médiées par les récepteurs ionotropiques du glutamate (Wong et coll, 1993; Bansal et coll., 2000; Demas et coll, 2003 et Syed et coll, 2004). Ce passage de l'acétylcholine à la transmission de glutamate est un processus graduel et dépend de la maturation des cellules bipolaires, la principale source de glutamate dans la rétine (Miller et coll., 1999).

Chez la souris, l'apparition de vagues rétinienne cholinergiques au cours de la première semaine après la naissance coïncide avec le remodelage axonal lors de la formation de la carte. De plus, le blocage pharmacologique et génétique de l'activité électrique de la rétine brouille la cartographie au SC (O'Leary et coll, 1986; Stellwagen et Shatz, 2002; McLaughlin et coll, 2003<sup>a</sup>; Chandrasekaran et coll., 2005 et Dhande et coll, 2011). Ces résultats amènent à croire au rôle modulateur de l'activité spontanée de la rétine sur la signalisation EphA / éphrineA (Nicol et coll., 2007). Cependant, la topographie rostro-caudale reste presque normale chez des souris transgéniques où l'activité spontanée de la rétine est

diminuée (Xu et coll., 2011). La démonstration moléculaire que la signalisation de répulsion EphA / ephrinA agit même en l'absence de l'activité de la rétine (Benjumbeda et coll., 2013) indiquent que la topographie à grande échelle est indépendante de l'activité rétinienne spontanée. L'activité spontanée est cependant essentielle pour le remodelage axonal à fine échelle y compris le raffinement spécifique des yeux (Shatz et Sretavan, 1986; Penn et coll., 1998; Cook et coll., 1999; Rossi et coll., 2001; Stellwagen et Shatz, 2002 et Xu et coll., 2011). Les arborisations des CGRs provenant des deux yeux se chevauchent au début et par la suite se séparent dans des territoires oculaires spécifiques distincts (Shatz et Sretavan, 1986).

L'origine de préférence pour les ondes rétiniennes est la région binoculaire (la rétine ventro-temporale chez la souris) puis elles se propagent en direction de la rétine dorso-nasale (Ackman et coll., 2012). Les axones ipsilatéraux semblent être plus sensibles aux effets du processus binoculaire compétitif que les axones controlatéraux. Les axones des CGRs ventro-temporales n'ayant pas d'EphB1 projetée de façon aberrante dans le côté opposé, mais ils se séparent des axones controlatéraux projetant normalement d'une manière dépendante de l'activité (Rebsam et coll., 2009). Cette ségrégation des axones ipsilatéraux sur le côté controlatéral peut refléter l'expression différentielle de protéines particulières tel que le transporteur de la sérotonine (*Sert*) dans les CGR ipsilatéraux, mais pas dans les controlatéraux (Garcia-Frigola et Herrera, 2010). Le récepteur de la sérotonine 5HT1B est exprimé dans toutes les terminaisons axonales rétiniennes (Upton et coll., 1999 et Salichon et coll., 2001). Il est couplé négativement à l'AC1 par l'intermédiaire de protéines G et il est activé par la sérotonine pour inhiber la production d'AMPc (Bouhelal et coll., 1988) et l'entrée du calcium dans les terminaisons axonales controlatérales. Par contre, les axones des CGRs ipsilatéraux qui expriment *Sert* internaliseraient la sérotonine extracellulaire pour relever

l'inhibition médiée par 5HT1B. Ainsi la production d'AMPC et l'afflux de  $Ca^{2+}$  entraînent la rétraction des terminaisons ipsilatérales permettant le raffinement et la ségrégation spécifiques des yeux.

Après l'occupation de leurs aires respectives dans leurs cibles visuelles, les terminaisons ipsi et controlatérales sont maintenues et stabilisées dans leurs cibles grâce à la transmission glutamatergique (Penn et coll., 1998; Stellwagen et Shatz 2002 et Demas et coll, 2003). Cependant, le retrait conditionnel du transporteur vésiculaire 2 du glutamate (VGLUT2) n'empêche pas les terminaisons des axones des CGRs ipsilatéraux de cibler dans la région appropriée malgré la concurrence des axones controlatéraux sur le même territoire. Ainsi, bien que la transmission de VGLUT2-dépendante soit importante pour certains aspects de raffinement spécifique, elle n'est pas essentielle pour le maintien et la consolidation des territoires axonaux dans les cibles (Koch et Ullian, 2010).

En résumé, la connectivité initiale sommaire qui relie les axones des CGRs à leurs cibles compte sur l'action d'un réseau complexe d'interactions moléculaires qui coordonne le comportement des axones. Cette connectivité délimite les caractéristiques anatomiques centrales des circuits visuels tels que la rétinitopie, la ségrégation et la régiosélectivité. L'activité spontanée rétinienne, survenant avant l'ouverture des yeux, rend ces cartes topographiques plus précises et fonctionnelles au moment de l'ouverture des yeux. Cette séquence d'événements moléculaires et dépendants de l'activité confère au système visuel en développement une plasticité extrême pour maximiser le champ visuel et le protéger en réponse à des perturbations telles que la dégénérescence.

En conclusion, l'établissement du système visuel en développement implique une interaction complexe entre plusieurs mécanismes basés sur la génétique, les interactions moléculaires et l'activité. La fonction visuelle dépend de façon critique de la génération et la spécification correcte des CGRs, et du guidage approprié de leurs axones vers leurs cibles visuelles dans le cerveau. Le guidage axonal n'est pas un processus simple et il nécessite des interactions intégrées entre de multiples signaux coexprimés et des facteurs modulateurs, ainsi qu'une régulation des changements intrinsèques dans les réponses des cônes de croissance et de l'expression des molécules de guidage. En atteignant leurs cibles, les terminaisons axonales sont soumises aux mécanismes moléculaires agissant de concert avec l'activité spontanée pour induire leur réarrangement et leur raffinement. La perturbation de l'un de ces processus peut entraîner une déficience visuelle sévère. Malgré les avancées considérables, la compréhension des mécanismes qui contrôlent le câblage et la mise en place du système visuel demeure un défi important pour les années futures.

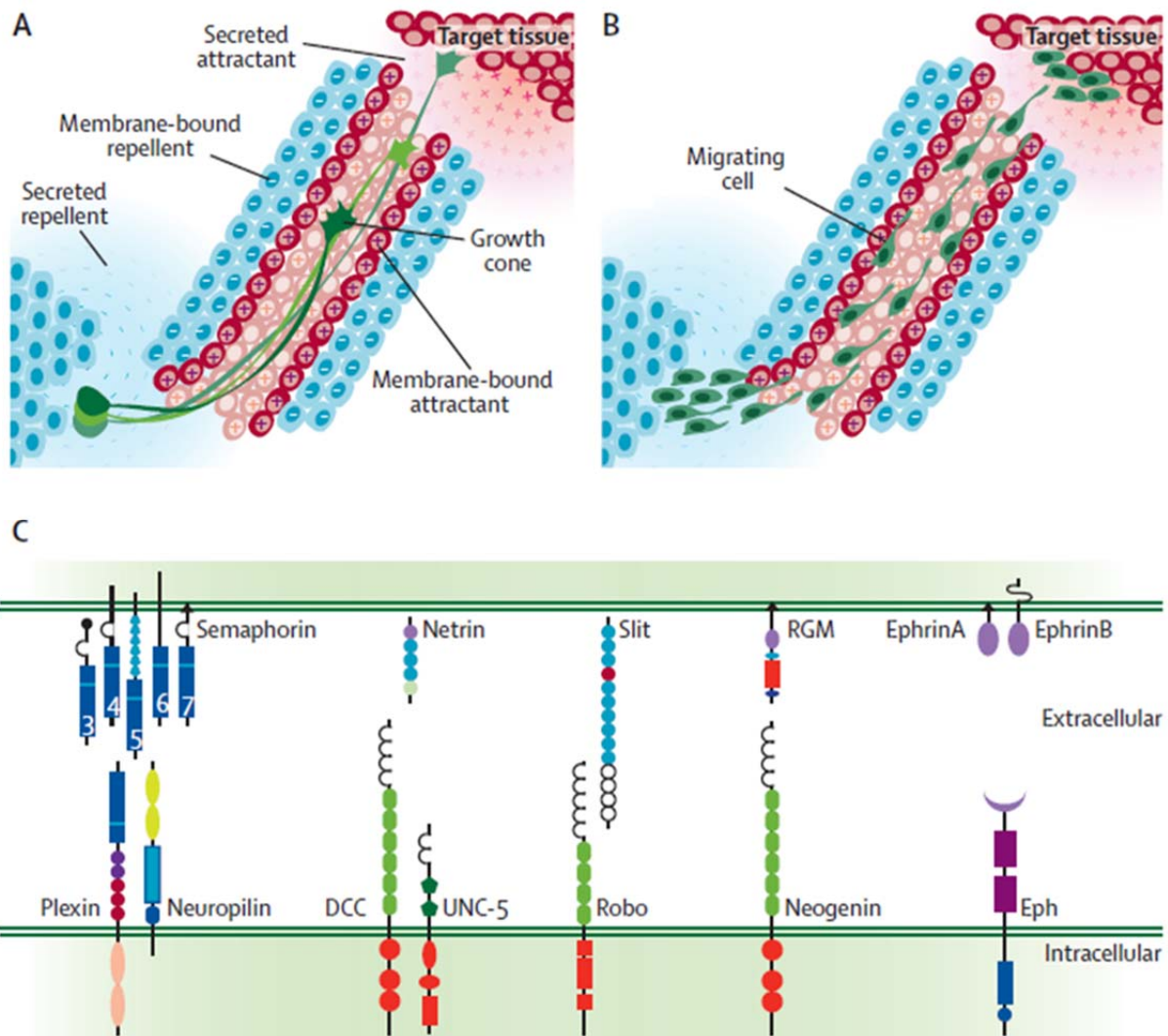


Figure 1.18 Le guidage axonal et les protéines du guidage axonal

(A) Au cours du développement embryonnaire, les axones sont guidés le long des voies prédéterminées par des protéines extracellulaires dans leur environnement. Le cône de croissance, une structure sensorielle à la pointe de l'axone, permet aux axones de réagir au guidage axonal des protéines. Les protéines réceptrices à la surface cellulaire du cône de croissance se lient aux signaux de guidage et induisent la direction de l'axone. (A) Les effets des molécules de guidage sur les axones en croissance peuvent être répulsives (bleu, -) ou attractives (rose, +). Elles peuvent exister en tant que protéines sécrétées qui forment des gradients dans la matrice extracellulaire ou en tant que des protéines membranaires avec des effets à courte portée. (B) Similaires aux axones et lors de leur migration, les cellules dans le système nerveux en développement sont guidées vers leurs cibles par des protéines de guidage axonal répulsives et attractives. (C) Cinq familles de protéines de guidage axonal canonique ont été identifiées (en haut). Elles se lient par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques sur le cône de croissance (en bas). RGM = molécules de guidage répulsives (tirée de Eljo et coll., 2015).

## 1.7 Objectifs de la recherche

L'objectif général de cette thèse était d'étudier l'implication des récepteurs couplés aux protéines G : GPR55; GPR91 et GPR99 durant le développement des projections des CGRs et des neurones corticaux. Cela comprenait la localisation et l'identification de ces récepteurs dans la rétine et le cerveau par différents essais biochimiques comme l'immunobuvardage (Western blot), l'immunocytochimie, l'hybridation in situ et l'immunohistochimie. Par la suite, nous avons utilisé diverses techniques dont la pharmacologie, la génétique, la biologie moléculaire, la microscopie en temps réel et confocale, l'immunohisto- et cytochimie pour démontrer l'implication (ou non) de ces récepteurs dans la croissance et le guidage axonal des cellules ganglionnaires de la rétine au cours du développement du système visuel. Puis, nous avons essayé de déterminer les mécanismes moléculaires et d'élucider les voies de signalisation impliquées lors de l'activation de chacun de ces récepteurs. Enfin, nous avons essayé de vérifier les résultats obtenus et les effets observés in vitro par une série d'expériences in vivo afin de mieux caractériser les rôles de ces trois récepteurs ainsi que de leurs ligands dans la croissance des projections de CGRs et la formation de la voie rétinothalamique. Dans le cadre de cet objectif, j'ai participé significativement aux travaux décrits dans les quatre articles suivants :

- Argaw A, **Cherif H**, ..., JF Bouchard (2011). Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. *J Neurosci*. 2011 26 jan; 31 (4): 1489-1499.
- Duff G, **Cherif H**, ..., Bouchard JF (2013). Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. *PLoS One*;8(8):e70849.
- **Cherif Hosni**, ..., Ken Mackie and Jean-François Bouchard (2015). Role of GPR55 during axon growth and target innervation. *eNeuro/Journal of neuroscience* : 2015 Nov 9;2(5). pii: ENEURO.0011-15.2015
- **Cherif Hosni**, ...,and Jean-François Bouchard (2015). GPR91 and GPR99 mediate axon growth not the guidance. Soumis à *Journal Nature neuroscience*.

## **CHAPITRE 2**



## **Role of GPR55 during axon growth and target innervation.**

Hosni Cherif<sup>1</sup>, Anteneh Argaw<sup>1,2</sup>, Bruno Cécycy<sup>1</sup>, Alex Bouchard<sup>1</sup>, Jonathan Gagnon<sup>1</sup>, Pasha Javadi<sup>1</sup>, Sébastien Desgent<sup>3</sup>, Ken Mackie<sup>4</sup> and Jean-François Bouchard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Optometry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1

<sup>2</sup> VIB Vesalius Research Center, KU Leuven, Leuven, Belgium

<sup>3</sup>CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5.

<sup>4</sup>Department of Physiological and Brain Sciences, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA, 47405-7000

Abbreviated title: GPR55 signaling in axon refinement in visual targets

Number of tables: 1

Number of figures: 8

Number of pages: 51

Number of words for Abstract: 201

Number of words for Introduction: 616

Number of words for Discussion: 2223

### Corresponding Author:

Jean-François Bouchard  
School of Optometry, University of Montreal  
3744, rue Jean-Brillant, Office- 260-7  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1  
Phone: (514) 343-6111 ext. 4083  
Fax: (514) 343-2382

## 2.1 Abstract

Guidance molecules regulate the navigation of retinal ganglion cell (RGC) projections toward their visual thalamic nuclei targets. In this study, we demonstrate that the G protein-coupled receptor 55 (GPR55) is expressed in the retina during development, and regulates growth cone (GC) morphology and axon growth. *In vitro* and in absence of the receptor, no pharmacological effect of the GPR55 ligands was observed. However, when neurons obtained from *gpr55* wildtype (*gpr55<sup>+/+</sup>*) mouse embryos were treated with GPR55 agonists LPI and O-1602; we observed a chemo-attractive effect and an increase in GC size and filopodia number. In contrast, CBD decreased the GC size and filopodia number inducing chemo-repulsion. Compared to their wildtype (WTs) littermates, GPR55-deficient mice revealed a decreased branching in the dorsal terminal nucleus (DTN) and a lower level of eye-specific segregation of retinal projections in the superior colliculus (SC) and in the dorsal lateral geniculate nucleus. Moreover, a single intraocular injection of LPI increased branching in the DTN while treatment with cannabidiol (CBD), an antagonist of GPR55, decreased it. These results indicate that GPR55 modulates the growth rate and the targets innervation of retinal projections and highlight, for the first time, an important role of GPR55 in axon refinement during development.

## 2.2 Introduction

The G protein-coupled receptor 55 (GPR55) is a 319-amino acid protein that was identified, cloned and mapped to human chromosome 2q37 in 1999 (Sawzdargo et al., 1999). GPR55 is expressed in the central nervous system as well as in intestine, bone marrow, immune and endothelial cells, spleen and platelets (Sawzdargo et al., 1999; Ryberg et al., 2007; Waldeck-Weiermair et al., 2008; Pietr et al., 2009; Balenga et al., 2011; Henstridge et al., 2011; Rowley et al., 2011). GPR55 is phylogenetically distinct from the traditional cannabinoid receptors and shows low amino acid identity compared to cannabinoid receptors 1 and 2: (CB1R, 13.5% and CB2R, 14.4%) (Baker et al., 2006). Despite its activation by several cannabinoid ligands, GPR55 lacks the classical cannabinoid-binding pocket present in both CB1R and CB2R (Petitet et al., 2006; Kotsikorou et al., 2011). Therefore, GPR55 is likely a receptor for small lipid mediators and some synthetic cannabinoids and related molecules. The lipid lysophosphatidylinositol (LPI), which activates GPR55 but not CB1R or CB2R, is the first, and the most potent to date, endogenous ligand for this receptor (Oka et al., 2007; Lauckner et al., 2008; Waldeck-Weiermair et al., 2008; Henstridge et al., 2009; Oka et al., 2009). A recent study showed that Phosphatidyl-b-D-glucoside (PtdGlc), a membrane glycerophospholipid (Nagatsuka et al., 2003) and its hydrolytic derivative lyso-phosphatidyl-b-D-glucoside (LysoPtdGlc) mediate guidance of nociceptive afferent axons in the developing spinal cord (Guy et al., 2015). The atypical synthetic cannabinoid O-1602, with no significant binding affinity for either CB1 or CB2, also activates GPR55 and is considered as a GPR55 agonist (Johns et al., 2007; Ryberg et al., 2007; Pertwee et al., 2007; Waldeck-Weiermair et al., 2008; Whyte et al., 2009; Schicho et al., 2010; Romero-Zerbo et al., 2011; Sylantsev et al., 2013). Conversely, cannabidiol, a constituent of *cannabis sativa* and an analog of O-1602, is an

effective GPR55 antagonist, with low affinity for CB1R/CB2R (Ryberg et al., 2007; Pertwee et al., 2007; Ross et al., 2009; Whyte et al., 2009; Sylantyeve et al., 2013). GPR55 primarily signals via the activation of ERK1/2 and RhoA pathways, the release of calcium from intracellular stores, and the stimulation of several transcriptional factors (Ryberg et al., 2007; Lauckner et al., 2008; Henstridge et al., 2010). *gpr55* mRNA is expressed in numerous central nervous system-derived cells and tissues (Henstridge et al., 2011) and the receptor appears to be expressed in both neurons and glia (Pietr et al., 2009). GPR55 protein is present in mouse dorsal root ganglia (Lauckner et al., 2008), in the hippocampus (Sylantyeve et al., 2013) and in the adult vervet monkey retina (Bouskila et al., 2013). Interestingly, a recent study using differentiated PC12 cells reported a role for GPR55 in neurite dynamics (Obara et al., 2011). Based on these reports, it is plausible to speculate that GPR55 plays a role during axonal navigation and refinement. Throughout development, the retinal ganglion cell (RGC) axons navigate to their thalamic (dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN)) and midbrain (superior colliculus (SC)) targets to form functional synaptic connections (Erskine et al., 2007). In the present study, we assessed the role played by GPR55 during axon growth and its possible implication in visual target innervation. We used the rodent neurovisual system to demonstrate a mechanism by which GPR55 influences axon growth. We found that during development, neurons express GPR55. Furthermore, *in vitro* and *in vivo* genetic and pharmacological manipulations of GPR55 affect RGC axon growth and retinothalamic development. Importantly, we observed that the ERK1/2 and RhoA pathways are necessary for GPR55-induced effects on growth cone morphology and axon outgrowth. This study is the first demonstration that GPR55 is expressed in the developing central nervous system and plays an important role in axon navigation and brain wiring.

## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Animal experimentation

All animal procedures were performed in accordance with the relevant university's animal care committee's regulations and approval. Male and female mice and hamsters have been used in this study. No statistical differences have been observed between both genders. All procedures were performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care and the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals, and were approved by the Ethics committee on animal research of the Université de Montréal. The *cnr1* transgenic mice were obtained from Pr Beat Lutz (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Germany). The *cnr2* transgenic mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA). The *gpr55* transgenic mice were from the Texas Institute for Genomic Medicine (TGIM, College Station, TX, USA). For all experiments, heterozygous females and males were mated to generate *gpr55*<sup>+/+</sup> and *gpr55*<sup>-/-</sup> littermates. Animal procedures involving *gpr55* mice were approved by the Indiana University Bloomington Institutional Animal Care and Use Committee and were conducted in compliance with the U.S. Department of Health and Human Services guidelines. All the surgical procedures were carried out under deep general anesthesia using either hypothermia (pups < P4) or isoflurane (pups >P4 and adults).

### 2.3.2 Reagents

Bovine serum albumin (BSA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), DNase, forskolin (FSK), Hoechst 33258, insulin, laminin, monoclonal anti- $\beta$ -actin, monoclonal anti-MAP Kinase (Diphosphorylated ERK-1/2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, pyruvate, selenium, LPI from soya bean, and trypsin, triiodothyronine, DEPEC, triethyl ethanol amine (TEA), Prehybridization solution, Formamide Glutaraldehyde 50% solution were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). CBD, Tocrifluor (T1117), and O-1602 (5-methyl-4 [(1R,6R)-3-methyl-6-(1-cyclohexen-1-yl)-1,3-benzenediol] from Tocris Bioscience (Ellisville, MI, USA). B27, N2, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), fetal bovine serum (FBS), glutamine, Neurobasal media, penicillin-streptomycin, S-MEM, sodium pyruvate, and Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Alexa 488 and Alexa 555) were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). The normal donkey serum (NDS), goat and HRP coupled secondary antibodies raised against rabbit IgG (H+L) or mouse IgM ( $\mu$  chain specific) were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Rabbit-anti-mouse-macrophage was obtained from Accurate Chemical (Wesbury, NY, USA). Anti-ERK1/2 and anti-GAP-43 were acquired from EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Anti-RhoA and anti-phosphorylated RhoA were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Anti-PKA, anti-phosphorylated PKA, anti-AKT and anti-phosphorylated AKT were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). The antibody directed against GPR55, the ROCK1 inhibitor (Y-27632) and the GPR55 blocking peptide were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). ERK 1/2 inhibitor (CI-1040) was obtained from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). LNAC was acquired from EMD (La Jolla, CA, USA). Avidin-biotin-peroxidase complex ABC

Kit and donkey anti-goat biotinylated secondary antibody were obtained from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). The B fragment of the cholera toxin (CTb) and goat-anti-CTb were from List Biological Laboratories (Campbell, CA, USA). Buffer kit, RnaseA buffer, and SSC buffer were from Ambion® (Burlington, ON, CA).

### **2.3.3 Tissue preparation for immunohistochemistry**

Newborn hamsters were deeply anesthetized by hypothermia while adult mice were euthanized by an overdose of isoflurane. A transcardiac perfusion was conducted with phosphate-buffered 0.9% saline (PBS; 0.1M, pH 7.4), followed by phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (PFA), until the head was fixed. The nasal part of the eyes of hamsters, mouse embryos and adult mice was marked with a suture and removed. Two small holes were made in the cornea before a first postfixation in 4% PFA for a period of 30 minutes. The cornea and lens were removed and the eyecups were postfixed for 30 minutes in 4% PFA. The eyecups were then washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in Neg 50 tissue Embedding Media (Fisher Scientific), flash-frozen and kept at -80°C. Sections (14µm thick) were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Concord, ON, Canada) and placed on gelatin/chromium-coated slides.

### **2.3.4 Immunohistochemistry**

The presence of GPR55 during the early development of the mouse and hamster retinas was investigated by immunohistochemistry. Retinal sections were washed in 0.1 M PBS, postfixed for 5 min in a 70% solution of ethanol, rinsed in 0.03% Triton X-100 in buffered saline, and blocked in 10% NDS and 0.5% Triton X-100 in buffered saline for 1 h. The sections were then coincubated overnight with rabbit anti-GPR55 antibody. After incubation with the primary

antibody, the sections were washed in buffered saline, blocked for 30 min, and incubated for 1 h with secondary antibody: Alexa donkey anti-rabbit 488. Due to the absence of immunoreactivity of several antibodies labeling the ganglion cells during the embryonic development of the mouse retina, we used a nucleus marker (Sytox) to visualize the cell somas. After washes, the sections were mounted with a homemade PVA-Dabco mounting media.

### **2.3.5 Fluorescent in situ hybridization (FISH)**

All solutions used for the FISH experiments were prepared with RNase-free reagents and diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated double deionized water (ddH<sub>2</sub>O). Glassware and instruments were RNase-decontaminated using RNase away solution (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Probes were designed in our laboratory and made by Sigma-Aldrich (Woodlands, Texas, USA). *In situ* hybridization to detect *gpr55* mRNA was performed following instructions as described in (Zangenehpour et al., 2001). For detection of each species' *gpr55* RNA, two specific probes were used, and all were coupled to a fluorescent dye: 6-Fluorescein Phosphoramidite (6-FAM). As a positive control, a poly-T probe was used. Primer sequences (5'-3') for *in situ* hybridization are listed below:

Mouse Probe 1: [6FAM]ACATGCTGATGAAGTAGAGGCA.

Mouse Probe 2: [6FAM]TTGGTTCTTCTGCTTCATACA.

Hamster Probe 1: [6FAM]TGAAGCAGATGGTGAAGACACT.

Hamster Probe 2: [6FAM]AGTTGCAGGAACAAGCTGATGT.

The mouse probes were based on the truncated sequence of nucleotides in *gpr55*<sup>-/-</sup> mice. Pictures showing expression patterns were taken using a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Burlington, ON, Canada).



### **2.3.6 Retinal explant culture:**

The retinas were isolated from mouse E14/15 embryos (Embryonic Days 14/15), dissected into small segments in ice cold DPBS and plated on 12mm glass coverslips previously coated with poly-D-Lysine (20µg/ml) and laminin (5µg/ml) in 24 well plates. The explants were cultured in Neurobasal supplemented with 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 5µg/ml LNAC, 1% B27, 40ng/ml selenium, 16µg/ml putrescine, 0.04ng/ml triiodo-thyronine, 100µg/ml transferrin, 60ng/ml progesterone, 100µg/ml BSA, 1mM sodium pyruvate, 2mM glutamine, 10ng/ml ciliary neurotrophic factor (CNTF), 5µg/ml insulin, and 10µM FSK at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. At DIV0 (Day *In Vitro* 0), one hour following plating), the explants were treated for 15 hours for projection analysis or for one hour at DIV1 for growth cone analysis. Photomicrographs were taken using an Olympus IX71 microscope (Olympus, Markham, ON, Canada) and analyzed with Image Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). The total length of axon bundles was quantified and expressed as mean ± SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat Software Inc, Chicago, IL, USA).

### **2.3.7 Purified retinal ganglion cell culture**

RGCs from P7–P8 mice (Charles River) were purified and cultured according to a protocol previously described by Barres et al. (1988). In brief, following enucleation, retinas were dissected and enzymatically dissociated, at 37°C for 30 min, in a papain solution (15 U/ml in DPBS) containing 1 mM l-cysteine. The retinas were then triturated sequentially, with a 1 ml pipette, in a solution containing ovomucoid (1.5 mg/ml), DNase (0.004%), BSA (1.5 mg/ml), and rabbit antibodies directed against mouse macrophages (1:75) to yield a suspension of single cells. The suspension was centrifuged and washed in a high concentration ovomucoid-

BSA solution (10 mg/ml for each in DPBS). The dissociated cells were resuspended in DPBS containing BSA (0.2 mg/ml) and insulin (5 µg/ml). RGCs were purified using the two-step panning procedure (Barres et al., 1988; Meyer-Franke et al., 1995). Briefly, to remove macrophages, the retinal suspension was incubated at room temperature in Petri dishes coated with affinity-purified goat anti-rabbit IgG (H+L). The nonadherent cells were then transferred to a Petri dish that had been coated with affinity-purified goat anti-mouse IgM (µ chain specific) followed by anti-Thy-1.2 monoclonal IgM. The adherent RGCs were first released enzymatically by incubating them in a 0.125% trypsin solution at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> followed by manually pipetting an enzyme inhibitor solution (30% FBS in Neurobasal) along the surface of the dish. Purified RGCs were plated on poly-D-lysine- (10 µg/ml) and laminin- (5 µg/ml) coated glass coverslips (number 0 Deckgläser; Carolina Biological) in 24-well plates. RGCs were cultured in 600 µl of serum-free medium modified from Bottenstein and Sato (1979). Neurobasal media was supplemented with B27, selenium, putrescine, triiodothyronine, transferrin, progesterone, pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), CNTF (10 ng/ml), BDNF (50 ng/ml), insulin (5 µg/ml), and FSK (10 µM). RGCs were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. All experiments on purified RGCs were performed 36–40 h following plating.

### **2.3.8 Primary neuron culture**

Primary cortical neurons were used in this study because of the large amount of neurons that can easily be cultured and harvested for biochemical assays, which is not possible with RGCs. *Cnr1*, *cnr2*, and *gpr55* pregnant knockout mice and their respective WT controls were used. CD1 staged pregnant mice were obtained from Charles Rivers (St-Constant, QC). E14/15 embryo brains were dissected and the superior layer of each cortex was isolated and transferred in 2ml S-MEM at 37°C with 2.5% trypsin and 2mg/ml DNase for 15 minutes.

Pellet was transferred into 10ml S-MEM with 10% FBS and stored at 4°C. After centrifugation, pellet was again transferred in 2ml S-MEM supplemented with 10% FBS and triturated 3 to 4 times. The supernatant was transferred in 10ml Neurobasal medium. Dissociated cells were counted and plated at 50,000 cells per well on 12mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (20µg/ml). Neurons were cultured for 2 days in Neurobasal medium supplemented with 1% B-27, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 0.25% N2 and 0.5mM glutamine. Neurons were treated with either GPR55 agonists (1µM LPI or 300nM O-1602), a GPR55 antagonist (300nM CBD), ERK 1/2 inhibitor (20µM CI-1040), ROCK1 inhibitor (20µM Y27632), for 60 minutes for GC morphology or 2, 5, 10 and 15 minutes for ERK-1/2, RhoA, AKT, and PKA protein quantification using Western Blots.

### **2.3.9 Growth cone behavior assay**

Embryonic retinal explants were cultured on a coverglass in a borosilicate chamber (Lab-Tek; Rochester, NY, USA) for 2 DIVs and placed in an incubator mounted on an inverted microscope (Olympus IX71). They were kept at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with a Live Cell chamber (Neve Bioscience, Camp Hill, PA, USA) throughout the whole experiment. A microgradient was created using a Picoplus micro-injector (Harvard Apparatus, St-Laurent, QC, Canada). Glass micropipettes with a diameter of the tip of 2-3µm were positioned at 45° and at 100µm away from the GC of interest (Argaw et al., 2011; Duff et al., 2013).

### **2.3.10 Immunocytochemistry**

After treatments, retinal explants and primary cortical neuron cultures were washed with PBS (pH 7.4), fixed in 4% PFA (pH 7.4) and blocked with 2% normal goat serum (NGS) and 2% BSA in PBS containing 0.1% Tween 20 (pH 7.4) for 30 minutes at room temperature.

Neurons were then incubated overnight at 4°C in blocking solution containing anti-GAP-43 (1:1,000) for GC morphology analysis, anti-GPR55 (1:500) or Tocrifluor T1117 (3µM) for GPR55 protein expression, MAP2 (1:500) or NFM (1:500). The following day, neurons were washed and labeled with Alexa Fluor secondary antibodies (488 and 555) and Hoechst 33258, and the coverslips were mounted with a homemade Dabco-PVD mounting media (Ono et al., 2001).

### **2.3.11 Western blot analysis:**

Mouse embryos or pups were sacrificed at various ages, namely: E14/15, E16/17, E18/19, P1 (Postnatal Day 1), and P3. Following deep anesthesia by hypothermia, eyes were immediately removed for Western blot analysis. Retinas were dissected on ice, homogenized by hand in Radio ImmunoPrecipitation Assay buffer (RIPA: 150mM NaCl, 20mM Tris, pH 8.0, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM EDTA). This buffer was supplemented with a protease inhibitor mixture (aprotinin, leupeptin, pepstatin (1µg/mL) and phenylmethylsulfonyl fluoride (0.2mg/mL); Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). Samples were then centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 10 minutes and supernatants were removed and stored. Protein content was equalized using BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada). In another set of experiments, primary cortical neurons were cultured for 2 DIVs at a density of  $\approx$  250,000 cells/dish in 35mm poly-D-lysine coated petri dishes. Following treatment, neurons were washed once with ice-cold PBS (pH 7.4) and then lysed with Laemmli sample buffer. Primary antibodies were used at the following concentrations: anti-GPR55 (1:500), anti- $\beta$ -actin (1:5,000), anti-AKT (1:1,000), anti-p-AKT (1:1,000), anti-ERK1/2 (1:5,000), anti-p-ERK1/2 (1:2,000), anti-RhoA (1:1,000), and anti-p-RhoA (1:1,000). Results were visualized using homemade Enhanced ChemiLuminescent (ECL) Western blot detection reagents (final

concentrations: 2.5mM luminol, 0.4mM p-coumaric acid, 0.1M Tris-HCl (pH 8.5), 0.018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **2.3.12 Intraocular injections**

Syrian golden hamsters (Charles River, St-Constant, QC) are born with a premature visual nervous system (Clancy et al., 2001). These mammals were used for studies investigating the implication of GPR55 ligands during retinal ganglion cell projection growth during development *in vivo*. Twenty-four hours following birth, at P1, anesthetized hamsters received a unilateral intraocular injection of 2µl solution of CTb, with either 0.9% saline solution, 1mM of LPI or 300µM of CBD. Briefly, to access to the right eye, a small incision was made in the eyelids under an operating microscope. A glass micropipette attached to a 10µl Hamilton syringe was used for the injection. Insertion of the micropipette into the vitreous was conducted carefully at an angle to avoid damage to the lens. Following the injection, we closed the eyelids using surgical glue (Vetbond; 3M, St-Paul, MN, USA). The same surgical procedures were performed using (P1) and adult *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* mice to allow the detection of any morphological or growth difference between the genotypes.

For eye-specific segregation studies in the dLGN, *gpr55<sup>-/-</sup>* and *gpr55<sup>+/+</sup>* adult mice received an intraocular injection of CTb conjugated to Alexa-555 into the left eye and CTb coupled to Alexa-488 into the right eye (2 µl; 0.5% in sterile saline). Two or four days after the injection for mice (pups and adults) and hamsters, respectively, the animals were anesthetized and perfused transcardially with 0.1M PBS (pH 7.4) followed by 4% PFA in PBS. The brains were removed, postfixed overnight at 4°C and cryoprotected by infiltration of buffered sucrose. Then, brains were frozen and kept at -80°C.

The effects of the intraocular injection of GPR55 agonist and antagonist were visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described in (Argaw et al., 2008). Briefly, 40 $\mu$ m thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1M PBS (pH 7.4) for 20 minutes. They were then rinsed and incubated in 0.1M glycine/PBS for 30 minutes, followed by an overnight incubation (4°C) in PBS containing 4% NDS, 2.5% BSA, and 1% Triton X-100. The sections were subsequently rinsed and immersed for 48 hours at room temperature in a solution containing goat anti-CTb diluted 1:4,000 in PBS with 2% NDS, 2.5% BSA, and 2% Triton X-100. Afterwards, the sections were rinsed and incubated in 2% NDS and 2.5% BSA/PBS for 10 minutes. This was followed by a one-hour incubation in donkey anti-goat biotinylated secondary antibody diluted 1:200 in PBS with 2% NDS, 2.5% BSA, and 1% Triton X-100. Tissue was rinsed, incubated in 2% NDS and 2.5% BSA in PBS for 10 minutes, and subsequently processed by an avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit (diluted 1:100 in PBS) for one hour, in the dark and at room temperature. The sections were then rinsed and preincubated in 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in PBS for 5 minutes. The peroxidase reaction product was visualized by adding 0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the DAB solution for 2–4 minutes. Sections were finally washed five times (one minute each) with PBS, mounted on gelatin-chromium alum-subbed slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylenes, and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA, USA).

### **2.3.13 Quantification method:**

Photomicrographs were taken with an inverted Olympus IX71 microscope (Olympus) and an Evolution VF camera (MediaCybernetics). The images were quantified using Image Pro Plus 5.1 image analysis software. The growth of axon branches was quantified on consecutive photomicrographs of coronal slices of brain tissue comprising the DTN. On each photomicrograph, the distance between the lateral border of the nucleus of interest and the tips of the longest axon branches was measured. To take into account for differences in brain sizes, axon branch lengths were normalized with the interthalamic distance (distance between the right and left lateral borders of the thalamus). Axon collateral number was quantified on consecutive photomicrographs comprising the DTN using an adaptation of the Sholl technique as described in (Duff et al., 2013). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

For eye specific segregation quantification in the dLGN, images were collected and measured by an observer "blind" to the experimental conditions to minimize any bias. Universal gains and exposures were established for each label. Raw images of the dLGN were imported to Matlab and an area of interest comprising the dLGN was cropped excluding the ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet, then the degree of left and right eye projection overlap was quantified using an established multi-threshold method of analysis (Torborg and Feller, 2004; Bjartmar et al., 2006; Stevens et al., 2007). This approach allows for a better analysis of overlapping regions independent of the threshold. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Significance of differences between means was evaluated by student t-test analysis (Systat).

### 2.3.14 Genotyping:

Animals were genotyped as described in (Wu et al., 2010). Tail samples were immersed in 50 mM NaOH, boiled for 30 minutes, vortexed vigorously for 10 sec, and neutralized with 1M Tris-HCl (pH8.0). Tail lysates obtained were vortexed again for 10 sec and centrifuged at 16,100 g for 1 minute. PCR reactions were conducted with a mixture of two primer pairs to generate the following amplicons: the 441 bp for the WT *gpr55* allele and the 301 bp for the neo allele. The primer sequence was for the WT allele: 5'–GCCATCCAGTACCCGATCC–3' and 5'– GTCCAAGATAAAGCGGTTCC–3' and for the *gpr55* mutant allele the sequence: 5'–GCAGCGCATCGCCTTCTATC–3' and 5'– TCAAGCTACGTTTTGGGTT – 3'. The PCR cycle conditions were: 5 min at 95°C, 36 cycles of three steps (50 sec at 94°C, 40 sec at 55°C, and 40 sec at 72°C), then 5 min at 72°C using the standard PCR reagents. The same genotyping protocol was done on mouse genomic tail DNA using sense primers: 5'- GCTGTCTCTGGTCCTCTTAAA-3'; 5'- GGTGTCACCTCTGAAAACAGA-3' for the WT allele and 5'- CCTACCCGGTAGAATTAGCTT -3' to detect the *Cnr1*<sup>-/-</sup> allele. The primers sequences for the *Cnr2* WT allele were 5'- GGAGTTCAACCCCATGAAGGAGTAC-3' and 5'-GACTAGAGCTTTGTAGGTAGGCGGG-3' and the *Cnr2* mutant allele the sequence 5'-GGGGATCGATCCGTCCTGTAAGTCT-3'.



## 2.4 Results

### 2.4.1 GPR55 expression in the developing retina

We used hamster and mouse retinas to evaluate the presence of GPR55 and its possible involvement during retinal projection navigation. Both GPR55 protein and mRNA were expressed in the hamster retina. At P1, GPR55 protein was present in the ganglion cell (GCL), ganglion cell fibers (GCFL), inner plexiform (IPL) and neuroblast (NBL) layers while GPR55 mRNA was present in the GCL (**Figure 1A-F**). GPR55 protein was also expressed in the GCL, GCFL, IPL and NBL whereas GPR55 mRNA was localized in GCL in retina of E14/15 mouse embryos (**Figure 1G-L**). GPR55 protein and mRNA were both detected in the adult *gpr55<sup>+/+</sup>* mouse retina (**Figure 1M-O**) but not in the *gpr55<sup>-/-</sup>* retina (**Figure 1P-R**).

Using western blot, GPR55 protein was detected in the brain and retina of mouse embryos and pups from E14/15 to P3. The signal was abolished in the presence of the blocking peptide for the antibody (**Figure 2A-B**). The same antibody failed to detect GPR55 in retina homogenate obtained from *gpr55<sup>-/-</sup>* mouse embryos (E14/15) (**Figure 2C**). In E14/15 mice retinal explants, GPR55 was present in the neurites; their growth cones (GCs) and filopodia (**Figure 2D**). Explants obtained from *gpr55<sup>-/-</sup>* embryos did not express GPR55 (**Figure 2E**). Furthermore, GPR55 was not detectable after co-incubation of the antibody with its blocking peptide (**Figure 2F**). GPR55 was present in GCs and neurites of retinal explants from *gpr55<sup>+/+</sup>* (**Figure 2G**). GPR55 immunoreactivity was not detectable in retinal explants obtained from *gpr55<sup>-/-</sup>* mice (**Figure 2H**) or in the presence of blocking peptide (**Figure 2I**). In WT mice, GPR55 was expressed in dendrites (**Figure 2J-L**) and axons (**Figure 2M-O**). It was also present in cortical neuron somas, neurites and GCs (**Figure 2P**). Moreover, the expression of GPR55 was investigated using Tocrifluor (T-1117), a fluorescent ligand of GPR55 (Sylantyeve et al., 2013),

confirming the presence of GPR55 in primary cortical neurons (**Figure 2Q**). Isolated retinal ganglion cells from E14/15 mice expressed GPR55 in their GCs and filopodia (**Figure 2R**). Overall, we observed that during development, GPR55 was present in the retinas of mouse and hamster.

#### **2.4.2 GPR55 ligands reorganize GC morphology and modulate axon growth**

To assess the role of GPR55 during retinal axon growth and guidance, retinal explants isolated from embryonic mice were cultured for 2 DIVs, and treated with pharmacological modulators of GPR55. When retinal explants were exposed to 1 $\mu$ M LPI (n = 1005 GCs; \*p <0.0001<sup>a</sup>) or 300 nM O-1602 (n = 1022 GCs; \*p <0.0001<sup>a</sup>) for 60 minutes, the GC surface area and the number of filopodia increased significantly compared to the control (n = 1023 GCs). In contrast, application of 300 nM CBD (n = 1134 GCs; \*p <0.0001<sup>a</sup>) to the cultures decreased the GC surface and filopodia number in RGCs neurons (Figure 3A-C). To investigate the effects of GPR55 ligands on axon growth, retinal explants were treated for 15 hours with LPI, O-1602, or CBD Treatments with agonists 1 $\mu$ M LPI (n = 605 explants; \*p <0.0001<sup>b</sup>) and 300 nM O-1602 (n = 595 explants; \*p <0.0001<sup>b</sup>) increased the total neurite growth whereas the 300 nM CBD (n = 602 explants; \*p <0.0001<sup>b</sup>) decreased it compared to the control (n = 720 explants) (**Figure 3D-E**). Interestingly, the LPI, O-1602, and CBD had similar effects in tissues obtained from WT, *cnr1*<sup>-/-</sup> (Cannabinoid receptor 1 knockout) or *cnr2*<sup>-/-</sup> (Cannabinoid receptor 2 knockout) mice (GC area, p=0.37<sup>c</sup>; Filopodia number, p=0.48<sup>c</sup>; total neurite outgrowth, p=0.29<sup>c</sup>) (**Figure 3B, C and E**). Taken together, these results indicate that ligands engaging GPR55 modulate GC morphology and axon growth in retinal explants, and that their effects are not mediated by CB1R or CB2R.

To investigate the possible effect of the deletion of *gpr55*, retinal explants from E14/15 *gpr55*<sup>-/-</sup> embryos were cultured and compared to the ones obtained from *gpr55*<sup>+/+</sup>. The absence of GPR55 was accompanied by a significant decrease in growth cone surface area (**Figure 4A-B**), filopodia number (**Figure 4A and 4C**) (n = 616 GCs for WT control and n = 218 GCs for KO; #*p* = 0.003<sup>e</sup>) and in total neurite outgrowth compared to WT, (n = 298 explants for WT control and n = 191 explants for *gpr55*<sup>-/-</sup> control group; #*p* = 0.0001<sup>d</sup>) (**Figure 4A and 4D**). To confirm the involvement of GPR55 in the changes of GC morphology and retinal projection growth following treatment with LPI, O-1602 and CBD, retinal explants obtained from *gpr55*<sup>+/+</sup> and *gpr55*<sup>-/-</sup> mouse embryos were treated with the aforementioned agonists and antagonist. In cultures prepared from *gpr55*<sup>+/+</sup> embryos, LPI (1 μM) (n = 585 GCs; \**p* < 0.0001<sup>d</sup>) and O-1602 (300 nM) (n = 501 GCs; \**p* < 0.0001<sup>d</sup>) increased the GC surface area and filopodia number while CBD (300 nM) (n = 547 GCs; \**p* < 0.0001<sup>d</sup>) decreased them (n = 616 GCs for WT control) (**Figure 4E-G**). These effects were absent in retinal explants obtained from *gpr55*<sup>-/-</sup> embryos (LPI: n = 135 GCs; #*p* = 0.0035<sup>e</sup>; O-1602: n = 111 GCs; #*p* = 0.0031<sup>e</sup>; CBD: n = 167 GCs; #*p* = 0.0029<sup>e</sup> compared to WT). Furthermore, the increase in total projection length after treatment with LPI (CTRL: n = 298 explants, LPI: n = 265 explants, \**p* < 0.0001<sup>d</sup>) and O-1602 (n = 248 explants, \**p* < 0.0001<sup>d</sup>) and the decrease induced by CBD (n = 273 explants, \**p* < 0.0001<sup>d</sup>) in *gpr55*<sup>+/+</sup> animals were absent in the *gpr55*<sup>-/-</sup> group (CTRL: n = 191 explants; LPI: n = 155 explants; #*p* = 0.0037<sup>e</sup>; O-1602: n = 108 explants; #*p* = 0.0029<sup>e</sup>; CBD: n = 127 explants; #*p* = 0.0032<sup>e</sup> compared to *gpr55*<sup>+/+</sup>) (**Figure 4H-I**). These results confirm that the effects observed on GC morphology and retinal projection growth following treatments with LPI, O-1602 and CBD are mediated by GPR55. Taken together,

these observations demonstrate that GPR55 modulates GC morphology and increases retinal projection growth.

### **2.4.3 At low concentrations, GPR55 agonists modulate GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway**

Since it is well documented that stimulation of GPR55 and subsequently Gα13 activate ERK1/2 (Henstridge et al., 2011), we tested whether this receptor modulates the ERK1/2 pathway during axon growth and guidance. ERK1/2 phosphorylation was significantly increased following 1μM LPI and 300nM O-1602 stimulation while 300nM CBD application decreased it (CTRL: n = 15 samples, LPI: n = 15 samples, \* $p < 0.0001^f$ , O-1602: n = 15 samples, \* $p < 0.0001^f$ , CBD: N = 15 samples, \* $p < 0.0001^f$ ) (**Figure 5A, B**). CI-1040 (1μM), a selective ERK1/2 inhibitor blocked the effects of LPI (1μM) and O-1602 (300 nM) on the ERK phosphorylation (**Figure 5C**). In primary neuronal cultures, 2, 5 and 20-minute modulation of GPR55 with LPI (1μM), O-1602 (300 nM) and CBD (300 nM) did not induce any significant changes in protein kinase B (AKT) or protein kinase A (PKA) phosphorylation levels (**Figure 5D, E**). To assess the role of the ERK 1/2 pathway in GPR55 effects, retinal explants were first treated with ERK-selective inhibitor. Followed by pharmacological activation of GPR55, CI-1040 blocked LPI (1μM) and O-1602 (300 nM) induced increases in GC surface area and filopodia number (CTRL: n = 520 GCs; LPI: n = 517 GCs; \* $p < 0.0001^g$ ; O-1602: n = 509 GCs; \* $p < 0.0001^g$ ; LPI+CI: n = 500 GCs; # $p < 0.0001^h$ ; O-1602+CI: n = 495 GCs; # $p < 0.0001^h$ ) (**Figure 5F-H**). Of note, no significant difference was observed between the CTRL condition and CTRL+CI in the GC surface area and the filopodia number (CTRL: n = 520 GCs; CTRL+CI: n = 498 GCs;  $p = 0.12^g$ ) (**Figure 5G-H**). Moreover, inhibition of ERK1/2 blocked the effect of LPI and O-1602 on total projection length (CTRL: n = 220

explants; LPI: n = 215 explants; \* $p < 0.0001^i$ ; O-1602: n = 209 explants; \* $p < 0.0001^i$ ; LPI+CI: n = 210 explants; # $p = 0.0012^j$ ; O-1602+CI: n = 200 explants; # $p = 0.003^j$ ). The ERK inhibitor had no significant effect on the total projection length by itself (CTRL: n = 220 explants; CTRL+CI: n = 204 explants;  $p = 0.2^i$ ) (**Figure 5I-J**). Together, these data demonstrate that the activation of GPR55 modulates GC morphology and axon outgrowth via the ERK1/2 pathway.

#### **2.4.4 At a higher concentration, LPI activates RhoA kinase**

In addition to ERK1/2, other signaling pathways such as RhoA, cdc42, and rac1 can be activated by GPR55 (Ryberg et al., 2007; Lauckner et al., 2008; Henstridge et al., 2010 and Obara et al., 2011). LPI at a concentration of 10 $\mu$ M but not 1 $\mu$ M induced an increase in RhoA phosphorylation (CTRL: n = 8 samples, 1 $\mu$ M LPI: n = 8 samples,  $p = 0.31^k$ , 10 $\mu$ M LPI: n = 8 samples, \* $p < 0.001^k$  and # $p < 0.001^k$  compared to 1 $\mu$ M LPI) (**Figure 6A, B**). Interestingly, 10 $\mu$ M LPI decreased the GC area, the number of filopodia (CTRL: n = 560 GCs, LPI 10 $\mu$ M: n = 547 GCs, \* $p < 0.0001^l$ ) and the total projection length compared to the control (CTRL: n = 260 explants, LPI 10 $\mu$ M: n = 217 explants, \* $p < 0.0001^m$ ), while 1 $\mu$ M LPI increased them (CTRL: n = 560 GCs, LPI 1 $\mu$ M: n = 522 GCs, \* $p < 0.0001^m$  and CTRL: n = 260 explants, LPI 1 $\mu$ M: n = 213 explants, \* $p < 0.0001^m$ ). In the presence of CBD (300 nM), the effect of 1 $\mu$ M LPI is blocked (1 $\mu$ M LPI: n = 522 GCs, 1 $\mu$ M LPI +CBD: n = 500 GCs, # $p < 0.0001^n$  and 1 $\mu$ M LPI: n = 213 explants, 1 $\mu$ M LPI +CBD: n = 203 explants, # $p < 0.0001^n$ ) whereas it is partially abolished for 10 $\mu$ M LPI (10 $\mu$ M LPI: n = 547 GCs, 10 $\mu$ M LPI +CBD: n = 498 GCs, # $p < 0.0001^n$  and 10 $\mu$ M LPI: n = 217 explants, 10 $\mu$ M LPI+CBD: n = 218 explants, # $p < 0.0001^n$ ) (**Figure 6C-G**). In order to assess if RhoA/ROCK1 participated in the effects induced by high concentration of LPI, retinal explants were pretreated with Y-27632 (20 $\mu$ M), a selective rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1 (ROCK1) inhibitor.

Y-27632 itself did not cause any changes in GC morphology (CTRL: n = 560 GCs, CTRL+ Y-27632: n = 480 GCs;  $p=0.31^l$ ) (**Figure 6 D & E**) or projection length (CTRL: n = 260 explants, CTRL+ Y-27632: n = 208 explants;  $p=0.22^m$ ) (**Figure 6G**). ROCK1 inhibition blocked 10 $\mu$ M LPI induced decreases in GC area, filopodia number and projection length (10 $\mu$ M LPI: n = 547 GCs, 10 $\mu$ M LPI +Y-27632: n = 488 GCs, # $p < 0.0001^n$  and 10 $\mu$ M LPI: n = 217 explants, 10 $\mu$ M LPI +Y-27632: n = 208 explants, # $p < 0.0001^n$ ) (**Figure 6C-G**). Similar activation of RhoA after stimulation of GPR55 with its ligand LysoPtdGlc was reported during the guidance modulation of nociceptive axon projections in the developing spinal cord (Guy et al., 2015). Taken together, these data demonstrate that a low concentration (1 $\mu$ M) of LPI activates the ERK1/2 pathway, while a higher concentration (10 $\mu$ M) activates RhoA. This could in part explain the considerable variation in experimental results obtained by different laboratories examining GPR55 signaling (Henstridge et al., 2012).

#### **2.4.5 Pharmacological manipulation of GPR55 affects RGC turning**

To evaluate the involvement of GPR55 in axon steering, time-lapse microscopy at DIV1 on embryonic mouse retinal explant growth cones was performed. Arrows and arrowheads show micropipette and growth cone position, respectively. A microgradient application of 1 $\mu$ M LPI elicited attractive turning while 300 nM CBD induced GC collapse and neurite retraction (Vehicle: n = 7, 1 $\mu$ M LPI: n = 9, 300 nM CBD: n = 11 \* $p < 0.0001^o$  for length and \* $p < 0.0001^p$  for angles) (**Figure 7A-E**). The vehicle did not induce any significant directional GC turning. Interestingly, at a concentration of 10 $\mu$ M, LPI induced growth cone collapse and retraction of the retinal axon (**Figure 7F**). These data show that GPR55 can modulate axon growth and steering, and its agonist LPI can act as a chemoattractive or chemorepulsive signal depending on its concentration.

## 2.4.6 GPR55 plays an important role during retinal projection growth and target innervation

To investigate the possible role played by GPR55 during development *in vivo*, we first performed a phenotypical screen on early postnatal *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* mice to detect any morphological difference. In P3 *gpr55<sup>-/-</sup>* mice, the absence of GPR55 induced a few aberrant projections in the ipsilateral side of the SC (**Figure 8A**). Compared to the WT group, P3 *gpr55<sup>-/-</sup>* mice showed a significant decrease in RGC axon branch growth and number in the DTN (**Figure 8B-8D**). (n = 8 brains for each type; WT: n = 192 and KO: n = 204, \*p = 0.0001<sup>s</sup> for axon growth and \*p = 0.0001<sup>t</sup> for number of branches at 150, 200, 250 and 300  $\mu$ m). During perinatal development, RGCs axons from both eyes connect with multiple target cells in the (dLGN). These projections spread throughout the dLGN sharing common terminal space. Eye-specific segregation occurs during postnatal development (Godement et al., 1984). In the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. To assess the involvement of GPR55 in retinogeniculate development, we examined the projections to the dLGN of adult *gpr55<sup>-/-</sup>* and their WT littermates. Contralateral projections of *gpr55<sup>-/-</sup>* mice occupied a larger area than that of *gpr55<sup>+/+</sup>* mice (**Figure 8E**). The contralateral and ipsilateral retinal projection images were quantified using a multithreshold method of analysis. These data indicate a significant overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of *gpr55<sup>-/-</sup>* mice (**Figure 8F**). (n = 7 brains (140 slices) for WT and n = 7 brains (140 slices) for KO; \*t = 0.0234<sup>u</sup>; df = 38). Compared to other rodents, hamsters have a shorter gestation period. The gestation period in hamsters (15.5 days) compared to rats (21.5 days) and mice (18.5 days). Hamsters are born with a relatively premature neuro-visual system at birth (Clancy et al., 2001). The embryonic

development of the neuro-visual system in these mammals (mouse and hamster) occurs at almost identical time points. For example, RGC generation starts at E9.5 for hamsters and E10.5 for mice while the dLGN starts to develop at E10.5 for both models (Clancy et al., 2001; Robinson et al., 1990). The RGC axons of hamster reach their thalamic and midbrain targets at (P3) (Bhide and Frost, 1991). Taking advantage from this opportunity, intraocular injections were performed in these mammals at P1, to investigate the effects of GPR55 ligands during the development of the visual system.

To assess the contribution of GPR55 ligands to the development of the retinal projections, the hamsters received intraocular injections of a GPR55 agonist or antagonist: LPI and CBD, respectively, at the date of birth. At P5, immunohistological investigation revealed that interfering with GPR55 signaling had detrimental effects on RGC axon development. As indicated by a robust labeling of hamster retinal axons, LPI injection at the day of birth induced aberrant projections in the ipsilateral side of the SC (**Figure 8G**). GPR55 pharmacological agents modulated collateral projection length: compared to the control group, intraocular injection of LPI induced a significant increase in RGC axon growth and branch number in the DTN (**Figure 8H**). Conversely, CBD decreased these parameters. Specifically, LPI injection induced a significant increase in RGC collateral length and branch number in the DTN, while these measures were significantly lower in the group treated with CBD compared to the vehicle group (Vehicle: n = 84, 1  $\mu$ M LPI: n = 25, 300 nM CBD: n = 44, \*p < 0.001<sup>q</sup> for axon growth and \*p < 0.0001<sup>r</sup> for number of branches at 150, 200, 250 and 300  $\mu$ m (LPI) and 100, 150, 200 and 250  $\mu$ m (CBD)) (**Figure 8I and 8J**). Altogether, these observations demonstrate the important role played by GPR55 during the development of the retinogeniculate pathway.



## 2.5 Discussion

In the present study, we show that GPR55 is expressed in the retina during the development of the visual pathway. GPR55 activation increased ERK 1/2 activity resulting in higher surface area and filopodia number of the growth cone. In addition, GPR55 agonist increased retinal axon growth, while a GPR55 antagonist decreased it. Interestingly, at high concentration, LPI can also activate the RhoA pathway, which decreases the growth cone surface area and the filopodia number, resulting in axon retraction. *In vivo*, at P3, the absence of the GPR55 causes a decrease of the axon branch number and length in the DTN. Accordingly, a decreased overlap between ipsi and contralateral projections compared to wildtype was expected in the adult mouse LGN. Interestingly, the opposite effect was observed which refers to a possible role of GPR55 in target innervation and refinement process. GPR55 activation with LPI in P5 hamster increased RGC projection length, branch number in the DTN and induced aberrant projections in the SC while its blockade, using CBD, mimics the effect observed in the DTN of the *gpr55*<sup>-/-</sup> mouse. Taken together, these observations demonstrate that GPR55 plays an important role in axon growth and visual brain innervation. Furthermore, this receptor is crucial for proper development of the retinothalamic pathway.

### 2.5.1 GPR55 expression in the retina

Previous studies reported ubiquitous distribution of *gpr55* mRNA in the central nervous system, with the following order of expression in mouse tissues: frontal cortex > striatum > hypothalamus > brain stem > cerebellum = hippocampus > spinal cord (Ryberg et al., 2007). It is also expressed in the caudate, putamen, dorsal root ganglion neurons, and differentiated PC12 cells (Lauckner et al., 2008; Obara et al., 2011; Sylantyev et al., 2013; Wu et al., 2013). In adult vervet monkey, GPR55 protein localization was reported strictly in the photoreceptor

layer of the retina with most prominent staining in the inner segments in rod (Bouskila et al., 2013<sup>a</sup>). In our study, GPR55 protein is largely expressed in the adult mouse retina. Similar difference in the pattern of expression of cannabinoid receptor 2 protein was observed between adult vervet monkeys and adult rodents (Bouskila et al., 2013<sup>b</sup> and Cécyre et al., 2013). In fact, CB2R is present only in Müller cells and no expression was detected in cones, rod bipolar cells, horizontal cells, amacrine cells, and ganglion cells in the adult vervet monkey retina (Bouskila et al., 2013<sup>b</sup>) while it is localized in cone and rod photoreceptors, horizontal cells, some amacrine cells, bipolar and ganglion cells in adult mouse retina (Cécyre et al., 2013). Similar distribution to the mouse was observed in the rat retina, with CB2R being localized in retinal pigmentary epithelium, inner photoreceptor segments, horizontal and amacrine cells, neurons in GCL, and fibers of the IPL (Lopez et al., 2011). The difference in the protein expression could be attributed to the differences in the visual system between rodents and primates and the physiological role played by the receptor in each animal model. Although the studies report the presence of the receptor in the adult CNS (Sawzdargo et al., 1999; Hui-Chen et al., 2013 for review) and adult vervet monkey retina (Bouskila et al., 2013<sup>a</sup>), its expression in retina and retinal projections of rodents during development were unknown. In this study, we demonstrate that GPR55 is expressed in the developing hamster and mouse retina, axonal projections, their growth cones, and filopodia.

### **2.5.2 Effects of the GPR55 ligands on the GC morphology and axon growth**

In this study, pharmacological activation or blockade of GPR55 modulated GC morphology and axon growth of RGCs. Accordingly, GPR55 agonists LPI and O-1602 increased retinal projection growth, induced an expansion in the surface area and augmented filopodia number of GCs. On the other hand, the GPR55 antagonist, CBD, decreased the growth of retinal

projections and induced GC collapse. These data are in accordance with previous studies in which LPI has been found to activate GPR55 in DRGs (Lauckner et al., 2008), osteoclasts (Whyte et al., 2009), lymphoblastoid cells (Oka et al., 2010), cancer cell proliferation (Andradas et al., 2011) and hippocampal slices (Sylantsev et al., 2013). Knowing the proliferative and pro migratory effects of LPI in cancer cell lines, we would expect a neurite elongation in PC12 cells (Soga et al., 2005; Pineiro et al., 2011; Hu et al., 2011). According to the literature on LPI, most studies showed significant effects when LPI was used in concentration ranging from 0.1 to 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M being the most commonly used concentration (Oka et al., 2007; Anavi-Goffer et al., 2012; Rojo et al., 2012). Most of the studies reporting an effect of LPI on intracellular calcium mobilization, proliferation, channels' activation and migration used lower concentrations such as 1-3 $\mu$ M (Oka et al., 2007; Pietr et al., 2009; Henstridge et al., 2009; Whyte et al., 2009; Pineiro et al., 2011). Our results are in accordance with Balenga et al., defining LPI (3 $\mu$ M) as a chemoattractive molecule for microglia (Balenga et al., 2011). Another study showed a highly migratory effect of LPI (1 $\mu$ M) on the metastatic MDA-MB231 breast cancer cell line, which expresses GPR55 (Monet et al., 2009). In addition, LPI stimulated cell elongation at the same concentration range (Ford et al., 2010). However, these findings challenge the results of neurite retraction produced by LPI via GPR55 in differentiated PC12 cells (Obara et al., 2011) or the absence of effect of LPI in spinal cord axons (Guy et al., 2015). The discrepancy could be explained by the fact that Obara *et al.* used LPI and CBD at concentrations 5 to 30 times higher than the ones used in the present study. At these high concentrations (10 $\mu$ M and above), these GPR55 pharmacological ligands could also act on non-specific targets or activate alternative signaling pathways such as RhoA/ROCK1 as shown in the present study. This hypothesis could explain the opposite

effects seen between the two ranges of concentrations for the same GPR55 agonist, and help to illustrate the complexity of interpreting experiments with these lipids. Furthermore, GPR55 protein levels in PC12 and in primary neurons are different and may produce distinctive effects. PC12 cells are derived from a chromaffin cell tumor, thus are neuroendocrine-derived and may be quite different from primary neurons. (Frassetto et al., 2006). Hence, the pharmacological differences in the effect of LPI can be explained by dissimilarities in the phenotype of these two cell types. An additional difference that arises between PC12 cell lines and RGCs is the morphological development that is regulated by diverse factors operating during different time periods (Coombs et al., 2007) and can explain the effect observed with LPI. The absence of effect of LPI on guidance of nociceptive afferent axons in the developing spinal cord could be attributed to a difference in neuron subtypes. Nevertheless, these findings highlight the distinct mechanisms by which GPR55 modulates the development of various neuronal populations.

### **2.5.3 Axon growth and GC morphology reorganization are mediated by GPR55 via the ERK1/2 or RhoA/ROCK1 pathways**

Although several G $\alpha$  subunits have been implicated in GPR55 signal initiation (Ryberg et al., 2007; Lauckner et al., 2008; Henstridge et al., 2011), it appears in our study that stimulation of GPR55 results in the activation of the MAPK pathway. To characterize the mechanism by which GPR55 modulates growth cone morphology and axon growth, we examined the ERK1/2 pathway. We demonstrate that at 1 $\mu$ M, the GPR55 agonist, LPI, increases ERK1/2 phosphorylation. This is in accordance with an increasing number of studies showing that LPI-stimulated GPR55 activates ERK1/2 (Oka et al., 2007; Kapur et al., 2009; Pietr et al., 2009;

Whyte et al., 2009; Andradas et al., 2011; Pineiro et al., 2011). In addition, our findings illustrate that at a higher concentration; this GPR55 agonist increases RhoA/ROCK1 activity and highlight additional signaling pathways associated with GPR55. A consensus among the articles published on GPR55 reported the involvement of the actin cytoskeleton and the activation of RhoA (Lauckner et al., 2008; Kapur et al., 2009; Henstridge et al., 2010). This dual action of LPI on ERK and RhoA/ROCK1 pathways is concentration dependent. Downstream signaling pathways of GPR55 remain controversial and further studies are needed to characterize all the mechanisms implicated.

#### **2.5.4 Effects of GPR55 ligands on RGC turning**

As the neurovisual system is established, axons travel relatively long distances guided by the concerted action of attractive and repulsive cues in a complex environment to reach their target. Located at the axonal tip, the GC is a highly motile structure detecting directional signals in the environment. Guidance cues, notably members of the netrin, semaphorin, ephrin, slit families, cell-adhesion molecules, morphogens, and growth factors, modulate the behavior and growth of axons (Dupin et al., 2013). GPR55, like CB1R and CB2R, could be another modulation mechanism of axon guidance (Argaw et al., 2011; Duff et al., 2013). GPR55 activity at the GC modulates retinal axon navigation; GCs are attracted in the presence of LPI microgradient, while CBD induced GC collapse and retraction. Based on these results, GPR55 plays a modulatory role in axon navigation by modifying the morphology and the behavior of the GC. These results show, for the first time, a role for GPR55 in axon guidance *in vitro*, and are in accordance with the literature of LPI effect on signaling, migration and growth (Oka et al., 2007; Lauckner et al., 2008; Henstridge et al., 2009; Pietr et al., 2009; Whyte et al., 2009; Oka et al., 2010; Pineiro et al., 2011; Sylantyev et al., 2013), while the opposite effect was

observed with CBD (Ryberg et al., 2007; Pertwee et al., 2007; Ross et al., 2009; Whyte et al., 2009; Balenga et al., 2011; Kallendrusch et al., 2013; Sylantsev et al., 2013).

### **2.5.5 GPR55 affects target selection during development *in vivo***

LPI can be generated by the action of a phospholipase PLA2 that catalyses the hydrolysis of an acyl group from phosphatidylinositol (PI) (Grzelczy et al., 2013). Similarly, PLA1 can be also involved in the formation of LPI (Yamashita et al., 2013). In 2007, LPI was described as the potential endogenous agonist of GPR55 (Oka et al., 2007) and was found present in different ranges in normal human cells (i.e., platelets (Billah et al., 1982), peripheral blood neutrophils (Smith et al., 1992), various cancer cell lines (Xiao et al., 2000; Xiao et al., 2001; Xu et al., 2001; Ford et al., 2010; Oka et al., 2010; Andradas et al., 2011; Pineiro et al., 2011; Cantarella et al., 2011), endothelial cells (Bondarenko et al., 2010), animal cells (i.e., mouse fibroblasts (Hong et al., 1981), macrophages (Zoeller et al., 1987), and rat brain cells (Oka et al., 2009)). The concentration of LPI varies from a tissue to another (37.5 nM per gram of tissue in rat brain, 2.5  $\mu$ M in mouse serum and 1.5  $\mu$ M in samples of human plasma (Grzelczy et al., 2013)).

During visual system development, RGC axons travel long distances to connect to their specific targets. Many guidance cues modulate their navigation and target recognition; GPR55 and its endogenous ligands could represent one set of cues. Indeed, our *in vivo* data show that pharmacological manipulation of GPR55 signaling affects retinal projection growth and navigation. We showed that a single intraocular injection of LPI leads to the emergence of aberrant ipsilateral RGC projections in the SC. Indeed, LPI injection increased branching or stabilized ipsilateral projections that would have normally retracted. Moreover, we report an increase in the length of retinal projections and in the number of axons in the DTN following

treatment with LPI and a decrease with CBD. In addition, we noticed the presence of aberrant ipsilateral RGC projections in the SC in the postnatal *gpr55<sup>-/-</sup>* mice. The increase in the branching observed in the *gpr55<sup>-/-</sup>* mice could be explained by a stabilization of the ipsilateral projections that would have normally retracted. In addition, our data show that genetic interference with the GPR55 activity profoundly affects retinal projection development and target selection. Accordingly, the important role played by GPR55 during RGC axon growth and refinement is demonstrated by the relative lack of eye-specific segregation of retinal projections in *gpr55<sup>-/-</sup>* postnatal and adult mice. We interpreted this as a deficit in eye-specific segregation of retinal projections. In WT animals, this process could be influenced by GPR55 endogenous activity at the retina and/or directly at the axon terminal. It is possible that the absence of GPR55 could influence retinal spontaneous activity, which is necessary for segregation and maintenance of specific inputs to the dLGN (Chapman et al., 2000) thus modifying the segregation outcome. Deficiency in eye-specific segregation might also occur as a result of the absence of functional GPR55 directly at the dLGN. In summary, modulation of GPR55 activity strongly affects retinal projection development and target selection. These observations are in accordance with previous studies showing the role of GPR55 in motility, migration, orientation and polarization of different types of human cells such as breast cancer cells (Ford et al., 2010; Andradas et al., 2011) and myenteric neurons in mouse and human colon (Li et al., 2013).

In conclusion, the present study shows for the first time, *in vitro* and *in vivo*, that GPR55 and its ligands are involved in axon growth and in projection refinement at their midbrain targets. In addition, it pinpoints the signaling pathways that mediate their effects. The identification of

the mediators implicated in these mechanisms is a valuable venue for developing new therapeutic agents aiming at the regeneration and repair of the central nervous system.

## **2.6 Acknowledgements:**

This work was supported by a grant to J.F.B from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC: 311892-2010) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR: MOP-86495 and MOP-301710). C.H. is supported by a studentship of Vision Health Research Network-Fonds de Recherche du Québec- Santé (FRQ-S). J.F.B. holds a Chercheur Boursier Senior from the FRQ-S. K.M. is supported by NIH grants DA011322 and DA021696. We thank Florence Dotigny and Sophie Charron for their excellent technical assistance.



## 2.7 References:

- Anavi-Goffer S, Baillie G, Irving AJ, Gertsch J, Greig IR, Pertwee RG, Ross RA (2012) Modulation of L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *Journal of Biological Chemistry*: 287(1):91-104.
- Andradas C, Caffarel MM, Perez-Gomez E, Salazar M, Lorente M, Velasco G, Guzman M and Sanchez C (2011) The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene* 30:245-252.
- Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F (2008) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Experimental Neurology* 211:494-502.
- Balenga NA, Aflaki E, Kargl J, Platzer W, Schroder R, Blattermann S, Kostenis E, Brown AJ, Heinemann A and Waldhoer M (2011) GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res* 21:1452-1469
- Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL (1988) Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1:791–803.
- Bhide PG, Frost DO (1991) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J Neurosci* 11:485-504.
- Billah M.M., Lapetina E.G. (1982). Formation of lysophosphatidylinositol in platelets stimulated with thrombin or ionophore A23187. *J. Biol. Chem.* 257, 5196.
- Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Rentería RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS (2006) Neuronal pentraxins

- mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 26:6269–6281.
- Bondarenko A., Waldeck-Weiermair M., Naghdi S., Poteser M., Malli R., Graier W.F. (2010). GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 161, 308.
- Bottenstein J, Sato G (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci* 76: 514–517
- Bouskila J<sup>a</sup>, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard J-F (2013) Rod Photoreceptors Express GPR55 in the Adult Vervet Monkey Retina. *PLoS ONE* 8(11): e81080.
- Bouskila J<sup>b</sup>, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard J-F. Muller Cells Express the Cannabinoid CB2 Receptor in the Vervet Monkey Retina. *The Journal of Comparative Neurology-Research in Systems Neuroscience* 521:2399–2415 (2013).
- Cantarella G., Scollo M., Lempereur L., Saccani-Jotti G., Basile F., Bernardini R. (2011). Endocannabinoids inhibit release of nerve growth factor by inflammation-activated mast cells. *Biochem. Pharmacol.* 82, 380.
- Cécylre B, Zabouri N, Huppé-Gourgues F, Bouchard J-F, Casanova C. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2013;54:8079–8090.
- Chapman B (2000) Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus. *Science* 287: 2479–2482.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7-17.

- Coombs JL, Van Der List D and Chalupa L (2007) M. Morphological Properties of Mouse Retinal Ganglion Cells During Postnatal Development. *The Journal of comparative neurology* 503:803– 814.
- Duff G, Argaw A, Cecyre B, Cherif H, Tea N, Zabouri N, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF (2013) Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. *PLoS One*;8(8):e70849.
- Dupin I, Dahan M, and Studer V (2013) Investigating Axonal Guidance with IMicrodevice-Based Approaches. *The Journal of Neuroscience*, 33(45): 17647-17655.
- Erskine L, Herrera E (2007) The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 308: 1–14.
- Ford LA, Roelofs AJ, navi-Goffer S, Mowat L, Simpson DG, Irving AJ, Rogers MJ, Rajnicek AM and Ross RA (2010) A role for L-alpha-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. *Br J Pharmacol* 160:762-771.
- Frassetto LJ, Schlieve CR, Lieven CJ, Utter AA, Jones MV, Agarwal N, and Levin LA (2006) Kinase-Dependent Differentiation of a Retinal Ganglion Cell Precursor. *Invest Ophthalmol Vision Science*;47.
- Godement P, Salaün J, Imbert M (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol* 230:552–575.
- Grzelczyk A., Gendaszewska-Darmach E. (2013). Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: new data -- new insight into their function. *Biochimie* 95, 667.

- Guy AT, Nagatsuka Y, Ooashi N, Inoue M, Nakata A, Greimel P, Inoue A, Nabetani T, Murayama A, Ohta K, Ito Y, Aoki J, Hirabayashi Y and Kamiguchi H (2015) Glycerophospholipid regulation of modality specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science*. Aug 28;349(6251):974-7.
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ (2009) The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling and NFAT activation. *FASEB J*. 23(1):183–193.
- Henstridge CM, Balenga NA, Schroder R, Kargl JK, Platzer W, et al (2010) GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 160: 604–614.
- Henstridge CM, Balenga NA, Kargl J, Andradas C, Brown AJ, Irving A, Sanchez C and Waldhoer M (2011) Minireview: Recent Developments in the Physiology and Pathology of the Lysophosphatidylinositol-Sensitive Receptor GPR55. *Mol Endocrinol* 25:1835-1848.
- Henstridge CM. Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55 (2012) *Pharmacology* 89: 179–187.
- Hong S.L., Deykin D. (1981). The activation of phosphatidylinositol-hydrolyzing phospholipase A2 during prostaglandin synthesis in transformed mouse BALB/3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 256, 5215.
- Hu G, Ren G, Shi Y (2011) The putative cannabinoid receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation. *Oncogene*, 30, pp. 139–141.
- Hui-Chen Lu , Jane E. Lauckner , John W. Huffman, and Ken Mackie (2013). GPR55 in the CNS. *endoCANNABINOIDS*, Part II; Chapter 3.

- Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME (2009) Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem.*;284(43):29817-27.
- Kumar A, Qiao Z, Kumar P, Song ZH (2012) Effects of palmitoylethanolamide on aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 4416–4425.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, et al (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2699–2704.
- Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, Mackie K, Li Y, Zimmer A, Göke B, Sharkey KA, Storr M (2013) A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology*. Volume 71: 255–263.
- Lopez EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, Lopez-Costa JJ. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse*. 2011;65:388–392.
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15:805–819.
- Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Poutier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, Juvin V, Rassendren F, Humez S, Prevarsakaya N (2009) Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation, *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 528–539.
- Obara Y, Ueno S, Yanagihata Y, Nakahata N (2011). Lysophosphatidylinositol causes neurite retraction via GPR55, G13 and RhoA in PC12 cells. *PLoS One*; 6:e24284.

- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T (2007) Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; 362(4):928–934.
- Oka S., Toshida T., Maruyama K., Nakajima K., Yamashita A., Sugiura T. (2009). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J. Biochem.* 145, 13.
- Oka S, Ota R, Shima M, Yamashita A, Sugiura T (2010) GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 395:232-237.
- Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, et al (2001) Quantitative Comparison of Anti-Fading Mounting Media for Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Histochem Cytochem* 49: 305–312.
- Pertwee R.G (2007) GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.*;152:984–986.
- Petitot F, Donlan M, Michel A (2006) GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des*; 67: 252–253.
- Pietr M, Kozela E, Levy R, Rimmerman N, Lin YH, Stella N, Vogel Z and Juknat A (2009) Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett* 583:2071-2076.
- Pineiro R, Maffucci T and Falasca M (2011) The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 30:142-152.
- Robinson SR, Dreher B (1990). The visual pathways of eutherian mammals and marsupials develop according to a common timetable. *Brain Behav Evol* 36: 177–195.

- Rojo ML, Gaztelumendi AR, Fowler CJ (2012) Lysophosphatidylinositol Stimulates [35S]GTP $\gamma$ S Binding in the Rat Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Neurochemical Research*. Volume 37, Issue 5, pp 1037-1042.
- Ross RA (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci.*;30 (3):156–163.
- Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA and Weyrich AS (2011) Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118:e101-e111.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T and Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092-1101.
- Sawzdargo M, et al (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 64(2):193–198.
- Schicho R., Bashashati M., Bawa M., McHugh D., Saur D., Hu H.M., Zimmer A., Lutz B., Mackie K., Bradshaw H.B., McCafferty D.M., Sharkey K.A., Storr M (2010) The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm. Bowel Dis*;17:1651–1664.
- Smith D.M., Waite M. (1992). Phosphatidylinositol hydrolysis by phospholipase A2 and C activities in human peripheral blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 52, 670.
- Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, Matsumoto S, Kamohara M, Hiyama H, Yoshida S, Momose K, Ueda Y, Matsushima H, Kobori M, Furuichi K (2005) Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an

orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326 pp. 744–751.

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mihalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164–1178.

Sylantsev S, Jensen TP, Ross RA and Rusakov DA (2013) Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 110(13): 5193–5198.

Torborg CL, Feller MB (2004) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *J Neurosci Methods* 135:17–26.

Waldeck-Weiemair M, Zorratti C, Osibow K, Balenga N, Goessnitzer E, Waldhoer M, Malli R and Graier WF (2008) Integrin-clustering enables anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor triggered repression. *J. Cell Sci.* 121:1704–1717.

Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA, Rogers MJ (2009) The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:16511-16516.

Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, Straiker A, Spencer C, Bradshaw H, Mackie K, Lu HC (2013) GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One* ;8(4):e60314.



- Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, et al. (2010) Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci*.
- Xiao Y., Chen Y., Kennedy A.W., Belinson J., Xu Y. (2000). Evaluation of plasma lysophospholipids for diagnostic significance using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 905, 242.
- Xiao Y.J., Schwartz B., Washington M., Kennedy A., Webster K., Belinson J., Xu Y. (2001). Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs nonmalignant ascitic fluids. *Anal. Biochem.* 290, 302.
- Xu Y., Xiao Y.J., Baudhuin L.M., Schwartz B.M. (2001). The role and clinical applications of bioactive lysolipids in ovarian cancer. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8, 1.
- Yamashita A., Oka S., Tanikawa T., Hayashi Y., Nemoto-Sasaki Y., Sugiura T. (2013). The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 107, 103
- Yasuko Nagatsuka, Miki Hara-Yokoyama, Takeshi Kasama, Masataka Takekoshi, Fumiko Maeda, Seiji Ihara, Shigeyoshi Fujiwara, Eriko Ohshima, Kumiko Ishii, Toshihide Kobayashi, Kazufumi Shimizu and Yoshio Hirabayashi (2003) Carbohydrate-dependent signaling from the phosphatidylglucoside-based microdomain induces granulocytic differentiation of HL60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7454–7459.

Zangenehpour S and Chaudhuri A (2001) Neural Activity Profiles of the Neocortex and Superior Colliculus after Bimodal Sensory Stimulation *Cerebral Cortex* 11 (10): 924-935.

Zoeller R.A., Wightman P.D., Anderson M.S., Raetz C.R (1987). Accumulation of lysophosphatidylinositol in RAW 264.7 macrophage tumor cells stimulated by lipid A precursors: *J. Biol. Chem.* 262, 17212.

## 2.8 Table and figure legends:

Table 2.1 Statistical Table.

Statistical analyses were performed by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test and Student's *t*-tests (Systat Software Inc, Chicago, IL, USA).

	Data structure	Type of test	Power
All statistical tests <sup>a-t</sup>	Normally distributed	ANOVA with post-hoc Bonferroni	0.9 - 1.0
Test <sup>u</sup>	Normally distributed	Student's <i>t</i> -test	0.921

**Table 1. Statistical Table.**

Figure 2.1 GPR55 protein and mRNA expression in the retina.

**(A-F)**: At P1, GPR55 protein and mRNA are expressed in the hamster retina **(A-C)**, expression of GPR55 protein in the ganglion cell layer **(D-F)**. **(G-L)**: GPR55 protein and mRNA are present in the E14/15 mouse retina **(G-I)**, especially for GPR55 protein in the ganglion cells layer **(J-L)**. **(M-O)**: GPR55 protein and mRNA are expressed in the adult mouse retina. **(P-R)**: The specificity of the antibody and the mRNA probe was validated using *gpr55<sup>-/-</sup>* mice. Scale bars: 75 $\mu$ m **(A-C, M-R)**; 30 $\mu$ m **(G-I)**; 25 $\mu$ m **(D-F, J-L)**. **NBL**: Neuroblast layer; **IPL**: Inner plexiform layer; **INL**: Inner nuclear layer; **OPL**: Outer plexiform layer; **ONL**: Outer nuclear layer; **GCL**: Ganglions cells layer; **GCFL**: Ganglions cells fiber layer.

Figure 1

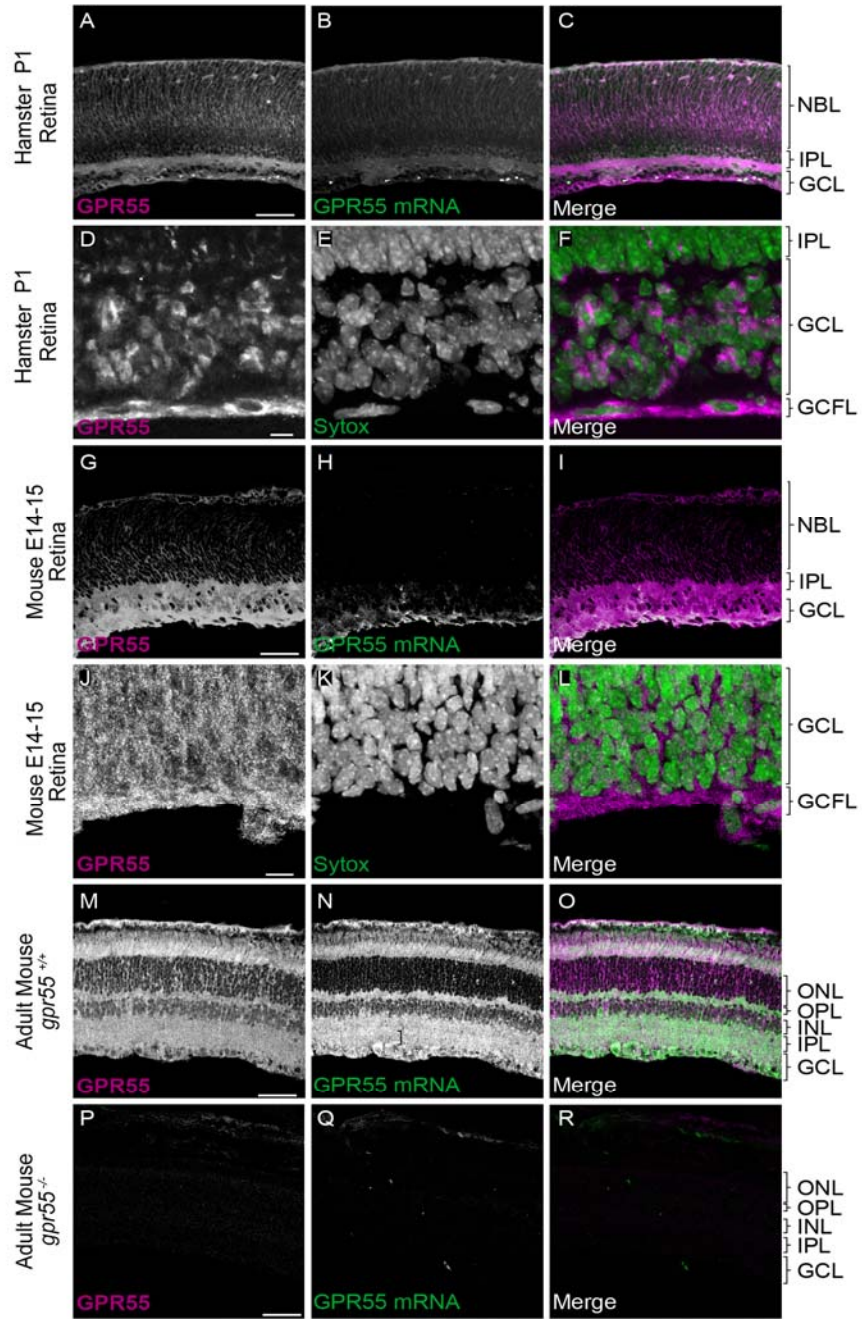


Figure 1. GPR55 protein and mRNA expression in the retina

Figure 2.2 GPR55 protein expression in retinal explants and primary cortical neurons.

**(A)** Expression of GPR55 in the mouse cortex and **(B)** retina at different developmental stages **(C)** Expression of GPR55 in the retina of *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* mouse embryo (E14/15). **(D-F)** Expression of GPR55 in retinal explants from *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* mice, and in the presence of the specific blocking peptide (BP). **(G-I)** E14/15 axons and growth cones of retinal explants from *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* mice, and with the in the presence of the specific BP. **(J-L)** The expression of GPR55 in dendrites (MAP2) and **(M-O)** axons (NFM) of RGCs. **(P)** Expression of GPR55 in primary cortical neuron using GPR55 antibody, **(Q)** using 3 $\mu$ M of specific GPR55 fluorescent Tocrifluor ligand T-1117 and **(R)** using GPR55 antibody in a purified RGC culture. Scale bars: 100 $\mu$ m **(D-F)**; 10 $\mu$ m **(G-I, P-R)**; 5 $\mu$ m **(J-O)**.

Figure 2

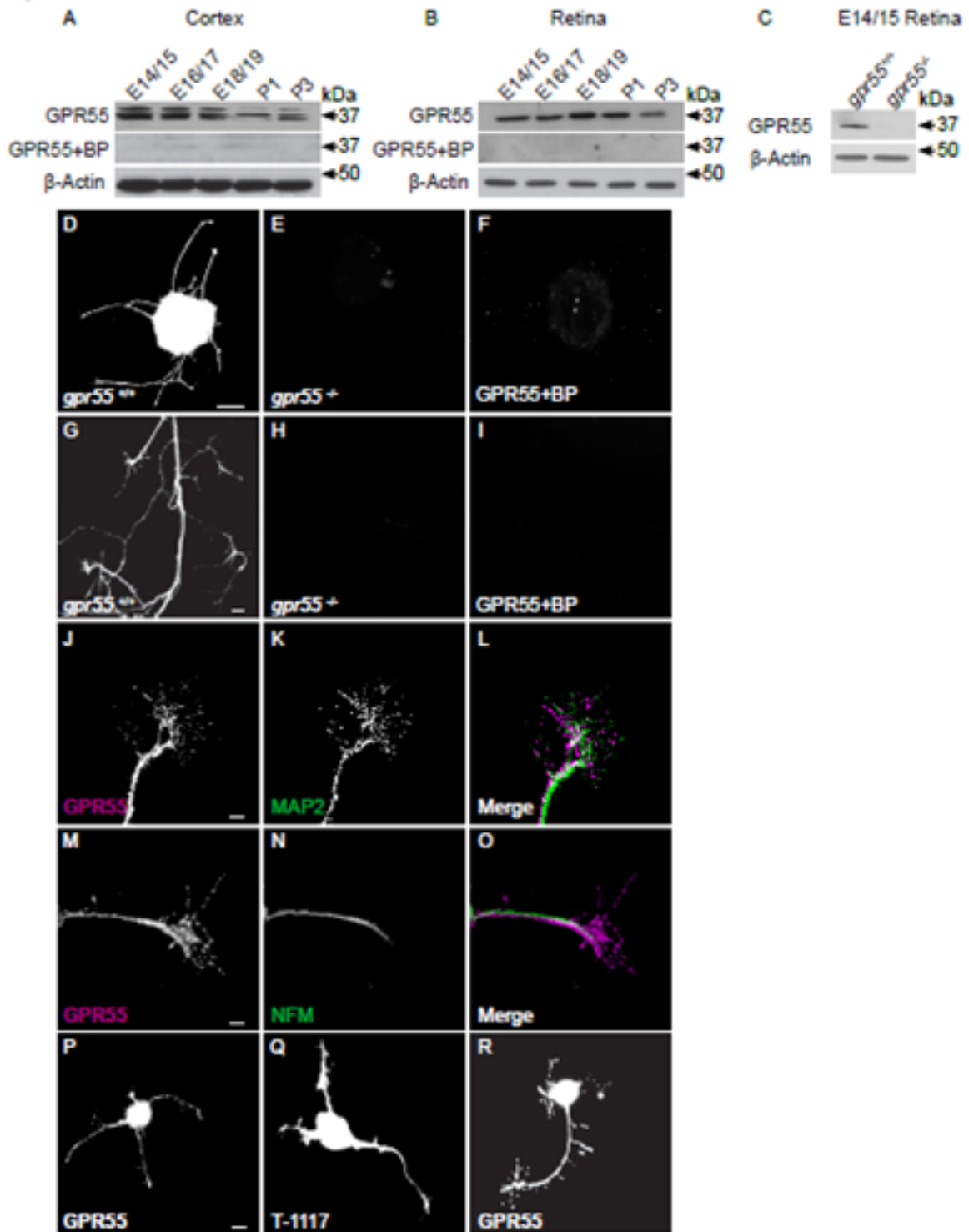


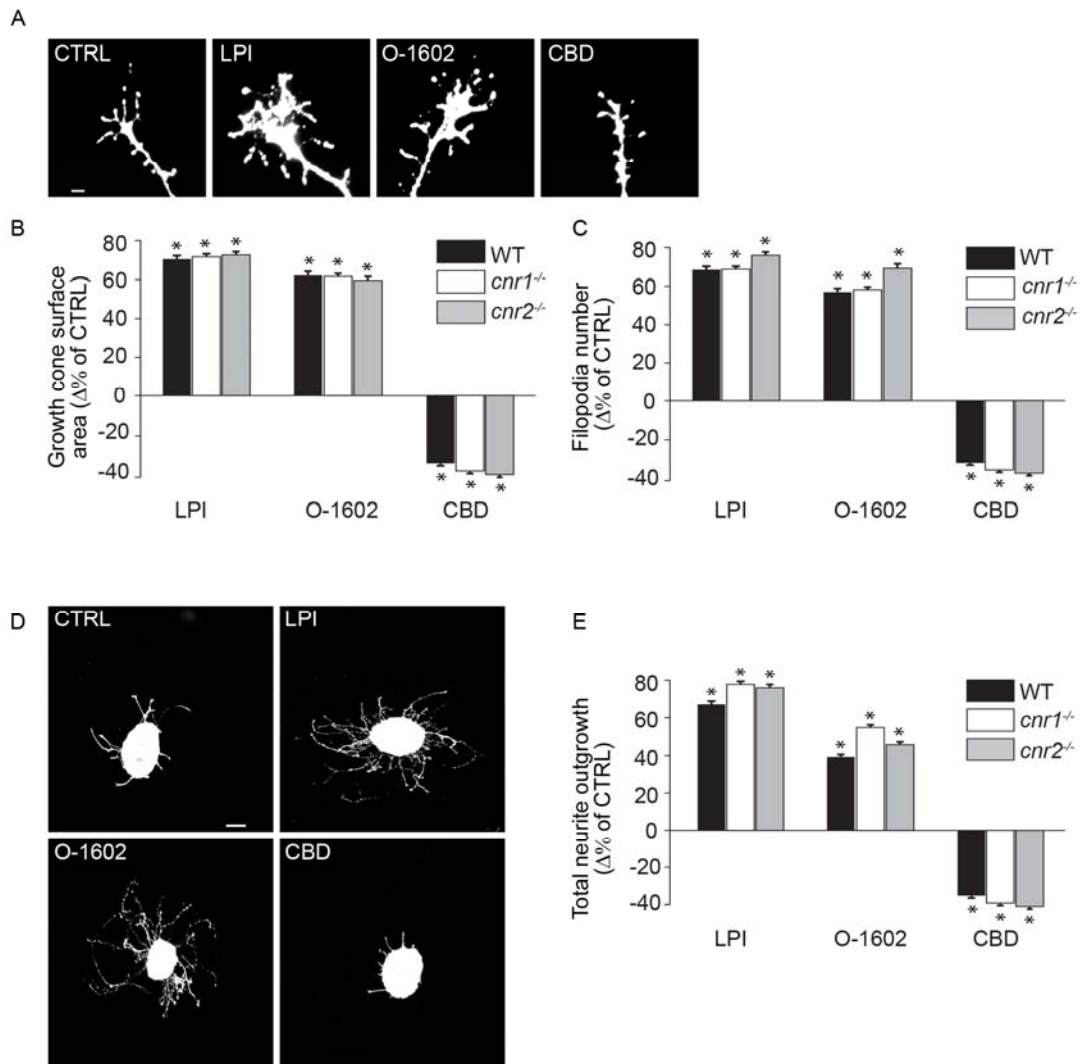
Figure 2. GPR55 protein expression in retinal explants and primary cortical neurons

Figure 2.3 GPR55 ligands reorganize the morphology of the GC and modulate axon growth via a cannabinoid independent pathway.

**(A-C)** Growth cone surface area and filopodia number of retinal projection GCs after a 60-minute treatment with GPR55 agonists LPI (1 $\mu$ M) and O-1602 (300nM) or antagonist CBD (300nM) in WT, *cnr1*<sup>-/-</sup>, and *cnr2*<sup>-/-</sup> mice. **(D-E)** Total retinal neurite growth of retinal explants cultured for 1DIV and treated for 15h with LPI (1 $\mu$ M), O-1602 (300nM) and CBD (300nM) in WT, *cnr1*<sup>-/-</sup>, and *cnr2*<sup>-/-</sup> mice. Scale bars: 5 $\mu$ m **(A)**; 100 $\mu$ m **(D)**. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates significant changes between LPI, O-1602, or CBD compared to control in **B**, **C**, and **E**;  $p < 0.004$ .



Figure 3

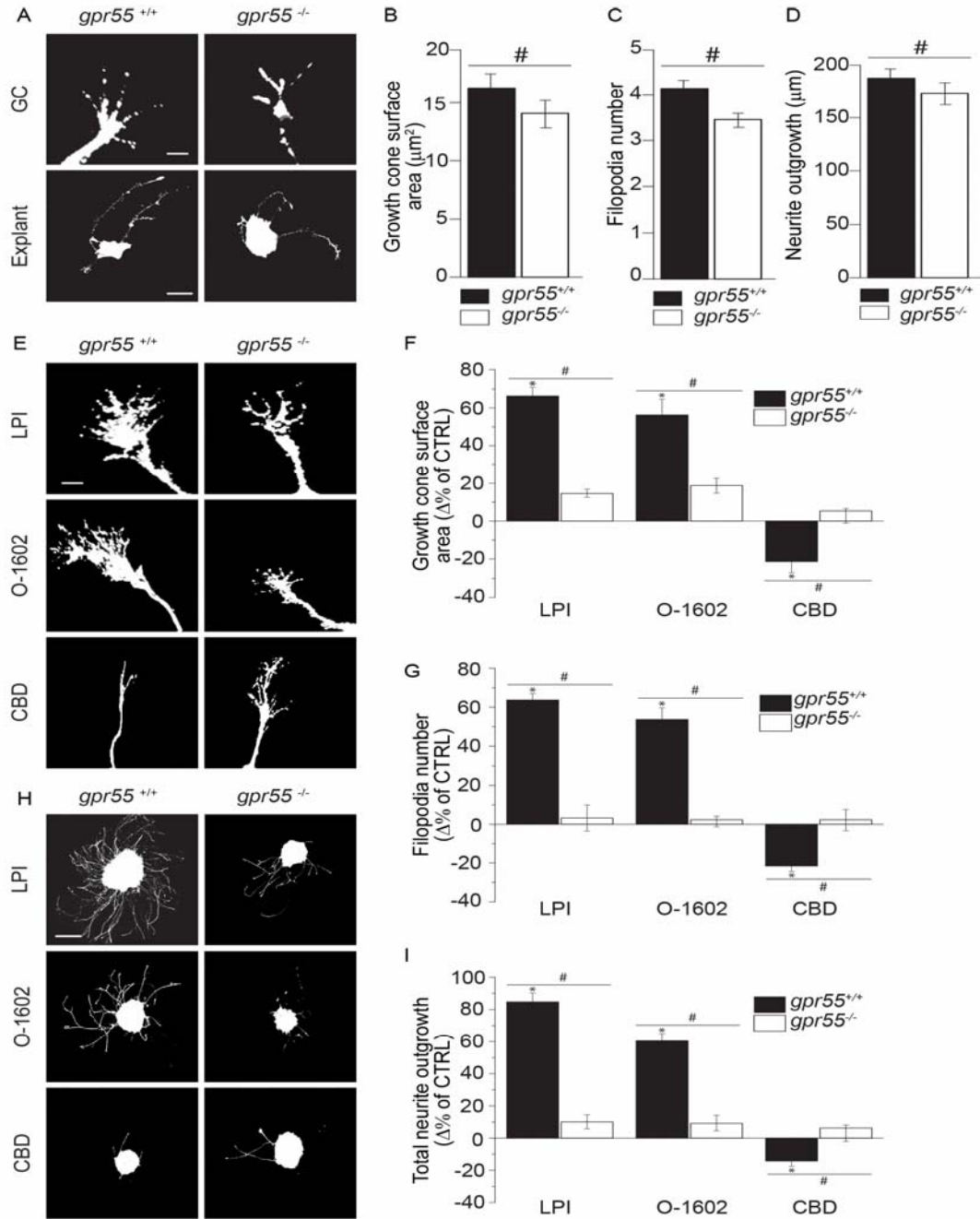


**Figure 3. GPR55 ligands reorganize the morphology of the GC and modulate axon growth via a cannabinoid independent pathway**

Figure 2.4 GPR55 mediates the reorganization of the GC morphology and the modulation of axon growth.

**(A-D)** Basal growth cone surface area, filopodia number and total neurite outgrowth in *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* retinal explants. **(E-G)** Growth cone surface area and filopodia number in *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* retinal explants treated for one hour with LPI (1 $\mu$ M), O-1602 (300 nM) or CBD (300 nM). **(H-I)** Total neurite outgrowth in *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* retinal explant treated for 15 hours with LPI, O-1602 or CBD at the same previously cited concentrations. Scale bars: 5 $\mu$ m **(A)** and **(E)** for GC; 100 $\mu$ m **(A)** and **(H)** for explants. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates a significant change induced by LPI, O-1602, or CBD compared to the control in **F**, **G** and **I**;  $p < 0.0001$ ; # indicates a significant change between LPI, O-1602, or CBD and the control in *gpr55<sup>+/+</sup>* compared to *gpr55<sup>-/-</sup>* in **F**, **G**, **I** and **B-D**;  $p < 0.004$ .

Figure 4



**Figure 4. GPR55 mediates the reorganization of the GC morphology and the modulation of axon growth**

Figure 2.5 At low concentration, GPR55 ligand modulates GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway

**(A)** Expression of P-ERK-1/2, ERK-1/2 and  $\beta$ -actin in primary cortical neurons incubated with one of the following: 1 $\mu$ M LPI, 300nM O-1602 or 300nM CBD at 37°C for 2, 5 and 20 minutes. The antibody  $\beta$ -actin was used to verify (and correct for) equal loading in all lanes.

**(B)** Histogram illustrating the quantification of ERK-phosphorylation. **(C)** ERK phosphorylation state following 15 minutes pre-treatment with CI-1040, an ERK1/2 inhibitor,

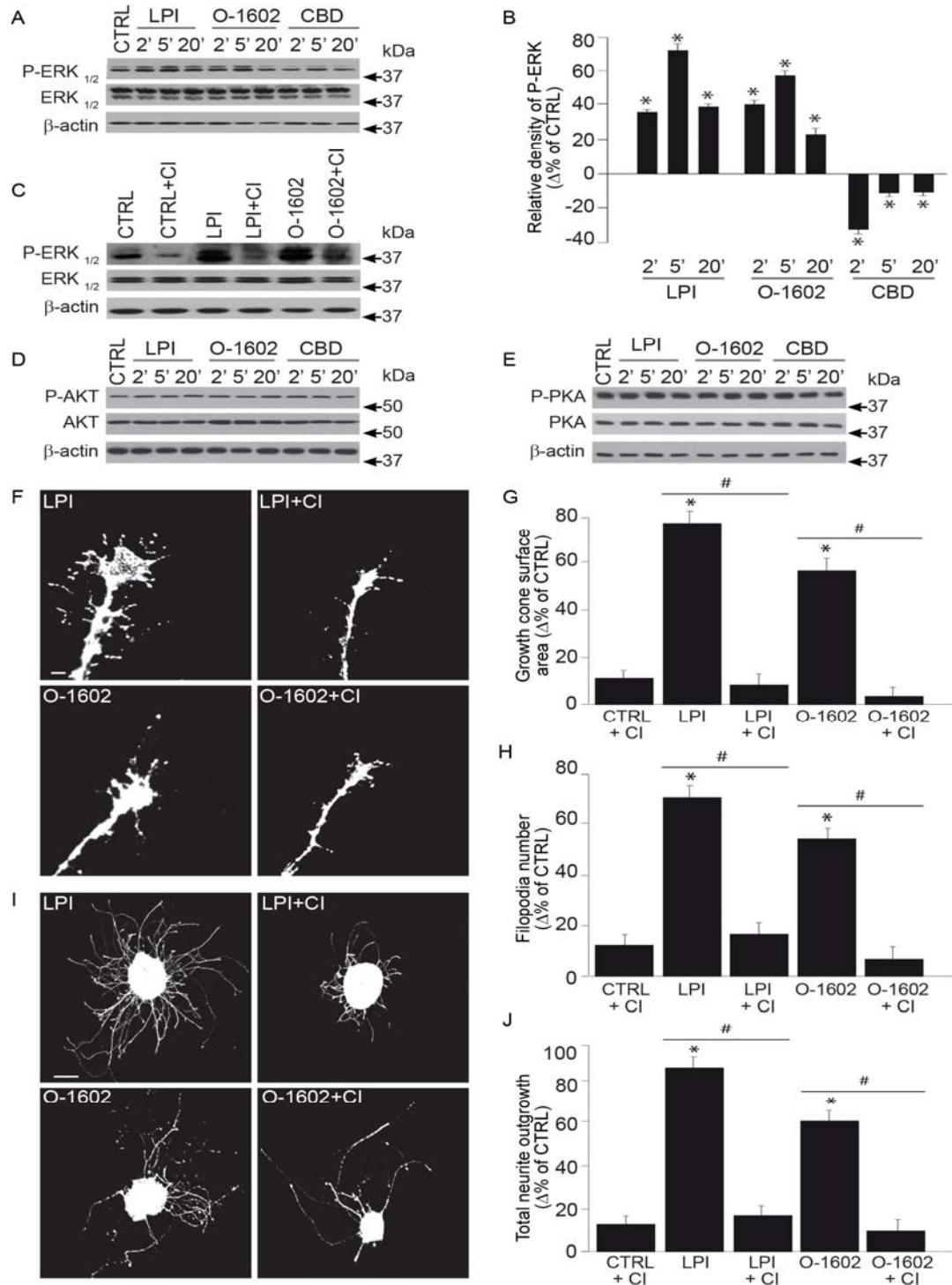
before the incubation with or without 1 $\mu$ M LPI, 300nM O-1602 or 300nM CBD. **(D-E)** AKT and PKA phosphorylation states, no significant variations were observed in the presence of

GPR55 ligands for the times indicated. **(F-H)** Growth cone surface area and filopodia number of retinal explant treated with GPR55 agonists in the presence or the absence of the ERK

inhibitor. **(I-J)** Total projection growth of retinal explant cultures treated with GPR55 agonists LPI and O-1602 in the presence or the absence of CI-1040. Scale bars: 10 $\mu$ m **(F)**; 100 $\mu$ m **(I)**.

Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates a significant change compared to the control group in **B**, **G**, **H** and **J**;  $p < 0.0001$ . # indicates a significant change induced by the ERK inhibitor in **G**, **H** and **J**;  $p < 0.004$ .

Figure 5



**Figure 5. At low concentration, GPR55 ligand modulates GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway**

Figure 2.6 At a higher concentration, LPI activates RhoA pathway and produces growth cone collapse and neurite repulsion.

**(A-B)** Using p-RhoA and RhoA antibodies, RhoA activation was determined analyzing the respective phosphorylation state by western blotting following treatment with 1 or 10 $\mu$ M LPI.

**(C-E)** Growth cone surface area and filopodia number of retinal explants after treatment with GPR55 agonist in the presence or the absence of the ROCK1 inhibitor, Y-27632. **(F-G)** Total

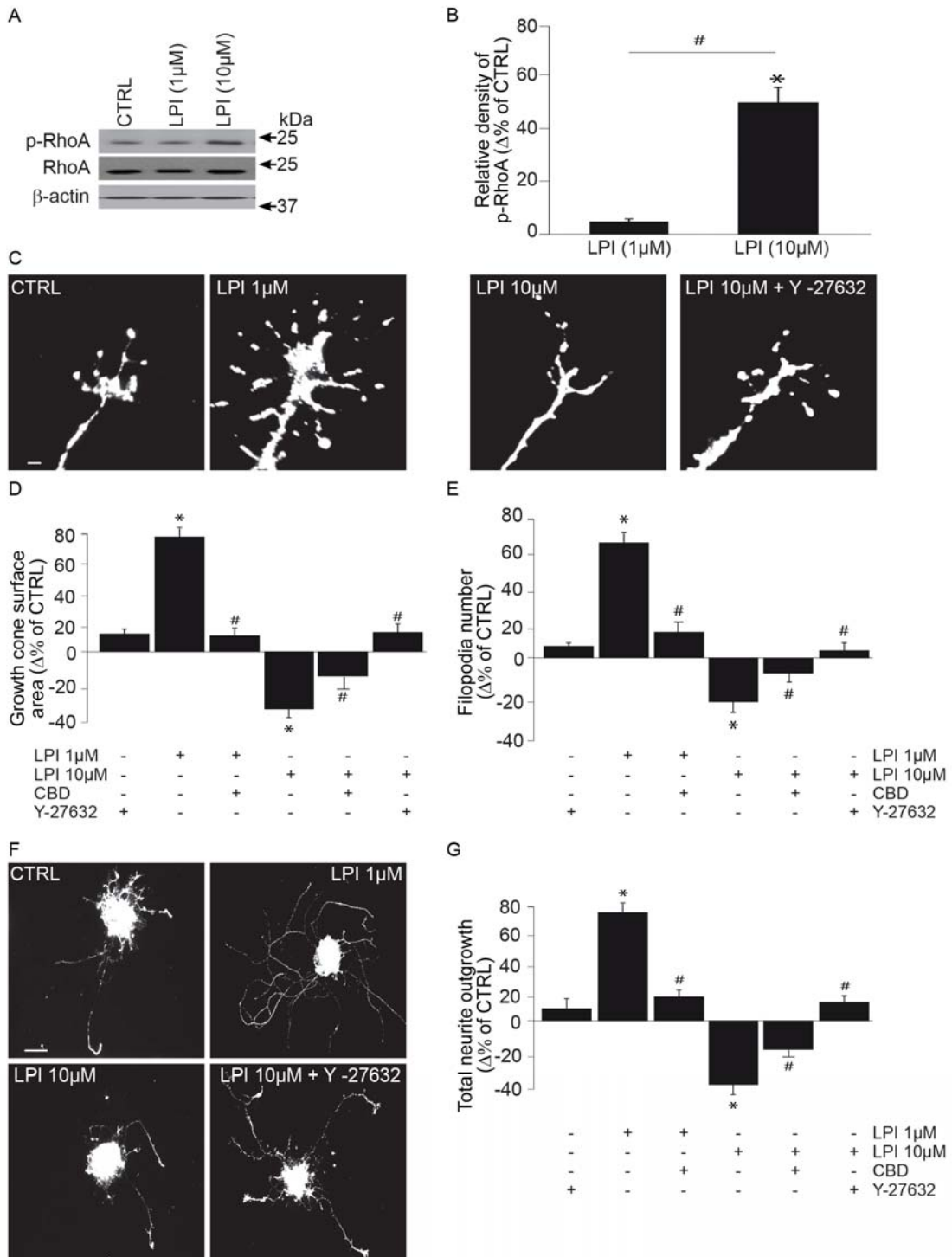
projection length of retinal explant treated with GPR55 agonist LPI (1 or 10 $\mu$ M) in the presence or the absence of the Y-27632. Scale bars: 5 $\mu$ m **(C)**; 100 $\mu$ m **(F)**. Values are

presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates a significant change compared to the control group, #

indicates a significant change induces by CBD (300nM) or Y-27632 (20 $\mu$ M) in **D**, **E** and **G**; p

< 0.0001 and p < 0.001 in **B**.

Figure 6



**Figure 6. At a higher concentration, LPI activates RhoA pathway and produces growth cone collapse and neurite repulsion**

Figure 2.7 Pharmacological modulation of GPR55 affects RGC turning *in vitro*

**(A)** Photomicrographs of time-lapse microscopy from DIV1 mouse retinal explant growth cone taken at  $t = 0$  minute and  $t = 60$  minutes during GC turning assay experiments. Black arrows indicate the direction of the microgradient while blue arrowheads indicate initial GC position. Green arrowheads show the GC position following neurite attraction and red arrowheads indicate the GC position after repulsion. **(B-C)** Superimposed RGC axon trajectories over the 60-minute observation period for vehicle and LPI; no significant changes were observed on growth cone behaviour in the presence of the vehicle while LPI increased axon growth and turning toward the pipette tip. Black arrows indicate the direction of the gradient. **(D)** Turning angle cumulative frequency curves of RGC growth cones. The turning angle of each growth cone was plotted against the percentage of growth cones turning that angle or less. **(E)** Quantification of neurite elongation and GC turning responses following drug stimulation. **(F)** Representative photomicrograph of the effect of repulsion and GC collapse created during 60-minute stimulation with  $10\mu\text{M}$  LPI. Scale bars:  $40\mu\text{m}$  **(A)** and **(F)**. Values are presented as means  $\pm$  SEM; \* indicates significant change compared to the vehicle in **(E)**;  $P < 0.0001$ .



Figure 7

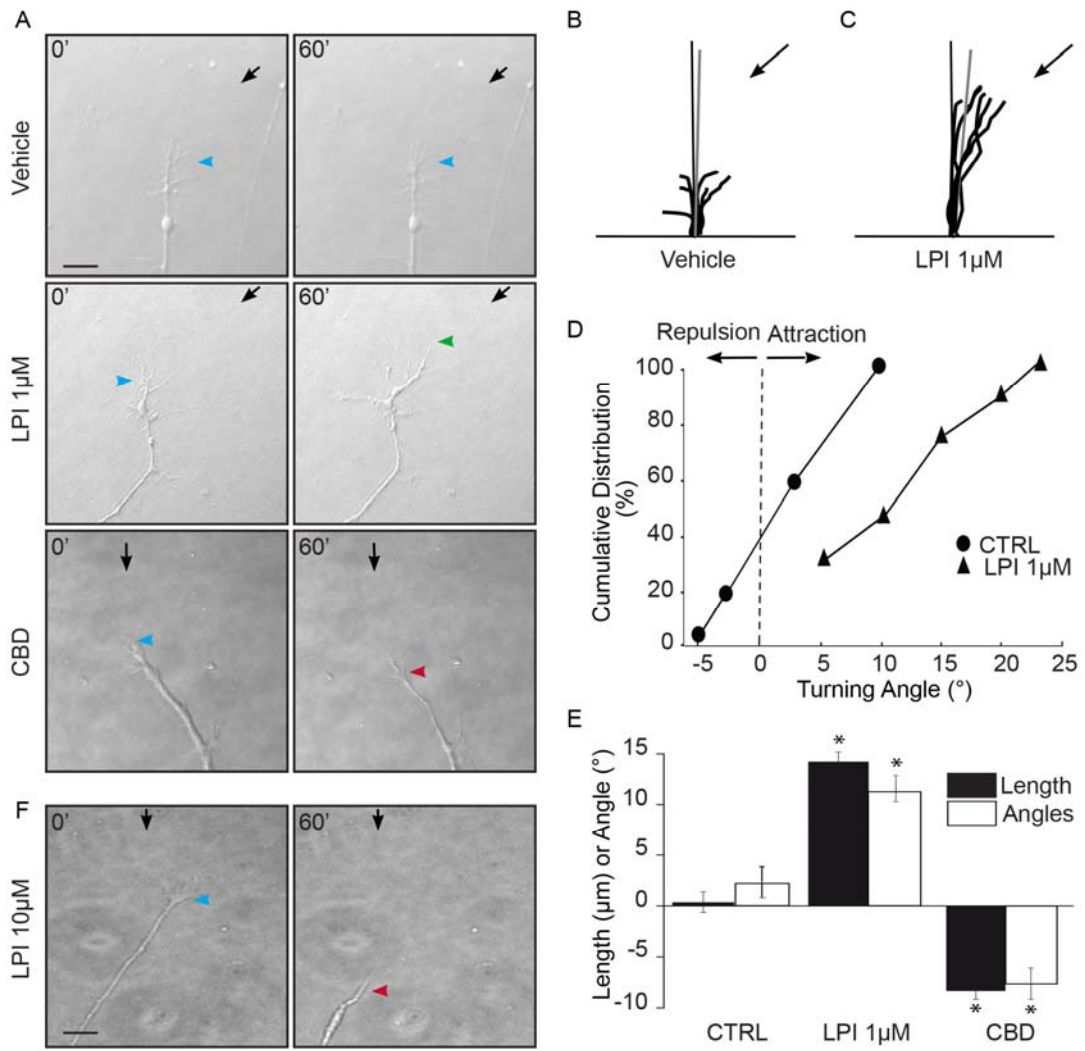
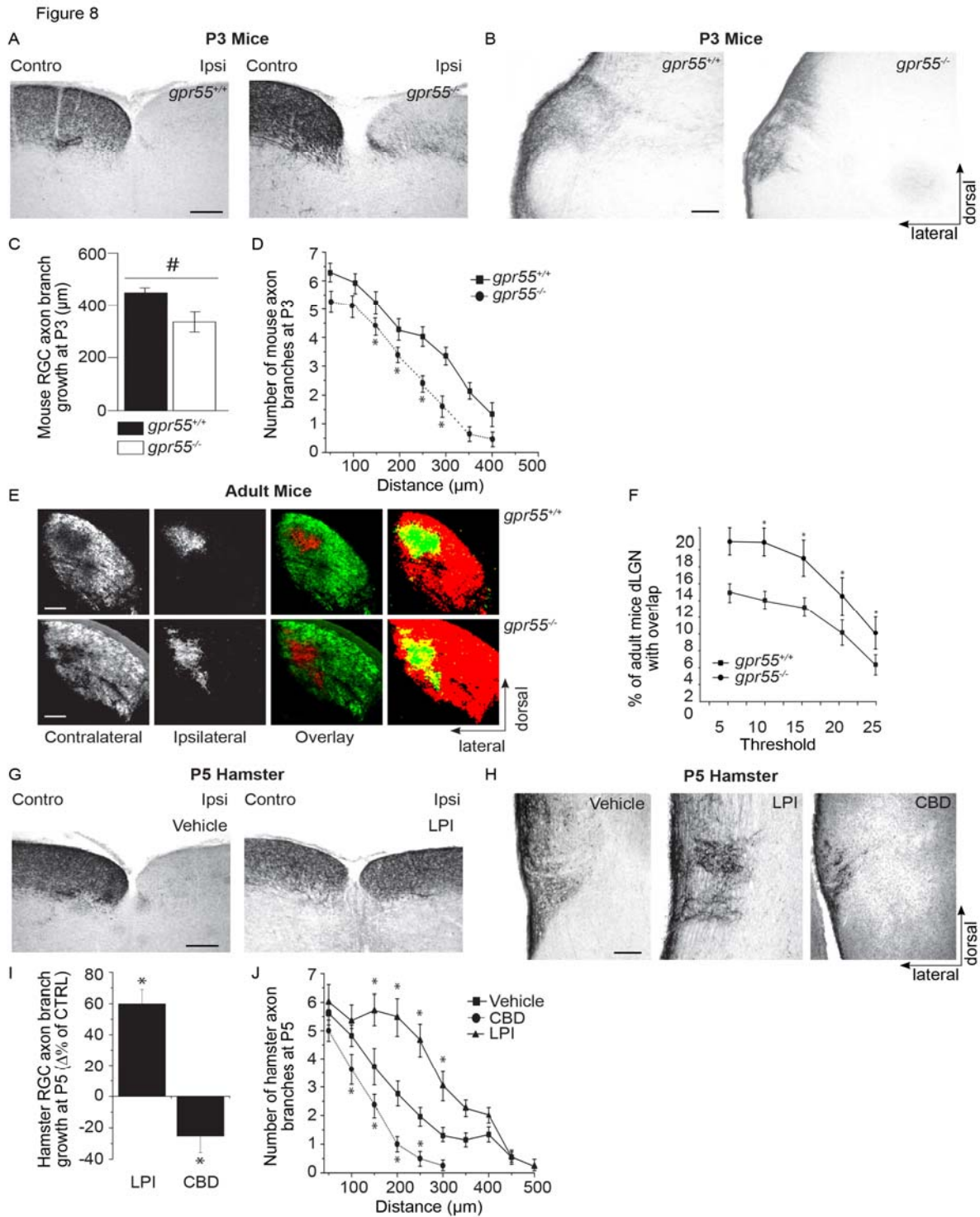


Figure 7. Pharmacological modulation of GPR55 affects RGC turning *in vitro*

Figure 2.8 GPR55 plays an important role during retinal projection growth and target selection *in vivo*

**(A)** Photomicrographs of retinal projections in the SC of P3 *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* mouse pups injected, at P1, in one eye with CTb. **(B)** Photomicrographs of retinal projections in the DTN of P3 *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* mice **(C)** Quantification of retinal projection development in the DTN of *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>*; collateral projection length are expressed as mean  $\pm$  SEM. **(D)** Number of collateral axon branches decreases in *gpr55<sup>-/-</sup>* compared to *gpr55<sup>+/+</sup>* mice. **(E)** Images of retinogeniculate projection patterns visualized following CTb conjugated to Alexa-555 (CTb-555; red) and CTb-488 (green) injections into left and right eyes of *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* adult mice. Merged images show all projections from both eyes to the dorsal lateral geniculate nucleus, overlaying projections are shown in yellow. **(F)** Quantification in *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>* adult mice of the percentage of the dLGN receiving overlapping inputs as mean  $\pm$  SEM. **(G)** Photomicrographs of retinal projections in the SC of P5 hamsters injected, at P1, in one eye with CTb and LPI or vehicle. A single injection of LPI induced aberrant projections in the ipsilateral SC. **(H)** Photomicrographs of P5 hamster retinal projections in the DTN in the control, LPI and CBD groups. **(I)** Quantification of retinal projection development in the DTN; collateral projection length are expressed as mean  $\pm$  SEM. **(J)** Number of collateral axon branches in treated groups compared to the control group. LPI increased axon growth and collateral branch number whereas CBD decreased these endpoints compared to the control. Scale bars: 200 $\mu$ m (**A, B, E and G**), 100 $\mu$ m (**H**); n= 8 brains per condition for P3 mice, n = 7 brains per condition for adult mice, and n = 5 brains per condition for P5 hamsters, \* indicates significant change compared to the control group in (**C, D, F, I, and J**); P= 0.0001.



**Figure 8. GPR55 plays an important role during retinal projection growth and target selection *in vivo***

## **CHAPITRE 3**

## **GPR91 and GPR99 mediate axon growth, not axon guidance**

Cherif Hosni<sup>1</sup>, Duhamel François<sup>2</sup>, Bruno Cécyre<sup>1</sup>, Alex Bouchard<sup>1</sup>, Ariane Quintal<sup>1</sup>, Sylvain Chemtob<sup>2</sup> and Jean-François Bouchard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Optometry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Research Center-CHU Ste-Justine, Department of Pharmacology and Therapeutics and Departments of Pharmacology University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Abbreviated title: GPR91, GPR99 and axon growth

Number of figures: 5

Number of pages: 41

Number of words for Abstract: 186 words.

The main text: 3189 words.

Corresponding author:

Jean-François Bouchard  
School of Optometry, University of Montreal  
3744, rue Jean-Brillant, Office- 260-7  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1  
Phone: (514) 343-6111 ext. 4083  
Fax: (514) 343-2382

Acknowledgments: This work was supported by a grant to J.F.B from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC: RGPAS 478115-2015 and RGPIN 2015-06582) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR: MOP-86495 and MOP-301710). C.H. is supported by a studentship of Vision Health Research Network-Fonds de Recherche du Québec- Santé (FRQ-S). J.F.B. holds a Chercheur Boursier Senior from the FRQ-S.

Keywords: GPR91 receptor, GPR99 receptor, Succinate,  $\alpha$ -Ketoglutarate, axon growth, growth cone, retinal ganglion cell, development, vision.

### 3.1 Abstract

GPR91 and GPR99 participate in various developmental and pathogenic processes. Both receptors are detected in the retina and they are expressed in the axons of developing retinal ganglion cells (RGC) in mice embryos. Analysis of specific ligand, simple and double receptor knockout mice shows that GPR91 and GPR99 signaling have complementary roles during RGC axon growth whereas; they have no effects on axon guidance. Selective agonists of GPR91 (succinate) and GPR99 ( $\alpha$ -ketoglutarate) increasing the GC size and the filopodia number regulate growth cone (GC) morphology. Partial decrease in these effects was observed in neuronal cultures obtained from *gpr91* and *gpr99* knockout mouse embryos. No effects were observed in double knockout. No effects on axon guidance were observed in the presence of these agonists. In addition, in this study, we showed that GPR91 and GPR99 activation triggers the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Furthermore, blocking ERK1/2 activity using CI-1040 completely abolished the effects of GPR91 and GPR99 on growth cone morphology and axon growth. These results suggest, for the first time, an important role of GPR91 and GPR99 during the establishment of the neurovisual system.

## 3.2 Introduction

Axon guidance is a fundamental mechanism that underlies the assembly of functional neuronal circuits in the developing and regenerating nervous system. A variety of extracellular guidance cues such as the four canonical families of axon guidance cues: netrins, ephrins, semaphorins, and slits lead accurately the axons during their navigation toward their appropriate targets<sup>1-3</sup>. The detection of the environment, the integration of positional signals and the activation of downstream effectors to regulate cytoskeletal organization are all mediated by the receptors present at the growth cone (GC) at the tip of the axon<sup>4-5</sup>. GC is a dynamic cytoskeletal vehicle, which drives the front end of a developing axon. It serves to interpret and navigate through the complex landscape of the early nervous system. In addition, the modulation of the neuronal growth cones is not only relevant for axonal patterning during development. It also participates to structural plasticity of synaptic connections in adults<sup>6</sup>.

G-protein coupled receptors (GPCRs) are essential regulators of cellular physiology and pathophysiology. Mutations or modifications of these receptors could produce aberrant cellular signaling and diseases<sup>7-8</sup>. Approximately 40-50% of the existing therapeutics specifically target GPCRs actions<sup>9-10</sup>. Moreover, a large subset of the GPCR family includes orphan receptors that may provide a potential source of novel therapeutic targets<sup>11</sup>. Increasing evidences in the past decade present GPCRs as mediators of both repulsive and attractive axon guidance *in vitro* and *in vivo*, and their ligands may serve as guidance cues for axon pathfinding<sup>12-15</sup>. For example, the seven transmembrane domain receptors Celsr3 and Fzd3 known for regulation cell polarity are also critical for axon guidance<sup>16-22</sup>.

In the 2004s, G-protein-receptor 91 (GPR91) and G-protein-receptor 91 (GPR99), members of the GPCR family, were both identified as receptors respectively of the Krebs cycle intermediates succinate and 2-oxoglutarate ( $\alpha$ -ketoglutarate)<sup>23</sup>. While it's crucial role in energy metabolism, succinate accumulation in mitochondria in low oxygen states may cause its out diffusion into the general circulation through a number of putative membrane transporters and its acting as a signaling molecule in peripheral tissues<sup>24</sup>. GPR91 expression was first reported in kidney<sup>25</sup>, more recently it was detected in other tissues, including in spleen, placenta, liver, plasma in the low micrometer range, cardiac muscle, white adipose tissue and retina<sup>23;25-29</sup>. GPR91 plays a critical role in the pathogenesis of diabetic neuropathy, hypertension, heart stress, liver damage<sup>27-28;30</sup> and normal retinal development and proliferative ischemic retinopathy<sup>26</sup>. In the kidneys, succinate via GPR91 by succinate increases renin secretion producing a rise in arterial blood pressure<sup>23</sup>. In rat ventricular cardiomyocytes, succinate and its receptor are involved in cardiac hypertrophy<sup>28</sup>. Moreover, GPR91 expressed in the mouse and rat retina, exerts an important role in the retinopathy of prematurity by controlling the expression of numerous major angiogenic factors<sup>31</sup>.

GPR99, a close relative of GPR91, was originally identified as an orphan GPCR with homology to the P2Y nucleotide receptor subfamily by searching in the human genomic databases<sup>32</sup>. *Gpr99* mRNA was detected in human tissues by Northern blot analysis in kidney and placenta<sup>32</sup> and by a quantitative RT-PCR, predominantly in trachea, salivary glands, kidney, fetal brain, and lung and highly expressed in umbilical cord blood-derived mast cells<sup>33</sup>.



In mouse tissues, *gpr99* mRNA is highly expressed in kidney, testis, and smooth muscle<sup>23</sup>. Based on its selective binding with 2-oxoglutarate ( $\alpha$ -ketoglutarate) at a high micromolar potency range, GPR99 was initially recognized as an oxoglutarate receptor<sup>23</sup>. This observation has been replicated in a  $\beta$ -arrestin assay<sup>34</sup> and eventually named the oxoglutarate receptor by the Receptor Nomenclature and Drug Classification (NC-IUPHAR) committee<sup>35</sup>. However, many recent studies highlight the importance of the GPR99 receptor as an additional receptor for leukotriene 4 (LTE4). While confirming an apparent affinity for oxoglutarate in the high micromolar range, cells transfected with the human GPR99 show binding and functional responses to LTE4 with an affinity in the low nanomolar range. Moreover, in *gpr99*<sup>-/-</sup> mice, vascular leakage induced by LTE4, but not by LTC4 or LTD4-induced, was prevented<sup>36</sup>. The different potency and affinity values suggest further investigations on binding and signaling mechanisms to distinguish the preferred endogenous ligands for GPR99.

Similar signaling mechanisms are shared between axon guidance and neuronal migration<sup>37; 38-40</sup> and most chemotactic factors in the immune system signal through GPCRs<sup>41-42</sup>. We, therefore, investigated the roles for GPR91 and GPR99 in axon growth and guidance during the development of retinal ganglions in embryonic mice models.

### **3.3 Methods**

All animal procedures were performed in accordance with the relevant university's animal care committee's regulations and approval.

#### **3.3.1 Reagents**

Bovine serum albumin (BSA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), DNase, forskolin (FSK), Glycerol, Hoechst 33258, insulin, , ketoglutarate, laminin, monoclonal anti- $\beta$ -actin, monoclonal anti-MAP Kinase (Diphosphorylated ERK-1/2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, selenium, succinate, trypsin, triiodo-thyronine and Urea were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). B27, N2, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), fetal bovine serum (FBS), glutamine, Neurobasal media, penicillin-streptomycin, S-MEM, sodium pyruvate, and Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Alexa 488 and Alexa 555) were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). The normal donkey serum (NDS), goat and HRP coupled secondary antibodies raised against rabbit IgG (H+L) and mouse IgM ( $\mu$  chain specific) were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Rabbit-anti-mouse-macrophage was obtained from Accurate Chemical (Wesbury, NY, USA). Anti-ERK1/2 and anti-GAP-43 were acquired from EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Anti-RhoA and anti-phosphorylated RhoA were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Anti-PKA, anti-phosphorylated PKA, anti-AKT and anti-phosphorylated AKT were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Antibodies directed against GPR91 and GPR99 were purchased from Novus biologicals (Oakville, ON, Canada). ERK 1/2 inhibitor (CI-1040) was obtained from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). LNAC was acquired from EMD (La Jolla, CA, USA). The B

fragment of the cholera toxin (CTb) was from List Biological Laboratories (Campbell, CA, USA). Triton (X-100) was purchased from US Biological Life Sciences (Salem, MA, USA). DiO (D275), C<sub>18</sub> (3) (3,3' Dioctadecyloxacarbocyanine Perchlorate) was obtained from Molecular probes (EugeneOR, USA).

### **3.3.2 Tissue preparation for immunohistochemistry**

Adult mice were euthanized by an overdose of isoflurane. A transcardiac perfusion was conducted with phosphate-buffered 0.9% saline (PBS; 0.1M, pH 7.4), followed by phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (PFA), until the head was fixed. The nasal part of the eyes of mouse embryos and adult mice was marked with a suture and removed. Two small holes were made in the cornea before a first postfixation in 4% PFA for a period of 30 minutes. The cornea and lens were removed and the eyecups were postfixed for 30 minutes in 4% PFA. The eyecups were then washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in Neg 50 tissue Embedding Media (Fisher Scientific), flash-frozen and kept at -80°C. Sections (14µm thick) were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Concord, ON, Canada) and placed on gelatin/chromium-coated slides.

### **3.3.3 Immunohistochemistry**

The presence of GPR91 and GPR99 during the early development of the mouse retinas was investigated by immunohistochemistry. Retinal sections were washed in 0.1 M PBS, postfixed for 5 min in a 70% solution of ethanol, rinsed in 0.03% Triton X-100 in buffered saline, and blocked in 10% NDS and 0.5% Triton X-100 in buffered saline for 1 h. The sections were then coincubated overnight with rabbit GPR91 or GPR99 antibodies. After incubation with the primary antibody, the sections were washed in buffered saline, blocked for 30 min, and

incubated for 1 h with secondary antibody: Alexa donkey anti-rabbit 488. During the embryonic development of the mouse retina, we used an antibody (Brn-3) to label the retinal ganglion cell nuclei. After washes, the sections were mounted with a homemade PVA-Dabco media.

### **3.3.4 Retinal explant culture**

The retinas were isolated from mouse E14/15 embryos (Embryonic Days 14/15), dissected into small segments in ice cold DPBS and plated on 12mm glass coverslips previously coated with poly-D-Lysine (20µg/ml) and laminin (5µg/ml) in 24 well plates. The explants were cultured in Neurobasal supplemented with 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 5µg/ml LNAC, 1% B27, 40ng/ml selenium, 16µg/ml putrescine, 0.04ng/ml triiodo-thyronine, 100µg/ml transferrin, 60ng/ml progesterone, 100µg/ml BSA, 1mM sodium pyruvate, 2mM glutamine, 10ng/ml ciliary neurotrophic factor (CNTF), 5µg/ml insulin, and 10µM FSK at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. At DIV0 (Day *In Vitro* 0), one hour following plating), the explants were treated for 15 hours for projection analysis or for one hour at DIV1 for growth cone analysis. Photomicrographs were taken using an Olympus IX71 microscope (Olympus, Markham, ON, Canada) and analyzed with Image Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). The total length of axon bundles was quantified and expressed as mean ± SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat Software Inc, Chicago, IL, USA).

### **3.3.5 Purified retinal ganglion cell culture**

RGCs obtained from P7–P8 mice (Charles River) were purified and cultured according to a protocol previously described by Barres et al. (1988). In brief, following enucleation, retinas

were dissected and enzymatically dissociated, at 37°C for 30 min, in a papain solution (15 U/ml in DPBS) containing 1 mM l-cysteine. The retinas were then triturated sequentially, with a 1 ml pipette, in a solution containing ovomucoid (1.5 mg/ml), DNase (0.004%), BSA (1.5 mg/ml), and rabbit antibodies directed against mouse macrophages (1:75) to yield a suspension of single cells. The suspension was centrifuged and washed in a high concentration ovomucoid-BSA solution (10 mg/ml for each in DPBS). The dissociated cells were resuspended in DPBS containing BSA (0.2 mg/ml) and insulin (5 µg/ml). RGCs were purified using the two-step panning procedure (Barres et al., 1988; Meyer-Franke et al., 1995). Briefly, to remove macrophages, the retinal suspension was incubated at room temperature in Petri dishes coated with affinity-purified goat anti-rabbit IgG (H+L). The nonadherent cells were then transferred to a Petri dish that had been coated with affinity-purified goat anti-mouse IgM (µ chain specific) followed by anti-Thy-1.2 monoclonal IgM. The adherent RGCs were first released enzymatically by incubating them in a 0.125% trypsin solution at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> followed by manually pipetting an enzyme inhibitor solution (30% FBS in Neurobasal) along the surface of the dish. Purified RGCs were plated on poly-D-lysine- (10 µg/ml) and laminin- (5 µg/ml) coated glass coverslips (number 0 Deckgläser; Carolina Biological) in 24-well plates. RGCs were cultured in 600 µl of serum-free medium modified from Bottenstein and Sato (1979). Neurobasal media was supplemented with B27, selenium, putrescine, triiodothyronine, transferrin, progesterone, pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), CNTF (10 ng/ml), BDNF (50 ng/ml), insulin (5 µg/ml), and FSK (10 µM). RGCs were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. All experiments on purified RGCs were performed 36–40 h following plating.

### **3.3.6 Primary neuron culture**

Primary cortical neurons were used in this study because of the large amount of neurons that can easily be cultured and harvested for biochemical assays, which is not possible with RGCs. *Gpr91*, *gpr99*, and *gpr91/99* pregnant knockout mice and their respective WT controls were used. E14/15 embryo brains were dissected and the superior layer of each cortex was isolated and transferred in 2ml S-MEM at 37°C containing 2.5% trypsin and 2mg/ml DNase for 15 minutes. Pellet was transferred into 10ml S-MEM with 10% FBS and stored at 4°C. After centrifugation, pellet was again transferred in 2ml S-MEM supplemented with 10% FBS and triturated 3 to 4 times. The supernatant was transferred in 10ml Neurobasal medium. Dissociated cells were counted and plated at 50,000 cells per well on 12mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (20µg/ml). Neurons were cultured for 2 days in Neurobasal medium supplemented with 1% B-27, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 0.25% N2 and 0.5mM glutamine. Neurons were treated with either GPR91 agonist (100µM succinate), a GPR99 agonist (200µM  $\alpha$ -ketoglutarate), ERK 1/2 inhibitor (20µM CI-1040), for 60 minutes for GC morphology or 2, 5, 10 and 15 minutes for ERK-1/2, RhoA, AKT, and PKA protein quantification using Western Blots.

### **3.3.7 Growth cone behavior assay**

Embryonic retinal explants were cultured on a coverglass in a borosilicate chamber (Lab-Tek; Rochester, NY, USA) for 2 DIVs and placed in an incubator mounted on an inverted microscope (Olympus IX71). They were kept at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with a Live Cell chamber (Neve Bioscience, Camp Hill, PA, USA) throughout the whole experiment. A microgradient was created using a Picoplus micro-injector (Harvard Apparatus, St-Laurent, QC, Canada).

Glass micropipettes with a diameter of the tip of 2-3 $\mu$ m were positioned at 45° and at 100 $\mu$ m away from the GC of interest<sup>14-15;98</sup>.

### **3.3.8 Immunocytochemistry**

After treatments, retinal explants and primary cortical neuron cultures were washed with PBS (pH 7.4), fixed in 4% PFA (pH 7.4) and blocked with 2% normal goat serum (NGS) and 2% BSA in PBS containing 0.1% Tween 20 (pH 7.4) for 30 minutes at room temperature. Neurons were then incubated overnight at 4°C in blocking solution containing anti-GAP-43 (1:1,000) for GC morphology analysis, anti-GPR91 (1:500) or anti-GPR99 (1:500) for GPR91 or GPR99 protein expression, MAP2 (1:500) or NFM (1:500). The following day, neurons were washed and labeled with Alexa Fluor secondary antibodies (488 and 555) and Hoechst 33258, and the coverslips were mounted with a homemade Dabco-PVD media<sup>99</sup>.

### **3.3.9 Western blot analysis**

Mouse embryos or pups were sacrificed at various ages, namely: E14/15, E16/17, E18/19, P1 (Postnatal Day 1), and P3. Following deep anesthesia by hypothermia, eyes were immediately removed for Western blot analysis. Retinas were dissected on ice, homogenized by hand in Radio ImmunoPrecipitation Assay buffer (RIPA: 150mM NaCl, 20mM Tris, pH 8.0, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM EDTA). This buffer was supplemented with a protease inhibitor mixture (aprotinin, leupeptin, pepstatin (1 $\mu$ g/mL) and phenylmethylsulfonyl fluoride (0.2mg/mL); Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). Samples were then centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 10 minutes and supernatants were removed and stored. Protein content was equalized using BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada). In another set of experiments, primary cortical neurons were cultured for 2 DIVs at a density of  $\approx$  250,000

cells/dish in 35mm poly-D-lysine coated petri dishes. Following treatment, neurons were washed once with ice-cold PBS (pH 7.4) and then lysed with Laemmli sample buffer. Primary antibodies were used at the following concentrations: anti-GPR91 (1:500), anti-GPR99 (1:500), anti- $\beta$ -actin (1:5,000), anti-AKT (1:1,000), anti-p-AKT (1:1,000), anti-ERK1/2 (1:5,000), anti-p-ERK1/2 (1:2,000). Results were visualized using homemade Enhanced ChemiLuminescent (ECL) Western blot detection reagents (final concentrations: 2.5mM luminol, 0.4mM p-coumaric acid, 0.1M Tris-HCl (pH 8.5), 0.018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **3.3.10 Lipophilic Dye Tracing and Tissue Clearing**

On the appropriate day of gestation, the pregnant mouse was anesthetized then sacrificed and the embryos were removed from the mother. The lambdoid sutures were incised and the occipital bones removed of the E14/15 embryos to better expose the brain to the fixative (PFA, 4%) where they were placed for 1 week at 4°C until tracing with DiO.

For complete optic nerve labeling, one eye of embryonic mouse tissue was enucleated, and crystals of DiO implanted unilaterally into the optic disk. Embryos were incubated at 37°C in PFA 4% for 7 days. Tissue clearing was performed according to *Hama et al.* Briefly embryos were incubated 2 days in Scale A2 solution (4M urea, 10% glycerol, 0.1% Triton 100x, in water) followed by 2 days in scale B4 solution (8M urea, 0.1% Triton 100x, in water) then in fresh Scale A2 solution until complete clearing for one week<sup>86</sup>. Brains with the optic nerve intact were then carefully removed, and the proximal visual system imaged by fluorescence microscope to allow identification of subtle guidance defects at the optic chiasm.



### 3.3.11 Intraocular injections

For eye-specific segregation studies in the dLGN, *gpr91*<sup>-/-</sup> and *gpr99*<sup>-/-</sup> adult mice and their WT littermates received an intraocular injection of CTb conjugated to Alexa-555 into the left eye and CTb coupled to Alexa-488 into the right eye (2  $\mu$ l; 0.5% in sterile saline). Four days after the injection, the mice were anesthetized and perfused transcardially with 0.1M PBS (pH 7.4) followed by 4% PFA in PBS. The brains were removed, postfixed overnight at 4°C, cryoprotected, frozen and kept at -80°C. The effects of the intraocular injection of the CTb were visualized on sections washed five times (one minute each) with PBS, mounted on gelatin-chromium alum-subbed slides, air-dried and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA, USA).

### 3.3.12 Quantification Method

Photomicrographs of optic chiasm were taken with a BX71 microscope (Olympus), an Evolution VF camera (MediaCybernetics) and Image Pro Plus 5.1 image analysis software. For eye specific segregation quantification in the dLGN, images were collected and measured by an observer “blind” to the experimental conditions to minimize any bias. Universal gains and exposures were established for each label. Raw images of the dLGN were imported to Matlab and an area of interest comprising the dLGN was cropped excluding the ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet, then the degree of left and right eye projection overlap was quantified using an established multi-threshold method of analysis<sup>88-90</sup>. This approach allows for a better analysis of overlapping regions independent of the threshold. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Significance of differences between means was evaluated by student t-test analysis (Systat).

## 3.4 Results

### 3.4.1 GPR91-GPR99 expression in the developing and adult mice retina

We used embryonic E14/15 mouse retinas to evaluate the presence of GPR91 and GPR99 and their possible involvement during retinal projection navigation. GPR91 and GPR99 proteins were detected in the adult *gpr91*<sup>+/+</sup> and *gpr99*<sup>+/+</sup> mouse retinas (**Figure 1A-1C**) but not in the knockout retinas (**Figure 1B-D**). At E14/15, GPR91 and GPR99 proteins were mainly present in the ganglion cells (GCL), but were also expressed in ganglion cell fiber layer (GCFL) and neuroblast (NBL) layers. Specific retinal ganglion cell marker Brn-3 was used to precisely identify in which cell type GPR91 and GPR99 proteins were expressed (**Figure 1I-K; 1M-R**). Knockout retinas from E14/15 mouse showed no expression of both proteins (**Figure 1B, 1D, 1F, and 1H**). Using western blot, GPR91 and GPR99 proteins were detected in the retina of E14/15 mouse embryos. The same antibodies failed to detect their respective protein in retina homogenate obtained from *gpr91*<sup>-/-</sup> and *gpr99*<sup>-/-</sup> mouse embryos (E14/15) (**Figure 1O-P**). In E14/15 mouse retinal explants, GPR91 (**Figure 2A; 2C**) and GPR99 (**Figure 2K; 2M**) were present in the neurites, their growth cones (GCs) and filopodia. Explants obtained from *gpr91*<sup>-/-</sup> embryos did not express GPR91 (**Figure 2B; 2D**) and explants from *gpr99*<sup>-/-</sup> embryos did not express GPR99 (**Figure 2L; 2N**). In WT mice, GPR91 and GPR99 were expressed in dendrites (**Figure 2E-G; 2O-Q**) and axons (**Figure 2H-J; 2R-T**) of retinal explants. Overall, we observed that during development, both receptors were present in the retinas of embryos and adult mouse.

### 3.4.2 Krebs cycle intermediates, succinate and $\alpha$ -ketoglutarate, reorganize GC morphology and modulate axon growth

To assess the roles of GPR91 and GPR99 during retinal axon growth, retinal explants isolated from embryonic mice were cultured for 2 DIVs, and treated with specific agonists. When retinal explants were exposed to 100 $\mu$ M succinate or 200 $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate for 60 minutes, the GC surface area and the number of filopodia increased significantly compare to the control in the WT animals. The effect of succinate on GC size and filopodia number was abolished in *gpr91*<sup>-/-</sup> but not in *gpr99*<sup>-/-</sup>.  $\alpha$ -ketoglutarate effect were maintained in *gpr91*<sup>-/-</sup> and decreased in *gpr99*<sup>-/-</sup>. Both effects of the two agonists were abolished in the double knockout *gpr91/99*<sup>-/-</sup> (**Figure 3A-C**). To investigate the effects of GPR91 and GPR99 ligands on axon growth, retinal explants were treated for 15 hours with 100 $\mu$ M succinate or 200 $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate inducing an increase of the total neurite growth compare to the control in tissues obtained from WT embryos, *gpr91*<sup>-/-</sup> in the presence of 200  $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate or *gpr99*<sup>-/-</sup> mice treated with 100 $\mu$ M succinate. The effect of succinate was almost abolished in *gpr91*<sup>-/-</sup>, and the increased outgrowth produced by  $\alpha$ -ketoglutarate was decreased in *gpr99*<sup>-/-</sup>. Interestingly, in the double KO (*gpr91/99*<sup>-/-</sup>), the effect produced by succinate or  $\alpha$ -ketoglutarate was totally abolished (**Figure 3D-E**). Taken together, these results indicate that Krebs cycle intermediates succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate modulate GC morphology and increase retinal projection growth in retinal explants, and that their effects are mediated by GPR91 and GPR99.

### 3.4.3 GPR91/GPR99 agonists modulate GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway

GPR91 is coupled to at least two signaling pathways Gi/Go and Gq11, depending on the tissue studied<sup>23;28;44-45</sup>. Earlier reports demonstrated that succinate via GPR91 activates the MAPK signaling pathways<sup>46-48</sup>. Despite it is well known that  $\alpha$ -ketoglutarate activates GPR99, its pharmacology and signalling pathways need further studies to be completely characterized<sup>36-49</sup>. GPR99 was initially recognized as an oxoglutarate receptor based on its binding and activation by  $\alpha$ -ketoglutarate via a Gq-mediated pathway<sup>23</sup>. Previous studies demonstrated that MAP Kinases mediate axon outgrowth, migration and guidance<sup>15;83-85</sup>. Thus, we tested whether the effects observed after the activation of both receptors GPR91 and GPR99 are mediated via the ERK1/2 pathway. ERK1/2 phosphorylation was significantly increased following 100 $\mu$ M succinate and 200 $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate application (**Figure 4A**). CI-1040 (10 $\mu$ M), a selective ERK1/2 inhibitor blocked the effects of both Krebs cycle intermediates on the ERK phosphorylation (**Figure 4B**). To assess the role of the ERK 1/2 pathway in the GC morphological effect and in the axon growth mediated by GPR91 and GPR99, retinal explants were treated with an ERK1/2-selective inhibitor, the CI-1040. CI-1040 blocked the succinate and the  $\alpha$ -ketoglutarate induced increases in GC surface area and filopodia number. No significant differences were observed between the CTRL and the CTRL+CI conditions (**Figure 4C-E**). Moreover, inhibition of ERK1/2 blocked the effect of succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate on total projection length. The ERK inhibitor had no significant effect on the total projection length by itself (**Figure 4F-G**). Together, these data demonstrate

the implication of the ERK1/2 pathway in the GPR91/99 modulation of GC morphology and axon outgrowth.

#### **3.4.4 GPR91 and GPR99 ligands have no effect on RGC axon turning**

To assess the involvement of GPR91/99 in axon pathfinding, time-lapse microscopy at DIV1 on embryonic mouse retinal explant growth cones was performed. Like the vehicle, both micro gradient application of 100 $\mu$ M succinate and 200 $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate, did not induce any significant directional GC turning (**Figure 5A**). Interestingly, the same concentration of succinate induced an increase in neurite growth of the retinal axon and 200 $\mu$ M of  $\alpha$ -ketoglutarate had no significant effect (**Figure 5B-E**). These data show that GPR91/99 cannot modulate axon steering.

#### **3.4.5 Role of GPR91 and GPR99 in vivo**

To assess the contribution of both GPR91 and GPR99 to the development of the retinal projections *in vivo*, embryonic E14/15 mouse received intraocular injections of a DiO tracer. After 7 days of tracer diffusion, surgery was performed to visualize the optic nerve; the optic chiasm and the optic tract. Photomicrographs obtained from Olympus Microscope revealed that single deletion of *gpr91* or *gpr99* signaling had no detrimental effects on RGC axon development. In fact, axon projection length and guidance at the optic chiasm (OC) after genetic modifications of *gpr91* or *gpr99* are similar to the wildtype group (**Figure 6A-C and 6E-G**). In *gpr91/99*<sup>-/-</sup> mouse embryos retinal axons, some fibers were not able to enter in the OC. For some others, after crossing the chiasma, they were not able to integrate the optic tract. Concomitant deletion of *gpr91* and *gpr99* induced aberrant projections before and after the OC, suggesting a complementary role of these receptors (**Figure 6D and 6H**).

To assess the involvement these receptors during the retinogeniculate development and refinement, we examined the projections to the dLGN of adult  $gpr91^{-/-}$ ,  $gpr99^{-/-}$  and their WT littermates. Contralateral projections of  $gpr91^{-/-}$  and  $gpr99^{-/-}$  mice occupied the same area than that of WT mice (**Figure 6I**). The contralateral and ipsilateral retinal projection images were quantified using a multithreshold method of analysis. These data indicate a similar overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN between  $gpr91^{-/-}$ ,  $gpr99^{-/-}$  and WT mice (**Figure 6J**). Altogether, these observations demonstrate that GPR91 and GPR99 are not strongly implicated in the guidance and the process of target selection during the development and refinement of the retinogeniculate pathway *in vivo*.

### 3.5 Discussion

In the present study, we show that GPR91 and GPR99 are both expressed in the mouse retina during the development. Their activation with their respective agonists, the succinate and the  $\alpha$ -KG, increased ERK 1/2 activity resulting in higher surface area and filopodia number of the GC. In addition, activation of the receptors increased retinal axon growth via a mechanism dependent of the ERK1/2. Interestingly, no effect on axon guidance was observed the activation of these receptors. Taken together, these findings demonstrate that GPR91 and GPR99 play an important role in axon growth but they had no effect on the guidance.

Recent research reported that GPR91 was localized into the RGCs<sup>26;47-49</sup> and it was associated with neovascularization in ischemic retinopathy<sup>26</sup>. GPR91 also plays critical roles in the pathogenesis of diabetic neuropathy, hypertension, heart stress and liver damage<sup>27;28;30;44</sup>. Although this receptor is expressed in RGCs, most of the previous studies show its expression in rat or mouse retinas at the postnatal ages and no immunohistological data using the knockout mice to prove the selectivity of the antibody were presented. In this study, we demonstrate, for the first time, the expression of GPR91 in the retina and retinal projections during the development of the mouse retina. In the E14/15 mouse embryos, GPR91 is expressed in axonal projections, their growth cones, and filopodia.

GPR99 is a close relative of GPR91; originally described as a homolog to the P2Y nucleotide receptor subfamily<sup>32</sup>, then recognized as an oxoglutarate receptor based on its binding to the  $\alpha$ -KG<sup>23;34-35</sup>. To date, previous studies were performed using Northern blot analysis and quantitative RT-PCR to detect GPR99 mRNA in human and mouse tissues. GPR99 mRNA is expressed in kidney, placenta, trachea, salivary glands, fetal brain, lung and in umbilical cord blood-derived mast cells<sup>32;33</sup> for human and in kidney, testis, and smooth muscle for the

mouse<sup>23</sup>. Here, we report, for the first time, its expression in the adult and embryonic mouse retina using western blot and immunohistochemistry assays. Moreover, GPR99 is expressed in the axonal projections, growth cones, and filopodia of E14/15 mouse retinal explants.

To investigate the possible role played by the Krebs cycle intermediates receptors during the development, genetic and pharmacological modulations were performed on GPR91 and GPR99 receptors. The Krebs cycle intermediate, the succinate, is normally present within mitochondria and is released outside of the cells and in the blood circulation if the energy demand of local tissues is out of balance and oxygen supply is low<sup>23;50</sup>. Substantial evidence indicates that succinate and metabolic diseases such as diabetes, hypertension are closely associated<sup>23;52-53</sup>. In our study, pharmacological manipulation of GPR91 with succinate and of GPR99 with  $\alpha$ -KG modulated GC morphology and axon growth of RGCs.

Axon guidance, like angiogenesis share some fundamental challenges during the formation of their extensive networks. Specialized endothelial cell (EC) at the end of each sprout, named tip cell, is motile, invasive and dynamically extends long filopodia protrusions reminiscent of axonal growth cones<sup>54-55</sup>. Thus, the effects of the GPR91 on axon growth corroborate with the results obtained by *Sapieha et al* where RGCs via GPR91 modulating angiogenesis in response to increased succinate levels<sup>26</sup>. Knowing the spatiotemporally link between neurogenesis and angiogenesis<sup>59</sup>, the morphological similarities between endothelial tip cells and axonal growth cones, the observed increase in the morphology of the GC and the neurite growth could be explained by a similar mechanisms in the presence of succinate. Several other studies showed the highly proliferative and stimulating effect of succinate via GPR91 in different tissues. Indeed, Succinate stimulates dendritic cells<sup>60</sup>.



*Gpr91* mRNA was detected in immature dendritic cells (DC) by *Rubic et al.* and succinate stimulates the migration of immature DCs cells in a concentration-dependent manner<sup>44</sup>. Moreover, GPR91 activation induced cell proliferation and protects cells from apoptosis erythroleukemia<sup>43</sup> and it mediates endothelial cell proliferation<sup>47</sup>. Finally, GPR91 is also expressed in hematopoietic precursor cells and multiple types of blood and immune cells<sup>43;61</sup>. When administered to platelets, succinate potentiates the activation and aggregation of platelets in a dose-dependent manner increasing the maximum aggregation compared to control without succinate<sup>61-62</sup>. Together these effects on cell motility mediated by the succinate via the GPR91 support its crucial role in the axon growth.

The increase of GC size and in axon growth of the RGC axons following stimulation with  $\alpha$ -KG is the first report of the implication of the GPR99 in axon growth. Previous studies on  $\alpha$ -KG show its critical role in four different metabolic and cellular pathways as an intermediate in the Krebs cycle to the energy metabolism, as a precursor to the formation of glutamine for the synthesis of amino acids, the physiological role in the cells as a first nitrogen carrier, finally as a co-substrate for Fe (II) / dependent dioxygenases of  $\alpha$ -KG<sup>68</sup>. Furthermore, a loss in the production of  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG) induces mutations in isocitrate dehydrogenases, which catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate to  $\alpha$ -KG. Mutations of IDH 1/2 are responsible of 75% of gliomas<sup>63</sup>, ~ 20% of acute myeloid leukemia (AML)<sup>64</sup>, and several other tumors at different frequencies<sup>65-68</sup>. The  $\alpha$ -KG was reported also, for his role in delaying aging and prolonging the life span of *C. elegans* by ~ 50%<sup>69</sup>. From these observations, this intermediate in the Krebs cycle is now used in the kidneys, liver and solutions of organ preservation for transplantation<sup>70</sup>. Finally, GPR99 present in the placenta was associated with

disturbances in placental RAS activity reducing placental blood flow during pregnancy, often with severe complications<sup>71</sup>.

Interestingly, the genetic modulation using and *gpr99*<sup>-/-</sup> mice blocked only the effect of the succinate in the *gpr91*<sup>-/-</sup> mouse while the observed effect of  $\alpha$ -KG was partially abolished in the *gpr99*<sup>-/-</sup> mouse. We used a double knockout mouse for *gpr91* and *gpr99* and the effect of both receptors was totally blocked. These results demonstrate that succinate effect on RGC growth was mediated only through GPR91 receptor while  $\alpha$ -KG could activate both receptors. The activation of GPR91 in *gpr99*<sup>-/-</sup> mouse with  $\alpha$ -KG possibly occurs because of the precursor role of  $\alpha$ -KG inducing the formation of succinate. Similar formation of succinate in the presence of  $\alpha$ -KG occurs during ischemia (anaplerotic reaction)<sup>72-73</sup>. In the reaction in which  $\alpha$ -KG is present, the reactive oxygen species (ROS) that are increased during ischemia promote decarboxylation of  $\alpha$ -KG, resulting in a non-enzymatic formation of succinate that can occur both in the mitochondria and in the cytosol<sup>73</sup>. In the absence of  $\alpha$ -KG, the substrates that form succinate are especially amino acids glutamine and alanine. These amino acids provide one carbon skeleton for the formation of succinate<sup>72-76</sup>. Nevertheless, these findings highlight the effect of succinate and  $\alpha$ -KG by which GPR91 and GPR99, respectively, modulate the development of RGCs.

Depending on the tissue or cell type used GPR91 is coupled mainly to Gi/o and Gq<sup>23; 43-44</sup> while GPR99 signaling pathway, following its activation by  $\alpha$ -KG, implicates Gq/G<sub>11</sub> family mediated by phospholipase C stimulation<sup>23</sup>. In our study stimulation of both receptors, GPR91 and GPR99, results in the activation of the MAPK pathway. To characterize the mechanism by which GPR91 modulates growth cone morphology and axon growth, we examined the

ERK1/2 pathway. We demonstrate that succinate and  $\alpha$ -KG increase ERK1/2 phosphorylation. This is corroborating with an increasing number of studies of signaling pathways triggered by GPR91, including an activation of ERK1/2<sup>23;28;30;43;46;47;77</sup>. In addition, our findings illustrate  $\alpha$ -KG-stimulated GPR91 activates ERK1/2 at a higher concentration confirming an apparent affinity of GPR99 for  $\alpha$ -KG in the high micromolar range. However, recent evidence points to GPR99 as an additional receptor for LTE4 with an affinity in the low nanomolar range<sup>36</sup>. These results, particularly activation of ERK1/2 in axon growth, is a new downstream of GPR99 activation with  $\alpha$ -KG although further investigations on binding and signaling mechanisms and independent confirmations by different research groups are necessary to characterize all the mechanisms implicated in the downstream signaling pathways of GPR99<sup>36-47</sup>.

Being the only type of neuronal cells that sends axons out of the retina, RGC axons ensure the visual and cognitive processing of information from the outside world in the brain. A combination of intrinsic and extrinsic signals also plays an important role in driving the axon through the visual pathway. To navigate through this landscape, the axon has a responsive vehicle: the growth cone, which must detect and effectively translate by appropriate mechanical response a multitude of external chemotactic cues. Guidance cues are organized in groups, including netrins, semaphorins, slits, ephrins and some morphogens and neurotrophins, modulate the behavior and growth of axons<sup>44;78-82</sup>. We previously demonstrated the implication of G coupled receptors: GPR55 and the two cannabinoid receptors CB1R and CB2R in the modulation of the mechanism of axon guidance and target selection<sup>14-15;98</sup>. Interestingly, neither GPR91 nor GPR99 activity at the GC modulates axon turning; GCs are not attracted nor repelled in the presence of succinate or  $\alpha$ -KG microgradient, while succinate

induced significant axon extension compare to the vehicle. Based on these results, GPR91 plays a modulatory role in axon growth by increasing the axon motility but both receptors had no effects on the behavior of the GC and axon guidance. Previous literature of succinate effect on motility, migration and growth strengthens our findings<sup>43;47;57-58;60-61</sup>

The divergence of crossing and noncrossing axons occurs at the optic chiasm at the developmental time of E14-16<sup>91-92</sup>. To assess the role of GPR91 and GPR99 in axon guidance within the developing visual system, we labeled retinal axons from the right eye of E14/15 wild-type, *gpr91* and/or *gpr99* deficient mice with the lipophilic dye, DiO. Lipophilic carbocyanine dyes are a series of tracers, of which DiI, DiA and DiO are the most frequently used to label both live and fixed cells<sup>93-95</sup>. At variance with other tracers, such as fluorescent tracers which are actively transported through axons, the DiO carbocyanine lipophilic dye diffuse passively in fixed tissue laterally within the fluid membrane as phospholipid molecules and independently of a retrograde transport system<sup>96-97</sup>. Optic chiasm appeared relatively normal in wildtype and mice deficient for *gpr91* or *gpr99*. In wild-type and single mutant, the majority of the axons at the midline crossed to project contralaterally. Our results suggest that in the mouse visual system, GPR91 and GPR99 proteins are not critical for retinal axon guidance. However, subtle defects may exist but they are not detectable due to the sensitivity of these experiments. Further detailed analysis would be needed to assess the possibility of any quantitative axon misguidance within the developing visual system.

The visual projections of mice deficient for both *gpr91/gpr99* developed striking abnormalities. Significant defects in axon guidance seen in the double mutants could be explained by the compensatory effect between the two receptors in the single mutant. The most striking defect was the development of aberrant projections ventral to the normal optic

chiasm. On the optic nerve side, some fibers appeared to travel ventral to the optic nerve to join the optic chiasm while others fibers after crossing extended out of the contralateral optic tract. The misguidance observed in the double mutants and not in the single mutants suggests that the GPR91 and GPR99 alone do not regulate axon divergence at the developing optic chiasm. Possibly because of their modulatory roles, these receptors act to affect divergence in a more subtle way, however, further experiments are needed to determine any defect in a more quantitative fashion.

During perinatal development, RGCs axons from both eyes connect with multiple target cells in the (dLGN). These projections spread throughout the dLGN sharing common terminal space. Eye-specific segregation occurs during postnatal development<sup>87</sup>. In the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. *In vivo*, our data show that genetic interference with the GPR91 or the GPR99 did not affects target selection of retinal projections in the dLGN. Accordingly, in adult single mutants for *gpr91* or *gpr99*, we observed a similar relative eye-specific segregation of retinal projections compared to their WT littermates. Thus, these *in vivo* results support previous *in vitro* findings that the Krebs cycle intermediates receptors do not modulate RGC axon guidance and target selection during the establishment of the visual pathways.

Collectively, the present study demonstrated, for the first time, the effects and the mechanisms of GPR91 and GPR99 during RGC axon growth following succinate and  $\alpha$ -KG stimulation. Using *in vitro* models, we demonstrate that GPR91 and GPR99 mediate axonal growth, by activating the ERK1/2 signaling pathway. In addition, we noted no effect of both Krebs cycle intermediates on axon guidance. The data from this study may help to elucidate the

mechanisms of GPR91 and GPR99 and their ligands in axon growth and motility and may prove useful to the development of more effective therapies in the central nervous system repair and regeneration.

### 3.6 References

1. Flanagan, J.G. & Vanderhaeghen, P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 309–345 (1998).
2. Mueller, B.K. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 351–388 (1999).
3. Raper, J.A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 88–94 (2000).
4. Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123–1133 (1996).
5. Song, H.J. & Poo, M-m. Cell biology of neuronal navigation. *Nat. Cell Biol.* 3, 93–98 (2001).
6. Eljo Y Van Battum, Sara Brignani and R Jeroen Pasterkamp. Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 14, 532–46 (2015).
7. Gartner F, Seidel T, Schulz U, Gummert J, Milting H. Desensitization and internalization of endothelin receptor A: impact of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2013; 288: 32138-32148.
8. Sheth H, Gorey C, Roush N, Smallman S, Collantes E, Santoro M, Olson B, Fitzgerald L, Lee PH, Shen XJ. A Multiplexed Fluorescent Calcium and NFAT Reporter Gene Assay to Identify GPCR Agonists. *Curr Chem Genomics Transl Med* 2013; 7: 1-8.
9. Andrews SP, Brown GA, Christopher JA. Structure-Based and Fragment-Based GPCR Drug Discovery. *Med Chem* 2014; 9: 256-75.
10. Zhan X, Wang J, Liu Y, Peng Y, Tan W. GPCR-like signaling mediated by smoothed contributes to acquired chemoresistance through activating Gli. *Mol Cancer* 2014; 13: 4.
11. Heinke J, Juschkat M, Charlet A, Mnich L, Helbing T, Bode C, Patterson C, Moser M. Antagonism and synergy between extracellular BMP modulators Tsg and BMPER balance blood vessel formation. *J Cell Sci* 2013; 126: 3082-3094.
12. Yang Xiang, Yan Li, Zhe Zhang, Kai Cui, Sheng Wang, Xiao-bing Yuan, Chien-ping Wu, Mu-ming Poo and Shumin Duan (2002). Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nature Neuroscience* 5, 843 – 848.

13. Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F (2008) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Experimental Neurology* 211:494-502.
14. Duff G, Argaw A, Cecyre B, Cherif H, Tea N, Zabouri N, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF (2013) Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. *PLoS One*;8(8):e70849.
15. Cherif Hosni, Anteneh Argaw, Bruno Cécyre, Jonathan Gagnon, Alex Bouchard, Sébastien Desgent, Ken Mackie and Jean-François Bouchard. GPR55 mediates axon guidance. *eNeuro Journal*: (2015)
16. Tissir F, Goffinet AM. Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nat Rev Neurosci* (2013) ;14:525–35.
17. Fenstermaker AG, Prasad AA, Bechara A, Adolfs Y, Tissir F, Goffinet A, et al. Wnt/planar cell polarity signaling controls the anterior-posterior organization of monoaminergic axons in the brainstem. *J Neurosci* (2010) ; 30:16053–64.
18. Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, et al. Anterior–posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* (2003) ;302:1984–8.
19. Armstrong A, Ryu YK, Chieco D, Kuruvilla R. Frizzled3 is required for neurogenesis and target innervation during sympathetic nervous system development. *J Neurosci* (2011) ;31:2371–81.
20. Chai G, Zhou L, Manto M, Helmbacher F, Clotman F, Goffinet AM, et al. Celsr3 is required in motor neurons to steer their axons in the hindlimb. *Nat Neurosci* (2014) ; 17:1171–9.
21. Hua ZL, Smallwood PM, Nathans J. Frizzled3 controls axonal development in distinct populations of cranial and spinal motor neurons. *eLife* (2013); 2:e01482.
22. Sasselli V, Boesmans W, Vanden Berghe P, Tissir F, Goffinet AM, Pachnis V. Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *J Clin Invest* (2013); 123:1763–72.
23. He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J et al. (2004). Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 429: 188–193.



24. Ariza AC, Deen PM, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol* (2012) 6(3):22.10.3389/fendo.2012.00022.
25. Gullans SR, Kone BC, Avison MJ, Giebisch G. Succinate alters respiration, membrane potential, and intracellular K<sup>+</sup> in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* (1988) 255: F1170–F1177.
26. Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, Honoré JC, Kermorvant-Duchemin E, Varma DR, Tremblay S, Leduc M, Rihakova L, Hardy P, Klein WH, Mu X, Mamer O, Lachapelle P, Di Polo A, Beauséjour C, Andelfinger G, Mitchell G, Sennlaub F, Chemtob S. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med* 2008; 14:1067-76.
27. Correa PR, Kruglov EA, Thompson M, Leite MF, Dranoff JA, Nathanson MH. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatol* 2007; 47:262-9.
28. Aguiar CJ, Andrade VL, Gomes ER, Alves MN, Ladeira MS, Pinheiro AC, Gomes DA, Almeida AP, Goes AM, Resende RR, Guatimosim S, Leite MF. Succinate modulates Ca<sup>2+</sup> transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium* 2012; 47:37-46.
29. Regard, J.B., Sato, I.T., and Coughlin, S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression (2008). *Cell* 135, 561–571.
30. Robben JH, Fenton RA, Vargas SL, Schweer H, Peti-Peterdi J, Deen PM, Milligan G. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int* 2009; 76:1258-67.
31. Rivera JC., Sapieha P., Joyal J.S., Duhamel F., Shao Z., Sitaras N., Picard E., Zhou E., Lachapelle P. and Sylvain Chemtob. Understanding Retinopathy of Prematurity: Update on Pathogenesis. *Neonatology* 2011; 100:343–353.
32. Wittenberger, T., Hellebrand, S., Munck, A., Kreienkamp, H. J., Schaller, H. C., and Hampe, W. (2002) GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of nucleotide receptors. *BMC Genomics* 3, 17
33. Inbe, H., Watanabe, S., Miyawaki, M., Tanabe, E., and Encinas, J. A. (2004) Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y<sub>15</sub>, for AMP and adenosine. *J. Biol. Chem.* 279, 19790–19799

34. Southern C, Cook JM, Neetoo-Isseljee Z, Taylor DL, Kettleborough CA, Merritt A et al. (2013). Screening beta-arrestin recruitment for the identification of natural ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* 18: 599–609.
35. Davenport AP, Alexander SP, Sharman JL, Pawson AJ, Benson HE, Monaghan AE et al. (2013). International union of basic and clinical pharmacology LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacol Rev* 65: 967–986.
36. Kanaoka Y, Maekawa A, Austen KF (2013). Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. *J Biol Chem* 288:10967–10972.
37. Wei Wu, Kit Wong, Jin-hui Chen, Zhi-hong Jiang, Sophie Dupuis, Jane Y. Wu, and Yi Rao. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*. 1999 Jul 22; 400(6742): 331–336.
38. Yee KT, Simon HH, Tessier-Lavigne M, O'Leary DM. Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron*. 1999 Nov; 24(3):607-22.
39. Zou YR1, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998 Jun 11; 393 (6685):595-9.
40. Ma Q1, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4; 95 (16):9448-53.
41. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12:593-633.
42. Devreotes PN, Zigmond SH. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Annu Rev Cell Biol*. 1988; 4:649-86
43. Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S, Le T, Liaw C, Connolly DT, et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol* (2009) 85:837–43.10.1189/jlb.1008618

44. Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol* (2008) 9:1261–9.10.1038/ni.1657
45. Schulte G, Fredholm BB. Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* 2000; 58:477-82.
46. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24:21-44.
47. Li T., Hu J., Du S., Chen Y., Wang S. and Wu Q. ERK1/2/COX-2/PGE2 signaling pathway mediates GPR91-dependent VEGF release in streptozotocin-induced diabetes. *Molecular Vision* 2014; 20:1109-1121.
48. Qi AD1, Harden TK, Nicholas RA. GPR80/99, proposed to be the P2Y(15) receptor activated by adenosine and AMP, is not a P2Y receptor. *Purinergic Signal*. 2004 Dec;1(1):67-74.
49. Gnana-Prakasam JP, Ananth S, Prasad PD, Zhang M, Atherton SS, Martin PM, Smith SB, Ganapathy V. Expression and iron-dependent regulation of succinate receptor GPR91 in retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:3751-8.
50. Favret S, Binet F, Leboeuf D, Carbadillo J, Rubic T, Picard E, Mawambo G, Tetreault N, Joyal JS, Chemtob S, Sennlaub F, Sangiovanni JP, Guimond M, Sapiéha P. Deficiency in the metabolite receptor GPR91 (GPR91) leads to outer retinal lesions. *Aging (Albany, NY Online)* 2013; 5:427-44.
51. Hebert S.C., Physiology: orphan detectors of metabolism, *Nature* 429 (2004) 143e145.
52. Arai M., M.A. Leo, M. Nakano, E.R. Gordon, C.S. Lieber, Biochemical and morphological changes of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption, *Hepatology* 4 (1984) 165e174.
53. Jakobsdottir G., J. Xu, G. Molin, S. Ahrne, M. Nyman, High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects, *PLoS One* 8 (2013) e80476.
54. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436: 193–200.

55. Klagsbrun M, Eichmann A. 2005. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 535–548.
56. Phng LK, Gerhardt H. 2009. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 16: 196–208.
57. Storkebaum E and Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* 113: 14–18,2004.
58. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, and Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111: 1843–1851, 2003.
59. Palmer TD, Willhoite AR, and Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425: 479–494, 2000.
60. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 2013; 38: 633-643
61. Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC, Gusnanto A, Steward M, Burns P, Langford CF, Ellis PD, Dudbridge F, Zwaginga JJ, Watkins NA, van der Schoot CE, Ouwehand WH (2007) Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood*, 109 (8): 3260-9.
62. Hogberg, C., Gidlof, O., Tan, C., Svensson, S., Nilsson-Ohman, J., Erlinge, D., and Olde, B. (2011) .Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase-beta signaling. *J. Thromb.Haemost.* 9, 361–372.
63. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807–1812
64. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, et al. 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361: 1058–1066.
65. Hemerly JP, Bastos AU, Cerutti JM 2010. Identification of several novel non-p.R132 IDH1 variants in thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol* 163: 747–755

66. Murugan AK, Bojdani E, Xing M 2010. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 555–559
67. Amary MF, Bacsı K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, Pollock R, O'Donnell P, Grigoriadis A, Diss T, et al. 2011. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol* 224: 306–308
68. Damato S, Alorjani M, Bonar F, McCarthy SW, Cannon SR, O'Donnell P, Tirabosco R, Amary MF, Flanagan AM 2012. IDH1 mutations are not found in cartilaginous tumours other than central and periosteal chondrosarcomas and enchondromas. *Histopathology* 60: 363–365
69. Gems D, Riddle DL. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2000; 154:1597–1610.
70. St Peter Shawn D, Charles J Imber, Peter J Friend. Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet* 2002; 359: 604–13.
71. Nielsen, A. H., Schauser, K. H. & Poulsen, K. *Placenta* 21, 468–477 (2000).
72. Katsura K, Folbergrova J, Siesjo BK: Changes in labile energy metabolites, redox state and intracellular pH in postischemic brain of normo- and hyperglycemic rats. *Brain Res* 1996, 726:57–63.
73. Fedotcheva NI, Sokolov AP, Kondrashova MN: Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006, 41:56–64.
74. Krebs HA: Rate control of the tricarboxylic acid cycle. *Adv Enzyme Regul* 1970, 8:335–353.
75. Ekholm A, Katsura K, Kristian T, Liu M, Folbergrova J, Siesjo BK: Coupling of cellular energy state and ion homeostasis during recovery following brain ischemia. *Brain Res* 1993, 604:185–191.
76. Folbergrova J, Ljunggren B, Norberg K, Siesjo BK: Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 1974, 80:265–279.

77. Hu J., Li T., Du S., Chen Y., Wang S., Xiong F. and Wu Q. (2015) The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells. *International journal of molecular medicine* 36: 130-138.
78. Dickson, B.J. (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959–1964.
79. Guan, K.L. and Rao, Y. (2003) Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 941–956
80. Charron, F. and Tessier-Lavigne, M. (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132, 2251–2262
81. Plachez, C. and Richards, L. (2005) Mechanisms of axon guidance in the developing nervous system. *Curr. Top. Dev. Biol.* 69, 267–346
82. Dupin I, Dahan M, and Studer V (2013) Investigating Axonal Guidance with IMicrodevice-Based Approaches. *The Journal of Neuroscience*, 33(45): 17647-17655.
83. Du-yu Nie, Alessia Di Nardo, Juliette M. Han, Hasani Baharanyi, Ioannis Kramvis, ThanhThao Huynh, Sandra Dabora, Simone Codeluppi, Pier Paolo Pandolfi, Elena B. Pasquale, and Mustafa Sahin (2010). Tsc2-Rheb Signaling Regulates EphA-Mediated Axon Guidance. *Nat Neurosci.* 13(2): 163–172.
84. Christelle Forcet, Elke Stein, Laurent Pays, Véronique Corset, Fabien Llambi, Marc Tessier-Lavigne & Patrick Mehlen (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature*. Vol 417: 443-447.
85. Johannes Lange, Yousef Yafai, André Noack, Xiu Mei Yang, Anne-Britta Munk, Sandra Krohn, Ianors Iandiev, Peter Wiedemann, Andreas Reichenbach and Wolfram Eichler (2012). The axon guidance molecule Netrin-4 is expressed by Müller cells and contributes to angiogenesis in the retina. *Glia* Volum60, Issue 10, pages 1567–1578.
86. Hiroshi Hama, Hiroshi Kurokawa, Hiroyuki Kawano, Ryoko Ando, Tomomi Shimogori, Hisayori Noda, Kiyoko Fukami, Asako Sakaue-Sawano & Atsushi Miyawaki. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience* 14, 1481–1488 (2011).

87. Godement P, Salaün J, Imbert M (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol* 230:552–575.
88. Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Rentería RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS (2006) Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 26:6269–6281.
89. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164–1178.
90. Torborg CL, Feller MB (2004) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *J Neurosci Methods* 135:17–26.
91. Godement, P., Salaun, J., and Mason, C.A. (1990). Retinal axon pathfinding in the optic chiasm: divergence of crossed and uncrossed fibers. *Neuron* 5, 173–186.
92. Sretavan, D.W. (1990). Specific routing of retinal ganglion cell axons at the mammalian optic chiasm during embryonic development. *J. Neurosci.* 10, 1995–2007.
93. Godement, P.; Vanselow, V.-J.; Thanos, S.; Bonhoeffer, F. A study in the developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* 101:697–713; 1987.
94. Honig, M. G.; Hume, R. I. DiI and DiO: Versatile fluorescent dyes for neuronal labeling and pathways tracing. *Trends Neurosci.* 12:333–341; 1989.
95. Thanos, S. Bidirectional fluorescent labelling techniques for the developing and regenerating visual system. *Acta Histochem. Suppl.* 38:259–267; 1990.
96. Luo, P.; Dessem, D. Transneuronal transport of intracellularly injected biotinamide in primary afferent axons. *Brain Res. Bull.* 39:323–334; 1996.
97. von Bartheld, C. S.; Cunningham, D. E.; Rubel, E. W. Neuronal tracing with DiI: Decalcification, cryosectioning and photoconversion for light and electron microscopic analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 38:725–733; 1990.

98. Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cécyre B, Chainé N, Cherif H, Tea N, Lutz B, Ptito M, Bouchard JF (2011) Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. *J Neurosci* 31:1489–1499.
99. Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, et al (2001) Quantitative Comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 49:305–312.

### **3.7 Authors contributions**

C.H. designed the project, performed the retinal explants and primary neuron cultures, the pharmacological tests, the growth cone turning assay, the intraocular injections, the immunohistochemistry and immunocytochemistry experiments, analysed imaging data, performed the statistical analysis and prepared the manuscript. A.B. performed the growth cone turning assay and analysed imaging data. B.C. executed some immunohistochemical experiments. F.D conducted the mice breeding and performed the genotyping experiments. S.C kindly provided the GPR91 and GPR99 transgenic mice and contributed to the preparation of the manuscript. J.F.B. designed and supervised the project experiments and contributed to the preparation of this manuscript.



### 3.8 Figure legends

Figure 3.1 GPR91 and GPR99 expression within the mouse retina

**(A-D)** Distribution of GPR91 and GPR99 protein expression in adult mouse retina **(A-B)**: Single-label immunofluorescence showing GPR91 protein expression in the *gpr91*<sup>+/+</sup> adult mouse retina with lack of fluorescence in the *gpr91*<sup>-/-</sup> **(C-D)** the specificity of the GPR99 antibody on the retina was tested using adult *gpr99*<sup>-/-</sup> mouse. **(E-H)** Protein expression distribution of GPR91 and GPR99 in E14/15 mouse embryo retinas **(E-F)** The specificity of the GPR91 and **(G-H)** GPR99 antibodies were tested on retinal sections obtained from E14/15 *gpr91*<sup>-/-</sup> or *gpr99*<sup>-/-</sup> mice. **(I-K)** Double-label immunofluorescence illustrating the presence of the GPR91 in RGCs (Brn-3) of E14/15 mouse embryos. **(L-N)** GPR99 protein is expressed in the ganglion cells in the retina of E14/15 mouse embryos. **(O)** Expression of GPR91 in the retina of *gpr91*<sup>-/-</sup> and *gpr91*<sup>+/+</sup> mouse embryo (E14/15) and **(P)** expression of GPR99 in the retina of *gpr99*<sup>-/-</sup> and *gpr99*<sup>+/+</sup> mouse embryo (E14/15). Scale bars: 75µm **(A-H)**; 25µm **(I-N)**. **NBL**: Neuroblast Layer; **IPL**: Inner Plexiform Layer; **INL**: Inner Nuclear Layer; **OPL**: Outer Plexiform Layer; **ONL**: Outer Nuclear Layer; **GCL**: Ganglion Cell Layer; **GCFL**: Ganglion Cell Fiber Layer.

Figure 1

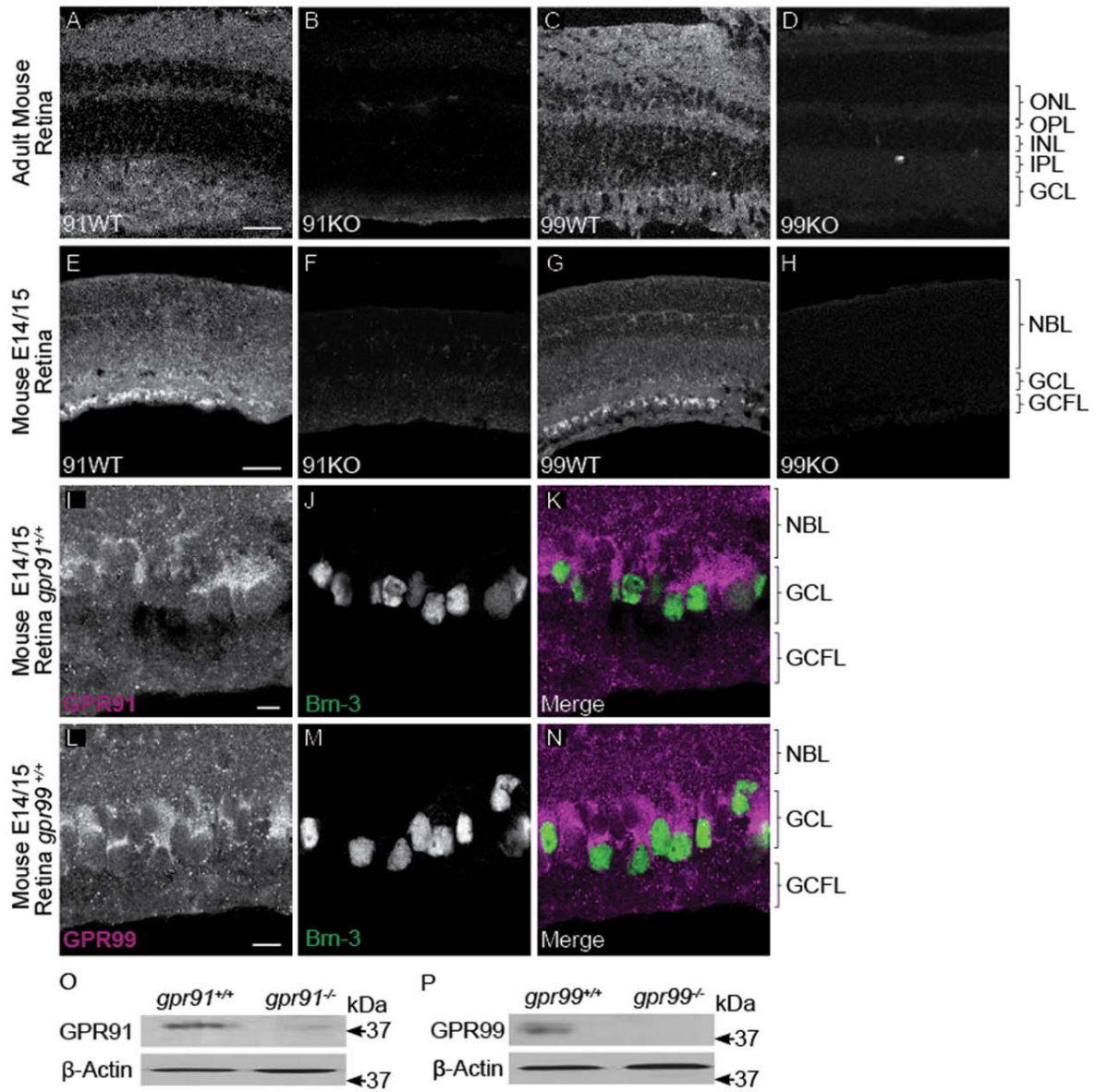
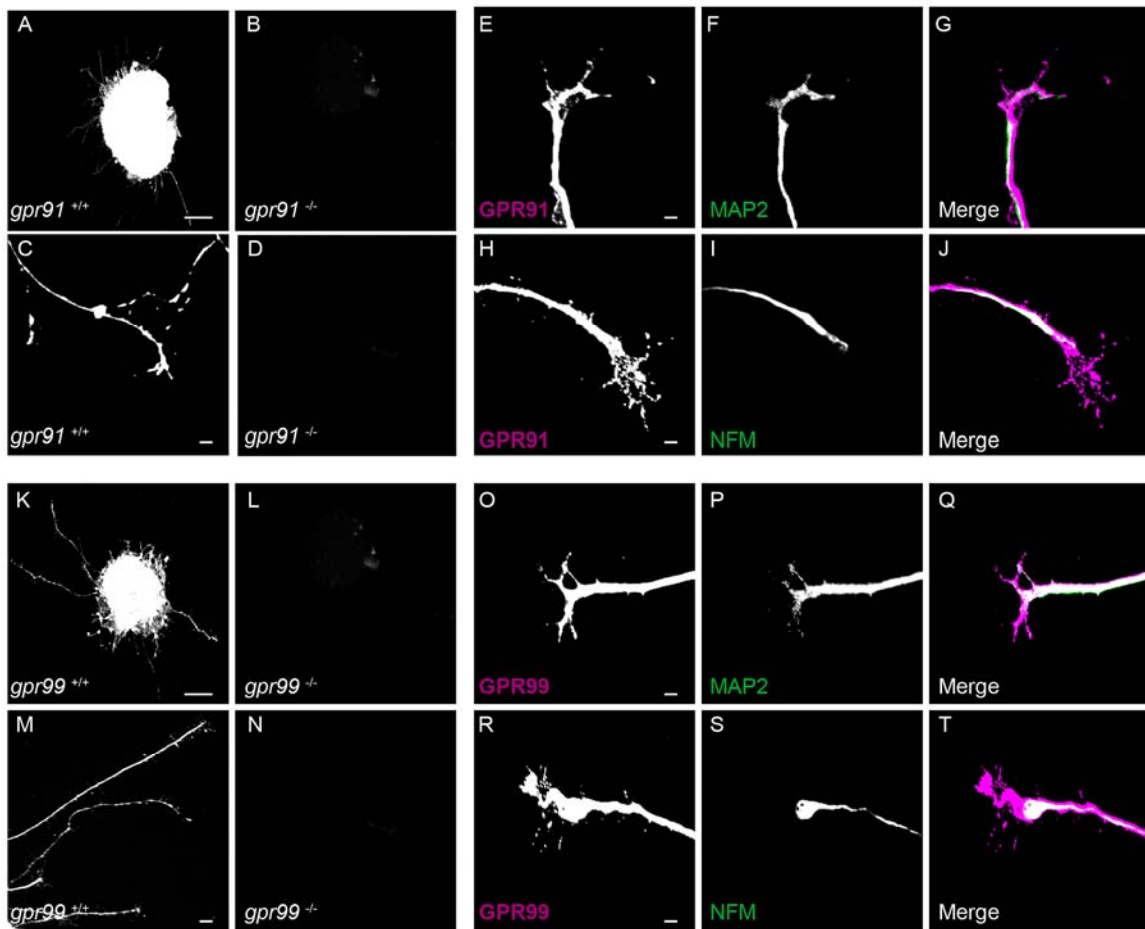


Figure 1. GPR91 and GPR99 protein expression within the mouse retina

Figure 3.2 GPR91 and GPR99 protein expression in retinal explants during the development  
Expression of GPR91 (**A-D**) and GPR99 (**K-N**) in retinal explants, axons and growth cones  
(GC) from E14/15 *gpr91*<sup>-/-</sup> and *gpr99*<sup>-/-</sup> mice and their WTs. Expression of GPR91 (**E-G**) and  
GPR99 (**O-Q**) in dendrites (MAP2). Double-label immunofluorescence illustrating the  
presence of GPR91 (**H-J**) or GPR99 (**R-T**) in the axon (NFM) of RGCs. Scale bars: 100µm  
(**A, B, K, and L**); 10µm (**C, D, M and N**); 5µm (**E-J and O-T**).

Figure 2

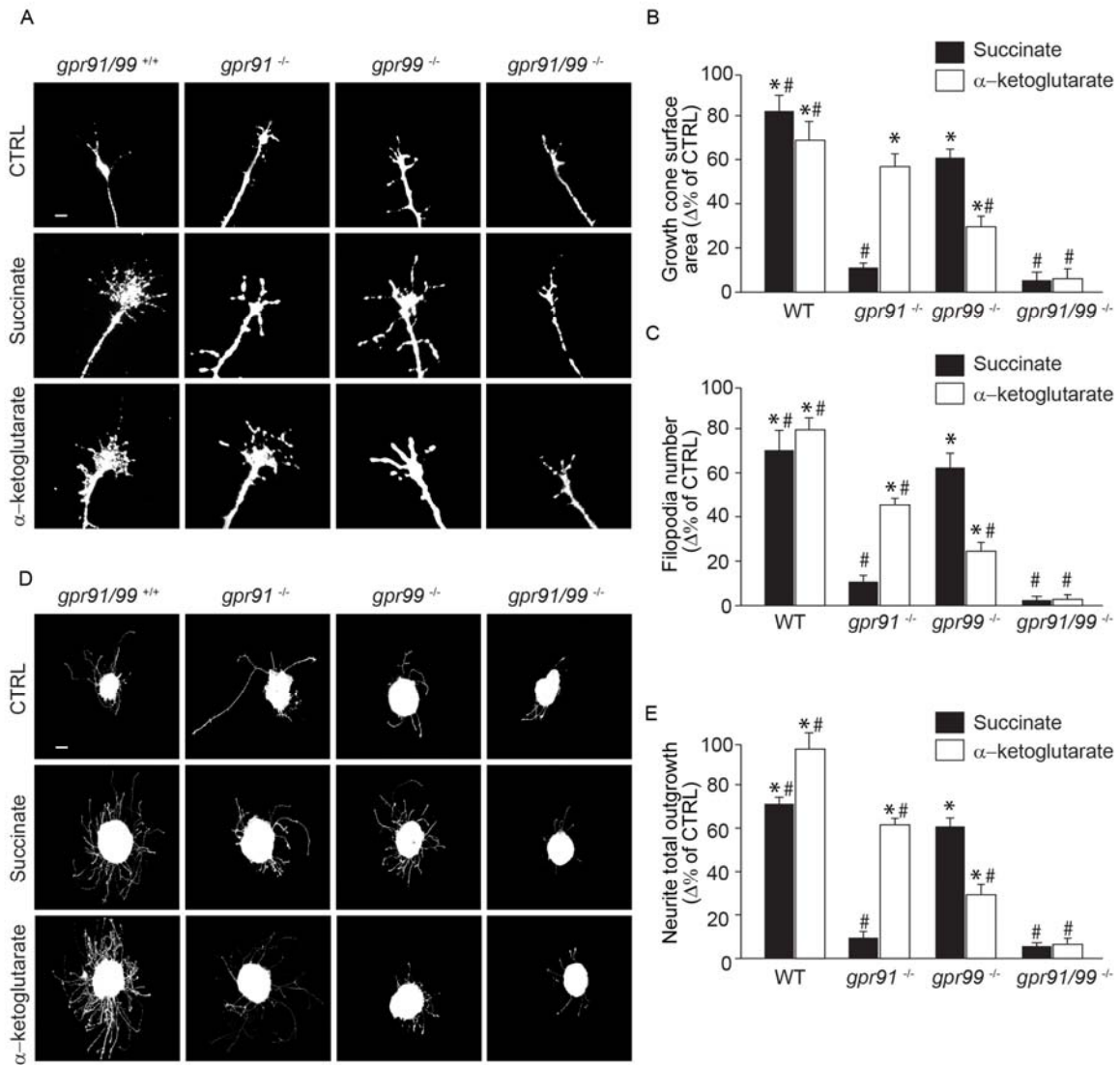


**Figure 2. GPR91 and GPR99 protein expression in retinal explants during the development**

Figure 3.3 Succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate modulate the GC morphology and the total neurite outgrowth.

**(A)** Photomicrographs of retinal projection GCs in *gpr91*<sup>-/-</sup>, *gpr99*<sup>-/-</sup>, *gpr91/99*<sup>-/-</sup> and WT E14/15 mouse embryos with or without treatment with GPR91 agonist (100 $\mu$ M succinate) or GPR99 agonist (200 $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate). **(B)** Analysis of the GC surface area and **(C)** the GC filopodia number following a 60-minute treatment with GPR91 and GPR99 ligands in WT and knockout mice. **(D)** Photomicrographs of retinal explants cultured for 1DIV and treated for 15h with 100 $\mu$ M succinate or 200 $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate for the same mouse genotypes cited previously **(E)** Quantification of total retinal neurite growth after treatment with GPR91 or GPR99 agonist of retinal explants obtained from *gpr91*<sup>-/-</sup>, *gpr99*<sup>-/-</sup>, *gpr91/99*<sup>-/-</sup> and WT E14/15 mouse embryos Scale bars: 5 $\mu$ m **(A)**; 100 $\mu$ m **(D)**. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates significant changes compared to control in **B**, **C**, and **E**;  $p < 0.001$ . # indicates a significant change induced by the knockout of GPR91 and GPR99 receptors in **B**, **C** and **E**;  $p < 0.001$ .

Figure 3

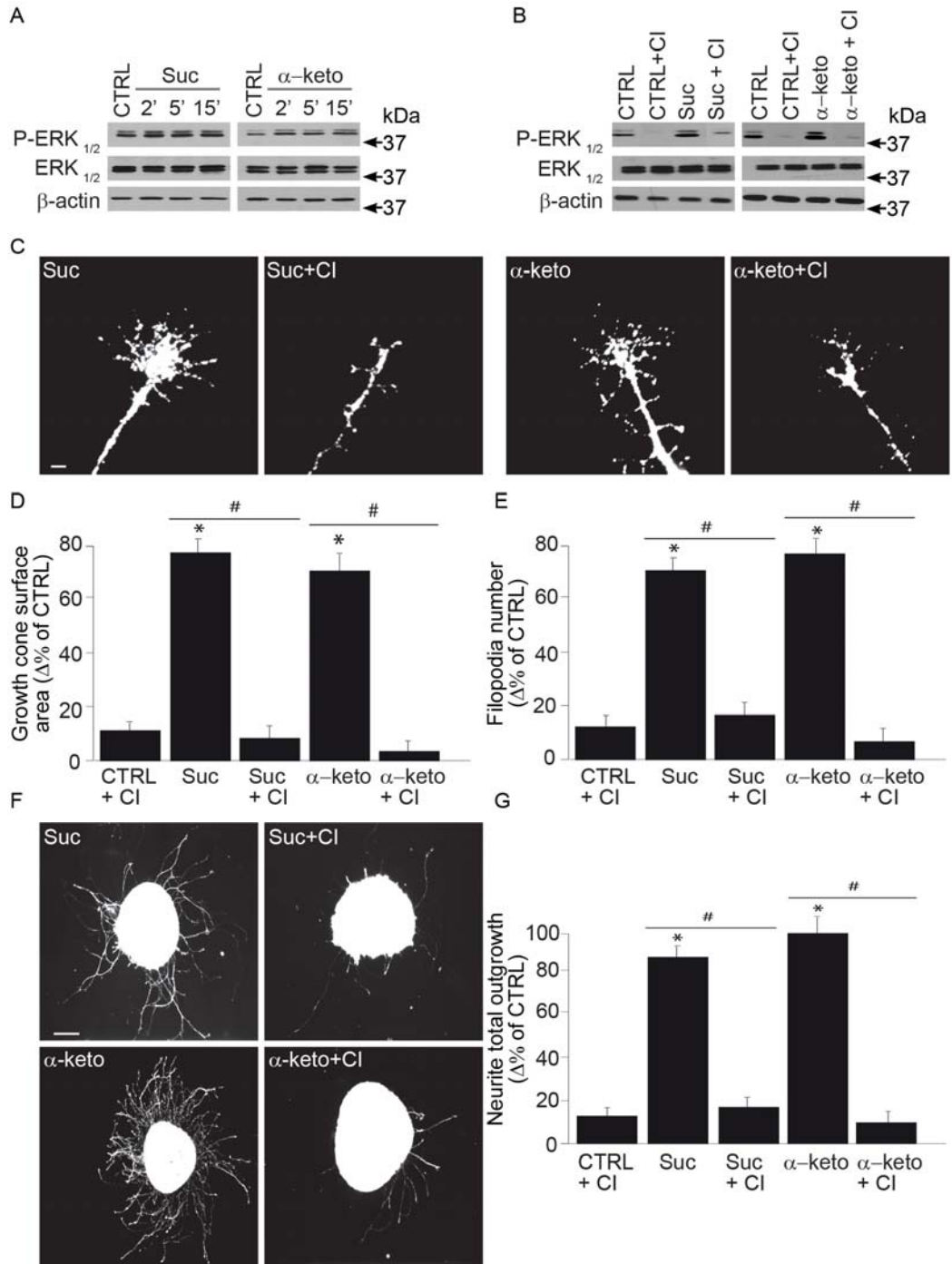


**Figure 3. Succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate modulate the GC morphology and the total neurite outgrowth**

Figure 3.4 GPR91 or GPR99 agonists modulate GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway

**(A)** Expression of P-ERK-1/2, ERK-1/2 and  $\beta$ -actin in primary cortical neurons incubated with one of the following: 100 $\mu$ M succinate or 200 $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate at 37°C for 2, 5, and 15 minutes. The antibody  $\beta$ -actin was used to verify the equal loading in all lanes. **(B)** ERK phosphorylation state following 15 minutes pre-treatment with CI-1040, an ERK1/2 inhibitor, before the incubation with or without the GPR91 or GPR99 agonists at the same concentrations cited previously. **(C)** Photomicrographs of retinal explant GCs treated with GPR91 or GPR99 agonist in the presence or the absence of the ERK inhibitor. **(D)** Quantifications of the GC's surface area and **(E)** the filopodia number. **(F)** Photomicrographs of retinal explant cultures treated with succinate (100 $\mu$ M) and  $\alpha$ -ketoglutarate (200 $\mu$ M) in the presence or the absence of CI-1040. **(G)** Analysis of the retinal projection growth in the explants treated above. Scale bars: 5 $\mu$ m **(C)**; 100 $\mu$ m **(F)**. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates a significant change compared to the control group in **D**, **E** and **G**;  $p < 0.0001$ . # indicates a significant change induced by the ERK inhibitor in **D**, **E** and **G**;  $p < 0.002$ .

Figure 4



**Figure 4. GPR91 or GPR99 agonists modulate GC morphology and axon growth via the ERK1/2 pathway**



Figure 3.5 GPR91 and GPR99 ligands had no effect on RGC turning *in vitro*

**(A)** Photomicrographs of time-lapse microscopy from DIV1 mouse retinal explant growth cone taken at  $t = 0$  minute and  $t = 60$  minutes during GC turning assay experiments in the presence or not of the GPR91 and GPR99 agonists. Black arrows indicate the direction of the microgradient while blue arrowheads indicate initial GC position. Green arrowheads show the GC position following neurite growth. **(B-D)** Superimposed RGC axon trajectories over the 60-minute observation period for vehicle (CTRL) and  $\alpha$ -ketoglutarate ( $200\mu\text{M}$ ); no significant changes were observed on growth cone behaviour while succinate ( $100\mu\text{M}$ ) increased axon growth but not the turning toward the pipette tip. Black arrows indicate the direction of the gradient. **(E)** Quantification of neurite elongation and GC turning responses following drug stimulation. Scale bars:  $40\mu\text{m}$  **(A)**. Values are presented as means  $\pm$  SEM; \* indicates significant changes compared to the vehicle in **(E)**;  $P < 0.0001$ .

Figure 5

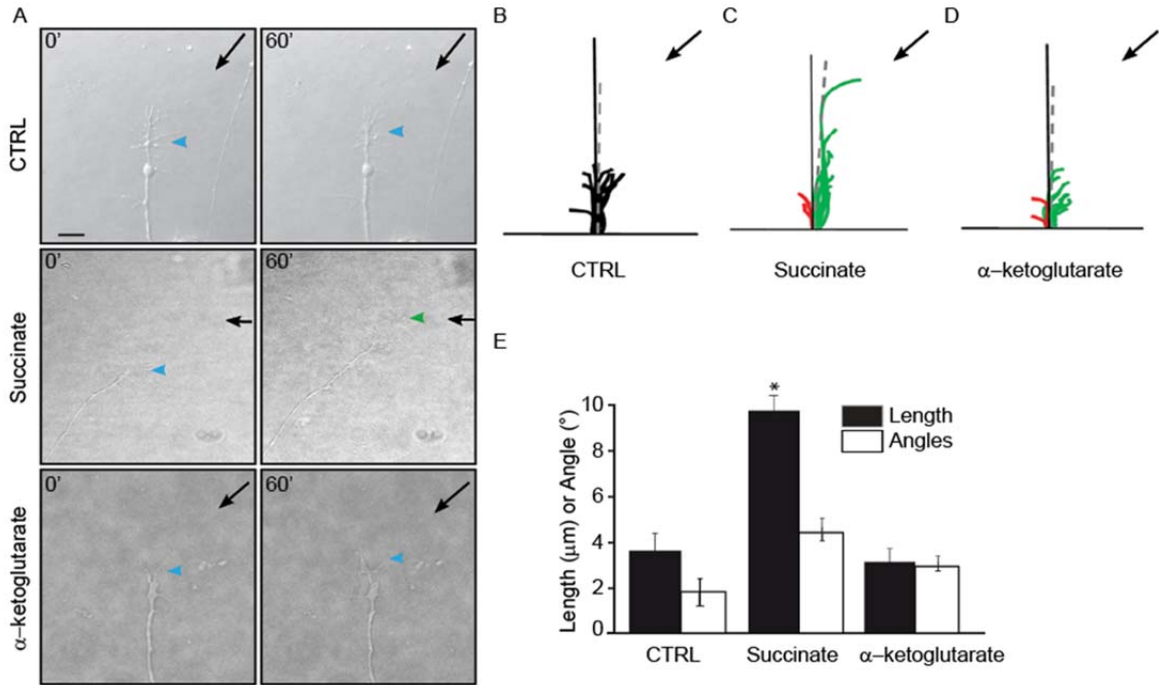


Figure 5. GPR91 and GPR99 ligands have no effect on RGC turning *in vitro*

Figure 3.6 Role of GPR91/GPR99 in RGC guidance and target selection *in vivo*

**(A–H)** Lipophilic dye tracings of the proximal visual pathway in E14/15 mice. Crystals of DiO were placed unilaterally in the right optic disk to create complete retinal axon fills. After diffusion of the dye, brains were dissected out and the ventral surface imaged with a dissecting **(A–D)** and a fluorescent microscope **(E–H)**.

**(A, E)** The visual pathway in WT mice labeled with DiO. Looking up at the ventral surface of the brain, anterior is to the top, posterior to the bottom. **(B, F)** *Gpr91*<sup>-/-</sup>. ON, optic nerve; OT, optic tract; Ipsi, ipsilateral pathway; Contra, contralateral pathway; the red asterisk marks the location of the normal optic chiasm. **(C, G)** *Gpr99*<sup>-/-</sup>. **(D, H)** *Gpr91/99*<sup>-/-</sup>. The arrowhead shows the aberrant projections prior crossing the optic chiasm and the thin arrow highlights the fibers that have extended out of the contralateral optic tract toward the contralateral eye. **(I)** Retinogeniculate projection patterns visualized following CTb conjugated to Alexa-555 (red) and CTb-488 (green) injections into left and right eyes of *GPR91R*<sup>-/-</sup>, *GPR99R*<sup>-/-</sup> and WT adult mice. **(J)** Quantification of the percentage of the dLGN receiving overlapping inputs. Data are presented as means ± SEM. Scale bars: 100µm (A and I); 50µm (B–H) n= 12 brains per condition for E14/15 mice; n = 5 brains per condition for adult mice.

Figure 6

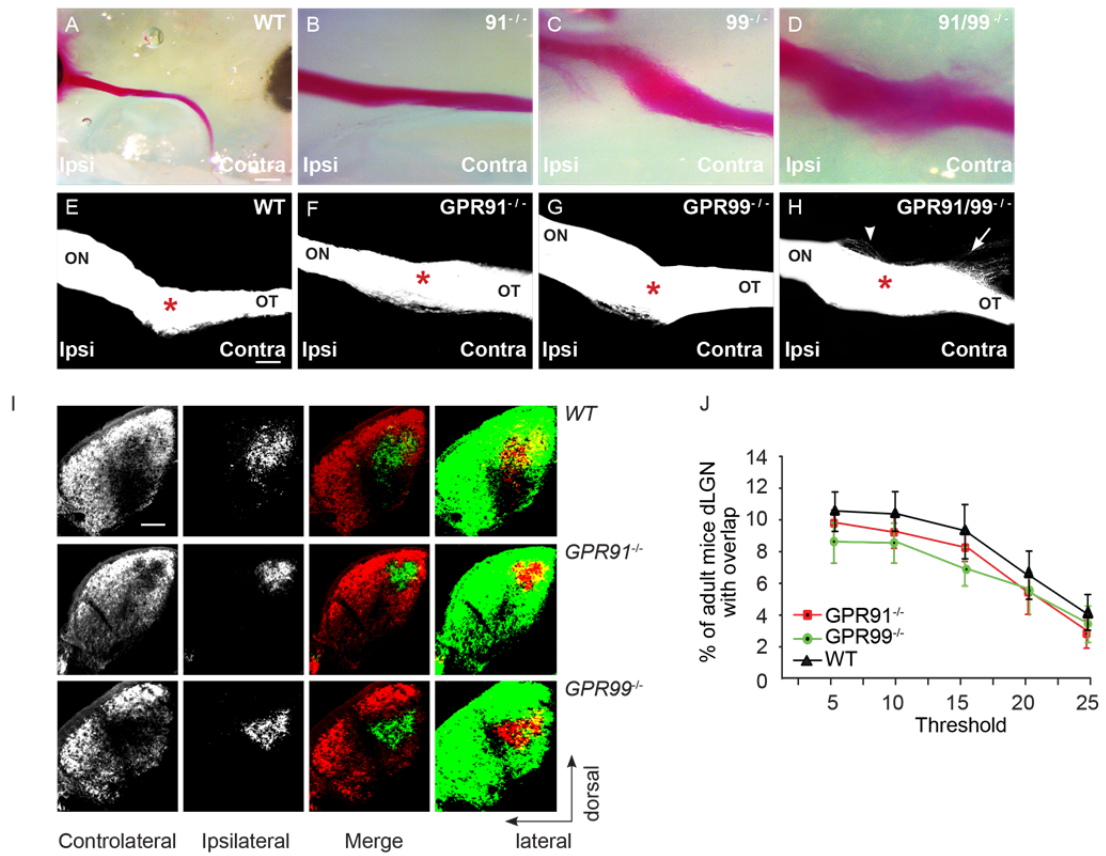


Figure 6. Role of GPR91/GPR99 in RGC guidance and target selection *in vivo*

## **CHAPITRE 4**

## 4.1 Discussion générale

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande superfamille de récepteurs cellulaires. Ils contrôlent toute une gamme de fonctions physiologiques et leur dérégulation est à l'origine de nombreuses maladies humaines. Bien qu'ils représentent, ensemble avec les enzymes la cible pharmacologique la plus fréquente des médicaments actuellement prescrits, un faible pourcentage des RCPGs est thérapeutiquement exploité.

Les déficiences visuelles peuvent être d'origine congénitale (l'hypoplasie du nerf optique) ou post-traumatique, dégénératives (dégénérescence maculaire) ou secondaires à une autre pathologie (glaucome, diabète,...). Actuellement, il n'y a aucune cure à ces maladies et l'étude des mécanismes impliqués dans l'établissement ou la régénération des circuits neurologiques visuels et l'identification de certaines cibles pharmacologiques constitue donc une voie prometteuse. Ainsi, le principal objectif de cette thèse de doctorat était d'identifier les rôles des récepteurs couplés à la protéine G (GPR55; GPR91 et GPR99) durant le guidage axonal et la croissance des axones des cellules ganglionnaires de la rétine pendant le développement du système visuel afin de voir leurs effets et essayer de comprendre les mécanismes impliqués pour éventuellement proposer de nouvelles cibles pharmacologiques pour la régénération du système visuel.

Les résultats observés suite à la recherche effectuée dans le cadre de cette thèse ont permis de constater la présence des trois récepteurs dans le système visuel durant le développement embryonnaire et postnatal. Malgré qu'ils activent tous la voie d'ERK-1/2 pour moduler la croissance axonale globale et la morphologie du cône de croissance, leurs effets sont différents lors du guidage axonal. Ceci démontre la spécificité de chaque récepteur lié à la nature de ses ligands, des concentrations utilisées et des cellules ou des tissus étudiés.

## **4.2 Expression des récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 dans la rétine**

Des études antérieures ont rapporté la distribution ubiquitaire de l'ARNm de GPR55 dans le système nerveux central, avec l'ordre d'expression suivant dans les tissus de souris: (Ryberg et coll, 2007) cortex frontal> striatum> hypothalamus> tronc cérébral> cervelet = hippocampe> moelle épinière. Il est également exprimé dans le noyau caudé, le putamen, les neurones du ganglion de la racine dorsale, et les cellules PC12 différenciées (Lauckner et coll, 2008; Obara et coll, 2011; Sylantyev et coll, 2013 et Wu et coll., 2013). Chez le singe vervet adulte, la localisation des protéines de GPR55 a été signalée strictement dans la couche des photorécepteurs de la rétine avec un marquage plus important dans les segments intérieurs (Bouskila et coll., 2013a). Dans notre étude, la protéine GPR55 est largement exprimée dans la rétine de souris adulte. Une différence similaire dans le motif d'expression protéique du récepteur cannabinoïde deux (CB2R) a été observée entre le même type de singe et les rongeurs à l'âge adulte (Bouskila et coll., 2013<sup>b</sup> et Cécyre et coll., 2013). En fait, CB2R est présent uniquement dans les cellules de Müller et aucune expression n'a été détectée dans les autres types cellulaires de la rétine, y compris les cellules ganglionnaires chez le singe vervet adulte (Bouskila et coll., 2013<sup>b</sup>). Par contre, il est localisé dans les cônes et bâtonnets des photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules amacrines, les bipolaires et les cellules ganglionnaires dans la rétine de souris adulte (Cécyre et coll., 2013). Une distribution similaire à la souris a été observée dans la rétine de rat, avec CB2R localisé dans l'épithélium rétinien pigmentaire, les segments internes des photorécepteurs, les cellules horizontales et amacrines, les CGRs, et les fibres de la couche plexiforme interne (Lopez et coll., 2011). La différence dans les patrons d'expression de la protéine GPR55 peut être attribuée à des différences dans

le système visuel entre les rongeurs et les primates et le rôle physiologique joué par le récepteur dans chaque modèle animal. Bien que les études signalent la présence du récepteur dans le SNC adulte (Sawzdargo et coll., 1999; Hui-Chen et coll., 2013 pour examen) et dans la rétine du singe vervet (Bouskila et al., 2013<sup>a</sup>), son expression dans la rétine et les projections de la rétine de rongeurs durant le développement était inconnue. Dans cette étude, nous démontrons que le GPR55 est exprimé dans la rétine du hamster et de la souris en développement, dans les projections axonales, leurs cônes de croissance et leurs filopodes.

Nous avons utilisé des rétines provenant de souris embryonnaires E14/15 pour évaluer aussi la présence des deux autres protéines G (GPR91 et GPR99) et leur implication possible pendant la navigation de projection de la rétine. Les protéines de GPR91 et GPR99 ont été détectés dans la rétine des embryons de souris à l'âge embryonnaire E14/15 et dans les rétines de souris adulte de souche sauvage. La recherche récente a révélé que GPR91 était localisée aux cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) (Qi et coll., 2004; Sapieha et coll., 2008; Gnana-Prakasam et coll., 2011 et Li et coll., 2014) et qu'il a été associé à la néovascularisation dans rétinopathie ischémique (Sapieha et coll., 2008). En plus de la pathogenèse de la neuropathie diabétique, il joue un rôle critique dans l'hypertension, le stress cardiaque et les dommages du foie (Correa et coll., 2007; Rubic et coll., 2008; Robben et coll., 2009 et Aguiar et coll., 2012). Bien que ce récepteur soit exprimé dans les CGRs, la plupart des études antérieures montrent son expression dans les rétines de rat ou de la souris à l'âge postnatal (P1 à l'âge adulte) et aucune donnée immunohistologique sur les souris knockout n'a été présentée. Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois l'expression de GPR91 dans la rétine et les projections de la rétine au cours du développement chez un mammifère : la souris. Chez les embryons de souris



E14/15, GPR91 est exprimé dans les projections axonales, les cônes de croissance et les filopodes.

GPR99 est un proche parent du GPR91; initialement décrit comme un homologue au récepteur nucléaire P2Y (Inbe et coll., 2004), puis il est reconnu comme un récepteur de l'oxoglutarate en se basant sur sa liaison et son activation par le 2-oxoglutarate ( $\alpha$ -KG) (He et coll., 2004; Davenport et coll., 2013 et Southern et coll., 2013). À ce jour, les études antérieures ont été effectuées en utilisant une analyse par transfert de Northern et RT-PCR quantitative pour détecter l'ARNm de GPR99 dans les tissus humains et murins. Bien que GPR99 ARNm est exprimé dans le rein, le placenta, la trachée, les glandes salivaires, le cerveau du fœtus, les poumons et dans les cellules dérivées du sang du cordon ombilical (MAST) (Wittenberger et coll., 2002 et Inbe et coll., 2004) pour l'homme et dans les reins, les testicules, et le muscle lisse de la souris (He et coll., 2004), notre étude est la première à rapporter son expression dans les neurones de la rétine de souris embryonnaires et adultes utilisant des analyses d'immunobuvardage et l'immunohistochimie. De plus, GPR99 est exprimé dans les projections axonales, les dendrites, les cônes de croissance et les filopodes dans les explants rétiniens de souris embryonnaires.

La présence des trois récepteurs au cours du développement dans la rétine et sur les projections axonales et les cônes de croissance et leurs filopodes nous amène à rechercher dans leur possible rôles dans la croissance, le guidage axonal lors de l'établissement des réseaux neuronaux au cours du développement et chez l'adulte avec d'éventuels rôles dans la régulation synaptique et la régénération.

### **4.3 Les récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 modulent la morphologie des CC et la croissance axonale globale**

Dans cette étude, nous avons activé ou bloqué pharmacologiquement et génétiquement les récepteurs étudiés pour constater les effets de leur présence ou absence ainsi que les effets de leurs ligands, *in vitro*, sur la morphologie des CC et sur la croissance axonale globale des axones des CGR. Par conséquent, les agonistes de GPR55, LPI et O-1602, ont augmenté la croissance des projections rétinienne et ils ont induit des changements morphologiques des cônes de croissance se traduisant par une expansion de l'aire de leurs surfaces et une augmentation du nombre de filopodes. D'autre part, l'antagoniste du GPR55, le CBD, cause une diminution de la croissance des projections de la rétine et induit une diminution de la taille du cône de croissance et du nombre de filopodes aboutissant à l'effondrement du CC. Ces données sont en accord avec des études précédentes dans lesquelles LPI active GPR55 dans les ganglions de la racine dorsale (DRGs) (Lauckner et coll., 2008), les ostéoclastes (Whyte et coll., 2009), les cellules lymphoblastoïdes (Oka et coll., 2010), la prolifération cellulaire dans le tissu cancéreux (Andradas et coll., 2011) et dans les tranches d'hippocampe (Sylantyeve et coll., 2013). Connaissant les effets promigratoires et prolifératifs de LPI dans les lignées cellulaires du cancer, nous nous attendons à un allongement des neurites dans les cellules PC12 (Soga et coll., 2005; Pineiro et coll., 2011 et Hu et coll., 2011). D'après la littérature portant sur le LPI, la plupart des études ont montré des effets significatifs à une concentration de LPI allant de 0,1 à 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  étant la concentration la plus utilisée (Oka et coll., 2007; Anavi-Goffer et coll., 2012 et Rojo et coll., 2012). Les faibles concentrations telles que 1-3 $\mu\text{M}$  ont été utilisées dans la plupart des études démontrant un effet de LPI sur la mobilisation de calcium intracellulaire, la prolifération, l'activation des canaux et la migration (Oka et coll.,

2007; Pietr et coll, 2009; Henstridge et coll, 2009 ; Whyte et coll, 2009 et Pineiro et coll, 2011). Nos résultats sont en accord avec Balenga et coll., définissant le LPI (3  $\mu\text{M}$ ) en tant que molécule chimioattractive pour les microglies (Balenga et coll., 2011). Une autre étude a montré un effet hautement migratoire du LPI (1  $\mu\text{M}$ ) sur la lignée métastatique MDA-MB231 des cellules de cancer du sein, qui exprime GPR55 (Monet et coll., 2009). En outre, à la même concentration le LPI stimule aussi l'élongation des cellules (Ford et coll., 2010). Cependant, des résultats de rétraction des neurites produite par le LPI via GPR55 dans les cellules PC12 différenciées (Obara et coll., 2011) et une absence d'effet de LPI dans les axones de la moelle épinière (Guy et coll., 2015) ont été rapportés. La différence dans l'effet attribué au LPI peut être expliquée par la différence de concentration de 5 à 30 fois plus élevée que celles utilisées dans la présente étude par *Obara et coll.* En effet, à ces concentrations élevées (10  $\mu\text{M}$ ) et au-dessus, le LPI pourrait également agir sur des cibles non spécifiques ou activer les voies de signalisation alternatives telles que RhoA / ROCK1 comme indiqué dans la présente étude. Cette hypothèse pourrait expliquer les effets opposés vus entre les deux concentrations pour le même agoniste de GPR55, et aider à illustrer la complexité de l'interprétation des expériences avec ces lipides. De plus, les niveaux de la protéine GPR55 dans les cellules PC12 et dans les neurones primaires sont différents et peuvent produire des effets distinctifs. Les cellules PC12 sont dérivées de cellules tumorales, donc de dérivées neuroendocriniennes, qui peuvent être tout à fait différentes de neurones primaires. (Frassetto et coll., 2006). Par conséquent, les différences dans les effets pharmacologiques de LPI peuvent être expliquées par différences dans le phénotype de ces deux types de cellules. Une autre différence qui se pose entre les CGRs et les lignées de cellules PC12 est le développement morphologique qui est contrôlé par divers facteurs qui opèrent au cours des périodes de temps différentes (Coombs et coll., 2007)

et peut expliquer l'effet observé avec LPI. L'absence d'effet de LPI sur l'orientation des axones afférents nociceptifs dans la moelle épinière en développement pourrait être attribuée à une différence dans les sous-types de neurones. Néanmoins, ces résultats mettent en évidence les mécanismes distincts par lesquels GPR55 module le développement de diverses populations neuronales. Il est important aussi de noter que la désactivation génétique du récepteur démontre une diminution légère, mais significative par rapport aux animaux non mutés. Aussi elle abolit les effets observés d'activation ou d'inhibition de ses ligands ce qui démontre une activité constitutive du récepteur à l'état basal et que GPR55 médie les effets de ses ligands sur la croissance des CGRs au cours du développement.

Pour étudier le rôle possible joué par les récepteurs des intermédiaires du cycle de Krebs au cours du développement, des modulations génétiques et pharmacologiques ont été effectuées sur les récepteurs GPR91 et GPR99. Le succinate, intermédiaire du cycle de l'acide citrique, est normalement présent dans les mitochondries et peut être libéré dans l'extérieur des cellules et dans la circulation sanguine si la demande en énergie des tissus locaux est déséquilibrée et que l'apport en oxygène est faible (He et coll., 2004 et Favret et coll., 2013). Des preuves substantielles indiquent les liens associant le succinate et les maladies métaboliques telles que le diabète, l'hypertension artérielle (Arai et coll., 1984; He et coll., 2004 et Hebert et coll., 2004). Dans notre étude, la manipulation pharmacologique du récepteur GPR91 avec 100  $\mu\text{M}$  de succinate et de GPR99 avec 200  $\mu\text{M}$  de  $\alpha\text{-KG}$  module la morphologie du CC et la croissance des axones du CGR. En conséquence, les deux agonistes augmentent la croissance des projections rétiniennes, l'aire des CC et le nombre de filopodes dans les groupes traités comparés au contrôle.

L'étude des rôles possibles des deux récepteurs GPR91 et GPR99 a été amorcée à la suite des études sur le rôle important du GPR91 dans l'angiogenèse. GPR99 étant un analogue proche de récepteur au succinate et tous deux leurs agonistes sont des intermédiaires du cycle de Krebs, on a essayé d'examiner les rôles possibles de ces récepteurs par analogie au rôle de GPR91 dans la formation des réseaux de vaisseaux sanguins. Le guidage axonal et l'angiogenèse rencontrent des défis fondamentaux lors de la formation de leurs réseaux étendus. Les cellules endothéliales spécialisées (CE) à leurs extrémités possèdent une pointe mobile, invasive et qui s'étendent dynamiquement sur de longues saillies rappelant les cônes de la croissance axonale (Carmeliet et coll., 2005; Klagsbrun et coll., 2005 et Phng et coll., 2009). Ainsi, les effets du récepteur de succinate sur la croissance des axones corroborent les résultats obtenus par *Sapieha et al* où les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) via GPR91 modulant l'angiogenèse, par le contrôle de facteur angiogénique VEGF, en réponse à une augmentation de niveaux de succinate (Sapieha et coll., 2008). En fait, les récepteurs du VEGF sont exprimés sur les neurones et leurs précurseurs (Storkebaum et coll., 2004) et VEGF-A peut agir directement sur ces cellules pour promouvoir la prolifération et la survie (Sun et coll., 2003) ainsi que la migration directionnelle (Zhang et coll., 2003). Connaissant le lien spatio-temporel entre la neurogenèse et l'angiogenèse (Palmer et coll., 2000), les similitudes morphologiques entre les cellules d'extrémité de l'endothélium et des cônes de croissance axonale et le rôle du VEGF en tant que régulateur central du comportement des cellules neurales et de la neurogenèse (Kempermann et coll., 2004 et Erskine et coll., 2011), l'augmentation observée de la morphologie des CC et la croissance globale des neurites peuvent être expliquée par un mécanisme similaire de la régulation du facteur VEGF en présence de succinate. Les effets que nous avons observés sur la croissance par le succinate

via GPR91 sont approuvés par plusieurs autres études où il a été montré l'effet hautement proliférant et stimulant du succinate via le GPR91 dans différents tissus. En effet, le succinate stimule les cellules dendritiques (Pearce et coll., 2013). L'ARNm du GPR91 a été détecté dans les cellules dendritiques immatures (DC) par *Rubic et coll.* et le succinate stimule la migration des cellules DC immatures d'une manière dépendante de la concentration (Rubic et coll., 2008). Aussi, l'administration intraveineuse de succinate augmente l'activité de la rénine plasmatique (He et coll., 2004 et Robben et coll., 2009) et le GPR91 médie la prolifération des cellules endothéliales (Li et coll., 2014). Enfin, le GPR91 est également exprimé dans les cellules précurseurs hématopoïétiques et de multiples types de cellules sanguines (Hakak et coll., 2009) et immunitaires (Macaulay et coll., 2007); lorsqu'il est administré à des plaquettes, le succinate potentialise l'activation et l'agrégation des plaquettes d'une manière dépendante de la dose augmentant l'agrégation maximale par rapport au témoin sans succinate (Macaulay et coll., 2007 et Hogberg et coll., 2011). Ensemble, ces fonctions du succinate médiées par GPR91 soutiennent le rôle crucial qu'il joue dans la croissance axonale.

L'augmentation de la taille du CC et dans la longueur des projections axonales des CGR après stimulation avec 200  $\mu$ M  $\alpha$ -KG a été le premier rapport d'un effet du  $\alpha$ -KG via son récepteur GPR99 sur le développement axonal chez les mammifères. Des études antérieures sur les  $\alpha$ -KG montrent son rôle critique dans quatre voies métaboliques cellulaires différentes comme intermédiaire dans le cycle de Krebs pour le métabolisme de l'énergie, en tant que précurseur pour la formation de la glutamine pour la synthèse d'acides aminés, son rôle physiologique dans les cellules en tant que premier transporteur d'azote, enfin comme cosubstrat de l'enzyme Fe (II) / dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -KG (Damato et coll., 2012). En outre, une perte dans la production d' $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) induit des mutations dans l'isocitrate

déshydrogénases qui catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ -KG. Les mutations des enzymes IDH 1/2 sont responsables de 75% des gliomes (Parsons et coll., 2008), ~ 20% de la leucémie myéloïde aiguë (LMA) (Mardis et coll., 2009), et plusieurs autres tumeurs (Hemerly et coll., 2010; Murugan et coll., 2010; Amary et coll., 2011 et Damato et coll., 2012). L' $\alpha$ -KG a été signalé également, pour son rôle dans le vieillissement et sa capacité à prolonger la durée de vie de *C. elegans* par ~ 50% (Gems et coll., 2000). Cet intermédiaire dans le cycle de Krebs est également utilisé dans les solutions de préservation d'organes pour transplantation des reins ou du foie (St Peter et coll., 2002). Enfin, GPR99 présent dans le placenta a été associé à des perturbations dans l'activité placentaire réduisant le débit de sang placentaire pendant la grossesse, souvent avec complications sévères (Nielsen et coll., 2000)

Fait intéressant, la modulation génétique, en utilisant des souris *gpr91<sup>-/-</sup>* et *gpr99<sup>-/-</sup>*, a bloqué seulement l'effet du succinate chez la souris *gpr91<sup>-/-</sup>* alors que l'effet observé de  $\alpha$ -KG chez les animaux WT a été partiellement aboli chez les souris *gpr99<sup>-/-</sup>*. Nous avons utilisé une souris doublement mutée pour les gènes codant pour les deux récepteurs et l'effet a été totalement bloqué. Ces résultats démontrent que l'effet sur la croissance du succinate sur les CGRs a été médié uniquement par le récepteur GPR91 alors l' $\alpha$ -KG pourrait activer les deux récepteurs. L'activation de GPR91 chez la souris *gpr99<sup>-/-</sup>* par l' $\alpha$ -KG se produit peut-être en raison de son rôle de précurseur dans la formation du succinate. Par exemple dans le cas d'ischémie, la formation du succinate se produit en présence d' $\alpha$ -KG (Katsura et coll., 1996 et Fedotcheva et coll., 2006). Les espèces oxygénées réactives (ROS), qui augmentent au cours de l'ischémie peuvent promouvoir la décarboxylation de l' $\alpha$ -KG, résultant en la formation non enzymatique du succinate qui peut se produire à la fois dans les mitochondries et le cytosol (Krebs et coll., 1970). Ces résultats mettent en évidence l'effet du succinate et du  $\alpha$ -KG par lequel GPR91 et

GPR99, respectivement, modulent la croissance des CGRs au cours du développement du système neurovisuel. Ces données sont importantes pour la découverte de nouveaux substrats et effecteurs dans les mécanismes qui régissent le développement des voies nerveuses. Cependant elles demeurent préliminaires et d'autres recherches sont nécessaires pour mieux élucider les mécanismes et les rôles de chaque récepteur.

#### **4.4 La voie de signalisation ERK-1/2 médie les effets des récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99**

Bien que GPR55 puisse activer plusieurs voies de signalisation (Ryberg et coll., 2007; Lauckner et coll., 2008; Henstridge et coll., 2011), il apparaît, à la lumière de nos résultats de notre étude que la stimulation de GPR55 active la voie de la MAPK ERK-1/2. Pour caractériser le mécanisme par lequel GPR55 module la morphologie du cône de croissance et la croissance des axones, nous avons examiné la voie ERK-1/2. Nous démontrons qu'à 1  $\mu$ M, l'agoniste du GPR55, le LPI, augmente la phosphorylation d'ERK-1/2. Ceci est en conformité avec un nombre croissant d'études montrant que la stimulation de GPR55 par le LPI active la voie ERK-1/2 (Oka et et coll., 2007; Kapur et et coll., 2009; Pietr et et coll., 2009; Whyte et et coll., 2009; Andradas et et coll., 2011; Pineiro et et coll., 2011). De plus, nos résultats montrent qu'à une concentration plus élevée; cet agoniste de GPR55 augmente l'activité RhoA/ROCK1 et met en évidence des voies de signalisation supplémentaires associées à GPR55. Un consensus parmi les articles publiés sur GPR55 rapporte l'implication du cytosquelette d'actine et l'activation de RhoA (Lauckner et et coll., 2008; Kapur et et coll., 2009; Henstridge et et coll., 2010 et Guy et coll., 2015). Cette double action de LPI sur les voies RhoA/ ROCK1 et ERK-1/2 est dépendante de la concentration. Les voies de



signalisation en aval de GPR55 restent controversées et d'autres études sont nécessaires pour caractériser tous les mécanismes impliqués.

Selon les tissus ou le type de cellules utilisé, GPR91 est couplé principalement à Gi/o et Gq, (He et coll., 2004; Rubic et coll., 2008 et Hakak et coll., 2009); tandis que la voie de signalisation de GPR99 suite à son activation par l' $\alpha$ -KG, implique la famille Gq/G<sub>11</sub> et une stimulation de la phospholipase C (He et coll., 2004). Dans notre étude, la stimulation des deux récepteurs GPR91 et GPR99 amène à l'activation de la voie MAPK ERK-1/2. Pour caractériser le mécanisme par lequel GPR91 et GPR99 modulent la morphologie du cône de croissance et la croissance des axones, nous avons examiné les niveaux de phosphorylation de la forme active d'ERK-1/2. Nous démontrons que 100  $\mu$ M de succinate et 200  $\mu$ M d' $\alpha$ -KG augmentent les niveaux de phosphorylation d'ERK-1/2 comparativement au témoin non traité. Ceci corrobore avec un nombre croissant d'études qui démontrent une activation de la voie de signalisation ERK-1/2 suite à la modulation de GPR91 (He et coll., 2004; Yoon et coll., 2006; Robben et coll., 2009; Hakak et coll., 2009; Aguiar et coll., 2012; Li et coll., 2014 et Hu et coll., 2015). De même, nos résultats illustrent que la stimulation par l' $\alpha$ -KG active la voie d'ERK1/2 confirmant une affinité apparente de GPR99 pour l' $\alpha$ -KG (He et coll., 2004 et Kanaoka et coll., 2013). Toutefois, des données récentes suggèrent que GPR99 pourrait agir comme un récepteur supplémentaire pour le leucotriène E4 (LTE4) avec une affinité dans l'ordre du nanomolaire (Kanaoka et coll., 2013). Bien que d'autres enquêtes sur les mécanismes et les confirmations indépendantes de liaison et de signalisation par d'autres groupes sont nécessaires pour caractériser tous les mécanismes impliqués dans l'aval voies de signalisation GPR99 (Kanaoka et coll., 2013 et Li et coll., 2014), ces résultats, en particulier

l'activation d'ERK-1/2 lors de la croissance axonale par l' $\alpha$ -KG, présentent une nouvelle voie de signalisation en aval de GPR99.

## **4.5 Les récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 dans le guidage axonal**

Au cours de l'établissement du système neurovisuel, les CGRs sont les seules qui envoient des axones de la rétine pour assurer le traitement visuel et cognitif de l'information du monde extérieur dans le cerveau. Pour atteindre leur cible, les axones voyagent sur des distances relativement longues guidées par l'action concertée d'une combinaison de signaux intrinsèques et extrinsèques dans leur environnement complexe. Situé à la pointe axonale, le CC est une structure très mobile capable de détecter et traduire efficacement en réponse mécanique appropriée une multitude d'indices de chimiotactiques externes. Les signaux de guidage, notamment les membres de la famille nétrines, sémaphorines, éphrines, Slits, des molécules d'adhésion cellulaire, des morphogènes, et des facteurs de croissance, modulent le comportement et la croissance des axones (Dickson et coll., 2002; Guan et coll., 2003; Charron et coll., 2005; Plachez et coll., 2005; Rubic et coll., 2008 et Dupin et coll., 2013). Nous avons démontré précédemment dans notre laboratoire que les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 modulent le guidage axonal (Argaw et et coll., 2011; Duff et et coll., 2013). Au début de mon doctorat, et encore aujourd'hui, la littérature n'est pas encore arrivée à un consensus sur la classification de GPR55 comme un troisième récepteur aux cannabinoïdes (CBR3). Nous avons essayé d'étudier les mécanismes de modulation du guidage axonal et la navigation des axones de la rétine suite à l'activation de GPR55. Nous avons constaté que les CCs sont attirés par la présence de microgradients de LPI, tandis que le

CBD induit leur effondrement et leur rétraction. Sur la base de ces résultats, nous avons conclu que le GPR55 joue un rôle modulateur dans la navigation de l'axone en modifiant la morphologie et le comportement des CC. Ces résultats montrent un rôle de ce récepteur dans le guidage axonal *in vitro*, et sont conformes à la littérature de l'effet de LPI sur la signalisation, la migration et la croissance (Oka et et coll., 2007; Lauckner et coll., 2008; Henstridge et et coll., 2009; Pietr et et coll., 2009; Whyte et et coll., 2009; Oka et et coll., 2010; Pineiro et et coll., 2011; Sylantyev et et coll., 2013), ainsi que l'effet inverse observé avec du CBD (Ryberg et et coll., 2007; Pertwee et et coll., 2007; Ross et et coll., 2009; Whyte et et coll., 2009; Balenga et et coll., 2011; Kallendrusch et et coll., 2013 et Sylantyev et et coll., 2013). Par la suite et tenant compte de l'analogie entre l'angiogenèse et le guidage axonal et les effets du succinate médiés par GPR91, nous avons étudié le rôle de ce récepteur ainsi que celui de son homologue GPR99 dans le guidage axonal. Fait intéressant, aucun des deux récepteurs n'était capable de moduler la navigation des axones de la rétine; les CCs ne sont ni attirés ni repoussés en présence de microgradients de succinate ou d' $\alpha$ -KG. Seulement en présence de succinate nous avons observé une augmentation significative de l'extension de l'axone comparé au véhicule et à l' $\alpha$ -KG. Ainsi, GPR91 peut jouer un rôle modulateur dans la croissance axonale en augmentant la motilité des axones, mais les deux récepteurs n'ont aucun effet sur le comportement des CCs et sur le guidage axonal. Ces résultats montrent, pour la première fois un rôle de GPR91 dans la motilité axonale, et sont conformes à l'effet du succinate stimulant la migration des cellules dendritiques immatures en fonction de la concentration (Rubic et coll., 2008). La littérature précédente de l'effet de succinate sur la motilité, la migration et la croissance renforce notre étude (Sun et coll., 2003; Storkebaum et coll., 2004; Macaulay et coll., 2007; Pearce et coll., 2013 et Li et coll., 2014).

## **4.6 Rôle du récepteur GPR55 dans le raffinement des projections rétiniennes et le choix des cibles thalamiques**

Le LPI peut être généré suite à l'action de la phospholipase A2 (PLA2) qui catalyse l'hydrolyse d'un groupement acyle du phosphatidylinositol (PI) (Grzelczy et coll., 2013). De même, la PLA1 peut être également impliquée dans la formation de LPI (Yamashita et coll., 2013). En 2007, le LPI a été décrit comme l'agoniste potentiel endogène de GPR55 (Oka et coll., 2007) et sa présence a été identifiée dans différents types de cellules humaines comme par exemple, les plaquettes (Billah et coll., 1982), les neutrophiles périphériques du sang (Smith et coll., 1992), et différentes lignées de cellules cancéreuses (Xiao et coll., 2000; Xiao et coll., 2001; Xu et coll., 2001; Ford et coll., 2010; Oka et coll., 2010; Andradas et coll., 2011; Pineiro et coll., 2011 et Cantarella et coll., 2011), les cellules endothéliales (Bondarenko et coll., 2010), des cellules animales comme les fibroblastes de souris (Hong et coll., 1981), les macrophages (Zoeller et coll., 1987), et les cellules du cerveau de rat (Oka et coll., 2009). Les concentrations de LPI varient d'un tissu à un autre (37,5 nM par gramme de tissu dans le cerveau de rat, 2,5  $\mu$ M dans du sérum de souris et de 1,5  $\mu$ M dans des échantillons de plasma humain (Grzelczy et coll., 2013).

Au cours du développement du système visuel, les axones des CGR parcourent de longues distances pour se connecter à leurs objectifs spécifiques. Beaucoup de signaux de guidage modulent leur navigation et leur reconnaissance de leurs cibles thalamiques; GPR55 et ses ligands endogènes pourraient représenter un ensemble de repères. En effet, nos données montrent qu'*in vivo* la manipulation pharmacologique de la signalisation de GPR55 affecte la croissance et la navigation des projections de la rétine. Nous avons montré qu'une seule injection intraoculaire de LPI conduit à l'émergence de projections RGCs ipsilatérales

aberrantes dans le collicule supérieur (SC). En effet, l'injection de LPI augmente la ramification ou stabilise les projections ipsilatérales qui sont déjà arrivées en un premier temps à leurs cibles empêchant ainsi leur rétraction dans le cadre du processus de raffinement. En outre, nous présentons une augmentation de la longueur des projections rétiniennes et du nombre d'axones dans le DTN après un traitement avec LPI et une diminution avec le CBD. De plus, nous avons remarqué la présence de projections de RGCs ipsilatérales aberrantes dans le SC de souris. L'augmentation de la ramification observée chez la souris *gpr55<sup>-/-</sup>* peut être expliquée par une stabilisation des projections ipsilatérales qui auraient normalement rétractées. Ainsi, nos données montrent que l'interférence génétique sur l'activité de GPR55 affecte profondément le développement des projections de la rétine et la sélection des cibles thalamiques. En conséquence, le rôle important joué par GPR55 au cours de la croissance axonale et le raffinement des CGRs est démontré par le manque relatif de la ségrégation spécifique des projections rétiniennes dans les yeux de souris postnatales et adultes mutées pour le gène codant pour le GPR55. Nous avons interprété ceci comme un déficit dans la ségrégation spécifique des projections rétiniennes. Chez les animaux WT, ce processus pourrait être influencé par l'activité endogène de GPR55 à la rétine et/ou directement au niveau des terminaisons axonales (SC ou LGN). Il est possible que l'absence de GPR55 puisse influencer l'activité spontanée de la rétine, qui est nécessaire à la ségrégation et le maintien des entrées spécifiques au dLGN (Chapman et coll., 2000) modifiant ainsi le résultat de la ségrégation. La carence de ségrégation spécifique des yeux peut également être produite en raison de l'absence de GPR55 fonctionnel directement dans le LGN. En résumé, la modulation de l'activité de GPR55 affecte fortement le développement et le guidage axonal des projections rétiniennes. Ces observations sont en accord avec les études précédentes montrant le rôle de

GPR55 dans la motilité, la migration, l'orientation et la polarisation des différents types de cellules humaines telles que des cellules de cancer du sein (Ford et et coll., 2010 et Andradas et coll., 2011) et les neurones myentériques du côlon chez la souris et l'humain (Li et coll., 2013).

Chez la souris, la décussation des axones des CGRs se produit au niveau du chiasma entre les âges embryonnaires E14-E16 (Godement et coll., 1990 and Sretavan et coll., 1990). Pour évaluer le rôle du GPR91 et GPR99 dans le guidage axonal dans le système visuel en développement, nous avons marqué avec le colorant lipophile (DiO) les axones de la rétine de l'œil droit de souris E14/15 de type sauvage ainsi que des souris mutées pour *gpr91*, *gpr99* ou les deux. À la différence des traceurs fluorescents qui sont transportés activement à travers les axones, le carbocyanine DiO est un colorant lipophile qui diffuse passivement dans le tissu fixé et indépendamment de tout système de transport antérograde ou rétrograde actif (Von Bartheld et coll., 1990 et Luo et coll., 1996). Le chiasma chez les souris mutées pour un des récepteurs apparaît relativement normal et semblable à celui observé chez le type sauvage. En effet, la majorité des axones traversent à la ligne médiane projettent controlatéralement. Nos résultats suggèrent que, dans le système visuel de la souris, les protéines GPR91 et GPR99 ne sont pas essentiels pour le croisement et le guidage des axones des CGRs au niveau du chiasma. Toutefois, des défauts subtils peuvent exister, mais ils ne sont probablement pas détectables en raison de la sensibilité de nos expériences. Une analyse plus détaillée serait nécessaire pour évaluer de façon plus quantitative la possibilité de toute déficience, due à l'absence de GPR91 ou GPR99, dans le guidage des axones des CGRs dans le système visuel en développement.

Fait intéressant, les projections axonales de souris déficientes pour les deux récepteurs *gpr91/99<sup>-/-</sup>* développent des anomalies de guidage. Ces défauts pourraient être expliqués par l'effet compensatoire entre les deux récepteurs dans le simple mutant. Cet effet corrobore avec nos résultats *in vitro* où l'on observe une disparition complète des effets des ligands de GPR91 et GPR99 uniquement chez les souris doubles mutées. Les erreurs de guidage observées chez les doubles mutants et non pas chez les mutants simples suggèrent que GPR91 et GPR99 seuls ne régulent pas le guidage axonal au niveau du chiasma au cours du développement chez la souris. De plus nos résultats *in vivo* chez les souris adultes confirment ces résultats. En effet, nos données montrent que la délétion de GPR91 ou de GPR99 n'affecte pas le choix des cibles thalamiques des projections rétiniennes. Par conséquent, chez la souris adulte *gpr91<sup>-/-</sup>* ou *gpr99<sup>-/-</sup>*, la ségrégation ipsi et controlatérale des projections rétiniennes demeure semblable à celle observée chez les WT. Ainsi, ces résultats *in vivo* soutiennent les conclusions antérieures *in vitro* que les intermédiaires du cycle de Krebs récepteurs ne modulent pas le guidage des CGRs et la sélection de la cible lors de l'établissement des voies visuelles. Possiblement en raison de leurs rôles modulateurs, ces récepteurs affectent le guidage axonal d'une manière plus subtile, cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour déterminer un défaut de façon plus quantitative.

L'identification des médiateurs impliqués dans ces mécanismes est un outil précieux pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques visant à la régénération et la réparation du système nerveux central.

## 4.7 Les limitations de notre étude

Durant cette thèse, nous avons essayé de concevoir l'étude qui correspond le plus à nos objectifs. Cependant, nous étions confrontés à quelques limites techniques associées à ce type d'étude.

Lors de l'évaluation des effets des ligands des différents RCPGs, un facteur limitant était la capacité de doser les concentrations endogènes de ces ligands dans les tissus et les cellules étudiés. L'évaluation des taux de ces agonistes endogènes nous aurait permis de confirmer leur présence pendant le développement. Pour évaluer indirectement leurs actions, nous avons utilisé des animaux transgéniques pour les récepteurs étudiés et nous avons opté pour des antagonistes hautement sélectifs de leur récepteur spécifique. Tout de même, l'implication possible d'autres récepteurs est probable. Des délétions locales de ces récepteurs en utilisant des techniques de transfection avec des siRNA pour baisser l'expression des récepteurs serait une des expériences complémentaires à notre étude et nous permettraient d'éviter les compensations qui peuvent être présentes chez animaux KO.

L'étude du développement des axones des cellules ganglionnaires se fait à l'âge embryonnaire. Bien que nous avons démontré le rôle *in vitro* des récepteurs étudiés, l'étude *in vivo* des effets de leurs ligands nécessitait des techniques de chirurgie et d'injections très sophistiquées dans les yeux des embryons pendant la gestation avec tous les risques de complications et d'infections postopératoires pour les embryons et leur mère. Pour pallier ce facteur limitant, nous avons choisi de réaliser ces expériences chez des hamsters qui naissent avec un système visuel prématuré comparativement aux autres rongeurs. Malgré la similitude au cours du développement du système visuel entre ces rongeurs, les différences



morphologiques et physiologiques propres à chaque animal doivent être tenues en considération.

De même, l'implication de chacun des RCPGs *in vivo* ainsi que les différences morphologiques et structurales en réponse à leurs délétions ont été réalisées chez les animaux adultes et de jeune âge postnatal. Une limitation technique du traceur utilisé (CTB) qui ne diffuse qu'à travers des tissus vivants n'a pas permis de marquer les voies visuelles chez les embryons E14/15. Pour pallier cette limite de l'étude, nous avons procédé à l'injection de traceurs lipophiliques (par exemple : DiI et DiO) et nous développons l'expertise nécessaire pour la chirurgie, la visualisation et la quantification des résultats dans les différentes structures du système visuel en développement chez les différentes souches testées.

Les essais biochimiques ou immunocytologiques sur les possibles voies de signalisations des récepteurs GPR91, GPR99 et GPR55 nous ont permis d'élucider un potentiel rôle de la voie ERK1/2, principalement, dans la médiation des effets observés. D'autres études menant à explorer les autres composantes en amont ou en aval d'ERK ou à mesurer les possibles interactions entre les divers effecteurs de la signalisation de ces récepteurs nous permettront de mieux comprendre leur pharmacologie et de caractériser toutes les composantes des voies de signalisations impliquées.

Enfin, une dernière limitation de cette étude est son impact sur l'humain et la détermination de la présence et des effets de ces récepteurs chez l'humain dans les conditions physiologiques et pathologiques. Récemment, nous avons commencé à tester les effets des ligands de GPR55 (LPI et CBD) sur l'activité rétinienne chez le singe vervet qui représente un modèle animal plus proche de l'humain. Aussi, nous étudions actuellement les effets des

cannabinoïdes sur la régénération des axones des CGRs. Ces nouvelles études vont permettre de se rapprocher des objectifs de notre thèse qui se traduisent par la présentation de nouvelles cibles pharmacologiques ou de nouvelles substances thérapeutiques capables de remédier certaines pathologies ou déformations accidentelles du SNC.

## Conclusion et perspectives

Pris ensemble, l'activation des récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 par leurs ligands spécifiques engendre une modulation de la croissance, la motilité des cellules ganglionnaires de la rétine et des neurones corticaux au cours du développement. Aussi, GPR55 médie le guidage axonal et la sélection des cibles des axones des CGRs au cours de l'établissement des voies visuelles. Les études actuelles soulignent l'association de ces récepteurs avec plusieurs pathologies, y compris celle du système nerveux central, d'où l'importance des recherches qui ont mené à la réalisation de cette thèse et leur contribution à l'avancement des connaissances. En effet, nos résultats démontrent pour la première fois la présence de GPR55, GPR91 et GPR99 dans le système neurovisuel et ils ont permis d'identifier le mécanisme de régulation spécifique à chacun des trois récepteurs lors du développement du SNC. De plus, ces études rapportent l'implication dans le raffinement et la ségrégation des projections ipsi- et controlatérales du récepteur GPR55. Pour les récepteurs GPR91 et GPR99 les résultats *in vitro* et *in vivo* observés démontrent leurs rôles dans la croissance et non dans le guidage des axones des CGRs au cours du développement du système visuel.

Les recherches effectuées sur GPR55, GPR91 et GPR99 sont parmi les premières études sur le rôle possible et l'implication des récepteurs couplés à des protéines G dans le développement du système neurovisuel chez les mammifères. Cependant plusieurs questions demeurent et constituent des sujets pour de nouvelles études afin de mieux comprendre le rôle des trois récepteurs en particulier et des récepteurs couplés à des protéines G en général dans l'établissement des voies rétino-thalamiques.

Par exemple, d'autres recherches sont nécessaires pour élucider la pharmacologie énigmatique de GPR55 et les variations d'effets dépendantes des concentrations de plusieurs ligands comme LPI et l' $\alpha$ -KG dans le cas du GPR99. Des mutations conditionnelles au niveau des CGRs pour chacun des récepteurs permettront de mieux cerner leurs rôles dans leur croissance, leur développement et ainsi éviter les effets de compensation observés chez les souris avec des mutations généralisées. Une autre perspective de recherche à notre étude serait de déterminer l'effet de ces récepteurs ou de leurs ligands sur d'autres structures du SNC comme les les projections thalamocorticales et les aires corticales visuelles. L'application de ces résultats peut débiter par des études sur la régénération du nerf optique qui examinent la capacité des ligands de ces récepteurs à régénérer des axones en premier lieu et à les guider à leurs cibles par la suite. Aussi par la recherche si ces récepteurs et leurs ligands modulent directement la croissance et le guidage des CCs ou suite à des interactions avec d'autres molécules de guidage. Finalement, l'étude de l'effet des ligands et celle de l'absence des récepteurs GPR55, GPR91 et GPR99 sur l'activité spontanée rétinienne ou la synaptogenèse permettront de mieux élucider leurs rôles et leurs mécanismes d'action dans diverses pathologies du SNC.

## Bibliographie

- Ackman, J. B., Burbridge, T. J., & Crair, M. C. (2012). Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature*, 490, 219–225.
- Adler PN (2002) Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 2:525-535.
- Aguiar CJ, Andrade VL, Gomes ER, Alves MN, Ladeira MS, Pinheiro AC, Gomes DA, Almeida AP, Goes AM, Resende RR, Guatimosim S, Leite MF. Succinate modulates Ca<sup>2+</sup> transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium* 2012; 47:37-46.
- Agurell, S., Carlsson, S., Lindgren, J. E., Ohlsson, A., Gillespie, H. & Hollister, L. 1981 Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabinal and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinal and cannabidiol by mass fragmentography. *Experientia* 37, 1090–1092.
- Allen J a., Yost JM, Setola V, Chen X, Sassano MF, et al. (2011) Discovery of beta-Arrestin-Biased Dopamine D2 Ligands for Probing Signal Transduction Pathways Essential for Antipsychotic Efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2–7.
- Amary MF, Bacsı K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, Pollock R, O'Donnell P, Grigoriadis A, Diss T, et al. 2011. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol* 224: 306–308
- Ameh Omede, Delvac Oceandy, Mamas Mamas, Elizabeth Cartwright, Min Zi, Sukhpal Prehar, Arfa Maqsood (2014). The Alpha-ketoglutarate Receptor GPR99 Regulates Pathological Cardiac Hypertrophy. *Basic Science, Heart* 2014; 100: A100 doi:10.1136/heartjnl-2014-306118.177
- Anavi-Goffer S, Baillie G, Irving AJ, Gertsch J, Greig IR, Pertwee RG, Ross RA (2012) Modulation of L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *Journal of Biological Chemistry*: 287(1):91-104.
- Andersen, S.S.L. (2005) The search and prime hypothesis for growth cone turning. *BioEssays* 27, 86–90
- Andradas C, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, et coll. The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene*. 2011;30(2):245–252.

- Andrews GL, Tanglao S, Farmer WT, Morin S, Brotman S, Berberoglu MA, Price H, Fernandez GC, Mastick GS, Charron F, et coll. 2008. Dscam guides embryonic axons by Netrin-dependent and -independent functions. *Development* 135: 3839–3848.
- Andrews SP, Brown GA, Christopher JA. Structure-Based and Fragment-Based GPCR Drug Discovery. *Med Chem* 2014; 9: 256-75.
- Antinucci, P., Nikolaou, N., Meyer, M. P., & Hindges, R. (2013). Teneurin-3 specifies morphological and functional connectivity of retinal ganglion cells in the vertebrate visual system. *Cell Reports*, 5, 582–592.
- Apkarian, P., & Bour, L. J. (2001). See-saw nystagmus and congenital nystagmus identified in the non-decussating retinal-fugal fiber syndrome. *Strabismus*, 9, 143–163.
- Apkarian, P., Bour, L. J., Barth, P. G., Wenniger-Prick, L., & Verbeeten, B. Jr. (1995). Non-decussating retinal-fugal fibre syndrome. An inborn achiasmatic malformation associated with visuotopic misrouting, visual evoked potential ipsilateral asymmetry and nystagmus. *Brain: A Journal of Neurology*, 118(Pt. 5): 1195–1216.
- Apkarian, P., Bour, L., & Barth, P. G. (1994). A unique achiasmatic anomaly detected in non-albinos with misrouted retinal-fugal projections. *European Journal of Neuroscience*, 6, 501–507.
- Arac D, Boucard AA, Bolliger MF, Nguyen J, Soltis SM, et al. (2012) A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO J* 31: 1364-1378.
- Arai M., M.A. Leo, M. Nakano, E.R. Gordon, C.S. Lieber, Biochemical and morphological changes of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption, *Hepatology* 4 (1984) 165e174.
- Archbold JK, Flanagan JU, Watkins HA, Gingell JJ, Hay DL (2011) Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 32: 591- 600.
- Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F (2008) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Experimental Neurology* 211:494-502.
- Ariza AC, Deen PM, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol* (2012) 6(3):22.10.3389/fendo.2012.00022.

- Armstrong A, Ryu YK, Chieco D, Kuruvilla R. Frizzled3 is required for neurogenesis and target innervation during sympathetic nervous system development. *JNeurosci* (2011) ;31:2371–81.
- Atkinson-Leadbeater, K., Bertolesi, G. E., Hehr, C. L., Webber, C. A., Cechmanek, P. B., & McFarlane, S. (2010). Dynamic expression of axon guidance cues required for optic tract development is controlled by fibroblast growth factor signaling. *Journal of Neuroscience*, 30, 685–693.
- Audet, M.; Bouvier, M. Restructuring G-Protein-Coupled Receptor Activation. *Cell* 2012, 151, 14–23.
- Augsburger A, Schuchardt A, Hoskins S, Dodd J, Butler S. 1999. BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* 24: 127–141.
- Austin, C. P., Feldman, D. E., Ida, J. A. Jr., & Cepko, C. L. (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development*, 121, 3637–3650. axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell*, 113, 11–23.
- Badea, T. C., Cahill, H., Ecker, J., Hattar, S., & Nathans, J. (2009). Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron*, 61, 852–864.
- Balenga NA, Aflaki E, Kargl J, et al. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* 2011; 21(10):1452–1469.
- Bansal, A., Singer, J. H., Hwang, B. J., Xu, W., Beaudet, A., & Feller, M. B (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. *Journal of Neuroscience*, 20, 7672–7681.
- Barbieri, A. M., Broccoli, V., Bovolenta, P., Alfano, G., Marchitello, A., Mocchetti, C., Banfi, S. (2002). *Vax2* inactivation in mouse determines alteration of the eye dorsalventral axis, misrouting of the optic fibres and eye coloboma. *Development*, 129, 805–813.
- Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL (1988) Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1:791–803.

- Baudet, M. L., Zivraj, K. H., Abreu-Goodger, C., Muldal, A., Armisen, J., Blenkinsop, C., Holt, C. E. (2012). miR-124 acts through CoREST to control onset of Sema3A sensitivity in navigating retinal growth cones. *Nature Neuroscience*, 15, 29–38.
- Becker, C. G., Schweitzer, J., Feldner, J., Becker, T., & Schachner, M. (2003). Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 23, 6232–6237.
- Behesti, H., Holt, J. K., & Sowden, J. C. (2006). The level of BMP4 signaling is critical for the regulation of distinct T-box gene expression domains and growth along the dorso-ventral axis of the optic cup. *BMC Developmental Biology*, 6, 62.
- Behesti, H., Papaioannou, V. E., & Sowden, J. C. (2009). Loss of Tbx2 delays optic vesicle invagination leading to small optic cups. *Developmental Biology*, 333, 360–372.
- Benjumeda, I., Escalante, A., Law, C., Morales, D., Chauvin, G., Muca, G., . . . , Herrera, E. (2013). Uncoupling of EphA/ephrinA signaling and spontaneous activity in neural circuit wiring. *Journal of Neuroscience*, 33, 18208–18218.
- Berg, H.C. and Purcell, E.M. (1977) Physics of chemoreception. *Biophys. J.* 20, 193–219.
- Bertuzzi, S., Hindges, R., Mui, S. H., O’Leary, D. D., & Lemke, G. (1999). The homeodomain protein vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. *Genes & Development*, 13, 3092–3105.
- Bhansali, P., Rayport, I., Rebsam, A., & Mason, C. (2014). Delayed neurogenesis leads to altered specification of ventrotemporal retinal ganglion cells in albino mice. *Neural Development*, 9, 11.
- Bhattacharyya S, Fusar-Poli P, Borgwardt S, Martin-Santos R, Nosarti C, O’Carroll C, Allen P, Seal ML, Fletcher PC, Crippa JA, et coll. (2009) Modulation of mediotemporal and ventrostriatal function in humans by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol: a neural basis for the effects of Cannabis sativa on learning and psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 66:442–451.
- Bhide PG, Frost DO (1991) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J Neurosci* 11:485-504.
- Bielas, S.L. et coll. (2007) Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell* 129, 579–591



- Billah M.M., Lapetina E.G. (1982). Formation of lysophosphatidylinositol in platelets stimulated with thrombin or ionophore A23187. *J. Biol. Chem.* 257, 5196.
- Birgbauer, E., Cowan, C. A., Sretavan, D. W., & Henkemeyer, M. (2000). Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development*, 127, 1231–1241.
- Bjarnadottir TK, Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, et al. (2004) The human and mouse repertoire of the adhesion family of Gprotein- coupled receptors. *Genomics* 84: 23-33.
- Bjarnadottir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, et al. (2006) Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88: 263-273.
- Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Rentería RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS (2006) Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 26:6269–6281.
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18: 1723-1729.
- Bondarenko A., Waldeck-Weiermair M., Naghdi S., Poteser M., Malli R., Graier W.F. (2010). GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 161, 308.
- Bortolato A, Dore AS, Hollenstein K, Tehan BG, Mason JS, et al. (2014). Structure of Class B GPCRs: new horizons for drug discovery. *Br J Pharmacol* 171: 3132-3145.
- Bottenstein J, Sato G (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci* 76: 514–517
- Bouhelal, R., Smounya, L., & Bockaert, J. (1988). 5-HT<sub>1B</sub> receptors are negatively coupled with adenylate cyclase in rat substantia nigra. *European Journal of Pharmacology*, 151, 189–196.
- Bouskila J, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard J-F (2013) Rod Photoreceptors Express GPR55 in the Adult Vervet Monkey Retina. *PLoS ONE* 8(11): e81080.

- Bouskila J, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard J-F. Muller Cells Express the Cannabinoid CB2 Receptor in the Vervet Monkey Retina. *The Journal of Comparative Neurology-Research in Systems Neuroscience* 521:2399–2415 (2013).
- Bouzigues, C. et coll. (2007) Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11251–11256
- Bovolenta P1, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci.* 2008 Mar 15;121(Pt 6):737-46.
- Brankatschk M, Dickson BJ. 2006. Netrins guide *Drosophila* commissural axons at short range. *Nat Neurosci* 9: 188–194.
- Brittis, P. A., & Silver, J. (1994). Exogenous glycosaminoglycans induce complete inversion of retinal ganglion cell bodies and their axons within the retinal neuroepithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 7539–7542.
- Brittis, P. A., & Silver, J. (1995). Multiple factors govern intraretinal axon guidance: A time-lapse study. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6, 413–432.
- Brittis, P. A., Canning, D. R., & Silver, J. (1992). Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina.
- Brittis, P. A., Lemmon, V., Rutishauser, U., & Silver, J. (1995). Unique changes of ganglion cell growth cone behavior following cell adhesion molecule perturbations: A time-lapse study of the living retina. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6, 433–449.
- Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96: 795–806.
- Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007;152(5):567–75.
- Brown, A., Yates, P. A., Burrola, P., Ortuno, D., Vaidya, A., Jessell, T. M., . . . , Lemke, G. (2000). Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell*, 102, 77–88.
- Brown, N. L., Patel, S., Brzezinski, J., & Glaser, T. (2001). Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development*, 128, 2497–2508.

- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615–1625.
- Bruckner, K. et coll. (1999) EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* 22, 511– 524
- Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., . . . , Holt, C. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature*, 438, 94–98.
- Buck, K.B. and Zheng, J.Q. (2002) Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J. Neurosci.* 22, 9358–9367
- Buhusi, M., Demyanenko, G. P., Jannie, K. M., Dalal, J., Darnell, E. P., Weiner, J. A., . . . , Maness, P. F. (2009). ALCAM regulates mediolateral retinotopic mapping in the superior colliculus. *Journal of Neuroscience*, 29, 15630–15641.
- Cajal, S.R.(1890).Notas anatómicas I.Sobre la aparición de la sexpansiones celulares en la medulla embrionaria. *Gac. Sanit.Barç.* 12, 413–419.
- Campbell, D. S., Regan, A. G., Lopez, J. S., Tannahill, D., Harris, W. A., & Holt, C. E. (2001). Semaphorin 3A elicits stagedependent collapse, turning, and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *Journal of Neuroscience*, 21, 8538–8547.
- Campos, A. C., & Guimaraes, F. S. (2008). Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199, 223–230.
- Cantagrel V, Lossi AM, Boulanger S, Depetris D, Mattei MG, Gecz J, Schwartz CE, Van Maldergem L, Villard L. (2004) Disruption of a new X linked gene highly expressed in brain in a family with two mentally retarded males. *J. Med. Genet.*, 41 (10): 736-42.
- Cantarella G., Scollo M., Lempereur L., Sacconi-Jotti G., Basile F., Bernardini R. (2011). Endocannabinoids inhibit release of nerve growth factor by inflammation-activated mast cells. *Biochem. Pharmacol.* 82, 380.
- Cao J, Huang S, Qian J, Huang J, Jin L, et coll. (2009) Evolution of the class C GPCR Venus flytrap modules involved positive selected functional divergence. *BMC Evol Biol* 9: 67.
- Cardozo, M. J., Sanchez-Arrones, L., Sandonis, A., Sanchez- Camacho, C., Gestri, G., Wilson, S. W., . . . , Bovolenta, P. (2014). Cdon acts as a Hedgehog decoy receptor during proximal- distal patterning of the optic vesicle. *Nature Communications*, 5, 4272.

- Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436: 193–200.
- Carreres, M. I., Escalante, A., Murillo, B., Chauvin, G., Gaspar, P., Vegar, C., . . . , Herrera, E. (2011). Transcription factor Foxd1 is required for the specification of the temporal retina in mammals. *Journal of Neuroscience*, 31, 5673–5681.
- Carvalho, R. F., Beutler, M., Marler, K. J., Knoll, B., Becker- Barroso, E., Heintzmann, R., . . . , Drescher, U. (2006).
- Cécylre B, Zabouri N, Huppé-Gourgues F, Bouchard J-F, Casanova C. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2013;54:8079–8090.
- Chai G, Zhou L, Manto M, Helmbacher F, Clotman F, Goffinet AM, et coll. *Celsr3* is required in motor neurons to steer their axons in the hindlimb. *Nat Neurosci* (2014) ; 17:1171–9.
- Chalasanani, S. H., Sabelko, K. A., Sunshine, M. J., Littman, D. R., & Raper, J. A. (2003). A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *Journal of Neuroscience*, 23, 1360–1371.
- Chalasanani, S. H., Sabol, A., Xu, H., Gyda, M. A., Rasband, K., Granato, M., . . . , Raper, J. A. (2007). Stromal cell-derived factor-1 antagonizes slit/robo signaling in vivo. *Journal of Neuroscience*, 27, 973–980.
- Chalupa, L. M., & Snider, C. J. (1998). Topographic specificity in the retinocollicular projection of the developing ferret: An anterograde tracing study. *Journal of Comparative Neurology*, 392, 35–47.
- Chan SS-Y, Zheng H, Su M-W, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, Culotti JG. 1996. UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 87: 187–195.
- Chan, S. O., & Guillery, R. W. (1994). Changes in fiber order in the optic nerve and tract of rat embryos. *Journal of Comparative Neurology*, 344, 20–32.
- Chandrasekaran, A. R., Plas, D. T., Gonzalez, E., & Crair, M. C. (2005). Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. *Journal of Neuroscience*, 25, 6929–6938.
- Chapman B (2000) Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus. *Science* 287: 2479–2482.

- Chapman, B., & Stone, L. S. (1996). Turning a blind eye to cortical receptive fields. *Neuron*, 16, 9–12.
- Chapman, B., Stryker, M. P., & Bonhoeffer, T. (1996a). Development of orientation preference maps in ferret primary visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 16, 6443–6453.
- Chapman, D. L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S. I., Gibson-Brown, J. J., . . . , Papaioannou, V. E. (1996b). Expression of the T-box family genes, *Tbx1-Tbx5*, during early mouse development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 206, 379–390.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M. (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113: 11–23.
- Charron F, Tessier-Lavigne M. (2007). The Hedgehog, TGFbeta/ BMP and Wnt families of morphogens in axon guidance. *Adv Exp Med Biol* 621: 116–133.
- Charron, F. and Tessier-Lavigne, M. (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132, 2251–2262
- Chen Z, Gore BB, Long H, Ma L, Tessier-Lavigne M. 2008. Alternative splicing of the *Robo3* axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* 58: 325–332.
- Chenau, G., & Henkemeyer, M. (2011). Forward signaling by EphB1/EphB2 interacting with ephrin-B ligands at the optic chiasm is required to form the ipsilateral projection. *European Journal of Neuroscience*, 34, 1620–1633.
- Cherif Hosni, Anteneh Argaw, Bruno Cécycy, Jonathan Gagnon, Alex Bouchard, Sébastien Desgent, Ken Mackie and Jean-François Bouchard. GPR55 mediates axon guidance. *eNeuro Journal*: (2015)
- Chun L, Zhang WH, Liu JF (2012) Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacol Sin* 33: 312-323.
- Chung, K. Y., Taylor, J. S., Shum, D. K., & Chan, S. O. (2000). Axon routing at the optic chiasm after enzymatic removal of chondroitin sulfate in mouse embryos. *Development*, 127, 2673–2683.

- Civelli O, Reinscheid RK, Zhang Y, Wang Z, Fredriksson R, et al. (2013) G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 127-146.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7-17.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. 1995. Netrin-1 is a bifunctional axon guidance cue: Long range repulsion of trochlear motor axons. *Cell* 81: 621–629.
- Colavita A, Krishna S, Zheng H, Padgett RW, Culotti JG. 1998. Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta. *Science* 281: 706–709.
- Colello, R. J., & Guillery, R. W. (1992). Observations on the early development of the optic nerve and tract of the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 317, 357–378.
- Colello, S. J., & Guillery, R. W. (1998). The changing pattern of fibre bundles that pass through the optic chiasm of mice. *European Journal of Neuroscience*, 10, 3653–3663.
- Conway, C. D., Howe, K. M., Nettleton, N. K., Price, D. J., Mason, J. O., & Pratt, T. (2011). Heparan sulfate sugar modifications mediate the functions of slits and other factors needed for mouse forebrain commissure development. *Journal of Neuroscience*, 31, 1955–1970.
- Cook, P. M., Prusky, G., & Ramoa, A. S. (1999). The role of spontaneous retinal activity before eye opening in the maturation of form and function in the retinogeniculate pathway of the ferret. *Visual Neuroscience*, 16, 491–501.
- Coombs, J. L., Van Der List, D., & Chalupa, L. M. (2007) Morphological properties of mouse retinal ganglion cells during postnatal development. *Journal of Comparative Neurology*, 503, 803–814.
- Correa PR, Kruglov EA, Thompson M, Leite MF, Dranoff JA, Nathanson MH. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatol* 2007; 47:262-9.
- Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, and Mechoulam R (1980) Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* 21:175–18.
- Dai, J., Dalal, J. S., Thakar, S., Henkemeyer, M., Lemmon, V. P., Harunaga, J. S., . . . , Maness, P. F. (2012). EphB regulates L1 phosphorylation during retinocollicular mapping. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50, 201–210.

- Dakubo, G. D., Wang, Y. P., Mazerolle, C., Campsall, K., McMahon, A. P., & Wallace, V. A. (2003). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development*, 130, 2967–2980.
- Damato S, Alorjani M, Bonar F, McCarthy SW, Cannon SR, O'Donnell P, Tirabosco R, Amary MF, Flanagan AM 2012. IDH1 mutations are not found in cartilaginous tumours other than central and periosteal chondrosarcomas and enchondromas. *Histopathology* 60: 363–365
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, et al. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462: 739–744
- Davenport AP, Alexander SP, Sharman JL, Pawson AJ, Benson HE, Monaghan AE et coll. (2013). International union of basic and clinical pharmacology LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacol Rev* 65: 967–986.
- Davis, N., Mor, E., & Ashery-Padan, R. (2011). Roles for *Dicer1* in the patterning and differentiation of the optic cup neuroepithelium. *Development*, 138, 127–138.
- De la Torre, J. R., Hopker, V. H., Ming, G. L., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., . . . , Holt, C. E. (1997). Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron*, 19, 1211–1224.
- Dell, A. L., Fried-Cassorla, E., Xu, H., & Raper, J. A. (2013). cAMP-induced expression of neuropilin1 promotes retinal axon crossing in the zebrafish optic chiasm. *Journal of Neuroscience*, 33, 11076–11088.
- De Mendoza A, Sebe-Pedros A, Ruiz-Trillo I (2014) The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. *Genome Biol Evol* 6: 606-619.
- De Minicis S., Seki E., Uchinami H., Kluwe J., Zhang Y., Brenner D. A., and Schwabe R.F. (2007) Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and *in vivo*. *Gastroenterology* 132, 1937–1946.
- De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini, P. C., Orlando, P., et coll. (2008). Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor

- potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 1007–1015.
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 235-271.
- Deiner, M. S., & Sretavan, D. W. (1999). Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 19, 9900–9912.
- Deiner, M. S., Kennedy, T. E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., & Sretavan, D. W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: Loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron*, 19, 575–589.
- Dell’Osso, L. F., Williams, R. W., Jacobs, J. B., & Erchul, D. M. (1998). The congenital and see-saw nystagmus in the prototypical achiasma of canines: Comparison to the human achiasmatic prototype. *Vision Research*, 38, 1629–1641.
- Demas, J., Eglen, S. J., & Wong, R. O. (2003). Developmental loss of synchronous spontaneous activity in the mouse retina is independent of visual experience. *Journal of Neuroscience*, 23, 2851–2860.
- Dent, E.W. and Gertler, F.B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209–227
- Devreotes PN, Zigmond SH. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Annu Rev Cell Biol.* 1988; 4:649-86
- Devreotes, P. and Janetopoulos, C. (2003) Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J. Biol. Chem.* 278, 20445–20448
- Dhande, O. S., Bhatt, S., Anishchenko, A., Elstrott, J., Iwasato, T., Swindell, E. C., . . . , Crair, M. C. (2012). Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development. *Journal of Comparative Neurology*, 520, 1562–1583.
- Dhande, O. S., Hua, E. W., Guh, E., Yeh, J., Bhatt, S., Zhang, Y., . . . , Crair, M. C. (2011). Development of single retinofugal axon arbors in normal and beta2 knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 31, 3384–3399.
- Dharmaratne, N., Glendining, K. A., Young, T. R., Tran, H., Sawatari, A., & Leamey, C. A. (2012). Ten-m3 is required for the development of topography in the ipsilateral retinocollicular pathway. *PLoS One*, 7, e43083.



- Dickson, B.J. (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959–1964.
- Dore AS, Okrasa K, Patel JC, Serrano-Vega M, Bennett K, et al. (2014) Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* 511: 557-562.
- Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):79–94.
- Downes GB, Gautam N (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* 62: 544-552.
- Drager, U. C. (1985). Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 224, 57–77.
- Drmota, T.; Greasley, P.; Groblewski, T. AstraZeneca. (2004) Screening assays for cannabinoid-ligand type modulators of GPR55. Patent WO04074844, 2004.
- Duff G, Argaw A, Cecyre B, Cherif H, Tea N, Zabouri N, Casanova C, Ptitto M, Bouchard JF (2013) Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. *PLoS One*;8(8):e70849.
- Dupin I, Dahan M, and Studer V (2013) Investigating Axonal Guidance with IMicrodevice-Based Approaches. *The Journal of Neuroscience*, 33(45): 17647-17655.
- Durst R, Danenberg H, Gallily R, Beeri R, Mechoulam R, Meir K et al. (2007). Cannabidiol, a non-psychoactive Cannabis constituent protects against myocardial ischemic reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: 3602–3607.
- Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG Jr, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M. 1996. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17: 1157–1172.
- Ekholm A, Katsura K, Kristian T, Liu M, Folbergrova J, Siesjo BK: Coupling of cellular energy state and ion homeostasis during recovery following brain ischemia. *Brain Res* 1993, 604:185–191.
- Elbegdorj O., Westkaemper R. B. and Zhang Y (2013). A homology modeling study toward the understanding of three-dimensional structure and putative pharmacological profile of the G-protein coupled receptor GPR55. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 39 (2013) 50–60.
- Eljo Y Van Battum, Sara Brignani and R Jeroen Pasterkamp (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol* 2015; 14: 532–46

- Engel A, Gaub HE (2008) Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu Rev Biochem* 77: 127-148.
- Erkman, L., Yates, P. A., McLaughlin, T., McEvelly, R. J., Whisenhunt, T., O'Connell, S. M., . . . , Rosenfeld, M. G (2000). A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system. *Neuron*, 28, 779–792.
- Erskine L, Herrera E (2007) The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 308: 1–14.
- Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J. M., . . . , Ruhrberg, C. (2011). VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron*, 70, 951–965.
- Erskine, L., Williams, S. E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R. A., Goodman, C. S., . . . , Mason, C. A. (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: Expression and function of robo and slits. *Journal of Neuroscience*, 20, 4975–4982.
- Escalante, A., Murillo, B., Morenilla-Palao, C., Klar, A., & Herrera, E. (2013). Zic2-dependent axon midline avoidance controls the formation of major ipsilateral tracts in the CNS. *Neuron*, 80, 1392–1406.
- Esteve, P., Sandonis, A., Cardozo, M., Malapeira, J., Ibanez, C., Crespo, I., . . . , Bovolenta, P. (2011). SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 14, 562–569.
- Fabre, P. J., Shimogori, T., & Charron, F. (2010). Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *Journal of Neuroscience*, 30, 266–275.
- Falasca M, Corda D. Elevated levels and mitogenic activity of lysophosphatidylinositol in k-ras-transformed epithelial cells. *Eur J Biochem*. 1994;221(1):383–389.
- Falasca M, Iurisci C, Carvelli A, Sacchetti A, Corda D. Release of the mitogen lysophosphatidylinositol from H-Ras-transformed fibroblasts; a possible mechanism of autocrine control of cell proliferation. *Oncogene*. 1998;16(18):2357–2365.
- Favret S, Binet F, Leboeuf D, Carbadillo J, Rubic T, Picard E, Mawambo G, Tetreault N, Joyal JS, Chemtob S, Sennlaub F, Sangiovanni JP, Guimond M, Sapiha P. Deficiency in the metabolite receptor GPR91 (GPR91) leads to outer retinal lesions. *Aging (Albany, NY Online)* 2013; 5:427-44. [PMID: 23833031].

- Fedotcheva NI, Sokolov AP, Kondrashova MN: Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006, 41:56–64.
- Feldheim DA, O’Leary DDM. 2010. Visual map development: Bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001768.
- Feldheim, D. A., Kim, Y. I., Bergemann, A. D., Frisen, J., Barbacid, M., & Flanagan, J. G. (2000). Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron*, 25, 563–574.
- Feldheim, D. A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M. J., Frisen, J., Lu, Q., Barbacid, M., . . . , Flanagan, J. G. (1998). Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron*, 21, 1303–1313.
- Feldkamp, T. et coll. *Am. J. (2004) Physiol. Renal Physiol.* 286, F749–F759.
- Feller, M. B., Wellis, D. P., Stellwagen, D., Werblin, F. S., & Shatz, C. J. (1996). Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science*, 272, 1182–1187.
- Fenstermaker AG, Prasad AA, Bechara A, Adolfs Y, Tissir F, Goffinet A, et al. Wnt/planar cell polarity signaling controls the anterior-posterior organization of monoaminergic axons in the brainstem. *J Neurosci* (2010) ; 30:16053–64.
- Flanagan, J.G. & Vanderhaeghen, P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 309–345 (1998).
- Flower, D. R. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* 1422, 207–234 (1999).
- Folbergrova J, Ljunggren B, Norberg K, Siesjo BK: Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 1974, 80:265–279.
- Ford LA, Roelofs AJ, Anavi-Goffer S, et coll. A role for L-alpha-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. *Br J Pharmacol.* 2010;160(3):762–771.
- Frassetto LJ, Schlieve CR, Lieven CJ, Utter AA, Jones MV, Agarwal N, and Levin LA (2006) Kinase-Dependent Differentiation of a Retinal Ganglion Cell Precursor. *Invest Ophthalmol Vision Science*;47.

- Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schioth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett* 2003;554(3):381–8.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272.
- Fricke, C., Lee, J. S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F., & Chien, C. B. (2001). Astray, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance. *Science*, 292, 507–510.
- Frisen, J., Yates, P. A., McLaughlin, T., Friedman, G. C., O’Leary, D. D., & Barbacid, M. (1998). Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, 20, 235–243.
- Fujitani, M. et coll. (2005) Biological activity of neurotrophins is dependent on recruitment of Rac1 to lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 150–154
- Fukuda N, Naito S, Masukawa D, Kaneda M, Miyamoto H, et coll. (2015). Expression of ocular albinism 1 (OA1), 3, 4- dihydroxy- L-phenylalanine (DOPA) receptor, in both neuronal and non-neuronal organs. *Brain Res* 1602: 62-74.
- Garcia-Frigola, C., & Herrera, E. (2010). Zic2 regulates the expression of Sert to modulate eye-specific refinement at the visual targets. *EMBO Journal*, 29, 3170–3183.
- Garcia-Frigola, C., Carreres, M. I., Vegar, C., Mason, C., & Herrera, E. (2008). Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and –independent mechanisms. *Development*, 135, 1833–1841.
- Gartner F, Seidel T, Schulz U, Gummert J, Milting H. Desensitization and internalization of endothelin receptor A: impact of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2013; 288: 32138-32148.
- Gasperi V., Dainese E., Oddi S., Sabatucci A. and Maccarrone M. (2013) GPR55 and its Interaction with Membrane Lipids: Comparison with Other Endocannabinoid-Binding Receptors. *Current Medicinal Chemistry*, 2013, 20, 64-78
- Gems D, Riddle DL. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2000; 154:1597–1610.

- Gnana-Prakasam JP, Ananth S, Prasad PD, Zhang M, Atherton SS, Martin PM, Smith SB, Ganapathy V. Expression and iron-dependent regulation of succinate receptor GPR91 in retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:3751-8. [PMID: 21357408].
- Godement, P., Salaun, J., & Imbert, M. (1984). Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 230, 552–575.
- Gonzalez-Hoyuela, M., Barbas, J. A., & Rodriguez-Tebar, A. (2001). The autoregulation of retinal ganglion cell number. *Development*, 128, 117–124.
- Goodhill, G.J. et coll. (2004) Predicting axonal response to molecular gradients with a computational model of filopodial dynamics. *Neural Comput.* 16, 2221–2243
- Gordon, L., Mansh, M., Kinsman, H., & Morris, A. R. (2010). *Xenopus* sonic hedgehog guides retinal axons along the optic tract. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 239, 2921–2932.
- Gore BB, Wong KG, Tessier-Lavigne M. 2008. Stem cell factor functions as an outgrowth-promoting factor to enable axon exit from the midline intermediate target. *Neuron* 57: 501–510.
- Grabham, P.W. et coll. (2007) Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. *J. Neurosci.* 27, 5823–5834
- Greasley, P.; Åstrand, A.; Lindblom, A.; Sjöqvist, P.O.; Hjorth, S; Sjögren, S. In: A role for GPR55 in mediating blood pressure responses. *Proceedings of the 18th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society (ICRS) Aviemore, Scotland, June 25-29, 2008.*
- Gross, J. M., & Dowling, J. E. (2005). *Tbx2b* is essential for neuronal differentiation along the dorsal/ventral axis of the zebrafish retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 4371–4376.
- Grueber W.B., Sagasti A. (2010) Self-avoidance and Tiling: Mechanisms of Dendrite and Axon Spacing. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi:10.1101/cshperspect.a001750.
- Grzelczyk A., Gendaszewska-Darmach E. (2013). Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: new data -- new insight into their function. *Biochimie* 95, 667.

- Guan, K.L. and Rao, Y. (2003) Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 941–956
- Guirland, C. et coll. (2004) Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* 42, 51–62
- Gullans SR, Kone BC, Avison MJ, Giebisch G. Succinate alters respiration, membrane potential, and intracellular K<sup>+</sup> in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* (1988) 255: F1170–F1177.
- Guo, D., Standley, C., Bellve, K., Fogarty, K., & Bao, Z. Z. (2012). Protein kinase Calpha and integrin-linked kinase mediate the negative axon guidance effects of Sonic hedgehog. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50, 82–92.
- Guy AT, Nagatsuka Y, Ooashi N, Inoue M, Nakata A, Greimel P, Inoue A, Nabetani T, Murayama A, Ohta K, Ito Y, Aoki J, Hirabayashi Y and Kamiguchi H (2015) Glycerophospholipid regulation of modality specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science*. Aug 28;349(6251):974-7.
- Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S, Le T, Liaw C, Connolly DT, et coll. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol* (2009) 85:837–43. [10.1189/jlb.1008618](https://doi.org/10.1189/jlb.1008618)
- Haleli Sharir and Mary E. Abood (2010). Pharmacological Characterization of GPR55, A Putative Cannabinoid Receptor. *Pharmacol Ther.* 2010 June ; 126(3): 301–313. [doi:10.1016/j.pharmthera.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.02.004)
- Halfter, W. (1996). Intraretinal grafting reveals growth requirements and guidance cues for optic axons in the developing avian retina. *Developmental Biology*, 177, 160–177.
- Halfter, W., Reckhaus, W., & Kroger, S. (1987). Nondirected axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. *Journal of Neuroscience*, 7, 3712–3722.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998). Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8268–8273.
- Hao JC, Yu TW, Fujisawa K, Culotti JG, Gengyo-Ando K, Mitani S, Moulder G, Barstead R, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI. 2001. *C. elegans* slit acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* 32: 25–38.

- Harrelson AL, Goodman CS. 1988. Growth cone guidance in insects: fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 242: 700–708.
- Harris R, Sabatelli LM, Seeger MA. 1996. Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: Identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* 17: 217–228.
- Harrison, R.G.(1910).The outgrowth of the nerve fibers as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp.Zool.* 9, 787–846.doi:10.1002/jez.1400090405.
- Hashimoto, T., Zhang, X. M., Chen, B. Y., & Yang, X. J. (2006). VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Development*, 133, 2201–2210.
- Hattori D, Chen Y, Matthews BJ, Salwinski L, Sabatti C, Grueber WB, Zipursky SL. 2009. Robust discrimination between self and non-self neurites requires thousands of Dscam1 isoforms. *Nature* 461: 644–648.
- Haupt C. et Huber A. B. How axons see their way – axonal guidance in the visual system. (2008) *Frontiers in Bioscience* 13, 3136-3149.
- He, W., Miao, F.J.P., Lin, D.C.H., Schwandner, R.T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J.L., Tian, H., and Ling, L. (2004). Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G- protein-coupled receptors. *Nature* 429, 188–193.
- Hebert S.C., Physiology: orphan detectors of metabolism, *Nature* 429 (2004) 143e145.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. 1990. The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells in the epidermis of *C. elegans*. *Neuron* 2: 61–85.
- Hehr, C. L., Hocking, J. C., & McFarlane, S. (2005). Matrix metalloproteinases are required for retinal ganglion cell axon guidance at select decision points. *Development*, 132, 3371–3379.
- Heinke J, Juschkat M, Charlet A, Mnich L, Helbing T, Bode C, Patterson C, Moser M. Antagonism and synergy between extracellular BMP modulators Tsg and BMPER balance blood vessel formation. *J Cell Sci* 2013; 126: 3082-3094.
- Hemerly JP, Bastos AU, Cerutti JM 2010. Identification of several novel non-p.R132 IDH1 variants in thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol* 163: 747–755

- Hems, D. A., and Brosnan, J. T. (1970). Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in-vivo. *Biochem. J.* 120, 105.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D., . . . , Lewis, J. (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Current Biology*, 7, 661–670.
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling and NFAT activation. *FASEB J.* 2009;23(1):183–193.
- Henstridge CM, Balenga NA, Kargl J, Andradas C, Brown AJ, Irving A, Sanchez C and Waldhoer M (2011) Minireview: Recent Developments in the Physiology and Pathology of the Lysophosphatidylinositol-Sensitive Receptor GPR55. *Mol Endocrinol* 25:1835-1848.
- Henstridge CM, Balenga NA, Schroder R, Kargl JK, Platzer W, et al (2010) GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 160: 604–614.
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ (2009) The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling and NFAT activation. *FASEB J.* 23(1):183–193.
- Henstridge CM. Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55 (2012) *Pharmacology* 89: 179–187.
- Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R. A., Dolen, G., Mikoshiba, K., . . . , Mason, C. A. (2003). *Zic2* patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell*, 114, 545–557.
- Herrera, E., Marcus, R., Li, S., Williams, S. E., Erskine, L., Lai, E., . . . , Mason, C. (2004). *Foxd1* is required for proper formation of the optic chiasm. *Development*, 131, 5727–5739.
- Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J. & Stephens, G. J. 2012 Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol. Ther.* 133, 79–97.
- Hill, C.A., Fox, A.N., Pitts, R.J., Kent, L.B., Tan, P.L., Chrystal, M.A., Cravchik, A., Collins, F.H., Robertson, H.M., and Zwiebel, L.J. (2002). G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 176–178.



- Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., & O'Leary, D. (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron*, 35, 475–487.
- Hinds, J. W., & Hinds, P. L. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: An electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Developmental Biology*, 37, 381–416.
- Hiroshi Hama, Hiroshi Kurokawa, Hiroyuki Kawano, Ryoko Ando, Tomomi Shimogori, Hisayori Noda, Kiyoko Fukami, Asako Sakaue-Sawano & Atsushi Miyawaki. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience* 14, 1481–1488 (2011).
- Hochachka, P. W., and Dressendorfer, R. H. (1976). Succinate accumulation in man during exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 35, 235–242.
- Hoffmann, M. B., Kaule, F. R., Levin, N., Masuda, Y., Kumar, A., Gottlob, I., . . . , Dumoulin, S. O. (2012). Plasticity and stability of the visual system in human achiasma. *Neuron*, 75, 393–401.
- Hogberg, C., Gidlof, O., Tan, C., Svensson, S., Nilsson-Ohman, J., Erlinge, D., and Olde, B. (2011) .Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase-beta signaling. *J. Thromb.Haemost.* 9, 361–372.
- Hollinger S, Hepler JR (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54: 527-559.
- Holt, C. E. (1989). A single-cell analysis of early retinal ganglion cell differentiation in *Xenopus*: From soma to axon tip. *Journal of Neuroscience*, 9, 3123–3145.
- Holt, C. E., Bertsch, T. W., Ellis, H. M., & Harris, W. A. (1988) Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron*, 1, 15–26.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. 1999. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97: 927–941.
- Hong S.L., Deykin D. (1981). The activation of phosphatidylinositol-hydrolyzing phospholipase A2 during prostaglandin synthesis in transformed mouse BALB/3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 256, 5215.

- Hopker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., & Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature*, 401, 69–73.
- Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The Druggable Genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002, 1, 727–730.
- Hornberger, M. R., Dutting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., . . . , Drescher, U. (1999). Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron*, 22, 731–742.
- Hu G, G. Ren, Y. Shi (2011) The putative cannabinoid receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation. *Oncogene*, 30, pp. 139–141.
- Hu J., Li T., Du S., Chen Y., Wang S., Xiong F. and Wu Q. (2015) The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 36: 130-138.
- Hu, M., & Easter, S. S. (1999). Retinal neurogenesis: The formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Developmental Biology*, 207, 309–321.
- Hua ZL, Smallwood PM, Nathans J. Frizzled3 controls axonal development in distinct populations of cranial and spinal motor neurons. *eLife* (2013); 2:e01482.
- Huang HC, Klein PS (2004) The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* 5: 234.
- Huang, L.; Ramirez, J.C.; Frampton, G.A.; Golden, L.E.; Quinn, M.A.; Pae, H.Y.; Horvat, D.; Liang, L.J.; DeMorrow, S. Anandamide exerts its antiproliferative actions on cholangiocarcinoma by activation of the GPR55 receptor. *Lab. Invest.*, 2011, 91(7), 1007-10017.
- Huang, Y. Y., Rinner, O., Hedinger, P., Liu, S. C., & Neuhauss, S. C. (2006). Oculomotor instabilities in zebrafish mutant belladonna: A behavioral model for congenital nystagmus caused by axonal misrouting. *Journal of Neuroscience*, 26, 9873–9880.
- Hufnagel, R. B., Le, T. T., Riesenberger, A. L., & Brown, N. L. (2010). Neurog2 controls the leading edge of neurogenesis in the mammalian retina. *Developmental Biology*, 340, 490–503.
- Hui-Chen Lu , Jane E. Lauckner , John W. Huffman, and Ken Mackie (2013). GPR55 in the CNS. *endoCANNABINOIDS, Part II; Chapter 3.*

- Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, et al. (2000) Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res* 7: 111-120.
- Hutson, L. D., & Chien, C. B. (2002). Pathfinding and error correction by retinal axons: The role of *astray/robo2*. *Neuron*, 33, 205–217.
- Ichijo, H., & Kawabata, I. (2001). Roles of the telencephalic cells and their chondroitin sulfate proteoglycans in delimiting an anterior border of the retinal pathway. *Journal of Neuroscience*, 21, 9304–9314.
- Ilia, M., & Jeffery, G. (1999). Retinal mitosis is regulated by dopa, a melanin precursor that may influence the time at which cells exit the cell cycle: Analysis of patterns of cell production in pigmented and albino retinae. *Journal of Comparative Neurology*, 405, 394–405.
- Imai, T., Suzuki, M., & Sakano, H. (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science*, 314, 657–661.
- Inatani, M., Irie, F., Plump, A. S., Tessier-Lavigne, M., & Yamaguchi, Y. (2003). Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science*, 302, 1044–1046.
- Inbe H, Watanabe S, Miyawaki M et al. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine. *J Biol Chem* 2004; 279: 19790–9.
- Irie, A., Yates, E. A., Turnbull, J. E., & Holt, C. E. (2002). Specific heparan sulfate structures involved in retinal axon targeting. *Development*, 129, 61–70.
- Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM. 1992. UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. Elegans*. *Neuron* 9: 873–881.
- Ishikawa, R. and Kohama, K. (2007) Actin-binding proteins in nerve cell growth cones. *J. Pharmacol. Sci.* 105, 6–11
- Issa, N. P., Trachtenberg, J. T., Chapman, B., Zahs, K. R., & Stryker, M. P. (1999). The critical period for ocular dominance plasticity in the Ferret's visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 19, 6965–6978.
- Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Scuderi C, and Steardo L (2009) Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci Ther* 15:65–75.

- Izzo, A. A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V. & Mechoulam, R. 2009 Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 515–527.
- Jakobsdottir G., J. Xu, G. Molin, S. Ahrne, M. Nyman, High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects, *PLoS One* 8 (2013) e80476.
- Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC (2012) Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337: 59-64.
- Jarai Z, Wagner JA, Varga K, et al. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 14136-14141
- Jassem, W., and Heaton, N. D. (2004). The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int.* 66, 514–517.
- Jeffery, G., & Erskine, L. (2005). Variations in the architecture and development of the vertebrate optic chiasm. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24, 721–753.
- Jensen TP, Sylantsev S et al (2011) GPR55 modulates transmitter release and short term plasticity in the hippocampus by initiating store mediated pre-synaptic Ca<sup>2+</sup> entry. 2011 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, Washington, DC. Online, Program #448.408
- Johns, D.G.; Behm, D.J.; Walker, D.J.; Ao, Z.; Shapland, E.M.; Daniels, D.A.; Riddick, M.; Dowell, S.; Staton, P.C.; Green, P.; Shabon, U.; Bao, W.; Aiyar, N.; Yue, T.L.; Brown, A.J.; Morrison, A.D.; Douglas, S.A. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br. J. Pharmacol.*, 2007, 152(5), 825-831.
- Johnston CA, Siderovski DP (2007) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol* 72: 219-230.
- Joost, P., and Methner, A. (2002). Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0063.
- Kamaraj, B., & Purohit, R. (2014). Mutational analysis of oculocutaneous albinism: A compact review. *BioMed Research International*, 2014, 905472.

- Kamiguchi, H. (2006) The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. *J. Neurochem.* 98, 330–335
- Kanaoka Y, Maekawa A, Austen KF (2013). Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. *J Biol Chem* 288: 10967–10972
- Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME (2009) Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem.*;284(43):29817-27.
- Katsura K, Folbergrova J, Siesjo BK: Changes in labile energy metabolites, redox state and intracellular pH in postischemic brain of normo- and hyperglycemic rats. *Brain Res* 1996, 726:57–63.
- Kaule, F. R., Wolynski, B., Gottlob, I., Stadler, J., Speck, O., Kanowski, M., . . . , Hoffmann, M. B. (2014). Impact of chiasma opticum malformations on the organization of the human ventral visual cortex. *Human Brain Mapping*, 35, 5093–5105
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS-Y, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87: 175–185.
- Keleman K, Dickson BJ. 2001. Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32:605–617.
- Kempermann G, Wiskott L, and Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14: 186–191, 2004.
- Kenakin T, Christopoulos A (2012) Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 12: 205–216.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78: 425–435.
- Kennedy TE, Wang H, Marshall W, Tessier-Lavigne M. 2006. Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *J Neurosci* 26: 8866–8874.

- Keshishian, H.(2004).Ross Harrison's "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement". *J. Exp.Zool.AComp.Exp.Biol.* 301, 201–203. doi:10.1002/jez.a.20032
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS. 1999. Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785–794.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G. 1998. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92: 205–215.
- Kim, J., Wu, H. H., Lander, A. D., Lyons, K. M., Matzuk, M. M., & Calof, A. L. (2005). GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. *Science*, 308, 1927–1930.
- Kim, N., Min, K. W., Kang, K. H., Lee, E. J., Kim, H. T., Moon, K., . . . , Kim, J. W. (2014). Regulation of retinal axon growth by secreted Vax1 homeodomain protein. *ELife*, 3, e02671.
- Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19: 995–1005.
- Klagsbrun M, Eichmann A. 2005. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 535–548.
- Klein R. 2004. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 16: 580–589.
- Kleuss C, Raw AS, Lee E, Sprang SR, Gilman AG (1994) Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9828-9831.
- Koch M,Murrell JR,HunterDD, Olson PF, JinW,Keene DR,Brunken WJ, Burgeson RE. 2000. A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: Identification, expression, and functional characterization. *J Cell Biol* 151: 221–234.
- Koch, S. M., & Ullian, E. M. (2010). Neuronal pentraxins mediate silent synapse conversion in the developing visual system. *Journal of Neuroscience*, 30, 5404–5414.
- Koelle MR (2006) Heterotrimeric G protein signaling: Getting inside the cell. *Cell* 126: 25-27.

- Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2: 1-7.
- Kolod AL, Matthes D, O'Connor T, Patel NH, Admon A, Bentley D, Goodman CS. 1992. Fasciclin IV: Sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9: 831–835.
- Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN. 1996. frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87: 197–204.
- Kolpak, A., Zhang, J., & Bao, Z. Z. (2005). Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *Journal of Neuroscience*, 25, 3432–3441.
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J. K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., . . . , Ogura, T. (2000). Tbx5 and the retinotectum projection. *Science*, 287, 134–137.
- Kralj-Hans, I., Tibber, M., Jeffery, G., & Mobbs, P. (2006). Differential effect of dopamine on mitosis in early postnatal albino and pigmented rat retinae. *Journal of Neurobiology*, 66, 47–55.
- Kramer ER, Knott L, Su F, Dessaud E, Krull CE, Helmbacher F, Klein R. 2006. Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 signals for motor-axon pathway selection in the limb. *Neuron* 50: 35–47.
- Krebs HA: Rate control of the tricarboxylic acid cycle. *Adv Enzyme Regul* 1970, 8:335–353.
- Kruger, K., Tam, A. S., Lu, C., & Sretavan, D. W. (1998). Retinal ganglion cell axon progression from the optic chiasm to initiate optic tract development requires cell autonomous function of GAP-43. *Journal of Neuroscience*, 18, 5692–5705.
- Kumar A, Qiao Z, Kumar P, Song ZH (2012) Effects of palmitoylethanolamide on aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 4416–4425.
- Kun Li, Jia-yan Feng, Yong-yu Li, Birol Yucece, Xu-hong Lin, Liang-ying Yu, Yan-na Li, Ya-jing Feng, and Martin Storr. Anti-Inflammatory Role of Cannabidiol and O-1602 in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas*. 2,013 Jan; 42 (1): 123-9
- Kurihara R, Tohyama Y, Matsusaka S, et coll. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J Biol Chem*. 2006;281(18): 12908–12918.

- Kushnir, M. M., Komaromy-Hiller, G., Shushan, B., Urry, F. M., and Roberts, W. L. (2001). Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin. Chem.* 47, 1993–2002.
- Kuwajima, T., Yoshida, Y., Takegahara, N., Petros, T. J., Kumanogoh, A., Jessell, T. M., . . . , Mason, C. (2012). Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. *Neuron*, 74, 676–690.
- Lagerstrom MC, Schioth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7: 339-357.
- Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1994) Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369: 621-628.
- Langenhan T, Aust G, Hamann J (2013) Sticky signaling--adhesion class G protein-coupled receptors take the stage. *Sci Signal* 6: re3.
- Lappano R, Maggiolini M (2011) G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 10: 47-60.
- Lauckner JE, Jensen JB, ChenHY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(7):2699–704.
- Leamey, C. A., Merlin, S., Lattouf, P., Sawatari, A., Zhou, X., Demel, N., . . . , Fassler, R. (2007). Ten\_m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. *PLoS Biology*, 5, e241.
- Lee DK, Nguyen T, Lynch KR, Cheng R, Vanti WB, Arkhitko O, Lewis T, Evans JF, George SR, O' Dowd BF. (2001) Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene*, 275: 83-91.
- Lee, J. S., von der Hardt, S., Rusch, M. A., Stringer, S. E., Stickney, H. L., Talbot, W. S., . . . , Roehl, H. (2004). Axon sorting in the optic tract requires HSPG synthesis by ext2 (dackel) and extl3 (boxer). *Neuron*, 44, 947–960.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. 1997. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386: 833–838.



- Leung, L. C., Urbancic, V., Baudet, M. L., Dwivedy, A., Bayley, T. G., Lee, A. C., . . . , Holt, C. E. (2013). Coupling of NF-protocadherin signaling to axon guidance by cue-induced translation. *Nature Neuroscience*, 16, 166–173.
- Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su M-W, Hedgecock EM, Culotti JG. 1992. UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type I domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71: 289–299.
- Lewis, G. D., Farrell, L., Wood, M. J., Martinovic, M., Arany, Z., Rowe, G. C., Souza, A., Cheng, S., McCabe, E. L., Yang, E., Shi, X., Deo, R., Roth, F. P., Asnani, A., Rhee, E. P., Systrom, D. M., Semigran, M. J., Vasan, R. S., Carr, S. A., Wang, T. J., Sabatine, M. S., Clish, C. B., and Gerszten, R. E. (2010). Metabolic signatures of exercise in human plasma. *Sci. Transl. Med.* 2, 33ra37.
- Leyva-Illades D. and DeMorrow S. Orphan G protein receptor GPR55 as an emerging target in cancer therapy and management (2013). *Cancer Management and Research* 2013:5 147–155.
- Li HS, Chen JH, WuW, Fagaly T, Zhou L, YuanW, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, et al. 1999. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96: 807–818.
- Li K, Feng JY, Li YY, et coll. Anti-inflammatory role of cannabidiol and O-1602 in cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas*. 2013;42(1):123–129.
- Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, Mackie K, Li Y, Zimmer A, Göke B, Sharkey KA, Storr M (2013) A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology*. Volume 71: 255–263.
- Li T., Hu J., Du S., Chen Y., Wang S. and Wu Q. ERK1/2/COX-2/PGE2 signaling pathway mediates GPR91-dependent VEGF release in streptozotocin-induced diabetes. *Molecular Vision* 2014; 20:1109-1121.
- Li, Q., Shirabe, K., Thisse, C., Thisse, B., Okamoto, H., Masai, I., . . . , Kuwada, J. Y. (2005). Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 25, 1711–1717.

- Lilienbaum, A., Reszka, A. A., Horwitz, A. F., & Holt, C. E. (1995). Chimeric integrins expressed in retinal ganglion cells impair process outgrowth in vivo. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6, 139–152.
- Lim, Y. S., McLaughlin, T., Sung, T. C., Santiago, A., Lee, K. F., & O’Leary, D. D. (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron*, 59, 746–758.
- Lin DM, Fetter RD, Kopczyński C, Grenningloh G, Goodman CS. 1994. Genetic analysis of fasciclin II in *Drosophila*: Defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron* 13: 1055–1069.
- Lin XH, Yucec B, Li YY, et al. A novel CB receptor GPR55 and its ligands are involved in regulation of gut movement in rodents. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(9):862-e342.
- Lin, A.C. and Holt, C.E. (2007) Local translation and directional steering in axons. *EMBO J.* 26, 3729–3736
- Liu, J., Wilson, S., & Reh, T. (2003). BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina. *Developmental Biology*, 256, 34–48.
- Lopez EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, Lopez-Costa JJ. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse.* 2011;65:388–392.
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marin O, et al. 2006. Tangential neuronal migration controls axon guidance: A role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125: 127–142.
- Loudon, R.P. et coll. (2006) RhoA-kinase and myosin II are required for the maintenance of growth cone polarity and guidance by nerve growth factor. *J. Neurobiol.* 66, 847–867
- Lowery LA, Van Vactor D. 2009. The trip of the tip: Understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 332–343.
- Lu, V. B., Puhl, H. L., III, & Ikeda, S. R. (2013). N-Arachidonyl glycine does not activate G protein-coupled receptor 18 signaling via canonical pathways. *Mol Pharmacol* 83, 267–282.
- Luo Y, Raible D, Raper JA. 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75: 217–227.

- Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M, Stein E. 2008. DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. *Cell* 133: 1241–1254.
- Lynda Erskine, Susan Reijntjes, Thomas Pratt, Laura Denti, Quenten Schwarz, Joaquim M. Vieira, Bennett Alakakone, Derryck Shewan and Christiana Ruhrberg (2011). VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. *Neuron* 70, 951–965, June 9.
- Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y. 2003. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302: 1984–1988.
- Ma L, Tessier-Lavigne M. 2007. Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* 27: 6843–6851.
- Ma Q1, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4; 95 (16):9448-53.
- Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC, Gusnanto A, Steward M, Burns P, Langford CF, Ellis PD, Dudbridge F, Zwaginga JJ, Watkins NA, van der Schoot CE, Ouwehand WH (2007) Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood*, 109 (8): 3260-9.
- Macdonald, R., Scholes, J., Strahle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M., . . . , Wilson, S. W. (1997). The Pax protein *Noi* is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development*, 124, 2397–2408.
- MacNeil LT, Hardy WR, Pawson T, Wrana JL, Culotti JG. 2009. UNC-129 regulates the balance between UNC-40 dependent and independent UNC-5 signaling pathways. *Nat Neurosci* 12: 150–155.
- Maiorano, N. A., & Hindges, R. (2013). Restricted perinatal retinal degeneration induces retina reshaping and correlated structural rearrangement of the retinotopic map. *Nature Communications*, 4, 1938.

- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R et al. (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9561–9566.
- Mann F, Chauvet S, Rougon G. 2007. Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Prog Neurobiol* 82: 57–79.
- Mann, F., Ray, S., Harris, W., & Holt, C. (2002). Topographic mapping in dorsoventral axis of the *Xenopus* retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. *Neuron*, 35, 461–473.
- Manuel, M., Pratt, T., Liu, M., Jeffery, G., & Price, D. J. (2008). Overexpression of Pax6 results in microphthalmia, retinal dysplasia and defective retinal ganglion cell axon guidance. *BMC Developmental Biology*, 8, 59.
- Marc Tessier-Lavigne and Alex L. Kolodkin (2011). Mechanisms and Molecules of Neuronal Wiring: A Primer *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a001727
- Marcus, R. C., Blazeski, R., Godement, P., & Mason, C. A. (1995). Retinal axon divergence in the optic chiasm: Uncrossed axons diverge from crossed axons within a midline glial specialization. *Journal of Neuroscience*, 15, 3716–3729.
- Marcus, R. C., Gale, N. W., Morrison, M. E., Mason, C. A., & Yancopoulos, G. D. (1996). Eph family receptors and their ligands distribute in opposing gradients in the developing mouse retina. *Developmental Biology*, 180, 786–789.
- Marcus, R. C., Shimamura, K., Sretavan, D., Lai, E., Rubenstein, J. L., & Mason, C. A. (1999). Domains of regulatory gene expression and the developing optic chiasm: Correspondence with retinal axon paths and candidate signaling cells. *Journal of Comparative Neurology*, 403, 346–358.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, et coll. 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361: 1058–1066
- Marinissen, M. J. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 368–376 (2001). Focuses on the molecular mechanisms by which GPCRs signal to the nucleus through an intricate network of second-messenger generating systems and MAPK signalling pathways.

- Markovich, D., and Murer, H. (2004). The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch.* 447, 594–602.
- Marler, K. J., Becker-Barroso, E., Martinez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., . . . Drescher, U. (2008). A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 28, 12700–12712.
- Marler, K. J., Suetterlin, P., Dopplapudi, A., Rubikaite, A., Adnan, J., Maiorano, N. A., . . . , Drescher, U. (2013). BDNF promotes axon branching of retinal ganglion cells via miRNA-132 and p250GAP. *Journal of Neuroscience*, 34, 969–979.
- Martinez-Garcia, M., & Montoliu, L. (2013). Albinism in Europe. *Journal of Dermatology*, 40, 319–324. Martinez-Morales, J. R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P., & Wittbrodt, J. (2005). Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Developmental Cell*, 8, 565–574.
- Marti-Solano M, Guixa-Gonzalez R, Sanz F, Pastor M, Selent J (2013) Novel Insights into Biased Agonism at G Protein-Coupled Receptors and their Potential for Drug Design. *Curr Pharm Des* 19: 5156–5166.
- Masai, I., Stemple, D. L., Okamoto, H., & Wilson, S. W. (2000). Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron*, 27, 251–263.
- Mason, C. and Erskine, L. (2000) Growth cone form, behavior, and interactions in vivo: retinal axon pathfinding as a model. *J. Neurobiol.* 44, 260–270
- Mason, C.A. and Wang, L.C. (1997) Growth cone form is behaviorspecific and, consequently, position-specific along the retinal axon pathway. *J. Neurosci.* 17, 1086–1100
- Maurer, K. A., Riesenberger, A. N., & Brown, N. L. (2014). Notch signaling differentially regulates Atoh7 and Neurog2 in the distal mouse retina. *Development*, 141, 3243–3254.
- McCabe, K. L., Gunther, E. C., & Reh, T. A. (1999). The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: Mechanisms that control differentiation. *Development*, 126, 5713–5724.
- McFarlane, S., Cornel, E., Amaya, E., & Holt, C. E. (1996). Inhibition of FGF receptor activity in retinal ganglion cell axons causes errors in target recognition. *Neuron*, 17, 245–254.

- McFarlane, S., McNeill, L., & Holt, C. E. (1995). FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system. *Neuron*, 15, 1017–1028.
- McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee RG, Ross RA. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol*. 2008; 73: 441-450
- McHugh, D., Hu, S. S., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, J. M., et coll. (2010). N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci* 11, 44.
- McLaughlin, T., Hindges, R., & O’Leary, D. D. (2003a). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 57–69.
- McLaughlin, T., Hindges, R., Yates, P. A., & O’Leary, D. D. (2003b). Bifunctional action of ephrin-B1 as a repellent and attractant to control bidirectional branch extension in dorsalventral retinotopic mapping. *Development*, 130, 2407–2418.
- McLaughlin, T., Lim, Y. S., Santiago, A., & O’Leary, D. D. (2014). Multiple EphB receptors mediate dorsal-ventral retinotopic mapping via similar bi-functional responses to ephrin-B1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 63C, 24–30.
- McLoon, S. C., & Barnes, R. B. (1989). Early differentiation of retinal ganglion cells: An axonal protein expressed by premigratory and migrating retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 9, 1424–1432.
- Mechoulam R and Shvo Y (1963) Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19:2073–2078.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO (2007). Cannabidiol– recent advances. *Chem Biodivers* 4: 1678–1692.
- Medeiros, N.A. et coll. (2006) Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat. Cell Biol.* 8, 215–226
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15:805–819.

- Miller LJ, Dong M, Harikumar KG, Gao F (2007) Structural basis of natural ligand binding and activation of the Class II G-protein-coupled secretin receptor. *Biochem Soc Trans* 35: 709-712.
- Miller, E. D., Tran, M. N., Wong, G. K., Oakley, D. M., & Wong, R. O. (1999). Morphological differentiation of bipolar cells in the ferret retina. *Visual Neuroscience*, 16, 1133–1144.
- Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol* 2014; 24: 313-20.
- Ming, G.L. et coll. (2002) Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417, 411–418
- Mishima K, Hayakawa K, Abe K, Ikeda T, Egashira N, Iwasaki K et al. (2005). Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5 hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor-dependent mechanism. *Stroke* 36:1077–1082.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier- Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. 1996. Genetic analysis of netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17: 203–215.
- Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Poutier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, Juvin V, Rassendren F, Humez S, Prevarsakaya N (2009) Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation, *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 528–539.
- Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE. 2007. Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621: 17–31.
- Mortimer D, Fothergill T, Pujic Z, Richards L. J. and Goodhill G. J (2008). Growth cone chemotaxis *Trends Neurosci*: 31(2):90-8.
- Mueller, B.K. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 351–388 (1999).
- Mui, S. H., Hindges, R., O'Leary, D. D., Lemke, G., & Bertuzzi, S. (2002). The homeodomain protein *Vax2* patterns the dorsoventral and nasotemporal axes of the eye. *Development*, 129, 797–804.
- Muller DJ, Wu N, Palczewski K (2008) Vertebrate membrane proteins: structure, function, and insights from biophysical approaches. *Pharmacol Rev* 60: 43-78.

- Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:593-633.
- Murugan AK, Bojdani E, Xing M 2010. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 555–559
- Nakamoto, C., Kuan, S. L., Findlay, A. S., Durward, E., Ouyang, Z., Zakrzewska, E. D., . . . , Nakamoto, M. (2014). *Nel* positively regulates the genesis of retinal ganglion cells by promoting their differentiation and survival during development. *Molecular Biology of the Cell*, 25, 234–244.
- Nakamura, H., & O’Leary, D. D. (1989). Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axon remodeling to develop topographic order. *Journal of Neuroscience*, 9, 3776–3795.
- Nei M, Niimura Y, Nozawa M (2008) The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat Rev Genet* 9: 951 963.
- Nern A, Zhu Y, Zipursky SL. 2008. Local N-cadherin interactions mediate distinct steps in the targeting of lamina neurons. *Neuron* 58: 34–41.
- Neumann S, Doubell TP et al (1996) Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384(6607):360–364
- Neumann, C. J., & Nusslein-Volhard, C. (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science*, 289, 2137–2139.
- Niclou, S. P., Jia, L., & Raper, J. A. (2000). Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *Journal of Neuroscience*, 20, 4962–4974.
- Nicol, X., Voyatzis, S., Muzerelle, A., Narboux-Neme, N., Sudhof, T. C., Miles, R., . . . , Gaspar, P. (2007). cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nature Neuroscience*, 10, 340–347.
- Nielsen, A. H., Schauser, K. H. & Poulsen, K. *Placenta* 21, 468–477 (2000).
- Nina K. Thiede-Stan and Martin E. Schwab. Attractive and repulsive factors act through multi-subunit receptor complexes to regulate nerve fiber growth. *Journal of Cell Science* (2015) 128, 2403-2414 doi:10.1242/jcs.165555



- Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP  $\gamma$ S. *Nature* 366: 654-663.
- Nordstrom KJ, Lagerstrom MC, Waller LM, Fredriksson R, Schiöth HB (2009) The Secretin GPCRs descended from the family of Adhesion GPCRs. *Mol Biol Evol* 26: 71-84.
- Nordstrom KJ, Sallman Almen M, Edstam MM, Fredriksson R, Schiöth HB (2011) Independent HHsearch, Needleman--Wunsch-based, and motif analyses reveal the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families. *Mol Biol Evol* 28: 2471-2480.
- O'Connor R, Tessier-Lavigne M. 1999. Identification of maxillary factor, a maxillary process-derived chemoattractant for developing trigeminal sensory axons. *Neuron* 24: 165–178.
- O'Leary, D. D., Crespo, D., Fawcett, J. W., & Cowan, W. M. (1986). The effect of intraocular tetrodotoxin on the postnatal reduction in the numbers of optic nerve axons in the rat. *Brain Research*, 395, 96–103.
- Obara, Y.; Ueno, S.; Yanagihata, Y.; Nakahata, N. Lysophosphatidylinositol causes neurite retraction via GPR55, G13 and RhoA in PC12 cells. *PLoS One*, 2011, 6(8):e24284.
- Oermann EK, Wu J, Guan KL, Xiong Y 2012. Alterations of metabolic genes and metabolites in cancer. *Semin Cell Dev Biol*.
- Ogata-Iwao, M., Inatani, M., Iwao, K., Takihara, Y., Nakaishi- Fukuchi, Y., Irie, F., . . . , Tanihara, H. (2011). Heparan sulfate regulates intraretinal axon pathfinding by retinal ganglion cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 6671–6679.
- Oh DY, Kim K, Kwon HB, Seong JY. Cellular and molecular biology of orphan G protein-coupled receptors. *Int Rev Cytol* 2006;252:163–218.
- Ohta, K., Tannahill, D., Yoshida, K., Johnson, A. R., Cook, G. M., & Keynes, R. J. (1999). Embryonic lens repels retinal ganglion cell axons. *Developmental Biology*, 211, 124–132.
- Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem*. 2010;147(5):671–678.

- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(4):928–934.
- Oka S, Ota R, Shima M, Yamashita A, Sugiura T (2010) GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 395:232-237.
- Oka S, Toshida, T.; Maruyama, K.; Nakajima, K.; Yamashita, A.; Sugiura, T. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J. Biochem.*, 2009, 145(1), 13-20.
- Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korsching SI (2009) The fifth class of Gα proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1484-1489.
- Oka Y, Korsching SI (2009) The fifth element in animal Gα protein evolution. *Commun Integr Biol* 2: 227-229.
- Okada A, Charron F, Morin S, Shin DS, Wong K, Fabre PJ, Tessier-Lavigne M, McConnell SK. 2006. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444: 369–373.
- Oldham WM, Hamm HE (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* 39: 117-166.
- Oldham WM, Hamm HE (2007) How do receptors activate G proteins? *Adv Protein Chem* 74: 67-93.
- Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G protein coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 60-71.
- Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, et al (2001) Quantitative Comparison of Anti-Fading Mounting Media for Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Histochem Cytochem* 49: 305–312.
- Oster, S. F., Bodeker, M. O., He, F., & Sretavan, D. W. (2003). Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development*, 130, 775–784.
- Osterhout, J. A., Josten, N., Yamada, J., Pan, F., Wu, S. W., Nguyen, P. L., . . . , Huberman, A. D. (2011). Cadherin-6 mediates axon-target matching in a non-image-forming visual circuit. *Neuron*, 71, 632–639

- O'Sullivan, S. E., Sun, Y., Bennett, A. J., Randall, M. D., & Kendall, D. A. (2009). Time dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 612, 61–68
- Oswald, S., Grube, M., Siegmund, W., and Kroemer, H. K. (2007). Transporter-mediated uptake into cellular compartments. *Xenobiotica* 37, 1171–1195.
- Ott, H., Bastmeyer, M., & Stuermer, C. A. (1998). Neurolin, the goldfish homolog of DM-GRASP, is involved in retinal axon pathfinding to the optic disk. *Journal of Neuroscience*, 18, 3363–3372.
- Otteson, D. C., Shelden, E., Jones, J. M., Kameoka, J., & Hitchcock, P. F. (1998). Pax2 expression and retinal morphogenesis in the normal and *Krd* mouse. *Developmental Biology*, 193, 209–224.
- Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How Many Drug Targets Are There? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5, 993–996.
- Pacal, M., & Bremner, R. (2014). Induction of the ganglion cell differentiation program in human retinal progenitors before cell cycle exit. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 243, 712–729.
- Pajor, A. M. (2006). Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch.* 451, 597–605.
- Pak, W., Hindges, R., Lim, Y. S., Pfaff, S. L., & O'Leary, D. D. (2004). Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell*, 119, 567–578.
- Palmer TD, Willhoite AR, and Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425: 479–494, 2000.
- Palmisano I, Bagnato P, Palmigiano A, Innamorati G, Rotondo G, et al. (2008) The ocular albinism type 1 protein, an intracellular G protein-coupled receptor, regulates melanosome transport in pigment cells. *Hum Mol Genet* 17: 3487-3501.
- Pan, L., Deng, M., Xie, X., & Gan, L. (2008). ISL1 and BRN3B coregulate the differentiation of murine retinal ganglion cells. *Development*, 135, 1981–1990.
- Pan, L., Yang, Z., Feng, L., & Gan, L. (2005). Functional equivalence of Brn3 POU-domain transcription factors in mouse retinal neurogenesis. *Development*, 132, 703–712.
- Parent, C.A. et coll. (1998) G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* 95, 81–91

- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, et coll. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807–1812
- Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 2013; 38: 633-643
- Penn, A. A., Riquelme, P. A., Feller, M. B., & Shatz, C. J. (1998). Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science*, 279, 2108–2112.
- Pérez-Gómez E, Andradas C, Flores JM, et al. The orphan receptor GPR55 drives skin carcinogenesis and is upregulated in human squamous cell carcinomas. *Oncogene*. 2013;32(20):2534–2542.
- Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol*. 2007; 152: 984-986
- Peti-Peterdi, J., Kang, J.J., and Toma, I. (2008). Activation of the renal renin- angiotensin system in diabetes–new concepts. *Nephrol.Dial.Transplant*. 23, 3047–3049.
- Petitot F, Donlan M, Michel A. GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des*. 2006;67(3):252–253.
- Petros, T. J., Shrestha, B. R., & Mason, C. (2009). Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *Journal of Neuroscience*, 29, 3463–3474.
- Phng LK, Gerhardt H. 2009. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 16: 196–208.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seventransmembrane receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 3, 639–650 (2002).
- Pietr M, Kozela E, Levy R, Rimmerman N, Lin YH, Stella N, Vogel Z and Juknat A (2009) Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett* 583:2071-2076.
- Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2011;30(2):142–152.
- Pinter, R., & Hindges, R. (2010). Perturbations of microRNA function in mouse dicer mutants produce retinal defects and lead to aberrant axon pathfinding at the optic chiasm. *PLoS One*, 5, e10021.

- Piper, M. et coll. (2005) Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nat. Neurosci.* 8, 179–186
- Piper, M., Anderson, R., Dwivedy, A., Weinl, C., van Horck, F., Leung, K. M., . . . , Holt, C. (2006). Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron*, 49, 215–228.
- Piper, M., Dwivedy, A., Leung, L., Bradley, R. S., & Holt, C. E. (2008). NF-protocadherin and TAF1 regulate retinal axon initiation and elongation in vivo. *Journal of Neuroscience*, 28, 100–105.
- Plachez, C. and Richards, L. (2005) Mechanisms of axon guidance in the developing nervous system. *Curr. Top. Dev. Biol.* 69, 267–346
- Plachez, C., Andrews, W., Liapi, A., Knoell, B., Drescher, U., Mankoo, B., . . . , Sundaresan, V. (2008). Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37, 719–730.
- Plump, A. S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C. J., Goodman, C. S., . . . , Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron*, 33, 219–232.
- Pomerat, C.M.(1951).Pulsatile activity of cells from the human brain in tissue culture. *J. Nerv.Ment.Dis.* 114, 430–449.doi:10.1097/00005053-195107000- 00030
- Poulain, F. E., & Chien, C. B. (2013). Proteoglycan-mediated axon degeneration corrects pretarget topographic sorting errors. *Neuron*, 78, 49–56.
- Poyner DR, Hay DL (2012) Secretin family (Class B) G protein-coupled receptors - from molecular to clinical perspectives. *Br J Pharmacol* 166: 1-3.
- Prakash, S., Dumoulin, S. O., Fischbein, N., Wandell, B. A., & Liao, Y. J. (2010). Congenital achiasma and see-saw nystagmus in VACTERL syndrome. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 30, 45–48.
- Prasov, L., & Glaser, T. (2012). Dynamic expression of ganglion cell markers in retinal progenitors during the terminal cell cycle. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50, 160–168.
- Pratt, T., Conway, C. D., Tian, N. M., Price, D. J., & Mason, J. O. (2006). Heparan sulphation patterns generated by specific heparan sulfotransferase enzymes direct distinct aspects of retinal axon guidance at the optic chiasm. *Journal of Neuroscience*, 26, 6911–6923.

- Pratt, T., Tian, N. M., Simpson, T. I., Mason, J. O., & Price, D. J. (2004). The winged helix transcription factor Foxg1 facilitates retinal ganglion cell axon crossing of the ventral midline in the mouse. *Development*, 131, 3773–3784.
- Promel S, Langenhan T, Arac D (2013) Matching structure with function: the GAIN domain of adhesion-GPCR and PKD1-like proteins. *Trends Pharmacol Sci* 34: 470-478.
- Qi AD1, Harden TK, Nicholas RA. GPR80/99, proposed to be the P2Y(15) receptor activated by adenosine and AMP, is not a P2Y receptor. *Purinergic Signal*. 2004 Dec;1(1):67-74.
- Qin, N., Neepers, M. P., Liu, Y., Hutchinson, T. L., Lubin, M. L., & Flores, C.M. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 28, 6231–6238.
- Rachel, R. A., Dolen, G., Hayes, N. L., Lu, A., Erskine, L., Nowakowski, R. S., . . . , Mason, C. A. (2002). Spatiotemporal features of early neurogenesis differ in wild-type and albino mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 22, 4249–4263.
- Rakhshan F, Day TA, Blakely RD, Barker EL (2000). Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 960–967.
- Rajasekharan, Sathyanath; Kennedy, Timothy E (2009). "The netrin protein family". *Genome Biology* 10 (9): 239
- Rakic, P. (1976). Prenatal genesis of connections subserving ocular dominance in the rhesus monkey. *Nature*, 261, 467–471.
- Randall M. Chin, Xudong Fu, Melody Y. Pai, Laurent Vergnes, Heejun Hwang<sup>2</sup>, Gang Deng, Simon Diep, Brett Lomenick, Vijaykumar S. Meli, Gabriela C. Monsalve, Eileen Hu, Stephen A. Whelan, Jennifer X. Wang, Gwanghyun Jung, Gregory M. Solis, Farbod Fazlollahi, Chitrada Kaweeteerawat, Austin Quach, Mahta Nili, Abby S. Krall, Hilary A. Godwin, Helena R. Chang, Kym F. Faull, Feng Guo, Meisheng Jiang, Sunia A. Trauger, Alan Saghatelian, Daniel Braas, Heather R. Christofk, Catherine F. Clarke, Michael A. Teitell, Michael Petrascheck, Karen Reue, Michael E. Jung, Alison R. Frand, and Jing Huang (2014). The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting the ATP synthase and TOR. *Nature*; June 19; 510(7505): 397–401. doi:10.1038/nature13264.

- Raper, J.A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 88–94 (2000).
- Rashid, T., Upton, A. L., Blentic, A., Ciossek, T., Knoll, B., Thompson, I. D., . . . , Drescher, U. (2005). Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, 47, 57–69.
- Rask-Andersen M, Almen MS, Schioth HB (2011) Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10: 579-590.
- Rask-Andersen M, Masuram S, Schioth HB (2014) The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54: 9-26.
- Reber, M., Burrola, P., & Lemke, G. (2004). A relative signalling model for the formation of a topographic neural map. *Nature*, 431, 847–853.
- Rebsam, A., Bhansali, P., & Mason, C. A. (2012). Eye-specific projections of retinogeniculate axons are altered in albino mice. *Journal of Neuroscience*, 32, 4821–4826.
- Rebsam, A., Petros, T. J., & Mason, C. A. (2009). Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. *Journal of Neuroscience*, 29, 14855–14863.
- Regard, J.B., Sato, I.T., and Coughlin, S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression (2008). *Cell* 135, 561–571.
- Resstel, L. B., Tavares, R. F., Lisboa, S. F., Joca, S. R., Correa, F. M., & Guimaraes, F. S. (2009). 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156, 181–188.
- Rhee, J., Mahfooz, N. S., Arregui, C., Lilien, J., Balsamo, J., & VanBerkum, M. F. (2002). Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nature Cell Biology*, 4, 798–805.
- Rice, D. S., Tang, Q., Williams, R. W., Harris, B. S., Davisson, M. T., & Goldowitz, D. (1997). Decreased retinal ganglion cell number and misdirected axon growth associated with fissure defects in *Bst/p* mutant mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 2112–2124.

- Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G. B., Cornel, E., Lilienbaum, A., . . . , Holt, C. E. (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron*, 17, 837–848.
- Ringstedt, T., Braisted, J. E., Brose, K., Kidd, T., Goodman, C., Tessier-Lavigne, M., . . . , O’Leary, D. D. (2000). Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. *Journal of Neuroscience*, 20, 4983–4991.
- Rivera JC., Sapielha P., Joyal J.S., Duhamel F., Shao Z., Sitaras N., Picard E., Zhou E., Lachapelle P. and Sylvain Chemtob. Understanding Retinopathy of Prematurity: Update on Pathogenesis. *Neonatology* 2011; 100:343–353.
- Robben JH, Fenton RA, Vargas SL, Schweer H, Peti-Peterdi J, Deen PM, Milligan G. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int* 2009; 76:1258-67.
- Robertson JD (1959) The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem Soc Symp* 16: 3-43.
- Robinson SR, Dreher B (1990). The visual pathways of eutherian mammals and marsupials develop according to a common timetable. *Brain Behav Evol* 36: 177–195.
- Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J. M., Fermin, Y., Trousse, F., . . . , Bovolenta, P. (2005). SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nature Neuroscience*, 8, 1301–1309.
- Rohrwasser A., Morgan T., Dillon H. F., Zhao L., Callaway C.W., Hillas E., Zhang S., Cheng T., Inagami T., Ward K., Terreros D.A., and Lalouel, J. M (1999). Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 34, 1265–1274.
- Rojo ML, Gaztelumendi AR, Fowler CJ (2012) Lysophosphatidylinositol Stimulates [35S]GTP $\gamma$ S Binding in the Rat Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Neurochemical Research*. Volume 37, Issue 5, pp 1037-1042.
- Romero-Zerbo SY, Rafacho A, Díaz-Arteaga A, et al. A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *J Endocrinol*. 2011;211(2):177–185.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009) The structure and function of G protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363.



- Ross RA. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(3):156–163.
- Rossi, F. M., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Marubio, L. M., Maffei, L., & Changeux, J. P. (2001). Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6453–6458.
- Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA and Weyrich AS (2011) Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118:e101-e111.
- Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol* (2008) 9:1261–9.10.1038/ni.1657
- Ruchhoeft, M. L., Ohnuma, S., McNeill, L., Holt, C. E., & Harris, W. A. (1999). The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *Journal of Neuroscience*, 19, 8454–8463.
- Ruscheweyh R, Forsthuber L et al (2007) Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with A-beta-, A-delta-, and C- fibers after chronic constriction injury in mice. *J Comp Neurol* 502(2):325–336
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007;152(7):1092–101.
- Sabatier C, Plump AS, Le M, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EY, Tessier-Lavigne M. 2004. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117: 157–169.
- Sadagopan N., Li W., Roberds S. L., Major T., Preston G. M., Yu Y., and Tones M.A. (2007). Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am.J.Hypertens.* 20, 1209–1215.
- Sagredo O, Ramos JA, Decio A, Mechoulam R, and Ferná'ndez-Ruiz J (2007) Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. *Eur J Neurosci* 26:843–851.

- Sakai, J. A., & Halloran, M. C. (2006). Semaphorin 3d guides laterality of retinal ganglion cell projections in zebrafish. *Development*, 133, 1035–1044.
- Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Kitagawa, K., Kokubo, S., Kobayashi, M., Hara, A., Yamahana, J., Okumura, T., Takasawa, K., Takeda, S.I., Yoshimura, M., Kida, H., and Yokoyama, H. (2005). Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy. *Am.J.Kidney Dis.* 45, 54–65.
- Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A. L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., . . . , Seif, I. (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 21, 884–896.
- Salinas PC, Zou Y. 2008. Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci* 31: 339–358.
- Sanchez-Arrones, L., Nieto-Lopez, F., Sanchez-Camacho, C., Carreres, M. I., Herrera, E., Okada, A., . . . , Bovolenta, P. (2013). Shh/Boc signaling is required for sustained generation of ipsilateral projecting ganglion cells in the mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 33, 8596–8607.
- Sanchez-Camacho, C., & Bovolenta, P. (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development*, 135, 3531–3541.
- Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, Honoré JC, Kermorvant-Duchemin E, Varma DR, Tremblay S, Leduc M, Rihakova L, Hardy P, Klein WH, Mu X, Mamer O, Lachapelle P, Di Polo A, Beauséjour C, Andelfinger G, Mitchell G, Sennlaub F, Chemtob S. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med* 2008; 14:1067-76.
- Sasselli V, Boesmans W, Vanden Berghe P, Tissir F, Goffinet AM, Pachnis V. Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *J Clin Invest* (2013); 123:1763–72.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, et al. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;64(2):193–8.

- Schicho R, Bashashati M, Bawa M, et al. The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(8):1651–1664.
- Schicho R., Bashashati M., Bawa M., McHugh D., Saur D., Hu H.M., Zimmer A., Lutz B., Mackie K., Bradshaw H.B., McCafferty D.M., Sharkey K.A., Storr M (2010) The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm. Bowel Dis*;17:1651–1664.
- Schioth HB, Nordstrom KJ, Fredriksson R (2010) The adhesion GPCRs; gene repertoire, phylogeny and evolution. *Adv Exp Med Biol* 706: 1-13.
- Schmidt, T. M., Do, M. T., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., & Matynia, A. (2011). Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: From form to function. *Journal of Neuroscience*, 31, 16094–16101.
- Schmitt, A. M., Shi, J., Wolf, A. M., Lu, C. C., King, L. A., & Zou, Y. (2006). Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature*, 439, 31–37.
- Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL. 2000. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101: 671–684.
- Scholes, J. H. (1979). Nerve fibre topography in the retinal projection to the tectum. *Nature*, 278, 620–624.
- Seth, A., Culverwell, J., Walkowicz, M., Toro, S., Rick, J. M., Neuhauss, S. C., . . . , Karlstrom, R. O. (2006). Belladonna/ (Ihx2) is required for neural patterning and midline axon guidance in the zebrafish forebrain. *Development*, 133, 725–735.
- Schuelert N, McDougall JJ (2011) The abnormal cannabidiol analogue O-1602 reduces nociception in a rat model of acute arthritis via the putative cannabinoid receptor GPR55. *Neurosci Lett* 500(1):72–76
- Schulte G (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev* 62: 632-667.
- Schulte G, Bryja V (2007) The Frizzled family of unconventional G-proteincoupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 518-525. *Science*, 255, 733–736.

- Schulte G, Fredholm BB. Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* 2000; 58:477-82.
- Schweda F., Friis U., Wagner C., Skott O., and Kurtz A. (2007) Renin release. *Physiology* 22, 310–319.
- Scuderi C, Filippis DD, Iuvone T, Blasio A, Steardo A, and Esposito G (2009) Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytother Res* 23:597–602.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes W, Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87: 1001–1014.
- Serafini T, Kennedy T, Galko M, Mirzayan C, Jessell T, Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins with homology to *C. Elegans* UNC-6. *Cell* 78: 409–424.
- Shanmugalingam, S., Houart, C., Picker, A., Reifers, F., Macdonald, R., Barth, A., . . . , Wilson, S. W. (2000). *Ace/Fgf8* is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development*, 127, 2549–2561.
- Shatz, C. J., & Sretavan, D. W. (1986). Interactions between retinal ganglion cells during the development of the mammalian visual system. *Annual Review of Neuroscience*, 9, 171–207.
- Shen B, Samaraweera P, Rosenberg B, Orlow SJ (2001) Ocular albinism type 1: more than meets the eye. *Pigment Cell Res* 14: 243-248.
- Shen K, Cowan CW. 2010. Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001842.
- Sheth H, Gorey C, Roush N, Smallman S, Collantes E, Santoro M, Olson B, Fitzgerald L, Lee PH, Shen XJ. A Multiplexed Fluorescent Calcium and NFAT Reporter Gene Assay to Identify GPCR Agonists. *Curr Chem Genomics Transl Med* 2013; 7: 1-8.
- Shewan, D., Dwivedy, A., Anderson, R., & Holt, C. E. (2002). Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nature Neuroscience*, 5, 955–962.

- Shi, M., Kumar, S. R., Motajo, O., Kretschmer, F., Mu, X., & Badea, T. C. (2013). Genetic interactions between Brn3 transcription factors in retinal ganglion cell type specification. *PLoS One*, 8, e76347.
- Shibata, T. and Fujimoto, K. (2005) Noisy signal amplification in ultrasensitive signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 331–336
- Shirasaki R, Lewcock JW, Lettieri K, Pfaff SL. 2006. FGF as a target-derived chemoattractant for developing motor axons genetically programmed by the LIM code. *Neuron* 50: 841–853. Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nature Neuroscience*, 9, 322–330.
- Silver, J. (1984). Studies on the factors that govern directionality of axonal growth in the embryonic optic nerve and at the chiasm of mice. *Journal of Comparative Neurology*, 223, 238–251.
- Simon, D. K., & O’Leary, D. D. (1992). Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *Journal of Neuroscience*, 12, 1212–1232.
- Siu FK, Lam IP, Chu JY, Chow BK (2006) Signaling mechanisms of secretin receptor. *Regul Pept* 137: 95-104.
- Smith D.M., Waite M. (1992). Phosphatidylinositol hydrolysis by phospholipase A2 and C activities in human peripheral blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 52, 670.
- Snow, R. L., & Robson, J. A. (1994). Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience*, 58, 399–409.
- Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, Matsumoto S, Kamohara M, Hiyama H, Yoshida S, Momose K, Ueda Y, Matsushime H, Kobori M, Furuichi K (2005) Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326 pp. 744–751.
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* 379: 369-374.
- Song, H. and Poo, M-M. (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nat. Cell Biol.* 3, E81–E88

- Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., . . . , Poo, M. (1998). Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, 281, 1515–1518.
- Southern C, Cook JM, Neetoo-Isseljee Z, Taylor DL, Kettleborough CA, Merritt A et al. (2013). Screening beta-arrestin recruitment for the identification of natural ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* 18: 599–609.
- Sowden, J. C., Holt, J. K., Meins, M., Smith, H. K., & Bhattacharya, S. S. (2001). Expression of *Drosophila* ombrelated T-box genes in the developing human and mouse neural retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 3095–3102.
- Spitzweck B, Brankatschk M, Dickson BJ. 2010. Distinct protein domains and expression patterns confer divergent axon guidance functions for *Drosophila* Robo receptors. *Cell* 140: 409–420.
- Sprang SR (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66: 639-678.
- Sretavan, D. W., & Kruger, K. (1998). Randomized retinal ganglion cell axon routing at the optic chiasm of GAP-43-deficient mice: Association with midline recrossing and lack of normal ipsilateral axon turning. *Journal of Neuroscience*, 18, 10502–10513.
- Sretavan, D. W., Feng, L., Pure, E., & Reichardt, L. F. (1994). Embryonic neurons of the developing optic chiasm express L1 and CD44, cell surface molecules with opposing effects on retinal axon growth. *Neuron*, 12, 957–975.
- Sretavan, D. W., Pure, E., Siegel, M. W., & Reichardt, L. F. (1995). Disruption of retinal axon ingrowth by ablation of embryonic mouse optic chiasm neurons. *Science*, 269, 98–101.
- St Peter Shawn D, Charles J Imber, Peter J Friend. Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet* 2002; 359: 604–13.
- Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 2008;139(1):225–236.
- Steckelings, U. M., Rompe, F., Kaschina, E., and Unger, T. (2009). The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CVdisease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam.Clin. Pharmacol.* 23, 693–703.

- Stellwagen, D., & Shatz, C. J. (2002). An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity. *Neuron*, 33, 357–367.
- Stettler, O., Joshi, R. L., Wizenmann, A., Reingruber, J., Holcman, D., Bouillot, C., . . . , Moya, K. L. (2012). Engrailed homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones. *Development*, 139, 215–224.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mihalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164–1178.
- Stevens, A., & Jacobs, J. R. (2002). Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals. *Journal of Neuroscience*, 22, 4448–4455.
- Stier, H., & Schlosshauer, B. (1995). Axonal guidance in the chicken retina. *Development*, 121, 1443–1454.
- Stone, K. E., & Sakaguchi, D. S. (1996). Perturbation of the developing *Xenopus* retinotectal projection following injections of antibodies against beta1 integrin receptors and N-cadherin. *Developmental Biology*, 180, 297–310.
- Storkebaum E and Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* 113: 14–18, 2004.
- Strittmatter, S. M., Fankhauser, C., Huang, P. L., Mashimo, H., & Fishman, M. C. (1995). Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell*, 80, 445–452.
- Strochlic, L., Dwivedy, A., van Horck, F. P., Falk, J., & Holt, C. E. (2008). A role for S1P signalling in axon guidance in the *Xenopus* visual system. *Development*, 135, 333–342.
- Su, J., Haner, C. V., Imbery, T. E., Brooks, J. M., Morhardt, D. R., Gorse, K., . . . , Fox, M. A. (2011). Reelin is required for class-specific retinogeniculate targeting. *Journal of Neuroscience*, 31, 575–586.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, and Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111: 1843–1851, 2003.

- Suzaki Y., Prieto Carrasquero M.C., and Kobori H.(2006) Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Curr.Hypertens.Rev.* 2, 151–157.
- Sweeney, N. T., Tierney, H., & Feldheim, D. A. (2014). Tbr2 is required to generate a neural circuit mediating the pupillary light reflex. *Journal of Neuroscience*, 34, 5447–5453.
- Syed, M. M., Lee, S., Zheng, J., & Zhou, Z. J. (2004). Stagedependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. *Journal of Physiology*, 560, 533–549.
- Sylantsev S, Jensen TP et al (2011) The enigmatic receptor GPR55 potentiates neurotransmitter release at central synapses. 2011 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, Washington, DC. Online, Program #653.601
- Sylantsev S, Jensen TP, Ross RA and Rusakov DA (2013) Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 110(13): 5193–5198.
- Takeda, S.; Kadowaki, S.; Haga, T.; Takaesu, H.; Mitaku, S. Identification of G Protein-Coupled Receptor Genes from the Human Genome Sequence. *FEBS Lett.* 2002, 520, 97–101.
- Tamagnone L, Comoglio PM. 2000. Signalling by semaphorin receptors: Cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* 10: 377–383. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123–1133.
- Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, Zheng L, Gardet A, Tong Z, Jany SS, Corr SC, Haneklaus M, Caffrey BE, Pierce K, Walmsley S, Beasley FC, Cummins E, Nizet V, Whyte M, Taylor CT, Lin H, Masters SL, Gottlieb E, Kelly VP, Clish C, Auron PE, Xavier RJ, O’Neill LA. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 2013; 496: 238-242.
- Taylor, C.T (2008).Mitochondriaand cellularoxygen sensing intheHIF pathway. *Biochem.J.* 409, 19–26.
- Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AGS, Dodd J, Jessell TM. 1988. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336: 775–778.



- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123–1133
- Thakar, S., Chenuaux, G., & Henkemeyer, M. (2011). Critical roles for EphB and ephrin-B bidirectional signalling in retinocollicular mapping. *Nature Communications*, 2, 431.
- Thompson, H., Andrews, W., Parnavelas, J. G., & Erskine, L. (2009). Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Developmental Biology*, 335, 418–426.
- Thompson, H., Barker, D., Camand, O., & Erskine, L. (2006b). Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract. *Developmental Biology*, 296, 476–484.
- Thompson, H., Camand, O., Barker, D., & Erskine, L. (2006a). Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina. *Journal of Neuroscience*, 26, 8082–8091.
- Tian, N. M., Pratt, T., & Price, D. J. (2008). Foxg1 regulates retinal axon pathfinding by repressing an ipsilateral program in nasal retina and by causing optic chiasm cells to exert a net axonal growth-promoting activity. *Development*, 135, 4081–4089.
- Tissir F, Goffinet AM. Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nat Rev Neurosci* (2013) ;14:525–35.
- Tojima, T. et al. (2007) Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat. Neurosci.* 10, 58–66.
- Toma I, Kang JJ, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, Meer E, Peti-Peterdi J. (2008) Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J. Clin. Invest.*, 118 (7): 2526-34.
- Torborg CL, Feller MB (2004) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *J Neurosci Methods* 135:17–26.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E., & Gruss, P. (1996). Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*, 122, 3381–3391.
- Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. 2007. Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 263–292.
- Trousse, F., Marti, E., Gruss, P., Torres, M., & Bovolenta, P. (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: A new role for Sonic hedgehog. *Development*, 128, 3927–3936.

- Tucker, R. P., & Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Teneurins: A conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Developmental Biology*, 290, 237–245.
- Tucker, R. P., Beckmann, J., Leachman, N. T., Scholer, J., & Chiquet-Ehrismann, R. (2011). Phylogenetic analysis of the teneurins: Conserved features and premetazoan ancestry. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1019–1029.
- Turner, D. L., Snyder, E. Y., & Cepko, C. L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron*, 4, 833–845.
- Upton, A. L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakely, R., Seif, I., . . . , Gaspar, P. (1999). Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: Possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *Journal of Neuroscience*, 19, 7007–7024.
- Urban J, Clarke W, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, et al. (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 1–13.
- Van Haastert, P.J.M. and Devreotes, P.N. (2004) Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 626–634
- Van Haastert, P.J.M. and Postma, M. (2007) Biased random walk by stochastic fluctuations of chemoattractant-receptor interactions at the lower limit of detection. *Biophys. J.* 93, 1787–1796
- Van Hooser, S. D., & Nelson, S. B. (2006). The squirrel as a rodent model of the human visual system. *Visual Neuroscience*, 23, 765–778.
- Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 112-124.
- Vargas SL, Toma I, Kang JJ, Meer EJ, Peti-Peterdi J. (2009) Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20 (5): 1002-11.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, et al. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494: 185-194.

- Victor, J. D., Apkarian, P., Hirsch, J., Conte, M. M., Packard, M., Relkin, N. R., . . . , Shapley, R. M. (2000). Visual function and brain organization in non-decussating retinal-fugal fibre syndrome. *Cerebral Cortex*, 10, 2–22.
- Von dem Hagen, E. A., Hoffmann, M. B., & Morland, A. B. (2008). Identifying human albinism: A comparison of VEP and fMRI. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 238–249.
- Von Heijne G (2006) Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 909-918.
- Von Philipsborn, A. and Bastmeyer, M. (2007) Mechanisms of gradient detection: a comparison of axon pathfinding with eukaryotic cell migration. *Int. Rev. Cytol.* 263, 1–62
- Von Zastrow, M. & Kobilka, B. K (1994). Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 269, 18448–18452
- Wadsworth WG, Bhatt H, Hedgecock EM. 1996. Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16: 35–46.
- Waid, D. K., & McLoon, S. C. (1995). Immediate differentiation of ganglion cells following mitosis in the developing retina. *Neuron*, 14, 117–124.
- Waid, D. K., & McLoon, S. C. (1998). Ganglion cells influence the fate of dividing retinal cells in culture. *Development*, 125, 1059–1066.
- Waldeck-Weiermair M, Zoratti C, Osibow K, et al. Integrin clustering enables anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 10): 1704–17.
- Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, et al. (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* 83:1047-1058.
- Walz, A., Anderson, R. B., Irie, A., Chien, C. B., & Holt, C. E. (2002). Chondroitin sulfate disrupts axon pathfinding in the optic tract and alters growth cone dynamics. *Journal of Neurobiology*, 53, 330–342.
- Walz, A., McFarlane, S., Brickman, Y. G., Nurcombe, V., Bartlett, P. F., & Holt, C. E. (1997). Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system. *Development*, 124, 2421–2430.

- Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M. 1999. Biochemical purification of a mammalian Slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96: 771–784.
- Wang, J., Chan, C. K., Taylor, J. S., & Chan, S. O. (2008). The growth-inhibitory protein Nogo is involved in midline routing of axons in the mouse optic chiasm. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 2581–2590.
- Wang, S. W., Kim, B. S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R. L., . . . , Gan, L. (2001). Requirement for *math5* in the development of retinal ganglion cells. *Genes & Development*, 15, 24–29.
- Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J., & Wallace, V. A. (2005). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development*, 132, 5103–5113.
- Watkins HA, Au M, Hay DL (2012) The structure of secretin family GPCR peptide ligands: implications for receptor pharmacology and drug development. *Drug Discov Today* 17: 1006-1014.
- Webber, C. A., Hocking, J. C., Yong, V. W., Stange, C. L., & McFarlane, S. (2002). Metalloproteases and guidance of retinal axons in the developing visual system. *Journal of Neuroscience*, 22, 8091–8100.
- Wei Wu, Kit Wong, Jin-hui Chen, Zhi-hong Jiang, Sophie Dupuis, Jane Y. Wu, and Yi Rao. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*. 1999 Jul 22; 400(6742): 331–336.
- Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A., Roeser, N. F., and Nissim, I. (2000). Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2826–2831.
- Weiner, J. A., Koo, S. J., Nicolas, S., Fraboulet, S., Pfaff, S. L., Pourquie, O., . . . , Sanes, J. R. (2004). Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 27, 59–69.
- Wetts, R., & Fraser, S. E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science*, 239, 1142–1145.

- Weiss, P.(1941).Nerve patterns: the mechanisms of nerve growth. Growth Third Growth Symp.Suppl. 5, 163–203.
- Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159-1204.
- White, L. E., Coppola, D. M., & Fitzpatrick, D. (2001). The contribution of sensory experience to the maturation of orientation selectivity in ferret visual cortex. *Nature*, 411, 1049–1052.
- Whitford KL, Dijkhuizen P, Polleux F, Ghosh A. 2002. Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* 25: 127–149.
- Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(38):16511–16516.
- Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, et al. (1992). Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet* 1: 85-91.
- Williams, R. W., Hogan, D., & Garraghty, P. E. (1994). Target recognition and visual maps in the thalamus of achiasmatic dogs. *Nature*, 367, 637–639.
- Williams, S. E., Grumet, M., Colman, D. R., Henkemeyer, M., Mason, C. A., & Sakurai, T. (2006). A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron*, 50,535–547.
- Williams, S. E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D. J., . . . , Henkemeyer, M. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron*, 39,919–935.
- Wise, A.; Brown, A.J. GlaxoSmithKline, Identification of modulators of GPR55 activity. Patent WO0186305, 2001.
- Wisler JW, Xiao K, Thomsen AR, Lefkowitz RJ (2014) Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol* 27C: 18–24.
- Wittenberger, T., Hellebrand, S., Munck, A., Kreienkamp, H. J., Schaller, H. C., and Hampe, W. (2002) GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of nucleotide receptors.*BMC Genomics* 3, 17.

- Wittenberger, T., Schaller, H.C., and Hellebrand, S (2001). An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J. Mol.Biol.* 307, 799–813.
- Wizenmann, A., Brunet, I., Lam, J. S., Sonnier, L., Beurdeley, M., Zarbališ, K., . . . , Prochiantz, A. (2009). Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron*, 64, 355–366.
- Wojtowicz WM, Wu W, Andre I, Qian B, Baker D, Zipursky SL. 2007. A vast repertoire of Dscam binding specificities arises from modular interactions of variable Ig domains. *Cell* 130: 1134–1145.
- Wong, G. K., Baudet, M. L., Norden, C., Leung, L., & Harris, W. A. (2012). Slit1b-Robo3 signaling and N-cadherin regulate apical process retraction in developing retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 32, 223–228.
- Wong, R. O., Meister, M., & Shatz, C. J (1993). Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron*, 11, 923–938.
- Wright, K. M., Lyon, K. A., Leung, H., Leahy, D. J., Ma, L., & Ginty, D. D (2012). Dystroglycan organizes axon guidance cue localization and axonal pathfinding. *Neuron*, 76, 931–944.
- Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, Straiker A, Spencer C, Bradshaw H, Mackie K, Lu HC (2013) GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One* ;8(4):e60314.
- Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O’Leary D, et al. (2010) Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci*.
- Wu H, Wang C, Gregory KJ, Han GW, Cho HP, et al. (2014) Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science* 344: 58-64.
- Wu, K.Y. et al. (2005) Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* 436, 1020–1024
- Xiang, M., Zhou, L., Macke, J. P., Yoshioka, T., Hendry, S. H., Eddy, R. L., . . . , Nathans, J. (1995). The Brn-3 family of POU domain factors: Primary structure, binding

- specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 15, 4762–4785.
- Xiao Y, Chen Y, Kennedy AW, Belinson J, Xu Y. Evaluation of plasma lysophospholipids for diagnostic significance using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;905:242–259.
- Xiao Y.J., Schwartz B., Washington M., Kennedy A., Webster K., Belinson J., Xu Y. (2001). Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs nonmalignant ascitic fluids. *Anal. Biochem.* 290, 302.
- Xu Y., Xiao Y.J., Baudhuin L.M., Schwartz B.M. (2001). The role and clinical applications of bioactive lysolipids in ovarian cancer. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8, 1.
- Xu, H. P., Furman, M., Mineur, Y. S., Chen, H., King, S. L., Zenisek, D., . . . , Crair, M. C. (2011). An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development. *Neuron*, 70, 1115–1127.
- Xu, H., Leinwand, S. G., Dell, A. L., Fried-Cassorla, E., & Raper, J. A (2010). The calmodulin-stimulated adenylate cyclase ADCY8 sets the sensitivity of zebrafish retinal axons to midline repellents and is required for normal midline crossing. *Journal of Neuroscience*, 30, 7423–7433.
- Xu, J. et al. (2005) Adaptation is not required to explain the long-term response of axons to molecular gradients. *Development* 132, 4545–4552
- Yamada, K.M., and Wessells, N.K.(1971). Axon elongation .Effect of nerve growth factor on microtubule protein. *Exp. Cell Res.* 66, 346–352.doi:10. 1016/0014-4827(71)90687-2
- Yamada, K.M., Spooner, B.S., and Wessells, N.K (1970) Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 66, 1206–1212. doi: 10.1073/pnas.66.4.1206
- Yamashita A., Oka S., Tanikawa T., Hayashi Y., Nemoto-Sasaki Y., Sugiura T. (2013). The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 107, 103
- Yamauchi K, Phan KD, Butler SJ. 2008. BMP type I receptor complexes have distinct activities mediating cell fate and axon guidance decisions. *Development* 135: 1119–1128.

- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, et al. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360: 765–773
- Yang Xiang, Yan Li, Zhe Zhang, Kai Cui, Sheng Wang, Xiao-bing Yuan, Chien-ping Wu, Mu-ming Poo and Shumin Duan (2002). Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nature Neuroscience* 5, 843 – 848.
- Yang, Z., Ding, K., Pan, L., Deng, M., & Gan, L. (2003). Math5 determines the competence state of retinal ganglion cell progenitors. *Developmental Biology*, 264, 240–254.
- Yasuko Nagatsuka, Miki Hara-Yokoyama, Takeshi Kasama, Masataka Takekoshi, Fumiko Maeda, Seiji Ihara, Shigeyoshi Fujiwara, Eriko Ohshima, Kumiko Ishii, Toshihide Kobayashi, Kazufumi Shimizu and Yoshio Hirabayashi (2003) Carbohydrate-dependent signaling from the phosphatidylglucoside-based microdomain induces granulocytic differentiation of HL60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7454–7459.
- Yazdani U, Terman JR. 2006. The semaphorins. *Genome Biol* 7: 211.
- Yee KT, Simon HH, Tessier-Lavigne M, O'Leary DM. Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron*. 1999 Nov; 24(3):607-22.
- Yin, H.; Chu, A.; Li, W.; Wang, B.; Shelton, F.; Otero, F.; Nguyen, D.G.; Caldwell, J.S.; Chen, Y.A. Lipid G-protein-coupled receptor ligand identification using beta -arrestin Pathhunter assay. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284(18), 12328-12338.
- Yoo, S., Kim, Y., Noh, H., Lee, H., Park, E., & Park, S. (2011). Endocytosis of EphA receptors is essential for the proper development of the retinocollicular topographic map. *EMBO Journal*, 30, 1593–1607.
- Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24:21-44.
- Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB. 2003. Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. *Nature* 422: 583–588.
- Young, R. W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *The Anatomical Record*, 212, 199–205.



- Young, T. R., Bourke, M., Zhou, X., Oohashi, T., Sawatari, A., Fassler, R., . . . , Leamey, C. A. (2013). Ten-m2 is required for the generation of binocular visual circuits. *Journal of Neuroscience*, 33, 12490–12509.
- Zallen J, Yi BA, Bargmann CI. 1998. The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. Elegans*. *Cell*92: 217–227.
- Zangenehpour S and Chaudhuri A (2001) Neural Activity Profiles of the Neocortex and Superior Colliculus after Bimodal Sensory Stimulation *Cerebral Cortex* 11 (10): 924-935.
- Zhan X, Wang J, Liu Y, Peng Y, Tan W. GPCR-like signaling mediated by smoothed contributes to acquired chemoresistance through activating Gli. *Mol Cancer* 2014; 13: 4.
- Zhang X, Maor Y, Wang JF, Kunos G, Groopman JE. Endocannabinoid-like N-arachidonoyl serine is a novel pro-angiogenic mediator. *Br J Pharmacol*.
- Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, and Kiss JZ. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* 163: 1375–1384, 2003
- Zhang, F., Lu, C., Severin, C., & Sretavan, D. W. (2000). GAP-43 mediates retinal axon interaction with lateral diencephalon cells during optic tract formation. *Development*, 127, 969–980.
- Zhang, J., Jin, Z., & Bao, Z. Z. (2004). Disruption of gradient expression of *Zic3* resulted in abnormal intra-retinal axon projection. *Development*, 131, 1553–1562.
- Zhang, X. M., & Yang, X. J. (2001). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development*, 128, 943–957.
- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, et al. 2009. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 $\alpha$ . *Science* 324: 261–265.
- Zheng, J. J., Lee, S., & Zhou, Z. J. (2004). A developmental switch in the excitability and function of the starburst network in the mammalian retina. *Neuron*, 44, 851–864.
- Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. 2008. Semaphorin signaling: Progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* 33: 161–170.
- Zhou, F-Q. and Cohan, C.S. (2004) How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. *J. Neurobiol.* 58, 84–91

- Zoeller R.A., Wightman P.D., Anderson M.S., Raetz C.R (1987). Accumulation of lysophosphatidylinositol in RAW 264.7 macrophage tumor cells stimulated by lipid A precursors: *J. Biol. Chem.* 262, 17212.
- Zolessi, F. R., Poggi, L., Wilkinson, C. J., Chien, C. B., & Harris, W. A. (2006). Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural Development*, 1, 2.
- Zou YR1, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998 Jun 11; 393 (6685):595-9.

# Annexe I. Publications CB1R et CB2R

Journal Section: Development/Plasticity/Repair

1490 • J. Neurosci., January 26, 2011 • 31(4):1489–1499

## Concerted Action of CB1 Cannabinoid Receptor and Deleted in Colorectal Cancer in Axon Guidance

Abbreviated title: CB1R and RGC axon guidance

Anteneh Argaw<sup>1, 2</sup>, Gabriel Duff<sup>2, 3</sup>, Nicolas Tea<sup>2</sup>, Nawal Zabouri<sup>2, 4</sup>, Nawal Zabouri,<sup>2</sup> Bruno Cécyre,<sup>2</sup> Natacha Chaine,<sup>2</sup> Hosni Cherif,<sup>2</sup> Nicolas Tea,<sup>2</sup> Beat Lutz,<sup>4</sup> Maurice Ptito,<sup>2</sup> and Jean-François Bouchard<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

<sup>2</sup>School of Optometry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1

<sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

<sup>4</sup>Department of physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

<sup>5</sup>Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University Medical Center Mainz, Duesbergweg 6, 55099 Mainz, Germany

Corresponding author:

Jean-François Bouchard

School of Optometry, University of Montreal

3744, rue Jean-Brillant, Office- 260-7

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1

Phone: (514) 343-6111 ext. 4083

Fax: (514) 343-2382

**Keywords:** cannabinoid receptor CB1, DCC, growth cone, retinal ganglion cell, development, vision

## Acknowledgments

This work is supported by a grant to J.F.B. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). A.A. and N.Z. are supported by a doctoral research award from E.A. Baker Foundation and The Institute of Neuroscience, Mental Health and Addiction (INMHA) of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). G.D. is supported by a fellowship from the Fonds de recherche en santé du Québec. M.P. holds the Harland Sanders Chair for Visual Science. J.F.B. is a scholar of Rx&D-CIHR Health Research Foundation. We thank Robert Weinberg for the *dcc* transgenic mice. We thank Matthieu Vanni for the image analysis script programmed with MatLab software and Marc Dufresne, Sophie Charron and Denis Latendresse for their excellent technical assistance.

## **Abstract**

Endocannabinoids (eCBs) are retrograde neurotransmitters that modulate the function of many types of synapses. The presence of eCBs, their CB1 receptor (CB1R), and metabolizing enzymes at embryonic and early postnatal periods have been linked to developmental processes such as neuronal proliferation, differentiation, and migration, axon guidance, and synaptogenesis. Here, we demonstrate the presence of a functional eCB system in the developing visual system and the role of CB1R during axon growth and retinothalamic development. Pharmacological treatment of retinal explants and primary cortical neuron cultures with ACEA, a selective CB1R agonist, induced a collapse of the growth cone (GC). Furthermore the application of AM251, a CB1R inverse agonist, to the neuronal cultures increased the surface area of GC. In vivo, intraocular injection of ACEA diminished retinal projection growth, while AM251 promoted growth and caused aberrant projections. In addition, compared with their wild-type littermates, CB1R-deficient adult mice revealed a lower level of eye-specific segregation of retinal projections in the dorsal lateral geniculate nucleus. Finally, we found that pharmacological modulation of CB1R affected the trafficking of Deleted in colorectal cancer (DCC) receptor to the plasma membrane in a PKA-dependent manner. Moreover, pharmacological inhibition or genetic inactivation of DCC abolished the CB1R-induced reorganization of the GC. Overall, these findings establish a mechanism by which the CB1R influences GC behavior and nervous system development in concerted action with DCC.

## **Introduction**

Marijuana is one of the most commonly abused drugs by women of reproductive age (Ebrahim and Gfroerer, 2003; Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies, 2008; Hanus, 2009). This is important to consider, as there is mounting evidence that prenatal exposure has been associated with deleterious neurobehavioral consequences in the offspring (Jutras-Aswad et al., 2009). The underlying mechanisms of the detrimental effects of cannabis on the developing nervous system have not been well understood to date, but the recent insights into the constituents and the functioning of the endocannabinoid (eCB) system have promoted possible mechanisms of action. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol are the main eCBs, modulating synaptic transmission in many brain regions (Kano et al., 2009). eCB actions are primarily mediated by the CB1 and CB2 receptors (CB1R, CB2R), but other receptor systems have also been implicated in eCB signaling (Ryberg et al., 2007; Mackie, 2008). Recent studies implicate the eCB system in a wide variety of developmental events, such as cell proliferation and migration, and axon guidance during CNS development (Berghuis et al., 2005, 2007; Harkany et al., 2008; Mulder et al., 2008; Watson et al., 2008; Keimpema et al., 2010; Wu et al., 2010). In particular, the CB1R has been reported to regulate pyramidal cell specification, GABAergic interneuron development, and cortical neuron growth (Berghuis et al., 2007; Mulder et al., 2008; Vitalis et al., 2008; Keimpema et al., 2010; Wu et al., 2010). Berghuis et al. (2007) reported that CB1R induces GC collapse by activating RhoA, an intracellular protein regulating cytoskeletal rearrangements. Recent investigations also allocated important functions to the eCB synthesis and degradation machinery in the control of axon growth and guidance (Keimpema et al.,

2010). Nonetheless, the mechanisms by which eCBs influence GC reorganization during axon guidance have remained to be elucidated.

Here, the involvement of the eCB system in the development of the visual system was investigated. During embryogenesis, retinal ganglion cell (RGC) axons navigate through distinct anatomical structures before reaching their targets. Axons enter the optic disc, penetrate the optic nerve head, cross the optic chiasm, and finally connect with their thalamic [dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and lateral posterior] and midbrain [superior colliculus (SC)] targets in the appropriate hemisphere (Isenmann et al., 2003). Growth of RGC axons is largely directed by guidance cues present in their environment, including netrin-1, slits, and ephrins (Inatani, 2005). Their respective receptors (DCC, Robo, and Eph) located at the growth cone (GC) transduce guidance signals to a cytoplasmic gradient of molecules, resulting in the formation of functional retinofugal connections (Sanford et al., 2008).

We used the rodent neurovisual system and primary cortical neuron cultures (for biochemical assays requiring a large amount of neurons) to demonstrate a mechanism by which eCBs influence axon guidance. We found that the developing visual system expresses the CB1R and the eCB-synthesizing and -degrading enzymes. Furthermore, pharmacological manipulation of the CB1R affects RGC growth and retinothalamic development. Importantly, we observed that the DCC receptor is necessary for CB1R-induced reorganization of the GC.

## Materials and Methods

All animal experiments were approved by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux from the University of Montreal and were handled in accordance with the recommendations provided by the Canadian Council on Animal Care. CB1R knock-out mice were generated and genotyped as previously described (Marsicano et al., 2002). dcc transgenic mice were obtained from Robert Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) and were genotyped as described previously (Fazeli et al., 1997). All surgical procedures were performed under deep general anesthesia using either hypothermia [pups < postnatal day 4 (P4)] or isoflurane.

## Reagents

Bovine serum albumin (BSA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), dibutyryl cAMP (db-cAMP), DNase, forskolin (FSK), Hoechst 33258, insulin, KT5720, laminin, monoclonal anti- $\beta$ -actin, monoclonal anti-MAP kinase (diphosphorylated Erk-1&2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, pyruvate, selenium, apo-transferrin, triiodo-thyronine, trypsin, anti-syntaxin, and anti-CB1R were purchased from Sigma. ACEA, AM251, and O2050 were purchased from Tocris Bioscience. B27, N2, Dulbecco's PBS (DPBS), fetal bovine serum (FBS), glutamine, Neurobasal media, penicillin–streptomycin, S-MEM, and sodium pyruvate were purchased from Invitrogen. Papain solution was from Worthington Biochemical, normal donkey serum (NDS) from Jackson ImmunoResearch Laboratories, and ovomucoid from Roche Diagnostics. Rabbit anti-mouse macrophage and mouse anti-Thy-1.2 monoclonal IgM ( $\mu$  chain specific) were obtained from



Accurate Chemical. Anti-cAMP, anti-ERK, and anti-GAP-43 were from Millipore Bioscience Research Reagents. Antibodies directed against CB1R, MGL, and FAAH were purchased from Cayman. Anti-NAPE-PLD and DAGL $\alpha$  were kind gifts from Ken Mackie (Department of Psychological and Brain Sciences, Indiana University, Bloomington, IN). Monoclonal DCC antibodies against extracellular (DCCEX, G92–13) or intracellular (DCCIN, G97–449) epitopes of DCC were obtained from PharMingen.  $\alpha$ DCCfb AF5, H89, and LNAC were purchased from EMD. Goat and HRP-coupled secondary antibodies raised against rabbit IgG (H+L) or mouse IgM ( $\mu$  chain specific) were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, and L1 and Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Alexa 488 and Alexa 546) were from Invitrogen. Avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit and donkey anti-goat biotinylated secondary antibody were from Vector Labs. The B fragment of the cholera toxin (CTb) and goat anti-CTb antibody were from List Biological Laboratories.

## **Retinal explant culture**

Mouse embryonic day 14 (E14)–E15 embryo retinas were isolated and dissected in small segments in DPBS and plated on 12 mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (20  $\mu$ g/ml) and laminin (5  $\mu$ g/ml) in 24-well plates. Explants were cultured in Neurobasal supplemented with 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 5  $\mu$ g/ml LNAC, 1% B27, 40 ng/ml selenium, 16  $\mu$ g/ml putrescine, 0.04 ng/ml triiodo-thyronine, 100  $\mu$ g/ml transferrin, 60 ng/ml progesterone, 100  $\mu$ g/ml BSA, sodium pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), CNTF (10 ng/ml), insulin (5  $\mu$ g/ml), and FSK (10  $\mu$ M) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Explants were treated for 15 h at day in vitro 0 (DIV0) for projections analysis or 1 h at DIV1 for growth cone analysis. Photomicrographs were taken using an Olympus BX51WI microscope

(Olympus Canada) and analyzed with Image Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics). The total length of axon bundles was quantified and expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by ANOVA with Bonferroni's post hoc test (Systat).

## **Purified retinal ganglion cell culture**

RGCs from P7–P8 mice (Charles River) were purified and cultured according to a protocol previously described by Barres et al. (1988). In brief, following enucleation, retinas were dissected and enzymatically dissociated, at 37°C for 30 min, in a papain solution (15 U/ml in DPBS) containing 1 mM l-cysteine. The retinas were then triturated sequentially, with a 1 ml pipette, in a solution containing ovomucoid (1.5 mg/ml), DNase (0.004%), BSA (1.5 mg/ml), and rabbit antibodies directed against mouse macrophages (1:75) to yield a suspension of single cells. The suspension was centrifuged and washed in a high concentration ovomucoid-BSA solution (10 mg/ml for each in DPBS). The dissociated cells were resuspended in DPBS containing BSA (0.2 mg/ml) and insulin (5  $\mu$ g/ml).

RGCs were purified using the two-step panning procedure (Barres et al., 1988; Meyer-Franke et al., 1995). Briefly, to remove macrophages, the retinal suspension was incubated at room temperature in Petri dishes coated with affinity-purified goat anti-rabbit IgG (H+L). The nonadherent cells were then transferred to a Petri dish that had been coated with affinity-purified goat anti-mouse IgM ( $\mu$  chain specific) followed by anti-Thy-1.2 monoclonal IgM. The adherent RGCs were first released enzymatically by incubating them in a 0.125% trypsin solution at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> followed by manually pipetting an enzyme inhibitor solution (30% FBS in Neurobasal) along the surface of the dish.

Purified RGCs were plated on poly-D-lysine- (10 µg/ml) and laminin- (5 µg/ml) coated glass coverslips (number 0 Deckgläser; Carolina Biological) in 24-well plates. RGCs were cultured in 600 µl of serum-free medium modified from Bottenstein and Sato (1979). Neurobasal media was supplemented with B27, selenium, putrescine, triiodo-thyronine, transferrin, progesterone, pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), CNTF (10 ng/ml), BDNF (50 ng/ml), insulin (5 µg/ml), and FSK (10 µM). RGCs were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. All experiments on purified RGCs were performed 36–40 h following plating.

## **Primary neuron culture**

Primary cortical neurons are used in the present study because of the large amount of cells that can easily be cultured and harvested for biochemical assays, as opposed to RGC cultures. Staged pregnant CD1 mice were obtained from Charles River. E14–E15 embryo brains were dissected and the superior layer of each cortex was isolated and transferred in 2 ml of S-MEM at 37°C with 2.5% trypsin and 2 mg/ml DNase for 15 min. Pellet was transferred into 10 ml of S-MEM with 10% FBS and stored at 4°C. Following centrifugation, pellet was again transferred in 2 ml of S-MEM with 10% FBS and triturated three to four times. Supernatant was transferred in 10 ml of Neurobasal medium. Dissociated cells were counted and plated at 50,000 cells per well on 12 mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (20 µg/ml). Cells were cultured for 2 d in Neurobasal medium containing 1% B-27, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25% N2, and 0.5 mM glutamine. Wells were treated with either a CB1R agonist (50 nM ACEA) or a CB1R inverse agonist (300 nM AM251) combined with adenylate cyclase activator (10 µM FSK) or PKA inhibitors (200 nM KT5720 and 2 µM H89), respectively, for 60 min for GC morphology or 15 min for cAMP

and PKA immunoreactivities. In another set of experiments, neurons were treated for 15 min with DCC function-blocking antibody ( $\alpha$ DCCfb; 3.5  $\mu$ g/ml), followed by 1 h stimulation with AM251, O2050, or FSK.

## **Growth cone turning assay**

Embryonic retinal explants were cultured on a coverglass in a borosilicate chamber (Lab-Tek) for 2 DIV and placed in an incubator mounted on an inverted microscope (Olympus IX71). They were kept at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with a Live Cell chamber (Neve Bioscience) throughout the whole experiment. A gradient was created using a micro-injector (Picoplus, Harvard Apparatus). The diameters of the tips of the glass microelectrodes used to eject the pharmacological agents were <3  $\mu$ m and the tip was positioned at  $\sim$ 45° and  $\sim$ 100  $\mu$ m away from the GC of interest.

## **Immunocytochemistry**

Following treatments, retinal explants, RGCs, and primary cortical neuron cultures were washed with PBS, pH 7.4, fixed in 4% paraformaldehyde, pH 7.4, and blocked with 2% normal goat serum (NGS) and 2% BSA in PBS containing 0.1% Tween 20, pH 7.4, for 30 min at room temperature. Neurons were then incubated overnight at 4°C in blocking solution containing anti-GAP-43 (1:1000) for GC morphology analysis, anti-cAMP (1:1000), anti-CB1R (1:1000), anti-NAPE-PLD (1:200), anti-DAGL $\alpha$  (1:200), anti-FAAH (1:100), anti-MGL (1:500), anti-DCCIN (1:500), anti-NFL (1:500), and anti- $\beta$ -actin (1:1000). The following day, cells were washed and labeled with Alexa secondary antibodies (488 and 546) and Hoechst 33258, and the coverslips were mounted with Immu-Mount (Thermo Scientific).

## **Surface biotinylation**

Cortical neurons from E14–E15 embryo cortices were dissociated, plated, and cultured for 2 DIV at a density of ~2,000,000 cells per 100 mm PDL-coated tissue culture dish. Then, cells were treated with 300 nM AM251, 300 nM O2050, 10  $\mu$ M FSK, 200 nM KT5720 + AM251, 2  $\mu$ M H89 + AM251, KT5720 + FSK, or H89 + FSK for 1 h. Neurons were then washed with ice-cold PBS containing 0.1 mM calcium chloride and 1 mM magnesium chloride, pH 7.4, to halt protein trafficking. Surface biotinylation was performed by adding EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Scientific), 5 ml per plate at 0.5 mg/ml in PBS at 4°C for 30 min (Bouchard et al., 2004); this was then removed, and the reaction was quenched by the addition of 5 ml of 10 mM ice-cold glycine in PBS at 4°C for two periods of 10 min. Subsequently, cell cultures were washed twice with 5 ml of ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer. Biotinylated proteins were precipitated with streptavidin–agarose (Thermo Scientific) and analyzed by Western blot.

## **Western blot analysis**

Dissociated primary cortical neurons were cultured for 2 DIV at a density of ~250 000 cells/dish in 35 mm poly-D-lysine-coated Petri dishes. After treatment, cells were washed once with pH 7.4 ice-cold PBS and then lysed with Laemmli sample buffer. Primary antibodies were used at the following concentrations: anti-CB1R (1:1000), anti-DCCIN (1:2000), anti-DCCEX (1:2000), anti-GAP43 (1:4000), anti- $\beta$ -actin (1:5000), anti-AKT (1:1000), anti-p-AKT (1:1000), anti-ERK1/2 (1:5000), anti-p-ERK1/2 (1:2000), anti-S6 (1:2000), and anti-p-S6 (1:2000). Results were visualized using chemiluminescence (PerkinElmer).

## **Intraocular injections**

Syrian golden hamsters (Charles River) were used for studies investigating, *in vivo*, the implication of the CB1R during retinal ganglion cell projection growth during postnatal development. These mammals are born with a premature nervous system (Clancy et al., 2001). Twenty-four hours following birth, at P1, anesthetized hamsters received a unilateral injection of 2  $\mu$ l solution of CTb, a highly sensitive anterograde tracer, with either 0.9% saline solution, a 300  $\mu$ M concentration of the CB1R agonist ACEA, or 300  $\mu$ M AM251, a CB1R inverse agonist (supplemental Fig. 4A, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Briefly, under an operating microscope, a small incision was made in the eyelids to access to the right eye. The injections were administered using a glass micropipette attached to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe. The micropipette was carefully inserted into the vitreous at an angle to avoid damage to the lens. Following the injection, the eyelids were closed with surgical glue (Vetbond; 3M).

## **Perfusion**

At P5, 4 d postinjection, anesthetized hamsters were perfused transcardially with 0.1 M PBS, pH 7.4, followed by 4% paraformaldehyde in PBS. The brains were removed, postfixed overnight at 4°C, and cryoprotected by infiltration of buffered sucrose. The brains were then frozen and kept at -80°C until further processing.

## **Immunohistochemistry**

The presence of the eCB system during early postnatal development was investigated by immunohistochemistry. The RGC fiber layer was labeled with syntaxin. Retinal sections were washed in 0.1 M PBS, postfixed for 5 min in a 70% solution of ethanol, rinsed in 0.03%

Triton X-100 in buffered saline, and blocked in 10% NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and 0.5% Triton X-100 in buffered saline for 1 h. The sections were then coincubated overnight in rabbit anti-CB1R, rabbit anti-NAPE-PLD, goat anti-DAGL $\alpha$ , rabbit anti-FAAH, or rabbit anti-MGL solution with an antibody tagged as mouse and directed against syntaxin. After incubation with the primary antibodies, the sections were washed in buffered saline, blocked for 30 min, and incubated for 1 h with secondary antibodies: Alexa donkey anti-rabbit 555 for CB1R, NAPE-PLD, FAAH, or MGL, Alexa donkey anti-goat 555 for DAGL $\alpha$ , and Alexa donkey anti-goat or mouse 488 for cell type markers (Invitrogen). After washes, the sections were mounted with a homemade Dabco-PVD mounting media (Ono et al., 2001).

The effects of intraocular injection of CB1R agonist, inverse agonist, and antagonist were visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described (Argaw et al., 2008). Briefly, 40- $\mu$ m-thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M PBS, pH 7.4, for 20 min. They were then rinsed and incubated in 0.1 M glycine in PBS for 30 min, followed by an overnight incubation (4°C) in PBS containing 4% NDS, 2.5% BSA, and 1% Triton X-100. Sections were subsequently rinsed and immersed for 48 h at room temperature in a solution containing goat anti-CTb diluted 1:4000 in PBS with 2% NDS, 2.5% BSA, and 2% Triton X-100. Afterward, sections were rinsed and incubated in 2% NDS and 2.5% BSA/PBS for 10 min. This was followed by a 1 h incubation in donkey anti-goat biotinylated secondary antibody diluted 1:200 in PBS with 2% NDS, 2.5% BSA, and 1% Triton X-100. Tissue was rinsed, incubated in 2% NDS and 2.5% BSA in PBS for 10 min, and subsequently processed by an avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit (diluted 1:100 in PBS) for 1 h, in the dark and at room temperature.

Sections were then rinsed and preincubated in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in PBS for 5 min. The peroxidase was visualized by adding 0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the DAB solution for 2–4 min. Sections were finally washed five times (1 min each) with PBS, mounted on gelatin-chrome alum-subbed slides, air dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylenes, and coverslipped with Depex (EMS).

## **Retinogeniculate projection patterns analysis**

For eye-specific segregation studies in the dLGN, CB1R<sup>-/-</sup>, and CB1R<sup>+/+</sup> adult mice were injected with the B fragment of the cholera toxin (CTb) conjugated to Alexa-546 (CTb-546; red) into the left eye and CTb-488 (green) into the right eye (1.5–2  $\mu$ l; 0.5% in sterile saline) (supplemental Fig. 4A,D, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Forty-eight hours later, brain tissue was harvested and postfixed overnight in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose, and then sectioned coronally at 40  $\mu$ m thickness, mounted onto slides, and coverslipped with Immu-Mount. Images were collected and quantified by an observer “blind” to the experimental conditions to minimize any bias. Universal gains and exposures were established for each label. Raw images of the dLGN were imported to Matlab and an area of interest comprising the dLGN was cropped excluding the ventral LGN and the intergeniculate leaflet; then, the degree of left and right eye projection overlap was quantified using an established multithreshold method of analysis (Torborg and Feller, 2004; Bjartmar et al., 2006; Stevens et al., 2007). This approach best permits the analysis of overlapping regions independent of the threshold. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Significance of differences between means was evaluated by Student's t test analysis (Systat).



## Quantification method

Photomicrographs were taken with an inverted Olympus IX71 microscope (Olympus Canada) and an Evolution VF camera (Media Cybernetics). Images were analyzed with Image Pro Plus 5.1 image analysis software (Media Cybernetics). Axon branch growth was quantified on consecutive photomicrographs of coronal slices of brain tissue comprising the dorsal terminal nucleus (DTN). On each photomicrograph, the distance between the lateral border of the nucleus of interest and the tips of the longest axon branches were measured (supplemental Fig. 4B, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). To account for differences in brain sizes, axon branch lengths were normalized with the interthalamic distance (distance between the right and left lateral borders of the thalamus). Axon collateral number was quantified on consecutive photomicrographs comprising the DTN using an adaptation of the Sholl technique (supplemental Fig. 4C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material) (Sholl, 1953). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by ANOVA with Bonferroni's post hoc test (Systat).

For cAMP immunoreactivities, all photomicrographs of GCs were taken using the same microscope, objective lens, and exposure time to allow comparison of measurements. Fluorescence intensity at the GC was corrected for background noise and quantified using Image Pro Plus 5.1 software. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by ANOVA with Bonferroni's post hoc test (Systat).

## Results

### **The developing visual system expresses the CB1R and the eCB-synthesizing and -degrading enzymes**

To explore the involvement of the eCB system during retinal projection guidance, E14–E15 mice retinas were dissected and cultured. We then examined the expression of the CB1R, the eCB-synthesizing enzymes NAPE-PLD [one of the enzymes implicated in anandamide (AEA) synthesis] and DAGL $\alpha$  [2-arachidonoylglycerol (2-AG)-synthesizing enzyme], and the eCB-degrading enzymes FAAH (AEA) and MGL (2-AG). These components of the eCB system were found to be expressed in the retinal projection axons as indicated by the colocalization of their immunoreactivities with NFL labeling (Fig. 1A). CB1R and FAAH were expressed in the GCs and filopodia, while NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , and MGL were mainly restricted to the retinal projection GCs (Fig. 1A). Furthermore, the CB1R is present in purified cultures of RGCs (Fig. 1B). Components of the eCB system were also investigated in primary cultures of cortical neurons. CB1R, DAGL $\alpha$ , and MGL were localized in cortical neuron cell bodies, neurites, and GCs (Fig. 1C; supplemental Fig. 1A, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material), and CB1R continued to be expressed for several days in vitro as shown by Western analysis (Fig. 1D; supplemental Fig. 1B, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

To explore the implication of the eCB system during retinal axon guidance, the spatiotemporal expression of CB1R, NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , FAAH, and MGL was investigated in the retinal ganglion cell fiber layer (supplemental Fig. 1C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). During early postnatal development, these proteins are expressed in the retina (supplemental Fig. 1C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material),

optic chiasm, dLGN, and SC [our unpublished data and Argaw et al. (2009)]. In the retina, CB1R and eCB-synthesizing and -degrading enzymes are expressed in retinal axons as they localize along the RGC fibers labeled with syntaxin, an axon marker (supplemental Fig. 1C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Overall, we observed that during the first days of postnatal development, CB1R, NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , FAAH, and MGL are expressed along the visual pathway. Together, these results indicate that the CB1R and the eCB-synthesizing and -degrading enzyme expressions are spatially and temporally coordinated with the development of RGCs and cortical neurons.

## **Pharmacological modulation of CB1R activity affects RGC GC morphology and turning in vitro**

To assess the role of eCBs during retinal axon growth and guidance, embryonic mice retinal explants were cultured for 2 DIV, and treated with pharmacological modulators of the CB1R pathway. AEA and 2-AG are the two most characterized eCBs. They can act as agonists for the CB1R and the CB2R (Pertwee, 2005). Since the present study focuses on the contribution of the CB1R in retinal axon guidance, ACEA, a highly selective synthetic CB1R agonist, has been used for the pharmacological experiments. When primary retinal (pure glutamatergic) and cortical (mixed population of GABAergic and glutamatergic) neuron cultures were treated with ACEA, GC surface area and number of filopodia diminished significantly (Fig. 2A–F). In contrast, application of AM251, a selective CB1R inverse agonist, or O2050, a CB1R antagonist, to the cultures significantly increased GC surface and filopodia number in RGCs and cortical neurons (Fig. 2A–F). As expected, AM251 or O2050 antagonized the effects of ACEA. Forskolin, a selective activator of adenylate cyclases,

increased retinal projection GC surface area and filopodia number (Fig. 2A–F). To test the effects of CB1R signaling on axon growth, retinal explants were treated overnight with ACEA, AM251, or O2050. Agonist (ACEA) treatment diminished total neurite length, whereas the inverse agonist (AM251) and pure antagonist (O2050) increased total neurite growth (Fig. 2G, H). Here again, the effect of ACEA was blocked by AM251 or O2050. Together, these results indicate that the CB1R modulates GC morphology and axon growth in retinal explants.

To evaluate whether the CB1R is involved in retinal axon steering, the turning assay was performed on embryonic mice retinal cultures. A microgradient application of ACEA induced GC collapse and neurite retraction, while db-cAMP, a stable analog of cAMP, a cytoplasmic messenger involved in GC steering, elicited attractive turning (Fig. 2I–L). The vehicle did not induce a significant directional GC turning. These data are in agreement with a recent study reporting the repulsive turning responses of GABAergic interneuron GCs following a CB1R agonist (WIN55,212-2) stimulation (Berghuis et al., 2007).

## **The CB1R modulates GC morphology via the cAMP/PKA pathway**

Endocannabinoids and their CB1Rs have a diverse range of signal transduction mechanisms. Upon activation, CB1 receptors recruit distinct second-messenger cascades translating into numerous downstream kinase interactions including the Raf-1/ERK1/2 (Derkinderen et al., 2003) and PI3K/AKT (Sánchez et al., 2003; Ozaita et al., 2007) signaling pathways. The implication of these signaling cascades was tested by Western blot analysis. In addition, we also investigated the implication of the cell growth-regulating signaling pathway

mTOR/S6K (Jaworski and Sheng, 2006; Puighermanal et al., 2009) following CB1R stimulation. Interestingly, in primary neuron cultures, 10 min stimulation of the CB1R did not induce changes in ERK1/2, AKT, or S6 phosphorylation levels (Fig. 3A, B). To confirm the validity of these observations, the experiments were repeated for a 20 min stimulation period without any discernible activation of these pathways (supplemental Fig. 2A–D, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Furthermore, CB1R stimulation following KCl-induced depolarization or insulin treatment did not result in additional changes in ERK1/2, AKT, or S6 phosphorylation levels (supplemental Fig. 2E,F, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Since it is well documented that the stimulation of CB1Rs and subsequent activation of Gi/α inhibits adenylate cyclase (Irving et al., 2008), we tested whether the CB1R modulates the cAMP/PKA pathway during axon growth and guidance. ACEA stimulation induced a significant decrease in cAMP levels at the GC, whereas AM251, O2050, and FSK increased them, as indicated by fluorescence intensity (Fig. 3C, D). Furthermore, PKA phosphorylation was significantly lower following ACEA stimulation, while the opposite was true after AM251 application as indicated by Western blot analysis (Fig. 3E, F). To further assess the implication of the cAMP/PKA pathway, primary neuron cultures were first treated with PKA-selective inhibitors followed by pharmacological manipulation of the CB1R. PKA inhibition blocked AM251-induced increases in GC surface area and filopodia number (Fig. 3G–I). ACEA reversed FSK-induced GC surface and filopodia increases (Fig. 3G–I). These data demonstrate that CB1R activation modulates GC morphology via the cAMP/PKA pathway.

## **The DCC receptor is required for CB1R-induced reorganization of the GC**

The cAMP/PKA pathway has been suggested to influence the GC's sensitivity to netrin-1 (Ming et al., 1997). Several studies have reported that activation of PKA increases netrin-dependent recruitment of DCC to the plasma membrane (Bouchard et al., 2004; Moore and Kennedy, 2006; Bouchard et al., 2008). Our results suggest that the cAMP/PKA pathway functions as a downstream effector for eCBs during GC guidance. Since CB1R and DCC are expressed in developing neurons, it is reasonable to investigate the potential interactions between these two receptors. Previous reports showed that DCC is expressed in primary cortical neurons (Bouchard et al., 2008) and retinal projection axons and GCs (Deiner et al., 1997). Our results indicated that the CB1R and DCC are expressed in embryonic retinal explant axons, GCs, and filopodia (Fig. 4A). We further examined whether DCC and CB1R are expressed in transgenic mice in which CB1R ( $CB1R^{-/-}$ ) and DCC ( $DCC^{-/-}$ ), respectively, were functionally inactivated. Immunocytochemical and Western blot analysis clearly indicated that DCC is expressed in  $CB1R^{-/-}$  neurons, while CB1R is present in  $DCC^{-/-}$  neurons (Fig. 4B–E). To determine whether CB1R activation modulates DCC trafficking to the plasma membrane, neuron cultures were treated with AM251, O2050, or FSK. Plasma membrane DCC was assessed by biotinylating cell surface proteins, and the relative amount of DCC present on the neuronal surface following the treatments was visualized by Western blot analysis (Fig. 4F). Interestingly, CB1R antagonist and inverse agonist significantly increased the amount of DCC at the plasma membrane (Fig. 4F). FSK also augmented the presence of DCC at the neuronal surface. To verify that CB1R-induced DCC trafficking is upstream or downstream of PKA activation; neuronal cultures were treated with KT5720+AM251,

H89+AM251, KT5720+FSK, or H89+FSK. As visualized by Western blot, inhibition of PKA abolished AM251, O2050, and FSK-induced increases in DCC at the plasma membrane (Fig. 4F). To determine whether DCC is required for CB1R-induced reorganization of GC morphology, primary neuron cultures were exposed to DCC function-blocking antibody ( $\alpha$ DCCfb) for 15 min before the addition of CB1R modulators.  $\alpha$ DCCfb blocked AM251- and O2050-induced GC area and filopodia number increases (Fig. 4, G and H, respectively; supplemental Fig. 3A, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). These effects were also observed for FSK (Fig. 4G,H). The importance of DCC for eCB-mediated axon development was further investigated in transgenic mice for DCC function ( $DCC^{-/-}$ ) and their wild-type ( $DCC^{+/+}$ ) littermates. Pharmacological modulation of the CB1R did not induce any significant changes in either GC surface area or filopodia number in primary neuron cultures obtained from  $DCC^{-/-}$  mouse embryos (Fig. 4I,K; supplemental Fig. 3B, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). In contrast, ACEA induced a decrease in GC surface and filopodia number, while AM251, O2050, and FSK augmented these endpoints in  $DCC^{+/+}$  neuron cultures (Fig. 4J,L; supplemental Fig. 3C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Together, these results demonstrate that DCC is required for CB1R-mediated GC reorganization during axon guidance and development. Furthermore, these findings unravel the mechanism by which cannabinoids modulate guidance cue-regulated GC steering (supplemental Fig. 4E, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

## **The CB1R plays significant role during retinal year growth projection and target selection in vivo**

For Assessment to the contribution of the retinal projection eCB during system development in vivo, hamsters received intraocular injections of CB1R modulators. Compared with rats and mice, hamsters gestation period-have shorting. Consequently, they are born with a relatively premature nervous system (Clancy et al., 2001). At birth (P0), RGC axons have-nots all thalamic and midbrain reached their targets. By P3 Virtually all RGC axons-have Reached their targets (Bhide and Frost, 1991). To take advantage of this opportunity, within 24 h following birth, hamsters received a unilateral intraocular injection of ACEA Either gold AM251. At P5, immunohistological experiments revealed that interfering with the signaling system eCB detrimental effects could Have we RGC axon development. Compared with the control group, intraocular injection of ACEA has significant induced RGC axon branch Decrease in growth in the DTN without differences in branch number (Fig. 5A-C). AM251 RGC collateral increased length and branch number in the DTN (Fig. 5A-C). In addition, interfering with the intrinsic ocular cannabinoid signaling with AM251 induced aberrant projections in the ipsilateral side of the SC as indicated by a robust labeling of retinal axons (Fig. 5D).

During perinatal development, RGCs from both eyes send axons that connect to multiple target cells in the dLGN. These projections spread throughout the dLGN sharing common terminal space. During postnatal development, an eye-specific segregation occurs (Godement et al., 1984). In the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. The implication of the CB1R during retinogeniculate development was further investigated in the dLGN in adult CB1R-deficient mice (CB1R<sup>-/-</sup>)



and their wild-type (CB1R<sup>+/+</sup>) littermates. The area occupied by contralateral projections is larger in CB1R<sup>-/-</sup> mice than in CB1R<sup>+/+</sup> mice (Fig. 5E). The contralateral and ipsilateral retinal projection images were quantified using a multithreshold method of analysis with MatLab software. These data indicate a significant overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of CB1R<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5F). The segregation defects observed were not due to an uneven labeling of RGCs in the retina as the optic nerves of both eyes were similarly labeled following intraocular injection of anterograde tracers (supplemental Fig. 4D, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

## Discussion

Previously, studies have reported by *in situ* hybridization and immunohistochemistry the presence of the CB1R in the outer and inner plexiform, inner nuclear, and ganglion cell layers of the retina (Buckley et al., 1998; Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Yazulla, 2008). Our observations further these studies by showing, for the first time, the presence of the CB1R and the eCB-synthesizing (NAPE-PLD and DAGL $\alpha$ ) and -degrading (FAAH and MGL) enzymes in retinal projection axons and GCs (Fig. 1A). In accordance with previous reports, we have observed the presence of the CB1R in RGCs and cortical neurons (Fig. 1B–D; supplemental Fig. 1B, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material) (Lalonde et al., 2006; Vitalis et al., 2008; Keimpema et al., 2010; Wu et al., 2010). Furthermore, our findings showed that, *in vivo*, expression of CB1R, NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , FAAH, and MGL is spatially and temporally synchronized with the development of RGC projections (supplemental Fig. 1C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). These findings demonstrate the presence of the eCB system in the developing neurovisual system

and strongly suggest its implication in retinal axon guidance and the establishment of functional retinothalamic and retinocollicular pathways.

We found that pharmacological activation or blockade of the CB1R activity modulates GC morphology of RGCs and cortical neurons (Fig. 2A–F). Accordingly, CB1R agonist induced the collapse of the GC, while the CB1R antagonist or inverse agonist expanded its surface area and filopodia number of these glutamatergic neurons. These data correlate with a previous study that showed CB1R agonist (WIN55,212-2)-induced GC collapse in GABAergic interneurons of the hippocampus (Berghuis et al., 2007). Additionally, our data indicate that the CB1R negatively regulates retinal projection growth (Fig. 2G,H). This is in accordance with a published study using hippocampal pyramidal neurons in which the CB1R expression was augmented by transfection (Vitalis et al., 2008). Conversely, our data are at odds with prior studies that reported that the CB1R positively regulates neurite development of cortical and cerebellar neurons (Williams et al., 2003; Mulder et al., 2008). At this point, our present understanding of the eCB system does not permit a conciliatory explanation for these discrepant results. Additionally, our results clearly demonstrate that the CB1R activity at the GC modulates retinal axon navigation (Fig. 2I–L). These results complement previously reported observations where CB1R agonist treatment induced GABAergic GC collapse and retraction (Berghuis et al., 2007). Furthermore, the presence of the CB1R and the eCB-synthesizing (NAPE-PLD and DAGL $\alpha$ ) and -degrading (FAAH and MGL) enzymes in retinal axons and GCs (Fig. 1A) and the CB1R-induced retinal GC steering (Fig. 2I–L) suggest that these neurons may use target-derived as well as cell-autonomous eCBs as directional cues for GC steering decisions. These findings are in accordance with the rationale proposed by Mulder et al. (2008) that eCB-controlled axonal growth in glutamatergic cells is primarily a

cell-autonomous mechanism, while GABAergic neurons use target-derived cues for directional navigation. The divergence in the mechanism used by glutamatergic and GABAergic neurons could in part be explained by the cell type-dependent regulation of eCBs. Indeed, Walker et al. (2010) reported that DAGL $\alpha$  expression diminishes dramatically once the neural stem cells differentiate in GABAergic phenotype. Furthermore, the recent work by Keimpema et al. (2010) showed the importance of the spatial and temporal expression of MGL, whereby axonal pathfinding is regulated. Furthermore, these findings highlight the intricate mechanism by which the eCB system modulates the development of various neuron populations.

Previously, Berghuis et al. (2007) reported CB1R agonist-induced ERK1/2 phosphorylation in cultured interneurons, while Ozaita et al. (2007) documented the regulation of the PI3K/AKT by cannabinoids. Recently, Puighermanal et al. (2009) showed that, in adult, CB1R expressed on GABAergic interneurons transiently modulated the mTOR/S6K pathway. Despite various experimental conditions, we were unable to obtain similar results in our cultures of primary cortical glutamatergic neurons (Fig. 3A,B; supplemental Fig. 2, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Intriguingly, however, our findings showed that CB1R reorganizes GC morphology through DCC, a receptor for netrin-1. First, CB1R and DCC are expressed at the GC, and functional deletion of DCC does not affect the expression of CB1R as indicated by immunocytochemistry and Western blot analysis (Fig. 4A–E). Second, CB1R activity influences the level of DCC present at the plasma membrane. Accordingly, blocking the constitutive CB1R activity, using the inverse agonist AM251, enhanced the level of DCC at the plasma membrane in a PKA-dependent manner (Fig. 4F). Third, the CB1R-induced GC reorganization requires the presence of a functional DCC at the

GC (Fig. 4G–L; supplemental Fig. 3, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). The functional implication of these findings is that the eCB system modulates axon guidance through CB1R by modulating GC's behavior to guidance cues present in its microenvironment (please refer to the working model in supplemental Fig. 4E, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Since eCBs are lipophilic compounds and are rapidly metabolized following their synthesis (Willoughby et al., 1997), it is very unlikely that they establish long-range concentration gradients similar to “classical” guidance molecules such as netrin. However, based on the results obtained in the present study, eCBs play, via CB1R, a modulatory role in axon guidance by modifying the response of GC toward a source of netrin. For instance, in spite the presence of netrin-1, an attractive guidance molecule, eCBs could induce retraction in part by downregulating the level of DCC at the plasma membrane. Furthermore, Berghuis et al. (2007) showed that CB1R induces growth cone collapse by activating RhoA, while Moore et al. (2008) provided evidence that RhoA inhibits DCC-dependent axon outgrowth to netrin. Thus, we believe that the CB1R-induced GC collapsing response observed in the present study is mediated by GTPases. Further studies are needed to unravel these mechanisms in detail.

In vivo, our data show that pharmacological and genetic interference with the CB1R activity profoundly affects retinal projection development and target selection. Accordingly, pharmacological manipulation of ocular eCB signaling affects retinal projection growth and navigation (Fig. 5A–D). Furthermore, the important role played by the eCB system during RGC axon guidance and target selection is demonstrated by the relative lack of eye-specific segregation of retinal projections in CB1R-deficient adult mice (Fig. 5E,F). Altogether, the present study identifies a mechanism by which the eCB system modulates retinothalamic

development and offers a potential mechanism by which parental exposure to CB1R agonists such as  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, the major psychoactive constituent in cannabis, affects CNS development, with detrimental effects in the offspring.

## References

- Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F (2008) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Exp Neurol* 211:494–502. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Argaw A, Duff G, Tea N, Ptito M, Bouchard J-F (2009) The endocannabinoid system modulates axon guidance and target selection during development. *Soc Neurosci Abstr* 35:129–8. [Google Scholar](#)
- Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL (1988) Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1:791–803. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19115–19120. [Abstract](#)/[FREE Full Text](#)
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316:1212–1216. [Abstract](#)/[FREE Full Text](#)

- Bhide PG, Frost DO (1991) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J Neurosci* 11:485–504. Abstract
- Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Rentería RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS (2006) Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 26:6269–6281. Abstract/FREE Full Text
- Bottenstein JE, Sato GH (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:514–517. Abstract/FREE Full Text
- Bouchard J-F, Moore SW, Tritsch NX, Roux PP, Shekarabi M, Barker PA, Kennedy TE (2004) Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: a novel mechanism regulating commissural axon extension. *J Neurosci* 24:3040–3050. Abstract/FREE Full Text
- Bouchard J-F, Horn KE, Stroh T, Kennedy TE (2008) Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *J Neurochem* 107:398–417. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82:1131–1149. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7–17. CrossRefMedlineGoogle Scholar

- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19:575–589. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol J-C, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault J-A (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23:2371–2382. [Abstract/FREE Full Text](#)
- Ebrahim SH, Gfroerer J (2003) Pregnancy-related substance use in the United States during 1996–1998. *Obstet Gynecol* 101:374–379. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) *Nature* 386:796–804. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Godement P, Salaün J, Imbert M (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol* 230:552–575. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Hanus LO (2009) Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med Res Rev* 29:213–271. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J (2008) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol* 286:S84–S90. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Inatani M (2005) Molecular mechanisms of optic axon guidance. *Naturwissenschaften* 92:549–561. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)

- Irving AJ, McDonald NA, Harkany T (2008) in *Cannabinoids and the brain, CB1 cannabinoid receptors: molecular biology, second messenger coupling and polarized trafficking in neurons*, ed Köfalvi A (Springer, New York), pp 59–73. [Google Scholar](#)
- Isenmann S, Kretz A, Cellerino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res* 22:483–543. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Jaworski J, Sheng M (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 34:205–219. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Jutras-Aswad D, DiNieri JA, Harkany T, Hurd YL (2009) Neurobiological consequences of maternal cannabis on human fetal development and its neuropsychiatric outcome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259:395–412. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89:309–380. [Abstract](#)/[FREE Full Text](#)
- Keimpema E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G, Yanagawa Y, Watanabe M, Mackie K, Harkany T (2010) Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *J Neurosci* 30:13992–14007. [Abstract](#)/[FREE Full Text](#)
- Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME (2006) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* 12:1160–1166. [Medline](#)[Google Scholar](#)



- Mackie K (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286:S60–S65. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530–534. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieder FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15:805–819. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Ming G-l, Song H-j, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo M-m (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19:1225–1235. [CrossRefMedlineGoogle Scholar](#)
- Moore SW, Kennedy TE (2006) Protein kinase A regulates the sensitivity of spinal commissural axon turning to netrin-1 but does not switch between chemoattraction and chemorepulsion. *J Neurosci* 26:2419–2423. [Abstract/FREE Full Text](#)
- Moore SW, Correia JP, Lai Wing Sun K, Pool M, Fournier AE, Kennedy TE (2008) Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1. *Development* 135:2855–2864. [Abstract/FREE Full Text](#)
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabás K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzmán M, Lu H-C, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8760–8765. [Abstract/FREE Full Text](#)

- Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A (2001) Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 49:305–312. Abstract/FREE Full Text
- Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R (2007) Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem* 102:1105–1114. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, 1–51. Google Scholar
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12:1152–1158. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092–1101. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Sánchez MG, Ruiz-Llorente L, Sánchez AM, Díaz-Laviada I (2003) Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB1 and CB2 cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal* 15:851–859. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Sanford SD, Gatlin JC, Hökfelt T, Pfenninger KH (2008) Growth cone responses to growth and chemotropic factors. *Eur J Neurosci* 28:268–278. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387–406. MedlineGoogle Scholar

- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164–1178. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G (1999) Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14565–14570. Abstract/FREE Full Text
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies (2008) Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National Findings (NSDUH Series H-34, DHHS Publication No. SMA 08-4343) (Department of Health and Human Services, Rockville, MD).
- Torborg CL, Feller MB (2004) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *J Neurosci Methods* 135:17–26. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Vitalis T, Lainé J, Simon A, Roland A, Leterrier C, Lenkei Z (2008) The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *Eur J Neurosci* 28:1705–1718. CrossRefMedlineGoogle Scholar
- Walker DJ, Suetterlin P, Reisenberg M, Williams G, Doherty P (2010) Down-regulation of diacylglycerol lipase-alpha during neural stem cell differentiation: identification of elements that regulate transcription. *J Neurosci Res* 88:735–745. MedlineGoogle Scholar

- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci* 38:89–97. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Williams E-J, Walsh FS, Doherty P (2003) The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 160:481–486. [Abstract](#)/[FREE Full Text](#)
- Willoughby KA, Moore SF, Martin BR, Ellis EF (1997) The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 282:243–247. [Abstract](#)/[FREE Full Text](#)
- Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K, Lutz B, Mackie K, Lu HC (2010) Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci* 32:693–706. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Yazulla S (2008) Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog Retin Eye Res* 27:501–526. [CrossRef](#)[Medline](#)[Google Scholar](#)
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG (1999) Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol* 415:80–90. [CrossRef](#)[Medline](#)

## **Author contributions**

This work is supported by a grant to J.-F.B. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). A.A. was supported by a doctoral research award from E.A. Baker Foundation and the Institute of Neurosciences, Mental Health and Addiction of the CIHR. G.D. was supported by a studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). M.P. holds the Harland Sanders Chair for Visual Science. J.-F.B. holds a Chercheur Junior 2 Award from the FRSQ. We thank Robert Weinberg for the dcc transgenic mice. We thank Matthieu Vanni for the image analysis script programmed with MatLab software and Florence Dotigny, Marc Dufresne, Sophie Charron, and Denis Latendresse for their excellent technical assistance. A.A. designed the project, performed the retinal explants, primary neuron cultures, growth cone turning assay, intraocular injections, immunohistochemistry and immunocytochemistry experiments, and statistical analysis, analyzed imaging data, and prepared the manuscript. G.D. performed the retinal explants, primary neuron cultures, growth cone turning assay, and immunohistochemistry and immunocytochemistry experiments, and analyzed imaging data. N.Z. and B.C. executed the immunohistochemical experiments. H.C. and N.C. performed and analyzed additional immunocytochemistry experiments. N.T. performed the Western blot analysis. B.L. kindly provided the CB1R transgenic mouse developed by his research team and contributed to the preparation of the manuscript. M.P. and J.-F.B. designed and supervised the project, performed the biotinylation experiments, and contributed to the preparation of this manuscript.

## Figure legends

### Figure.1 Expression of the eCB system in retinal projections

**A**, Retinal ganglion cell projections of E14–E15 mice retinal explants cultured for 1 DIV and immunolabeled for CB1R, NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , FAAH, MGL, and NFL. **B, C**, A retinal ganglion cell and a primary cortical neuron immunostained for CB1R. **D**, Western analysis of CB1R expression in primary cortical neuron cultures at different DIVs. Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel.

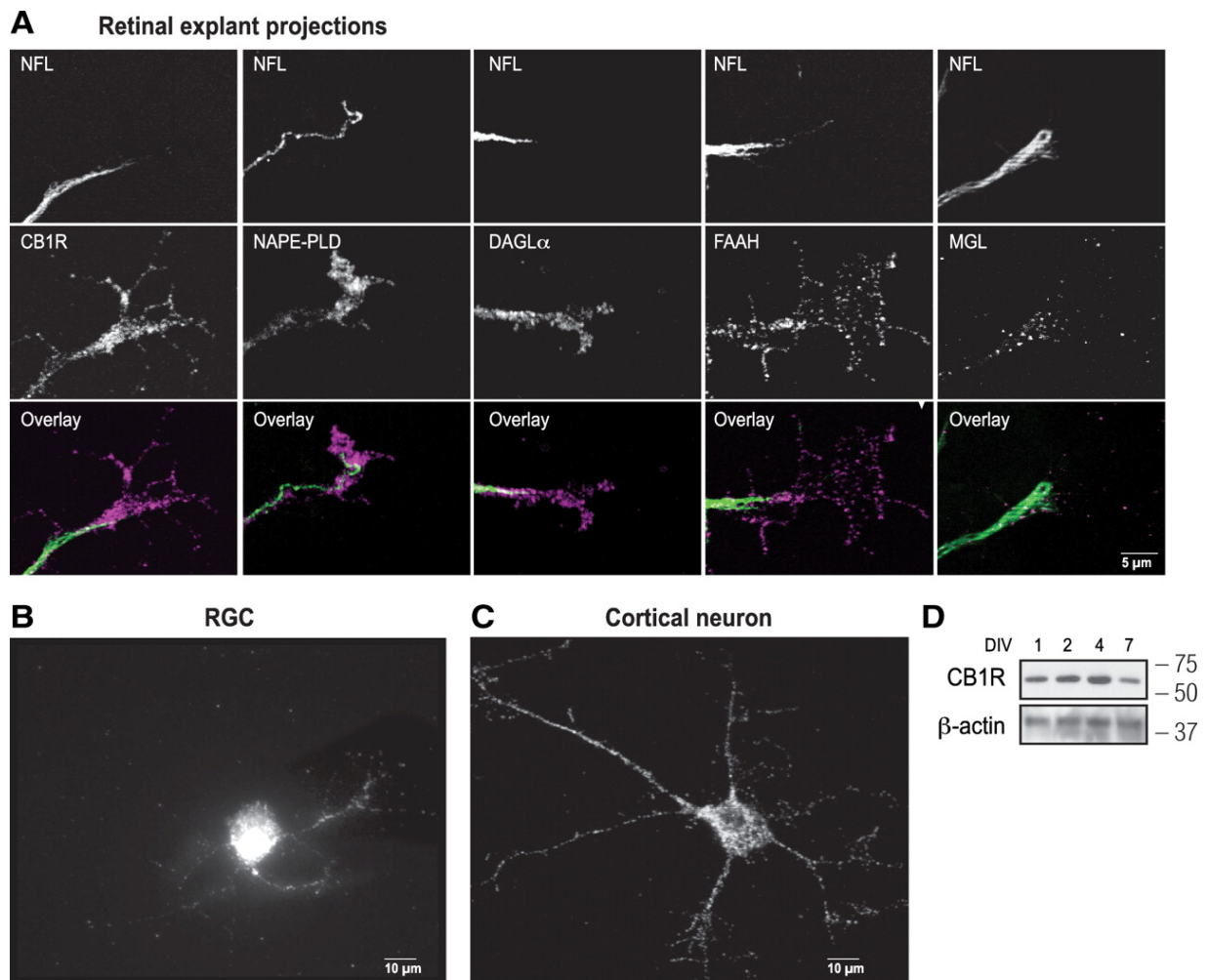


Figure.1 Expression of the eCB system in retinal projections.

## **Figure.2 Pharmacological activation and blockade of the CB1R reorganizes the morphology of the GC and modulates axonal growth and navigation.**

**A, D**, Photomicrographs of retinal projection GCs cultured for 1 DIV (**A**) and of primary neurons cultured for 2 DIV (**D**) treated with a CB1R agonist (ACEA), an inverse agonist (AM251), an antagonist (O2050), or FSK. **B, C, E, F**, GC surface area and filopodia number analysis following a 60 min pharmacological treatment of retinal explant (**B, C**) and cortical neuron cultures (**E, F**). **G**, Photomicrographs of retinal explant cultures treated with ACEA or AM251. **H**, Quantification of retinal projection growth subsequent to treatments with CB1R agonist or inverse agonist. **I**, Photomicrographs of RGC projection GCs taken at  $t = 0$  min and 60 min during GC turning assay experiments. Arrows indicate the direction of the microgradient, while arrowheads show the neurite stimulated. **I**, Representative photomicrograph of the microgradient created during drug stimulation. **J**, Scatter plot analysis of GC behavior as a result of CB1R agonist, db-cAMP, or vehicle application. **K, L**, Quantifications of neurite elongation and GC turning responses following drug stimulation. Values are presented as means  $\pm$  SEM. \* indicates a significant change compared with the control group,  $p < 0.01$  (**B, C, E, F, H**).

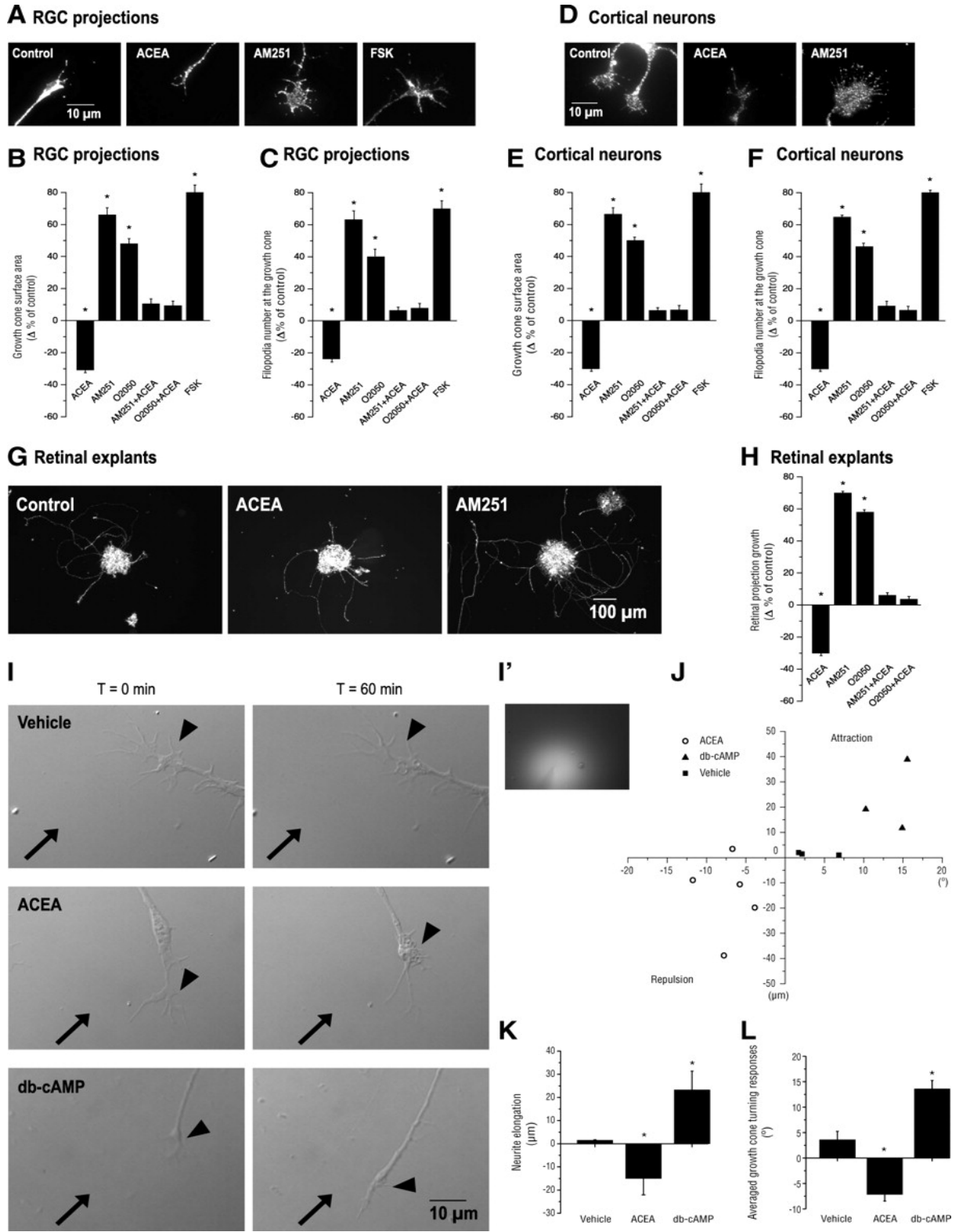


Figure.2 Pharmacological activation and blockade of the CB1R reorganizes the morphology of the GC and modulates axonal growth and navigation.



### **Figure.3 The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway.**

**A**, Western blot analysis of downstream kinases previously suggested to modulate eCB action. Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel. **B**, Quantification of the optical density for P-AKT, P-ERK1/2, and P-S6 following 10 min stimulation with ACEA or AM251. **C**, Photomicrographs of cortical neuron cultures immunolabeled for cAMP following 15 min stimulation with ACEA, AM251, O2050, or FSK. **D**, Quantification of cAMP fluorescence intensity at the GC. # and \* indicate significant changes compared with the control group,  $p < 0.05$  and  $p < 0.0001$ , respectively. **E**, Western blot analysis of PKA phosphorylation following 10 min stimulation with ACEA or AM251. Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel. **F**, Quantification of the optical density for P-PKA. **G**, Photomicrographs of GCs treated with CB1R inverse agonist and agonist, FSK and PKA inhibitors. **H, I**, GC surface area and filopodia analysis subsequent to the addition of a CB1R inverse agonist and simultaneous inhibition of PKA or the activation of PKA and the addition of a CB1R agonist. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates a significant change compared with the AM251 group and # with the FSK group ( $p < 0.0001$ ).

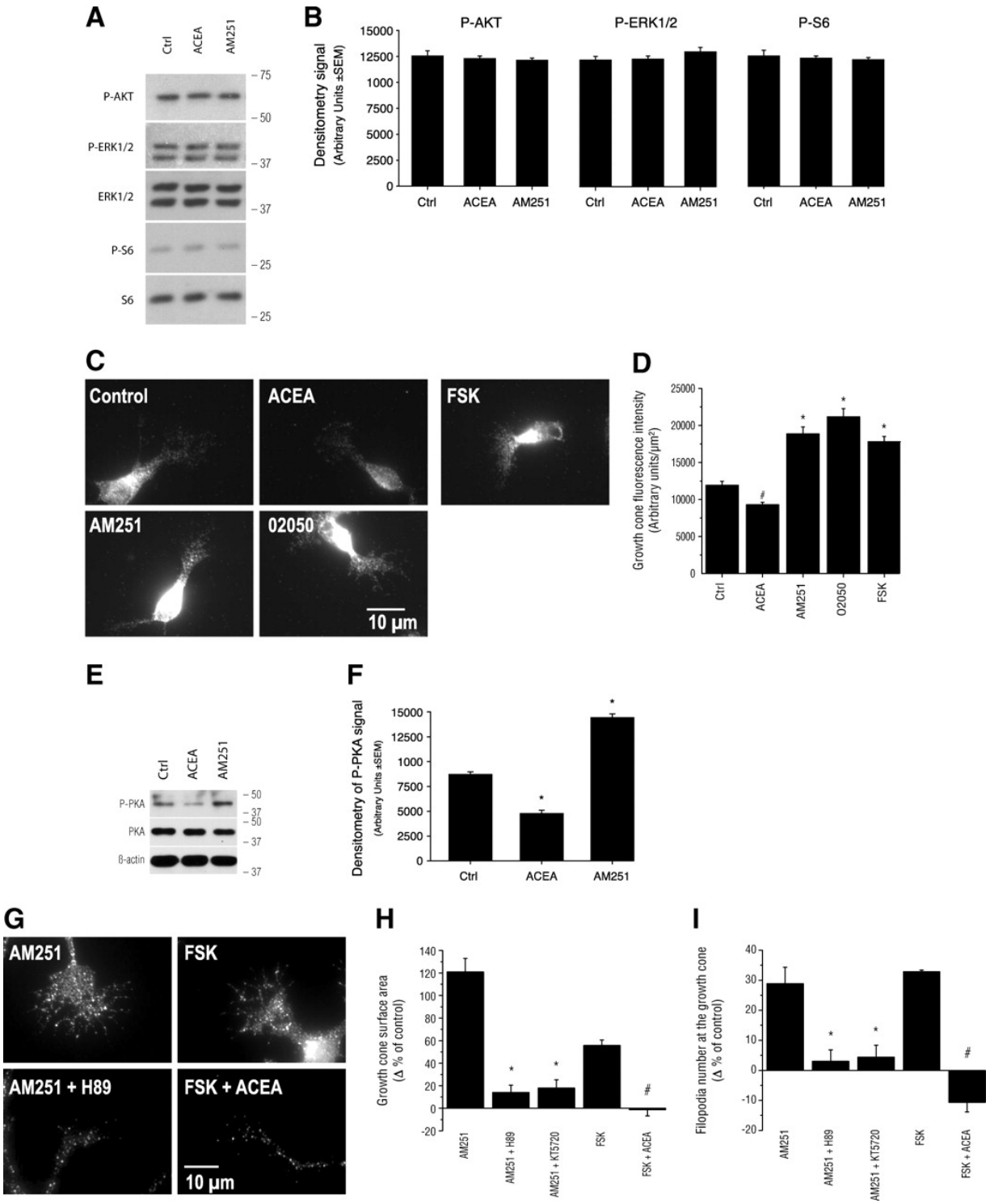


Figure.3 The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway.

## **Figure.4 DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC.**

**A**, E14–E15 mice RGC projections immunolabeled for DCC, CB1R, and L1. **B, C**, Immunocytochemical and Western blot analysis of DCC expression in primary retinal neuron cultures obtained from CB1R<sup>-/-</sup> mice. **D, E**, Immunocytochemical and Western blot analysis of CB1R expression in primary neuron cultures obtained from DCC<sup>-/-</sup> mice. **F**, Total and biotinylated proteins analyzed by Western blot with antibodies directed against either DCC,  $\beta$ -actin, CB1R, or NCAM. For Western blots, molecular weight markers are indicated on the right side of the panel. **G, H**, GC surface area and filopodia number analysis of cortical neuron cultures treated with  $\alpha$ DCCfb followed by the addition of either a CB1R inverse agonist or antagonist (AM251 or O2050, respectively) or FSK. **I–L**, GC surface area and filopodia number analysis of DCC<sup>-/-</sup> (**I, K**) and DCC<sup>+/+</sup> (**J, L**) primary neuron cultures treated with either ACEA, AM251, O2050, or FSK. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* indicates a significant change compared with the AM251, O2050, or FSK in **G** and **H**, and the control group in **J** and **L** ( $p < 0.05$ ).

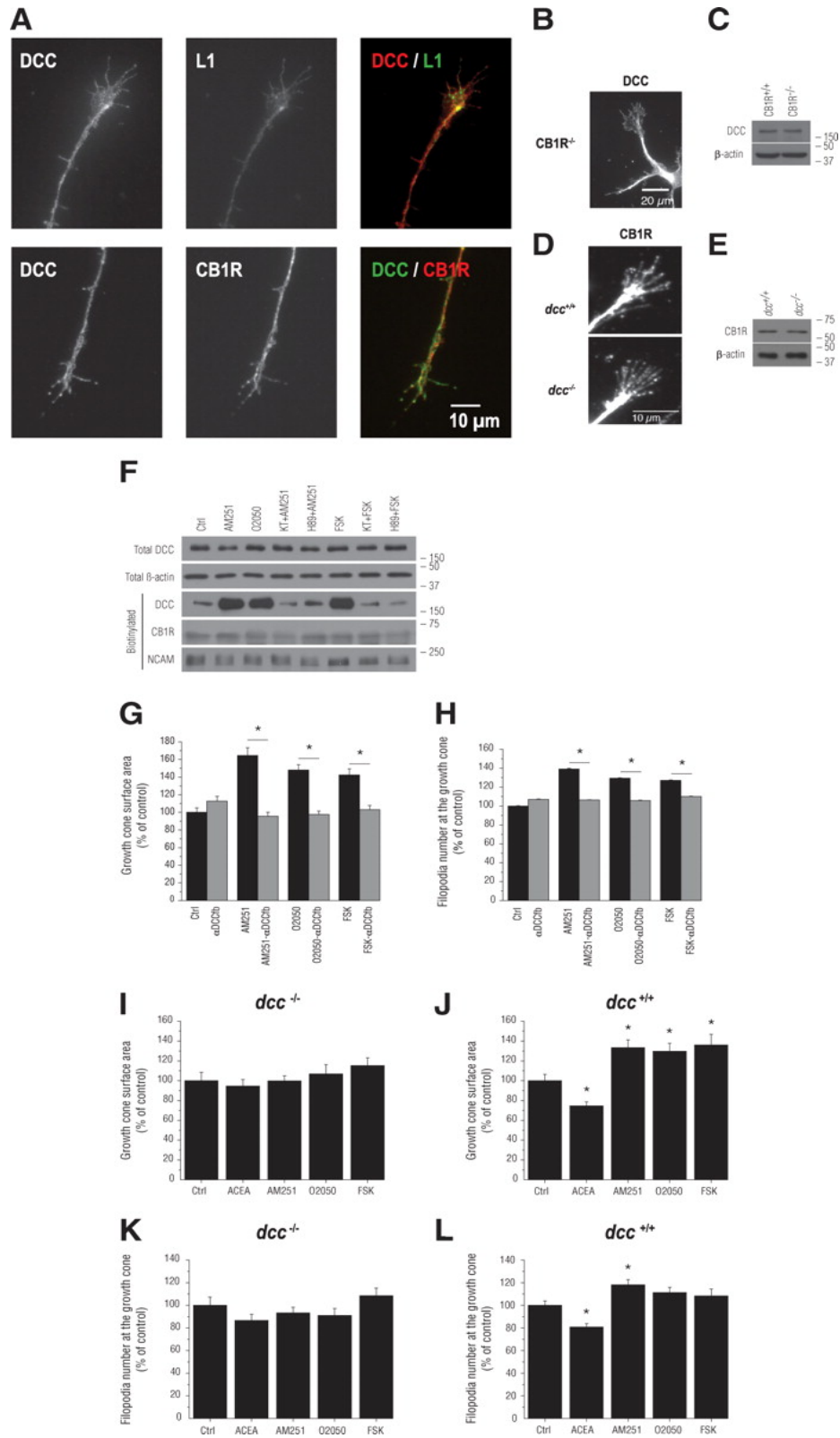


Figure.4 DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC.

## **Figure.5 Pharmacological modulation of CB1R activity modulates retinal projection development in vivo.**

**A**, Photomicrographs of P5 retinal projections in the DTN in the control, ACEA, and AM251 groups. Lower panel shows higher magnification of retinal projections. **B, C**, Quantification of retinal projection development in the DTN; axon collateral growth (**B**) and collateral branch number (**C**) of treated groups compared with the control group. **D**, Photomicrographs of retinal projections in the SC in the control and AM251-treated groups. **E**, Retinogeniculate projection patterns visualized following CTb conjugated to Alexa-546 (CTb-546; red) and CTb-488 (green) injections into left and right eyes of CB1R<sup>-/-</sup> and CB1R<sup>+/+</sup> adult mice. **F**, Quantification of the percentage of the dLGN receiving overlapping inputs in CB1R<sup>-/-</sup> and CB1R<sup>+/+</sup> adult mice. Data are presented as means ± SEM. \* indicates a significant change compared with the control group in **C** ( $p < 0.05$ ) and the CB1R<sup>+/+</sup> group in **F** ( $p < 0.005$ ).

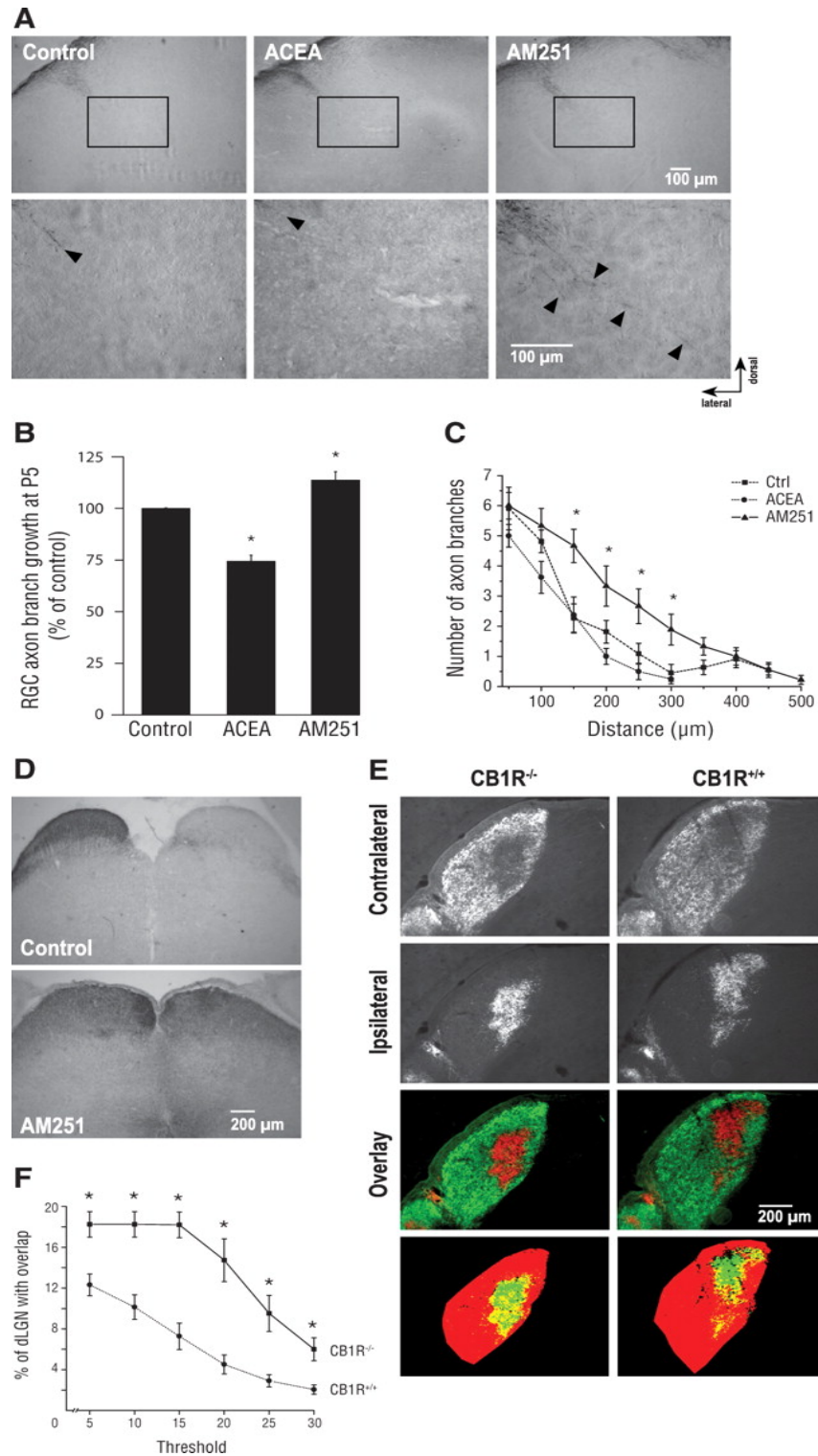


Figure.5 Pharmacological modulation of CB1R activity affects retinal projection development in vivo.

PLoS ONE 8(8): e70849.

## **Cannabinoid receptor CB2R modulates axon guidance**

Gabriel Duff<sup>1,2</sup>, Anteneh Argaw<sup>1,3</sup>, Bruno Cecyre<sup>1</sup>, Hosni Cherif<sup>1</sup>, Nicolas Tea<sup>1</sup>, Nawal Zabouri<sup>1</sup>, Christian Casanova<sup>1</sup>, Maurice Ptito<sup>1</sup>, Jean-François Bouchard<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Optometry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3T 1P1

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

<sup>3</sup>Department of Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3T 1J4

\*Corresponding author:

Jean-François Bouchard

School of Optometry, University of Montreal

3744, rue Jean-Brillant, Office- 260-7

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1

Phone: (514) 343-6111 ext. 4083

Fax: (514) 343-2382

## Summary

Navigation of retinal projections towards their targets is regulated by guidance molecules and growth cone transduction mechanisms. Here, we present in vitro and in vivo evidences that the cannabinoid receptor 2 (CB2R) is expressed along the retino-thalamic pathway and exerts a modulatory action on axon guidance. These effects are specific to CB2R since no changes were observed in mice where the gene coding for this receptor was altered (*cnr2<sup>-/-</sup>*). The CB2R induced morphological changes observed at the growth cone are PKA dependent and require the presence of the netrin-1 receptor, Deleted in Colorectal Cancer. Interfering with endogenous CB2R signalling using pharmacological agents increased retinal axon length and induced aberrant projections. Additionally, *cnr2<sup>-/-</sup>* mice showed abnormal eye-specific segregation of retinal projections in the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) indicating CB2R's implication in retinothalamic development. Overall, this study demonstrates that the contribution of endocannabinoids to brain development is not solely mediated by CB1R, but also involves CB2R.



## Introduction

The endogenous cannabinoid system comprises the endocannabinoids (eCBs), the enzymes involved in their synthesis and degradation, and their receptors [1]. Type 1 (CB<sub>1</sub>R) and type 2 (CB<sub>2</sub>R) are the principal receptors characterized so far [2]. CB<sub>2</sub>R was first observed in peripheral and immune tissues [3] and there are increasing evidences that it is also expressed in neurons. For example, CB<sub>2</sub>Rs are found in mouse cerebellum[4] as well as in rat dorsal root ganglia neurons and neuronal progenitors [5], [6]. The presence of CB<sub>2</sub>R was also reported in brainstem, cerebellar and hippocampal pyramidal neurons of adult mammals [7], [8]. Moreover, this receptor [9] and its mRNA [10] have also been reported in the adult rat retina. There is no evidence as yet of its expression in the developing neurovisual system.

In 2000, Fernandez-Ruiz *et al* proposed that the eCB system is involved in numerous processes regulating the development of the Central Nervous System (CNS) [11]. eCBs, through CB<sub>1</sub>R, modulate pyramidal cell progenitor proliferation and immature pyramidal cell migration. Furthermore, CB<sub>1</sub>R deletion causes deficits in pyramidal cell fasciculation [12]. Deficiencies in fasciculation and axonal growth have also been reported following pharmacological activation of CB<sub>1</sub>R in chick, and gene knockdown in zebrafish [13]. Its role in axon guidance has been shown in GABAergic interneurons, where its activation induced growth cone collapse resulting in chemorepulsion [14]. Recently, we demonstrated that CB<sub>1</sub>R modulates retinal projection axon guidance and development [15]. Although the implication of CB<sub>2</sub>R in proliferation, differentiation and survival of neuronal cells is well documented [16]–[18], no emphasis has been put on its putative role on axon guidance during CNS development. Because eCB levels fluctuate in the brain during development [19] and since the

presence of CB<sub>2</sub>R has been reported in the developing CNS, it is plausible to speculate that eCBs, via CB<sub>2</sub>R, affect axonal navigation.

During the development of the visual system, Retinal Ganglion Cell (RGC) axons navigate from the retina to their thalamic and midbrain targets. In rodents, they steer towards the optic chiasm where the majority of axons decussate to reach the contralateral side while a small contingent remains ipsilaterally. When axons reach their main targets, namely the dLGN and the superior colliculus (SC), they form synaptic connections [20].

Our study indicates that the pharmacological and genetic manipulations of CB<sub>2</sub>R activity affect RGC growth and retinothalamic development. Importantly and similar to CB<sub>1</sub>R, CB<sub>2</sub>R-induced reorganization of the growth cone implicates the cAMP/PKA pathway and the DCC receptor. The present study is the first demonstration that CB<sub>2</sub>R is expressed in the developing visual system and that it plays a role in axon guidance and brain wiring.

## **Materials and Methods**

Protocols for animal experimentation were approved by the *Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux* of the University of Montreal (Permit numbers: 12–071, 12–080, and 12–081) and handled in accordance to the Canadian Council on Animal Care recommendations.

## Reagents

Antibody raised against GAPDH, Bovine serum albumin (BSA), ciliary neurotrophic factor (CNTF), dibutyl cAMP (db-cAMP), DNase, dextran-FITC, forskolin (FSK), Hoechst 33258, insulin, KT5720, laminin, rabbit polyclonal anti-CB1R, monoclonal anti- $\beta$ -actin, monoclonal anti-MAP Kinase (Diphosphorylated Erk-1&2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, selenium, apo-transferrin, triiodo-thyronine, and trypsin were purchased from Sigma (Oakville, ON). Rabbit anti-mouse macrophage and mouse anti-Thy-1.2 monoclonal IgM ( $\mu$  chain specific) were obtained from Accurate Chemical (Westbury, NY). B27, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), Fetal Bovine Serum (FBS), glutamine, N2, neurobasal media, penicillin-streptomycin, S-MEM and sodium pyruvate were bought from Invitrogen Canada (Burlington, ON). Antibodies directed against NCAM, neurofilament-L, p-AKT (ser473), AKT, p-S6 (ser235/236), S6, p-PKA C (thr197), and PKA C- $\alpha$  were from Cell Signaling Tech (Beverly, MA). Normal donkey serum (NDS) and normal goat serum (NGS) were purchased from Jackson Immuno (West Grove, PA). Shandon ImmuMount was bought from Thermo Scientific (Pittsburgh, PA). AM630, JTE907, JWH015, and JWH133 were acquired from Tocris Bioscience (Ellisville, MI). Primary antibodies raised against Brn3a, GAP-43, p-ERK1/2, ERK1/2, and cAMP were from Chemicon International (Temecula, CA). Monoclonal DCC antibodies against extracellular (DCC<sub>EX</sub>, G92-13) or intracellular (DCC<sub>IN</sub>, G97-449) epitopes of DCC were obtained from PharMingen (Mississauga, ON, Canada). Anti-DCC<sub>FB</sub> AF5, H89, LNAC, LY294002 and rapamycin were purchased from EMD (La Jolla, CA). Primary antibody against L1 and alexa fluor conjugated secondary antibodies (Alexa-488 and Alexa-546) were obtained from Invitrogen. Avidin-biotin-peroxidase complex

ABC Kit, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)-Nickel, and donkey anti-goat biotinylated secondary antibody were from Vector Labs (Burlingame, CA). The B fragment of the cholera toxin (CTb) and goat anti-CTb were from List Biological Laboratories (Campbell, CA). Rabbit polyclonal anti-CB<sub>2</sub>R, its blocking peptide (human CB<sub>2</sub>R amino acid sequence 20–33 (NPMKDYMILSGPQK)), and rabbit polyclonal anti-MGL were purchased from Cayman (Ann Arbor, Michigan). Goat polyclonal anti-CB<sub>2</sub>R was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The monoclonal anti-Netrin 1 (MAB1109) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) and the polyclonal anti-Netrin 1 (PN2) was kindly provided by Pr. Timothy Kennedy (Montreal Neurological Institute, Montreal, QC). Anti-NAPE-PLD and anti-DAGL $\alpha$  were kind gifts from Ken Mackie (Department of Psychological & Brain Sciences, Indiana University, Bloomington, IN).

## **Purified Retinal Ganglion Cell Culture**

Retinal ganglion cells (RGC) from P7-P8 mice (Charles River, St-Constant, QC) were purified and cultured according to a protocol previously described by Barres *et al.* [21]. In brief, following enucleation, retinas were dissected and enzymatically dissociated, at 37°C for 30 min, in a papain solution (15 U/ml in DPBS) containing 1 mM L-cysteine. The retinas were then triturated sequentially, with a 1 ml pipette, in a solution containing ovomucoid (1.5 mg/ml), DNase (0.004%), BSA (1.5 mg/ml) and rabbit antibodies directed against mouse-macrophage (1:75) to yield a suspension of single cells. The suspension was then centrifuged and washed in a high concentration ovomucoid-BSA solution (10 mg/ml for each in DPBS). The dissociated cells were resuspended in DPBS containing BSA (0.2 mg/ml) and insulin (5  $\mu$ g/ml).

RGCs were purified using the two-step panning procedure [21], [22]. Briefly, to remove macrophages, the retinal suspension was incubated at room temperature in petri dishes coated with affinity-purified goat anti-rabbit IgG (H+L). The nonadherent cells were then transferred to a petri dish that had been coated with affinity purified goat anti-mouse IgM ( $\mu$  chain specific) followed by anti-Thy-1.2 monoclonal IgM. The adherent RGCs were first released enzymatically by incubating them in a 0.125% trypsin solution at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> followed by manually pipetting an enzyme inhibitor solution (30% FBS in Neurobasal) along the surface of the dish.

Purified RGCs were plated on poly-D-lysine (10  $\mu$ g/ml) and laminin (5  $\mu$ g/ml) coated glass coverslips (number 0 Deckgläser; Carolina Biological, Burlington, NC) in 24-well plates. RGCs were cultured in 600  $\mu$ l of serum-free medium modified from Bottenstein and Sato [23]. Neurobasal media was supplemented with B27, selenium, putrescine, triiodo-thyronine, transferrin, progesterone, pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), ciliary neurotrophic factor (CNTF; 10 ng/ml), brain-derived neurotrophic factor (BDNF; 50 ng/ml), insulin (5  $\mu$ g/ml), and FSK (10  $\mu$ M). RGCs were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

## **Primary Neuron Culture**

Staged pregnant mice were obtained from Charles River (St-Constant, QC). E14–15 mouse embryo cortices were isolated surgically and transferred in a vial containing 2 ml S-MEM at 37°C supplemented with 2.5% trypsin and 2 mg/ml DNase for 15 minutes. The pellet was then transferred into 10 ml S-MEM with cold 10% FBS and stored at 4°C. Following centrifugation, pellet was transferred in 2 ml S-MEM with 10% FBS and triturated 3 or 4 times to yield to a suspension of single neurons. Then, 10 ml of Neurobasal medium was

added to this suspension. Dissociated cells were counted and plated on 12 mm poly-D-lysine treated glass coverslips (20 µg/ml; 50 000 cells/well). Cells were cultured for 2 days *in vitro* (DIV2) in Neurobasal medium containing 1% B-27, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25% N2 and 0.5 mM glutamine for growth cone analysis. Then, neurons were treated with, either CB<sub>2</sub>R agonists (300 nM JWH133 or JWH015), CB<sub>2</sub>R inverse agonists (300 nM AM630 or JTE907), adenylyl cyclase activator (10 µM FSK), PKA inhibitors (200 nM KT5720 or 2 µM H89) or DCC function blocking (3.5 µg/ml anti-DCC<sub>FB</sub> AF5) for 1 hour for growth cone morphology experiments or for 15 minutes for cAMP immunocytochemistry.

## **Retinal Explant Culture**

E14–15 mouse embryo retinas were isolated and dissected in small segments in ice cold DPBS and plated in 24 well plates on 12 mm poly-D-Lysine (20 µg/ml) and laminin (5 µg/ml) treated glass coverslips. Explants were cultured in Neurobasal supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 5 µg/ml LNAC, 1% B27, 40 ng/ml selenium, 16 µg/ml putrescine, 0.04 ng/ml triiodo-thyronine, 100 µg/ml transferrin, 60 ng/ml progesterone, 100 µg/ml BSA, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 10 ng/ml ciliary neurotrophic factor (CNTF), 5 µg/ml insulin, and 10 µM FSK. Explants were treated for 15 hours at DIV0 (1 hour following plating) for outgrowth analysis or for 1 hour at DIV1 for growth cone analysis assay. Photomicrographs for outgrowth analysis were taken using an Olympus BX51WI microscope (Olympus Canada, Markham, ON) with a 10X objective lens and analyzed using Image Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD). The total length of axon bundles was quantified and expressed as mean ± SEM. Statistical significance of differences

between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

## **Immunocytochemistry**

Plates were washed with cold PBS (pH 7.4) and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes. Primary neuron and retinal explants cultures were blocked in 2% NGS and 2% BSA in PBS during 30 minutes at room temperature. Antibodies were added overnight in a blocking solution at the following concentrations: anti-GAP-43 1:1,000, anti-CB<sub>2</sub>Rsc 1:100, anti-CB<sub>2</sub>Rcayman 1:500, anti-MGL 1:500, anti-L1 1:500, anti-cAMP 1:1,000, anti- $\beta$ -actin 1:1,000, anti-NFL 1:500, anti-NAPE-PLD 1:200, anti-DAGL $\alpha$  1:200, anti-DCC<sub>IN</sub> 1:500. The following day, the neurons or explants were washed with PBS-tween (PBST), incubated with secondary antibodies Alexa 488 or 546 for 2 hours at room temperature. Nuclei were labeled with Hoechst 33258 and coverslips were mounted with ImmuMount (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

## **Quantification of cAMP Immunoreactivity**

All photomicrographs used for quantification were taken using an inverted Olympus IX71 microscope (Olympus Canada, Markham, ON) with a 60X objective lens and identical exposure time to allow for comparison of measurements. Fluorescence intensity at the growth cone was corrected for background noise and quantified using Image Pro Plus 5.1 software. For growth cone analysis, both Differential Interference Contrast (DIC) and fluorescent images were taken. Fluorescence intensity per squared micrometer is expressed as the mean  $\pm$

SEM. Statistical significance was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

## **Western Blots**

Hamster pups were sacrificed at various ages, namely: P1, 3, 5. They were deeply anesthetized by hypothermia. Eyes were immediately removed for Western blot analysis. The retinas were dissected on ice, homogenized by hand using a sterile pestle in RIPA lysis buffer, supplemented with a protease inhibitor mixture (aprotinin, leupeptin, pepstatin, and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). Samples were then centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 10 min and the supernatant was extracted and stored. Protein contents were equalized using a BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Fischer scientific, Ottawa, ON). In another set of experiments, dissociated mouse primary neurons were cultured for 2 DIVs at a density of approximately 250,000 cells/dish in 35 mm poly-D-lysine coated dish. After 10-minute treatment with CB<sub>2</sub>R agonists (300 nM JWH133 or JWH015), CB<sub>2</sub>R inverse agonists (300 nM AM630 or JTE907), or adenylyl cyclase activator (10 μM FSK), neurons were washed once with ice-cold PBS and lysed with Laemmli sample buffer. Western blot analysis was performed using anti-CB<sub>2</sub>Rcayman 1:1,000, anti-CB<sub>1</sub>R 1:1,000, anti-β-actin 1:5,000, anti-GAPDH 1:20,000, anti-p-PKA C 1:1,000, anti-PKA C $\alpha$  1:1,000 anti-DCC<sub>IN</sub>1:2,000, anti-NCAM 1:5,000, anti-ERK1/2 1:5,000, anti-p-ERK1/2 1:2,000, anti-AKT 1:1,000, anti-p-AKT 1:1,000, anti-S6 1:2,000, anti-p-S6 1:2,000 overnight at 4°C. Results were visualized using the Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus kit (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Immunoreactivity was imaged with a ScanJet 5300C (Hewlett Packard Canada, Mississauga, ON, Canada).



## **Surface Biotinylation**

E14–15 neurons were plated and cultured for 2 days at a density of 2,000,000 cells per 100 mm PDL-coated tissue culture dish. On day 2, cells were treated with CB<sub>2</sub>R inverse agonists (300nM AM630 or JTE907), PKA inhibitors (200 nM KT5720 or 2 μM H89), adenylylate cyclase activator (10 μM FSK), or vehicle for 15 min. Neurons were then washed with ice-cold PBS containing 0.1 mM calcium chloride and 1 mM magnesium chloride, pH 7.4, to halt protein trafficking. Surface biotinylation was performed by adding EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Scientific, Rockford, IL), 5 ml per plate at 0.5 mg/ml in PBS at 4°C for 30 min, removed, and the reaction was quenched by the addition of 5 ml of 10 mM ice-cold glycine in PBS at 4°C for two 10 min periods. Subsequently, neurons were washed twice with 5 ml of ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer. Biotinylated proteins were precipitated with streptavidin–agarose (Thermo Scientific) and analyzed by Western blot.

## **Growth Cone Behavior Assay**

Retinal explants were cultured in borosilicate-chambered coverglass (Lab-Tek; Rochester, NY). At DIV1, explants were installed in a Live Cell chamber (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) (Neue Bioscience, Camp Hill, PA) mounted to an inverted Olympus IX71 microscope. Glass micropipettes with an orifice of 2–3 μm diameter were positioned at 45° and 100 μm away from the growth cone of interest. A concentration gradient was created using a micro-injector (Picoplus, Harvard Apparatus - Model 702213).

## Intraocular Injections

Syrian golden hamsters (Charles River, St-Constant, QC) were used for intraocular injections. These mammals are born with a relatively premature nervous system [24]. Compared with rats and mice, hamsters have a shorter gestation period. The gestation periods are 21.5, 18.5 and 15.5 days for rats, mice and hamsters, respectively [24]. The neural events that characterize the development of the mouse and hamster nervous system, including the neuro-visual system, occur at almost identical time points of embryonic development [24]. For example, RGC generation starts at E9.5 for hamsters and E10.5 for mice while the dLGN starts to develop at E10.5 for both models [24], [25]. At birth (postnatal day 0, P0), RGC axons have not all reached their thalamic and midbrain targets in hamster. By P3, virtually all RGC axons have reached their targets [26]. To take advantage of this opportunity, 1 day after birth (P1), hamsters received a 2  $\mu$ l unilateral injection of a 1% solution of the beta subunit of the cholera toxin coupled to FITC (CTb-FITC), a highly sensitive anterograde tracer, in either 0.9% saline solution, 300  $\mu$ M JWH133 (CB<sub>2</sub>R agonist) or 300  $\mu$ M AM630, a CB<sub>2</sub>R inverse agonist. Briefly, under an operating microscope, a small incision was made in the eyelids to access the right eye; the injections were administered using a glass micropipette attached to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe. The micropipette was carefully inserted into the vitreous at an angle to avoid damaging the lens. Following the injection, the eyelids were closed with surgical glue (Vetbond; 3 M, St-Paul, MN). The same surgical procedures were performed using adult mice where the gene coding for the CB<sub>2</sub>R was genetically modified to produce non-functional CB<sub>2</sub>R (*cnr2*<sup>-/-</sup>). In these series of experiments, adult mice (*cnr2*<sup>-/-</sup> and their wildtypes (*cnr2*<sup>+/+</sup>)) were injected in the right eye with the CTb-Alexa-546 and the left one received an

injection of CTb-Alexa-488. Four days following the injections, animals were perfused transcardially with 0.1 M PBS followed by 4% paraformaldehyde in PBS. The brains were removed, postfixed overnight at 4°C, cryoprotected by infiltration of buffered sucrose, flash frozen and kept at -80°C until further processing.

## **Immunohistochemistry**

The presence of the CB<sub>2</sub>R during early postnatal development was investigated by immunohistochemistry. The RGCs were labeled with Brn3a. Retinal sections were washed in 0.1 M PBS, post fixed for 5 minutes in a 70% solution of ethanol, rinsed in 0.03% Triton X-100 buffered saline and blocked in 10% normal donkey serum (NDS, Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA) and 0.5% Triton X-100 in buffered saline for 1 h. The sections were then co-incubated overnight in rabbit anti-CB<sub>2</sub>R (1:200, Cayman) solution with a mouse anti-Brn3a. After incubation with the primary antibodies, the sections were washed in buffered saline, blocked for 30 minutes and incubated for 1 h with secondary antibodies: Alexa donkey anti-rabbit 555 for CB<sub>2</sub>R and Alexa donkey anti-mouse 488 for syntaxin (Molecular Probes, Eugene, OR). After washes in buffered saline, the sections were mounted with a homemade PVA-Dabco mounting medium [27]. Photomicrographs were taken using a Leica TCS SP2 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Exton, PA). Images were captured in the Alexa fluo 555/546 and Alexa fluo 488/FITC channels, pseudo-colored, merged and exported using Leica LCS software (version 2.61). The pictures were taken sequentially to ensure no 'Bleed-through' between channels.

The presence of the CB<sub>2</sub>R in the hamster neuro-visual brain (dLGN, SC, and visual cortex) was also assessed using immunohistochemistry. Forty µm thick coronal sections of tissue

comprising the dLGN, SC or visual cortex were pre-incubated for 20 min at room temperature in PBS 0.1 M containing 0.3% hydrogen peroxide, followed by 1 h in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 3% Normal Donkey Serum. The sections were then incubated for 48 h at 4°C in the blocking solution (PBS 0.3% Triton X-100 with 0.5% Donkey Serum) containing rabbit anti-CB<sub>2</sub>R (1:200). Subsequently, sections were rinsed and immersed in a blocking solution for 30 min. Sections were then incubated in a blocking solution containing donkey anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:200) for 2 h and then for 1 h in the avidin-biotin complex (ABC Elite). After each incubation step, rinses were carried out in PBS containing 0.3% Triton. A peroxidase-substrate kit Vector DAB-Nickel was used to develop the reaction product during a period of 4 min. Sections were then mounted onto slides, dehydrated and coverslipped with Permount. Photographs were taken with a microscope by MicroBrightField digital system (Williston, VT).

The effects of intraocular injection of CB<sub>2</sub>R agonist and inverse agonist were visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described [28]. Briefly, 40 µm thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 20 min. After several washes, they were incubated in 0.1 M glycine solution for 30 min, and then blocked overnight at 4°C. Sections were subsequently rinsed and immersed for 48 h at room temperature in a solution-containing goat 1:4000 anti-CTb diluted in blocking solution. Afterwards, sections were rinsed and incubated 1 h with a biotinylated donkey secondary antibody directed against goat diluted in blocking solution (1:200). Tissue was rinsed and subsequently processed using an avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit (1:100) for 1 h, in the dark and at room temperature. Sections were then rinsed and preincubated in DAB/PBS for 5 min. The peroxidase was visualized by adding 0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the DAB solution for 5–

10 min. Sections were finally washed five times with PBS, mounted on gelatin-chrome alum-subbed slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA). Photomicrographs were taken with an Olympus BX51WI microscope (Olympus Canada, Markham, ON) using a 10X objective lens. Images were analyzed with Image Pro Plus 5.1 software.

## **Retinothalamic and Retinogeniculate Projection Analyses**

Axon branch growth was quantified on consecutive photomicrographs of coronal slices of brain tissue, as described previously [28], comprising the lateral terminal nucleus. Briefly, the distance between the lateral border of the nucleus of interest and the tips of the longest axon branches was measured and normalized for interthalamic distance. Axon collateral density was also quantified for the lateral terminal nucleus using an adaptation of the Sholl technique [29]. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Sheffe's post hoc test (Systat).

For eye specific segregation studies in the dLGN, *cnr2*<sup>-/-</sup> and *cnr2*<sup>+/+</sup> adult mice were injected with the B fragment of the cholera toxin (CTb) conjugated to Alexa -546 (CTb-546; red) into the left eye and CTb-488 (green) into the right eye (1.5–2  $\mu$ l; 0.5% in sterile saline). Forty-eight hours later, brain tissue was harvested and postfixed overnight in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose and then sectioned coronally at 40  $\mu$ m thickness, mounted onto slides and coverslipped with Immu-Mount. Images were collected and quantified by an observer "blind" to the experimental conditions to minimize any bias. Universal gains and exposures were established for each label. Raw images of the dLGN were imported to Matlab and an area of interest comprising the dLGN was cropped excluding the ventral lateral geniculate nucleus

and the intergeniculate leaflet, then the degree of left and right eye projection overlap was quantified using an established multi-threshold method of analysis [30]–[32]. This approach allows for a better analysis of overlapping regions independent of the threshold. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Significance of differences between means was evaluated by student t-test analysis (Systat).

## Results

### Spatio-Temporal Localization of CB<sub>2</sub>R in the Developing Visual System

Despite emerging evidence supporting the presence of the eCB system in the developing CNS, the expression of CB<sub>2</sub>R is not well characterized in the developing neurovisual system. In order to explore the implication of CB<sub>2</sub>R during retinal axon guidance, we assessed its expression *in vivo*. Western blot analysis of retina lysates revealed that CB<sub>2</sub>R is expressed at early postnatal stages (Figure 1A). CB<sub>2</sub>R levels increased from postnatal day 1 *in vitro* (P1) to P5 while CB<sub>1</sub>R expression remained unchanged (Figure 1A). The specificity of the antibody directed against CB<sub>2</sub>R was tested using retinas obtained from adult *cnr2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1B–C) and P1 hamsters (Figure 1D–I). The spatio-temporal expression of CB<sub>2</sub>R was investigated in the RGC and RGC fiber layers (Figure 1D–O), SC (Figure 2A, B), dLGN (Figure 2C–F), and visual cortex (Figure 2G–J). During early postnatal development, this receptor is expressed in the retina, the dLGN, the SC, and the visual cortex at all ages investigated.

Overall, these results demonstrate that CB<sub>2</sub>R is indeed found in the developing neurovisual system.

### **CB<sub>2</sub>R is Expressed in RGCs and their Growth Cones *in Vitro***

Western blot analysis of retinal ganglion cell culture lysates revealed that these neurons express CB<sub>2</sub>R for several DIVs (Figure 3A). Similar to what we observed *in vivo*, CB<sub>2</sub>R level increased from DIV1 to DIV5 while CB<sub>1</sub>R expression remained unchanged (Figure 3A).

The expression pattern of CB<sub>2</sub>R was assessed by immunocytochemistry in retinal explants obtained from mouse embryos. At DIV1, CB<sub>2</sub>R expression was observed in RGC neurites, growth cones, and filopodia (Figure 3B, E, H). Both CB<sub>2</sub>R and CB<sub>1</sub>R are expressed in the growth cone (Figure 3B–D). The CB<sub>2</sub>R immunoreactivity was also observed in primary cortical neuron cultures at DIV2 (Figure 3T). Western blot analysis of primary neuron culture lysates revealed that these neurons express CB<sub>2</sub>R for several DIVs (Figure 3U).

Diacylglycerol lipase  $\alpha$  (DAGL $\alpha$ ) and N-acyl phosphatidylethanolamine-phospholipase D (NAPE-PLD), enzymes involved in the synthesis of the main eCBs: 2-arachidonylglycerol (2-AG) and arachidonylethanolamine (AEA) respectively, as well as monoacylglycerol lipase (MGL), an enzyme implicated in the degradation of 2-AG, are also expressed in the growth cones, filopodia and neurites of RGCs (Figure 3K–S). These results demonstrate the presence of functional CB<sub>2</sub>Rs in retinal neurites and growth cones suggesting their implication during growth cone navigation.

## CB<sub>2</sub>R Reorganizes growth cone morphology

The implication of the CB<sub>2</sub>R during axon navigation was evaluated in mouse E14–15 retinal explant and primary neuron growth cones (Figure 4). Because hamsters are born with a premature nervous system, we believe that E14–15 mouse retinal explants are at similar developmental stages than a retina from a newborn hamster.

The growth cone surface area was greatly reduced when CB<sub>2</sub>R agonists (JWH015 or JWH133) were added to the culture; conversely, the surface area was increased following CB<sub>2</sub>R inverse agonist (AM630 or JTE907) stimulation (Figure 4B and E). In addition, the use of agonists caused a decrease in the number of filopodia at the growth cone, while inverse agonists increased their number (Figure 4C and F). These results demonstrate that CB<sub>2</sub>R regulation can directly influence growth cone morphology.

Previous studies have demonstrated the implication of the CB<sub>1</sub>R in GABAergic interneurons and retinal axons axon development [14], [15]. Since both receptors are expressed in the developing visual system, it is possible that CB<sub>1</sub>R contributes to the growth cone reorganization induced by JWH015, JWH133, AM630 and JTE907. We addressed this possibility using pharmacological and genetic approaches. Addition of CB<sub>2</sub>R inverse agonists (AM630 and JTE907) to retinal explants obtained from *cnr1*<sup>-/-</sup> embryos produced a significant increase in growth cone area and filopodia number while adding CB<sub>2</sub>R agonists (JWH015 and JWH133) decreased growth cone surface and filopodia number (Figure 5A and B). These changes are comparable to those observed in retinal explants obtained from *cnr1*<sup>+/+</sup> embryos. Addition of these pharmacological agents to retinal explants derived from *cnr2*<sup>+/+</sup> mouse embryos induced similar effects. As predicted, these effects were



completely abolished in retinal explants obtained from *cnr2*<sup>-/-</sup> embryos (Figure 5C and D). In another set of experiments, deletion of *cnr2* induced a significant increase in growth cone surface area and in filopodia number compare to wildtype (Figure 5E). These results confirm the contribution of the CB<sub>2</sub>R in the modulation of growth cone behavior. In addition, the effects of AM630, JTE907, JWH015, and JWH133 on the growth cone can be directly attributed to CB<sub>2</sub>R. Noteworthy, ACEA and AM251 (CB<sub>1</sub>R specific ligands) stimulation did not produce any effects on *cnr1*<sup>-/-</sup> growth cones (Figure 5A and B). We observed similar results in primary cortical neurons from these transgenic animals (unpublished observations). Taken together, these results demonstrate that CB<sub>2</sub>R influences growth cone morphology independently from CB<sub>1</sub>R.

## **CB<sub>2</sub>R Modulates RGC Axon Outgrowth**

To assess whether CB<sub>2</sub>R could affect axonal growth, E14–15 mouse retinal explants were exposed to CB<sub>2</sub>R agonists or inverse agonists for 15 hours at DIV0 (Figure 6A). Treatment with CB<sub>2</sub>R agonists (JWH015 or JWH133) reduced total projection length of the explants whereas addition of CB<sub>2</sub>R inverse agonists (AM630 or JTE907) increased it (Figure 6B). Retinal fibers emerging from the explants were labeled with L1 antibody to ensure that all the neurites quantified were RGC axons since they are the only neurons that express this protein in the mouse retina [33]. These results demonstrate that CB<sub>2</sub>R influences RGC fiber extension. To ascertain that these effects were CB<sub>2</sub>R specific, we performed the same experiment using *cnr2*<sup>-/-</sup> retinal explants. In contrast to *cnr2*<sup>+/+</sup> cultures, *cnr2*<sup>-/-</sup> retinas did not demonstrate significant changes in projection length following CB<sub>2</sub>R agonist and inverse agonist treatment (Figure 6B). This indicates that these pharmacological agents are selective for the CB<sub>2</sub>R and

that this receptor modulates retinal axon growth *in vitro*. Interestingly, we found an increase in axon outgrowth in retinal explants obtained from *cnr2<sup>-/-</sup>* embryos (Figure 6C). This confirms our pharmacological results showing that CB<sub>2</sub>R inhibits axon outgrowth.

## **CB<sub>2</sub>R Agonists Modulate Growth Cone Behaviour**

CB<sub>1</sub>R can mediate GABAergic interneurons growth cone repulsion *in vitro* [14]. Recently, we demonstrated that CB<sub>1</sub>R also modulates growth cone turning in glutamatergic neurons (RGCs) [15]. To evaluate whether CB<sub>2</sub>R is involved in retinal axon growth cone steering, turning assay experiments were performed on embryonic mice retinal cultures (Figure 7A). A microgradient application of JWH015 and JWH133 induced growth cone collapse and neurite retraction while AM630, elicited attractive turning (Figure 7 B–E). The vehicle (EtOH) did not induce any significant changes in growth cone direction. The concentration gradient was visualized with immunofluorescent dextran-FITC (Figure 7F), indicating that the drugs reached the growth cone. These results show that CB<sub>2</sub>R can modify axon growth and steering, and that its agonists can act as chemorepulsive signals on RGC growth cones.

## **CB<sub>2</sub>R-Induced Growth Cone Morphological Changes Require**

### **PKA Activity**

Endocannabinoids and their CB<sub>2</sub>R have a diverse range of signal transduction mechanisms. Since it is well documented that stimulation of CB<sub>2</sub>R and subsequent activation of G<sub>i/oα</sub> inhibits adenylyl cyclase (AC)[34], we tested whether CB<sub>2</sub>R modulates the cAMP/PKA pathway during axon growth and guidance. We evaluated changes in growth cone intracellular cAMP levels following CB<sub>2</sub>R modulation using an antibody raised against cAMP (Figure 8A).

In  $cnr2^{+/+}$ , the CB<sub>2</sub>R agonists (JWH015 or JWH133) decreased cAMP levels at the growth cone as indicated by the lower fluorescence intensity compared with the control group (Figure 8A–B). Conversely, CB<sub>2</sub>R inverse agonists (AM630 or JTE907) as well as AC activator (forskolin) increased cAMP levels (Figure 8A–B). In  $cnr2^{-/-}$ , CB<sub>2</sub>R agonists and inverse agonists did not produce any significant variation of cAMP levels. It is noteworthy that, under control conditions, deletion of *cnr2* significantly increases growth cone cAMP level (Figure 8B<sup>1</sup>). In another set of experiments, PKA phosphorylation was significantly lower following CB<sub>2</sub>R agonist stimulation while the opposite was observed following inverse agonist or FSK application as indicated by western blot analysis (Figure 8C). To further assess the implication of the cAMP/PKA pathway, primary neuron cultures were first treated with PKA-selective inhibitors followed by pharmacological manipulation of the CB<sub>2</sub>R. PKA inhibition (KT5720 or H89) blocked AM630-induced increases in growth cone surface area and filopodia number (Figure 8D–F). JWH133 abolished FSK-induced growth cone surface and filopodia increases (Figure 8D–F). These data demonstrate that CB<sub>2</sub>R activation modulates growth cone morphology via the cAMP/PKA pathway.

Upon activation, CB<sub>2</sub>Rs can also recruit other distinct second-messenger cascades including ERK1/2, PI3K/AKT and mTOR/S6K [35]–[37]. The implication of these signaling cascades was tested using western blot analysis. Interestingly, in primary neuron cultures, 10 min stimulation of the CB<sub>2</sub>R did not induce changes in AKT, ERK1/2, or S6 phosphorylation levels (Figure 8G). To validate these observations, the experiments were repeated for a 15 min stimulation period without any discernible activation of these pathways (data not shown). Altogether, these results demonstrate that the growth cone morphology reorganization induced

by CB<sub>2</sub>R is dependent upon the cAMP/PKA pathway and not of ERK1/2, AKT or S6 signaling cascades.

## **Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Receptor is required for**

### **CB<sub>2</sub>R Action on Growth Cone**

Growth cone cytoskeleton reorganization in response to guidance cues is the main mechanism by which axons navigate toward their target cells [38]. Netrin is a chemotropic factor implicated in axonal guidance [39] and DCC, a transmembrane immunoglobulin superfamily receptor, is one of its receptors [40]. Growth cone morphology can be modified by DCC activation through substrate adhesion to netrin-1 and the recruitment of actin organization complex [41].

The cAMP/PKA pathway has been suggested to influence the growth cone's sensitivity to netrin-1 [42]. In fact, activation of PKA increases netrin-dependent recruitment of DCC to the plasma membrane [43], [44]. Our results suggest that the cAMP/PKA pathway functions as a downstream effector for eCBs during growth cone guidance. Since CB<sub>2</sub>R, DCC, and netrin-1 are expressed in developing neurons (Figure 9A–D), it is reasonable to investigate the potential interactions between these molecules. DCC is widely expressed in RGCs [45] and cortical neurons [44] during development. Recently, we reported its presence in embryonic retinal explant axons, growth cones and filopodia [15]. Furthermore, DCC colocalizes with CB<sub>2</sub>R in these axons (Figure 9A–C). Hence, using pharmacological and genetic approaches, we investigated the potential interaction between these two receptors. First, we examined the effect of perturbing DCC function on CB<sub>2</sub>R evoked growth cone remodeling. Adding a DCC

function-blocking antibody ( $\alpha$ DCC<sub>fb</sub>) inhibits the CB<sub>2</sub>R inverse agonists AM630 and JTE907 induced-increase in growth cone surface area and filopodia number (Figure 9E–G). Secondly, CB<sub>2</sub>R agonists or inverse agonists did not induce any significant changes in growth cone area and filopodia number in neurons obtained from *dcc*<sup>-/-</sup> mouse embryos (Figure 9H–L). To determine whether CB<sub>2</sub>R activation modulates DCC trafficking to the plasma membrane, neurons were treated with AM630, JTE907, or FSK. Biotinylating cell surface proteins allowed the assessment of plasma membrane DCC. The relative amount of DCC present on the neuronal surface following the treatments was visualized by western blot analysis (Figure 9M). Interestingly, CB<sub>2</sub>R inverse agonists significantly increased the amount of DCC at the plasma membrane (Figure 9M). FSK also augmented the presence of DCC at the neuronal surface. To verify whether the CB<sub>2</sub>R induced DCC trafficking is upstream or downstream of PKA activation, neuronal cultures were treated with KT5720+AM630 or H89+AM630. As visualized by western blot, inhibition of PKA abolished AM630 induced increases in DCC at the plasma membrane (Figure 9M). Taken together, these results demonstrate that the CB<sub>2</sub>R induced reorganization of the growth cone implicates the presence of functional DCC receptors at the cell membrane.

## **CB<sub>2</sub>R Modulates Retinal Projection Growth and Segregation *in***

### ***Vivo***

Previous study on chick embryos have shown that inhibiting CB<sub>1</sub>R affects axonal growth [13]. Recently, we observed that CB<sub>1</sub>R modulates retinal projections *in vivo* [15]. In addition, retinal cAMP elevation was shown to increase retinal collateral length in the lateral terminal nucleus [28].

To assess the contribution of the CB<sub>2</sub>R pathway during the development of retinal projections *in vivo*, hamsters received intraocular injections of CB<sub>2</sub>R modulators. Compared to rats and mice, hamsters have shorter gestation period. Consequently, they are born with a relatively premature nervous system [24]. To take advantage of this opportunity, 24h after birth (P1), hamsters received a unilateral intraocular injection of AM630 or JWH133. Our data show that collateral projection length at the lateral terminal nucleus was significantly higher in the group treated with a CB<sub>2</sub>R inverse agonist when compared with the untreated group (Figure 10A–C). JWH133 did not affect significantly projection growth. Axon collateral density was also evaluated and branch density was significantly increased in the AM630-treated group (Figure 10D). In addition, interfering with the intrinsic ocular cannabinoid signaling with AM630 induced aberrant projections in the ipsilateral side of the SC as indicated by a robust labeling of retinal axons (Figure 10E).

During perinatal development, RGCs from both eyes send axons, which connect with multiple target cells in the dorsal lateral geniculate nucleus. These projections spread throughout the dLGN sharing common terminal space. During postnatal development, an eye-specific segregation occurs [46]. In the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. The implication of the CB<sub>2</sub>R during retinogeniculate development was further investigated in the dLGN in adult CB<sub>2</sub>R-deficient mice (*cnr2*<sup>-/-</sup>) and their wild-type (*cnr2*<sup>+/+</sup>) littermates. Adult *cnr2*<sup>+/+</sup> and *cnr2*<sup>-/-</sup> mice received a bilateral intraocular injection of the anterograde tracers CTb-Alexa488 in the left and of CTb-Alexa546 in the right eyes, respectively. Our data indicate a significant increase of the overlapping region between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of *cnr2*<sup>-/-</sup> mice (Figure

10F–G). These observations confirm the essential role played by the CB<sub>2</sub>R during retinogeniculate development.

## Discussion

In the present study, we showed that CB<sub>2</sub>R is present throughout the visual pathway during development including *in vitro* primary RGC and retinal explants. CB<sub>2</sub>R activation modulates cAMP levels resulting in a PKA-dependent modification of the growth cone surface area and filopodia number. In addition, we observed that retinal axon outgrowth decreased following CB<sub>2</sub>R agonist treatment while stimulation with inverse agonist increased it. Most importantly, DCC, an axon guidance molecule receptor, is required for CB<sub>2</sub>R mediated morphological changes of the growth cone. *In vivo*, CB<sub>2</sub>R modulated RGC projection length, induced aberrant projections and the absence of this receptor altered eye-specific segregation. Taken together, these observations demonstrate that CB<sub>2</sub>R plays an essential role in the development of the retinothalamic pathway.

The expression of CB<sub>2</sub>R in the adult mammal brain has been previously detected by immunoreactivity [7],[8]. Although this receptor was also localized in developing neural progenitors and dorsal root ganglia [5],[6], its expression in retinal projections and along the visual tract remained unknown until now. Here, we show that RGC axons express CB<sub>2</sub>R and eCBs synthesis enzymes NAPE-PLD and DAGL $\alpha$  as well as degradation enzyme MGL. The receptor is present on axonal projections, growth cones and their filopodia *in vitro*. Moreover, *in vivo*, CB<sub>2</sub>R is localized at several important decision making points along the visual pathway. Indeed, CB<sub>2</sub>Rs are expressed in a spatio-temporal fashion in RGCs, optical

chiasm, dLGN and SC. These results combined with those reported by Argaw et al (2011) clearly demonstrate the presence of the eCB system in the developing neurovisual pathway and strongly suggest its influence on axonal navigation during CNS development.

In this study, CB<sub>2</sub>R effects on growth cone morphology were demonstrated in retinal axons and primary neuron cultures. Both bath application and microgradient stimulation studies showed its action on the growth cone. CB<sub>2</sub>R agonists produced chemorepulsive effect and collapse of the axonal growth cone. Additionally, CB<sub>2</sub>R had an important effect on retinal axon length for both short and long stimulation periods showing its capacity to influence axonal growth rate. These results are similar to those recently observed by our group for CB<sub>1</sub>R [15] and by other laboratories [13], [14], [47].

To characterize the mechanism by which CB<sub>2</sub>R modulates growth cone morphology and axonal growth, we examined an AC dependent signaling pathway [48]. Our study shows that CB<sub>2</sub>R acts by modulating intracellular cAMP concentrations, which directly influence PKA activity. These results are similar to those obtained with CB<sub>1</sub>R [15] but are in contradiction with a study showing that stimulation of CB<sub>1</sub>R with anandamide induced MAPK activation in GABAergic neurons [14]. However, under our experimental conditions, the MAPK signaling pathway was not modulated by CB<sub>2</sub>R. This could be explained in part by the fact that Berghuis et al. (2007) have studied the CB<sub>1</sub>R whereas we studied CB<sub>2</sub>R. Also, the difference in neuron types (GABAergic vs glutamatergic) could also account for the divergence in the downstream signaling pathways. We studied embryonic RGC growth cones that are glutamatergic in nature as compared to GABAergic interneurons favored by the Berghuis *et al.* (2007) study. Elevated cAMP levels in growth cone increase surface area and filopodia



number in RGCs [28]. Adding CB<sub>2</sub>R inverse agonists to the neurons produced the same effect and increased growth cone cAMP levels. Furthermore, we showed that the CB<sub>2</sub>R modulates the cAMP/PKA pathway and that this signaling pathway is essential to the growth cone remodeling. This places PKA as an important downstream determinant for CB<sub>2</sub>R-induced growth cone reorganization.

PKA is not the only important molecule since DCC is also required for CB<sub>2</sub>R-induced growth cone morphology alterations. In the presence of an antibody that blocks DCC function, CB<sub>2</sub>R agonists or inverse agonists induced no changes in growth cone morphology. Furthermore, in *dcc* knockout mice, the absence of a functional DCC blocked the effects of CB<sub>2</sub>R on the growth cone. Earlier reports showed that PKA potentiated the mobilization of DCC to the cell surface [43], [44]. We have confirmed that elevation of PKA activity induces DCC receptor translocation to the plasma membrane through biotinylation analysis. Our results indicate that CB<sub>2</sub>R, which modulates cAMP levels, regulates growth cone expansion via a PKA-dependant mechanism. Variation of PKA activity will modulate the presence of DCC receptors at the growth cone surface and will induce growth cone morphological changes [43], [44]. A similar mechanism was observed with CB<sub>1</sub>R [15].

Recently, it was proposed that CB<sub>1</sub>R stimulation activates RhoA in GABAergic interneurons [14]. Spatially restricted activation of RhoA in the collapsing growth cone is associated with filopodia retraction and growth cone repulsion in response to chemical and electrical cues [49]–[51] through the activation of the serine-threonine kinase Rho kinase (ROCK) [51]. Moore et al. [52] demonstrated that RhoA inhibition recruits DCC to the plasma membrane. Therefore, CB<sub>2</sub>R agonists may, by increasing RhoA activity, prevent the presence

of DCC at the membrane and consequently induce growth cone collapse. Conversely, CB<sub>2</sub>R inverse agonists or antagonists could decrease the activity of RhoA and promote axon growth via the translocation of DCC to the plasma membrane. Evidences from the literature suggest that there is an interaction between the RhoA and PKA pathways. In fact, PKA can directly inhibit RhoA [53]–[55], thus the PKA induced recruitment of DCC to the plasma membrane could result from several mechanisms and the inhibition of RhoA signaling might be one of them. We are currently investigating this possibility.

It is known that CB<sub>1</sub>R agonists induce neurite retraction in neuroblast cells [56] and chemorepulsive effect in GABAergic [14] and glutamatergic neurons [15]. Since CB<sub>2</sub>R can modulate growth cone morphology and its agonists have a repulsive effect on RGC axons, eCBs could act as an inhibitory signal in axon guidance. During brain development where axons travel relatively long distances to connect to specific neurons, CB<sub>2</sub>R could represent another mechanism by which eCBs modulate the guidance response to netrin-1 [42] or other guidance cues. In fact, integration of multiple cues by RGC axons may increase the specificity of their navigation and allow a better target recognition.

We showed that a single intraocular injection of AM630, a CB<sub>2</sub>R inverse agonist, increased the length of projections in the lateral terminal nucleus. Similar effects on growth rate were reported using cAMP analog [28]. We also observed the presence of aberrant ipsilateral RGC projections following a single intraocular injection of AM630. One may argue that the injection increased the branching or stabilized ipsilateral projections that would have normally retracted.

We noticed that adult *cnr2*<sup>-/-</sup> mice have increased overlapping regions of retinal projections from the two eyes in the dLGN compared to *cnr2*<sup>+/+</sup> mice. We interpreted this as a deficit in eye-specific segregation of retinal projections. In wildtype animals, this process could be influenced by eCB activity at the retina and/or directly at the axon terminal. It is possible that non functional CB<sub>2</sub>Rs influence retinal spontaneous activity, which is necessary for segregation and maintenance of specific inputs to the dLGN [57], thus modifying the segregation outcome. Deficiency in eye-specific segregation might also occur as a result of the absence of functional CB<sub>2</sub>R directly at the dLGN. In *cnr2*<sup>-/-</sup> mouse, eCBs would not be able to act as local modulators, inducing retraction of exuberant ectopic branches that have less activity. In fact, eCBs, via their action on CB<sub>2</sub>Rs may contribute to the normal inhibitory environment present in the CNS [58]. It is also reasonable to assume that *cnr2* knockout effect may not be as important as predicted because CB<sub>1</sub>R might in part surrogate CB<sub>2</sub>R activity, especially since main constituents of the eCBs, like 2-AG, have affinity for both receptors types [59], [60].

In conclusion, this study demonstrates for the first time that CB<sub>2</sub>R is involved in axon guidance, and identifies the signaling pathway that mediates its effects. Therefore, we suggest a mechanism by which CB<sub>2</sub>R modulates retinothalamic development and nervous system wiring.

## References

1. Salzet M (2000) Invertebrate molecular neuroimmune processes. *Brain Res Brain Res Rev* 34: 69–79[PubMed]
2. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161–202 [PubMed]
3. Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, et al. (2003) The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 74: 486–496 [PubMed]
4. Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, et al. (1996) The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3984–3989[PMC free article] [PubMed]
5. Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, et al. (2001) Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40: 221–232 [PubMed]
6. Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzman M, et al. (2006) Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *Faseb J* 20: 2405–2407 [PubMed]
7. Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, et al. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310: 329–332 [PubMed]
8. Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, et al. (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071: 10–23 [PubMed]
9. Lopez EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, Lopez-Costa JJ (2011) Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse* 65: 388–392 [PubMed]
10. Lu Q, Straiker A, Maguire G (2000) Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci* 17: 91–95 [PubMed]
11. Fernandez-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* 23: 14–20 [PubMed]

12. Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, et al. (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8760–8765 [PMC free article] [PubMed]
13. Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 38: 89–97 [PubMed]
14. Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, et al. (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316: 1212–1216 [PubMed]
15. Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cecyre B, Chaine N, et al. (2011) Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. *J Neurosci* 31: 1489–1499 [PubMed]
16. Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, et al. (2007) CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci* 25: 629–634 [PubMed]
17. Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, et al. (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65: 999–1007 [PubMed]
18. Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, et al. (2007) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci* 28: 39–45 [PubMed]
19. Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33: 181–191 [PubMed]
20. Erskine L, Herrera E (2007) The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 308: 1–14 [PubMed]

21. Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL (1988) Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1: 791–803[PubMed]
22. Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15: 805–819 [PubMed]
23. Bottenstein J, Sato G (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci* 76: 514–517 [PMC free article] [PubMed]
24. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105: 7–17 [PubMed]
25. Robinson SR, Dreher B (1990) The visual pathways of eutherian mammals and marsupials develop according to a common timetable. *Brain Behav Evol* 36: 177–195 [PubMed]
26. Bhide PG, Frost DO (1991) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J Neurosci* 11: 485–504 [PubMed]
27. Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, et al. (2001) Quantitative Comparison of Anti-Fading Mounting Media for Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Histochem Cytochem* 49: 305–312[PubMed]
28. Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard JF (2008) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Exp Neurol* 211: 494–502 [PubMed]
29. Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87: 387–406 [PMC free article] [PubMed]
30. Torborg CL, Feller MB (2004) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *J Neurosci Methods* 135: 17–26 [PubMed]
31. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, et al. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131: 1164–1178 [PubMed]
32. Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Renteria RC, Liu X, et al. (2006) Neuronal Pentraxins Mediate Synaptic Refinement in the Developing Visual System. *J Neurosci* 26: 6269–6281 [PMC free article][PubMed]

33. Demyanenko GP, Maness PF (2003) The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons. *J Neurosci* 23: 530–538 [PubMed]
34. Prather PL (2008) CB2 Cannabinoid Receptors : Molecular, Signaling, and Trafficking Properties. In: *Cannabinoids and the Brain* (Köfalvi A, ed): 75–90. New York, NY: Springer.
35. Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C (2007) The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 121: 2172–2180 [PubMed]
36. Jaworski J, Sheng M (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 34: 205–219 [PubMed]
37. Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, et al. (2009) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12: 1152–1158 [PubMed]
38. Bovolenta P (2005) Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *J Neurobiol* 64: 405–416 [PubMed]
39. Kennedy TE, Serafini T, de la TorreJR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78: 425–435 [PubMed]
40. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SSY, et al. (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. *Cell* 87: 175–185 [PubMed]
41. Shekarabi M, Moore SW, Tritsch NX, Morris SJ, Bouchard JF, et al. (2005) Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* 25: 3132–3141 [PubMed]
42. Ming G-l, Song H-j, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, et al. (1997) cAMP-Dependent Growth Cone Guidance by Netrin-1. *Neuron* 19: 1225–1235 [PubMed]
43. Bouchard JF, Moore SW, Tritsch NX, Roux PP, Shekarabi M, et al. (2004) Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension. *J Neurosci* 24: 3040–3050 [PubMed]

44. Bouchard J-F, Horn KE, Stroh T, Kennedy TE (2008) Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *Journal of Neurochemistry* 107: 398–417 [PubMed]
45. Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, et al. (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19: 575–589 [PubMed]
46. Godement P, Salaun J, Imbert M (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol* 230: 552–575 [PubMed]
47. Vitalis T, Laine J, Simon A, Roland A, Leterrier C, et al. (2008) The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *Eur J Neurosci* 28: 1705–1718 [PubMed]
48. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, et al. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48: 443–450 [PubMed]
49. Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK (2000) Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* 149: 263–270 [PMC free article] [PubMed]
50. Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, et al. (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5: 38–45 [PubMed]
51. Rajnicek AM, Foubister LE, McCaig CD (2006) Temporally and spatially coordinated roles for Rho, Rac, Cdc42 and their effectors in growth cone guidance by a physiological electric field. *J Cell Sci* 119: 1723–1735 [PubMed]
52. Moore SW, Correia JP, Lai Wing Sun K, Pool M, Fournier AE, et al. (2008) Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1. *Development* 135: 2855–2864 [PubMed]
53. Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, et al. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* 15: 510–519 [PMC free article] [PubMed]

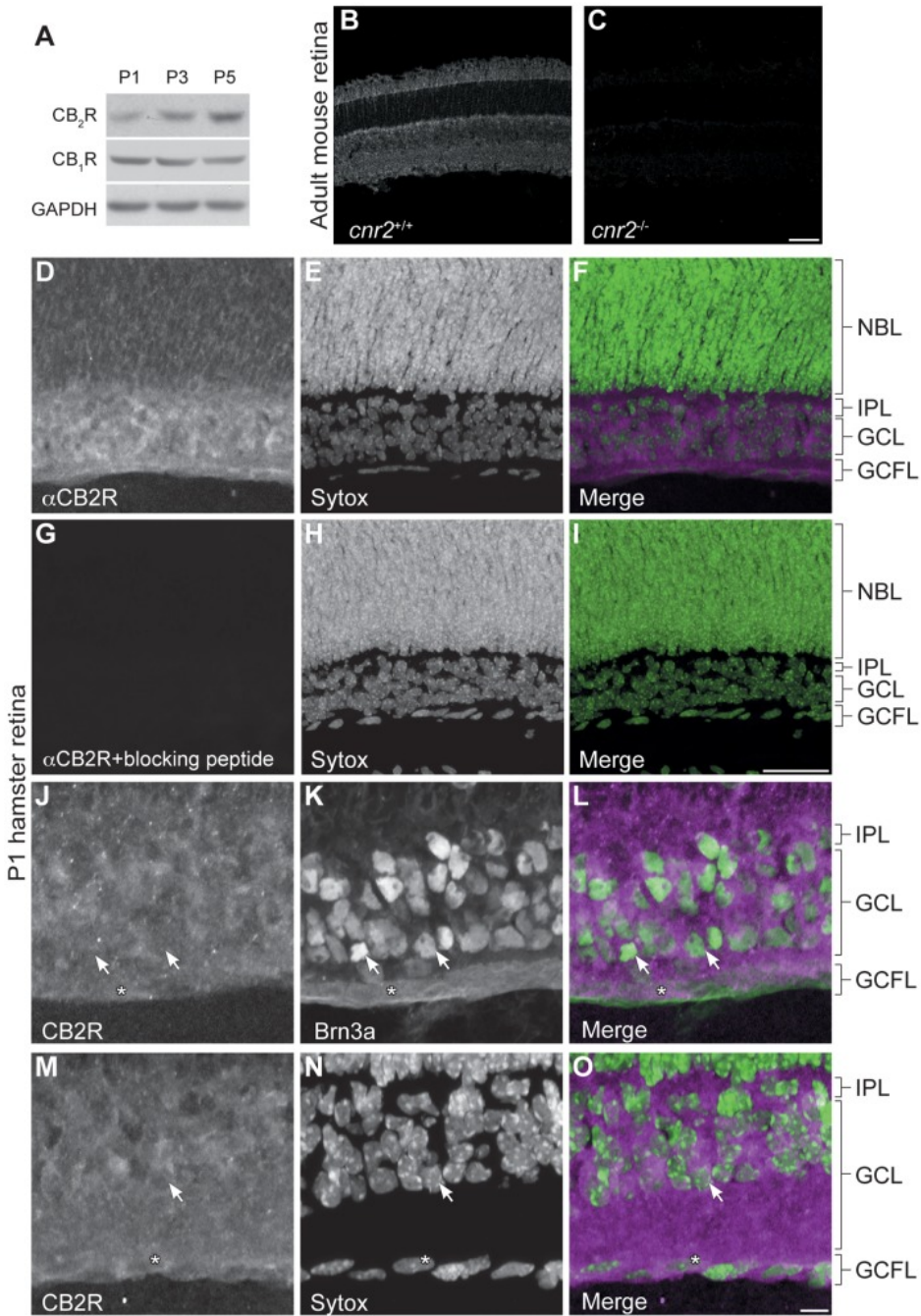


54. Ellerbroek SM, Wennerberg K, Burridge K (2003) Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem* 278: 19023–19031 [PubMed]
55. Qiao J, Huang F, Lum H (2003) PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L972–980 [PubMed]
56. Zhou D, Song ZH (2001) CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells. *J Neurosci Res* 65: 346–353 [PubMed]
57. Chapman B (2000) Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus. *Science* 287: 2479–2482 [PMC free article] [PubMed]
58. Monsul NT, Geisendorfer AR, Han PJ, Banik R, Pease ME, et al. (2004) Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve. *Exp Neurol* 186: 124–133 [PubMed]
59. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388: 773–778 [PubMed]
60. Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, et al. (1996) 2-Arachidonoylglycerol, a Putative Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, Induces Rapid, Transient Elevation of Intracellular Free Ca<sup>2+</sup> in Neuroblastoma × Glioma Hybrid NG108–15 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229: 58–64 [PubMed]

## Figure Legends

### Figure.1 Spatio-Temporal Expression of the CB<sub>2</sub>R in the Retina during Postnatal Retinal Projection Development in vivo.

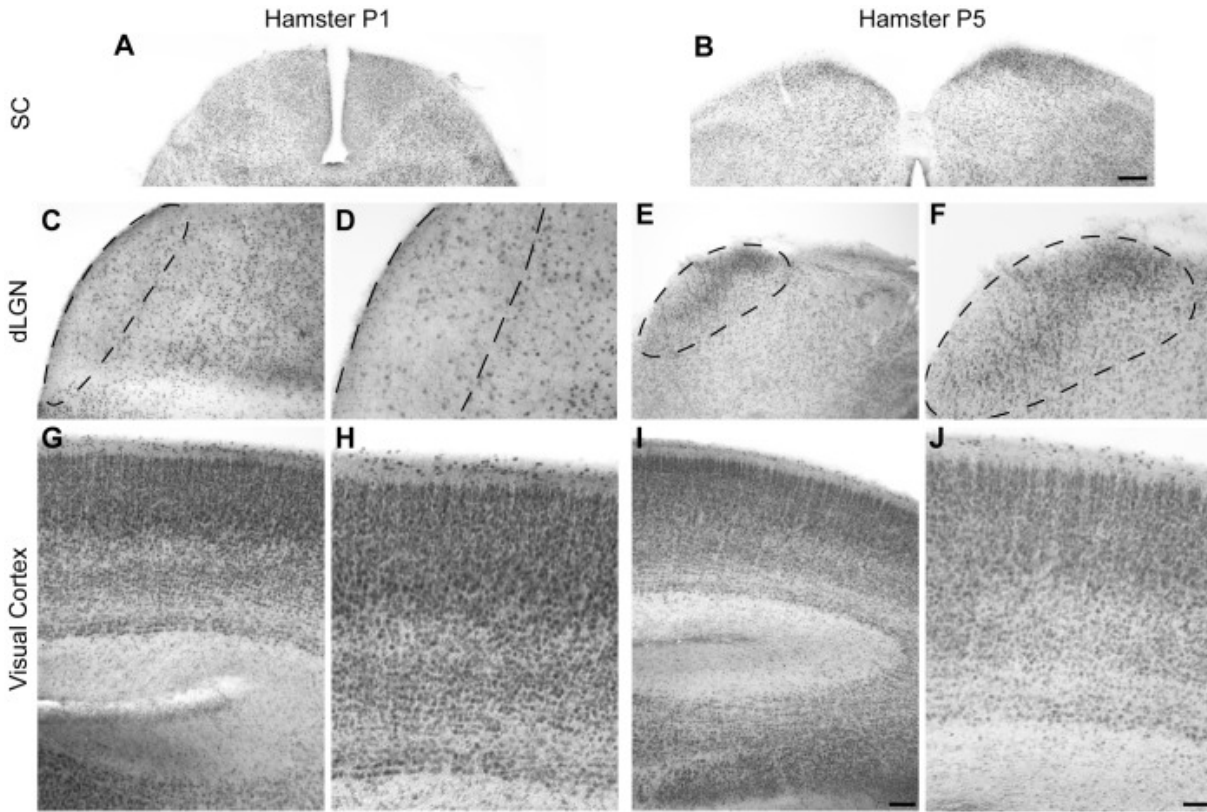
(A) Western blot analysis of CB<sub>2</sub>R and CB<sub>1</sub>R expression during retinal postnatal development in the hamster. Photomicrographs illustrating the specificity of the CB<sub>2</sub>R antibody in the adult mouse retina (B, C) and the P1 hamster retina (D–I). (D–O), Photomicrographs of hamster retinal cross-sections showing CB<sub>2</sub>R (magenta) during early postnatal development (at postnatal day 1, P1). Sytox (green) was used to stain cell nuclei. Brn3a was used to label retinal ganglion cells (green). In panels (J–O), some CB<sub>2</sub>R positive retinal ganglion cell somas and fibers are indicated using arrows and asterisks respectively. NBL, Neuroblast layer; IPL, Inner plexiform layer; GCL, Ganglion cell layer; GCFL, Ganglion cell fiber layer. Specificity of the CB<sub>2</sub>R antibody is confirmed using *cnr2*<sup>+/+</sup> and *cnr2*<sup>-/-</sup> adult mouse retina. Scale bars: 50 μm (B, C); 25 μm (D–I); 10 μm (J–O).



**Figure.1 Spatio-temporal Expression of the CB2R in the Retina during Postnatal Retinal Projection Development in vivo.**

**Figure.2 Expression of CB<sub>2</sub>R in the Superior Colliculus, dorsal Lateral Geniculate Nucleus, and Visual Cortex during Development in the Hamster.**

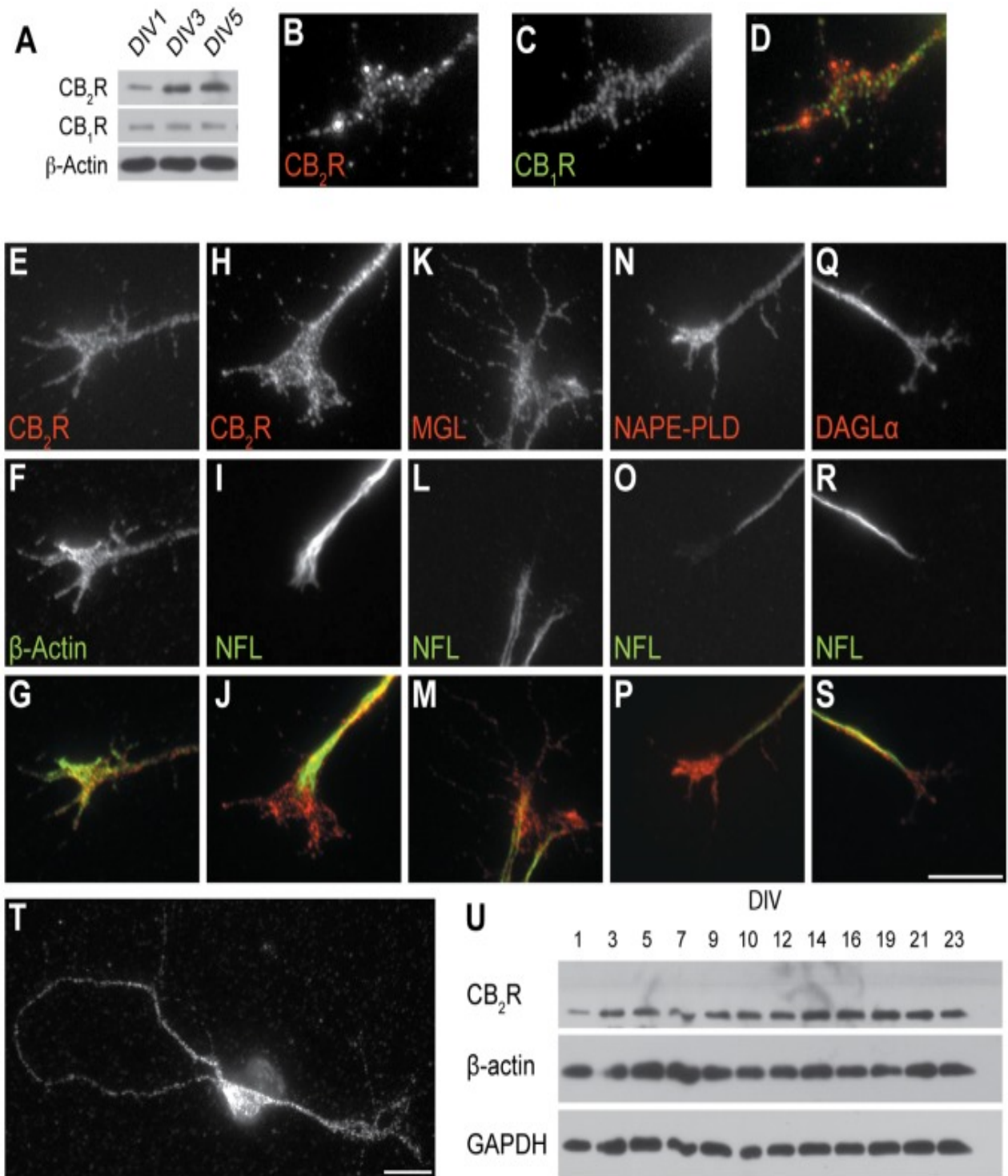
Photomicrographs of coronal sections illustrating CB<sub>2</sub>R expression at P1 (**A, C, D, G, H**) and P5 (**B, E, F, I, J**) in the superior colliculus (SC) (**A, B**), the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) (**C–F**), and the visual cortex (**G–J**). In panel **C–F**, dLGN has been outlined for better visualization. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  (**A, B**); 100  $\mu\text{m}$  (**C, E, G, I**); 50  $\mu\text{m}$  (**D, F, H, J**).



**Figure.2 Expression of CB2R in the Superior Colliculus, dorsal Lateral Geniculate Nucleus, and Visual Cortex during Development in the Hamster.**

**Figure.3 Expression of CB<sub>2</sub>R, CB<sub>1</sub>R, MGL, NAPE-PLD, and DAGL $\alpha$  in vitro.**

(A) Western blot shows temporal protein expression of CB<sub>2</sub>R and CB<sub>1</sub>R in cultured retinal ganglion cells. DIV1 retinal explants growth cones labeled with primary antibodies directed against CB<sub>2</sub>R (**B, E, and H**), CB<sub>1</sub>R (**C**), MGL (**K**), NAPE-PLD (**N**), and DAGL $\alpha$  (**Q**). Growth cones were also labeled for  $\beta$ -actin (**F**), Neurofilament-L (**I, L, O, and R**). Merged images are presented in **D, G, J, M, P, and S**. (**T**) Photomicrograph of a DIV2 primary cortical neuron immunolabeled for CB<sub>2</sub>R. Primary neurons were cultured for various numbers of days *in vitro* and cell extracts were equalized for total protein content. (**U**) Western blot showing temporal protein expression of CB<sub>2</sub>R,  $\beta$ -actin and GAPDH. Scale bars: 5  $\mu$ m (**B–S**), 15  $\mu$ m (**T**).

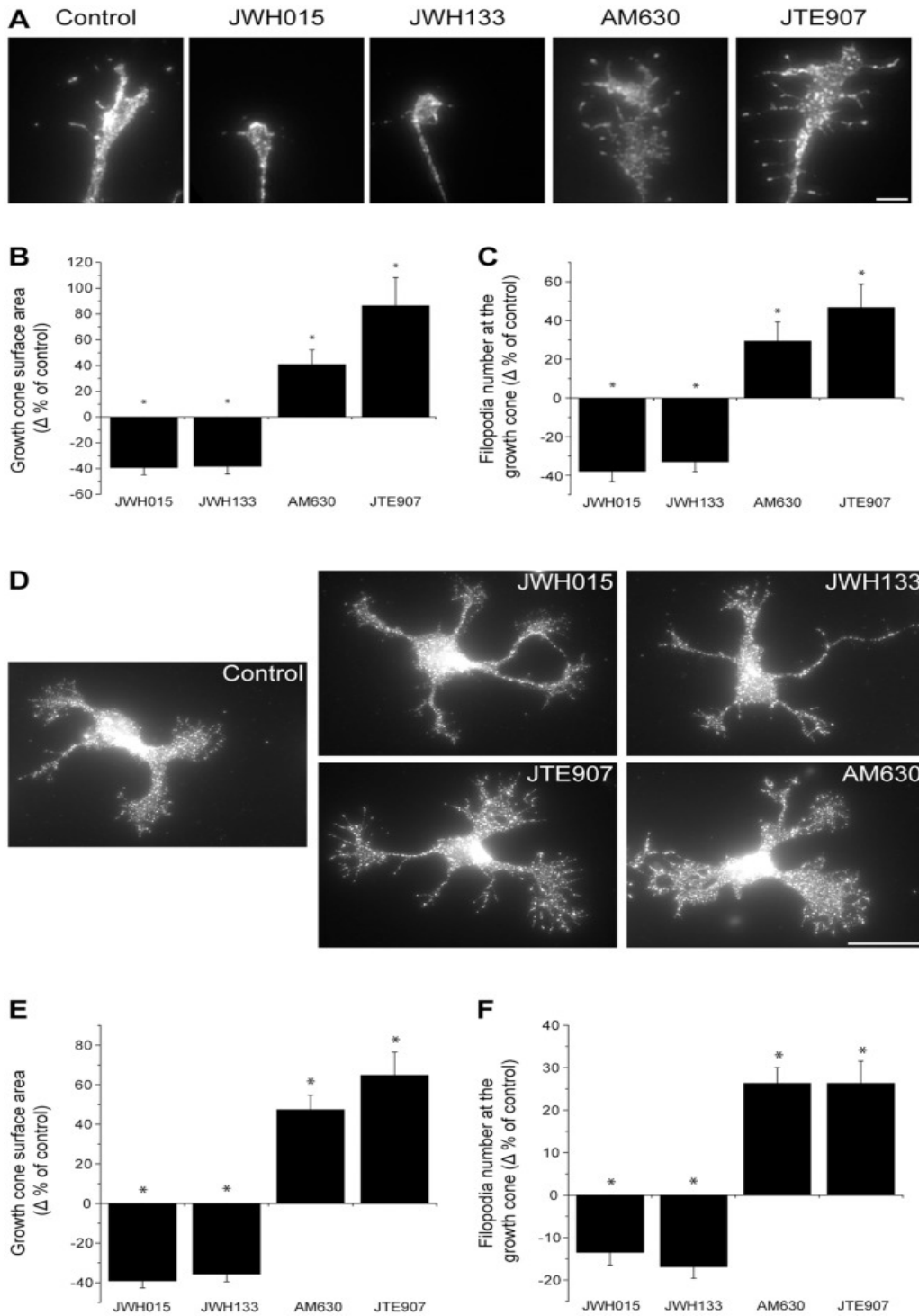


**Figure.3** Expression of CB<sub>2</sub>R, CB<sub>1</sub>R, MGL, NAPE-PLD, and DAGLα in vitro.

**Figure.4 CB<sub>2</sub>R Reorganizes the Growth Cone Morphology.**

(A) Retinal explants and (D) dissociated neurons were grown for 1 and 2 days *in vitro*, respectively. Growth cones were exposed for 1 hour to 300 nM JWH015, 300 nM JWH133, 300 nM AM630, or 300 nM JTE907. Following treatment, retinal explants and neurons were fixed and immunolabeled for L1 and GAP-43, respectively. Addition of CB<sub>2</sub>R inverse agonists (AM630, JTE907) increased growth cone surface area (**B and E**) and filopodia number (**C and F**) while the opposite effects was observed following CB<sub>2</sub>R agonists (JWH015 and JWH133) treatment (mean ± SEM; n=374 to 714 per condition). Scale bar, 5 μm (A); 20 μm (D). \*P<0.05 vs control.

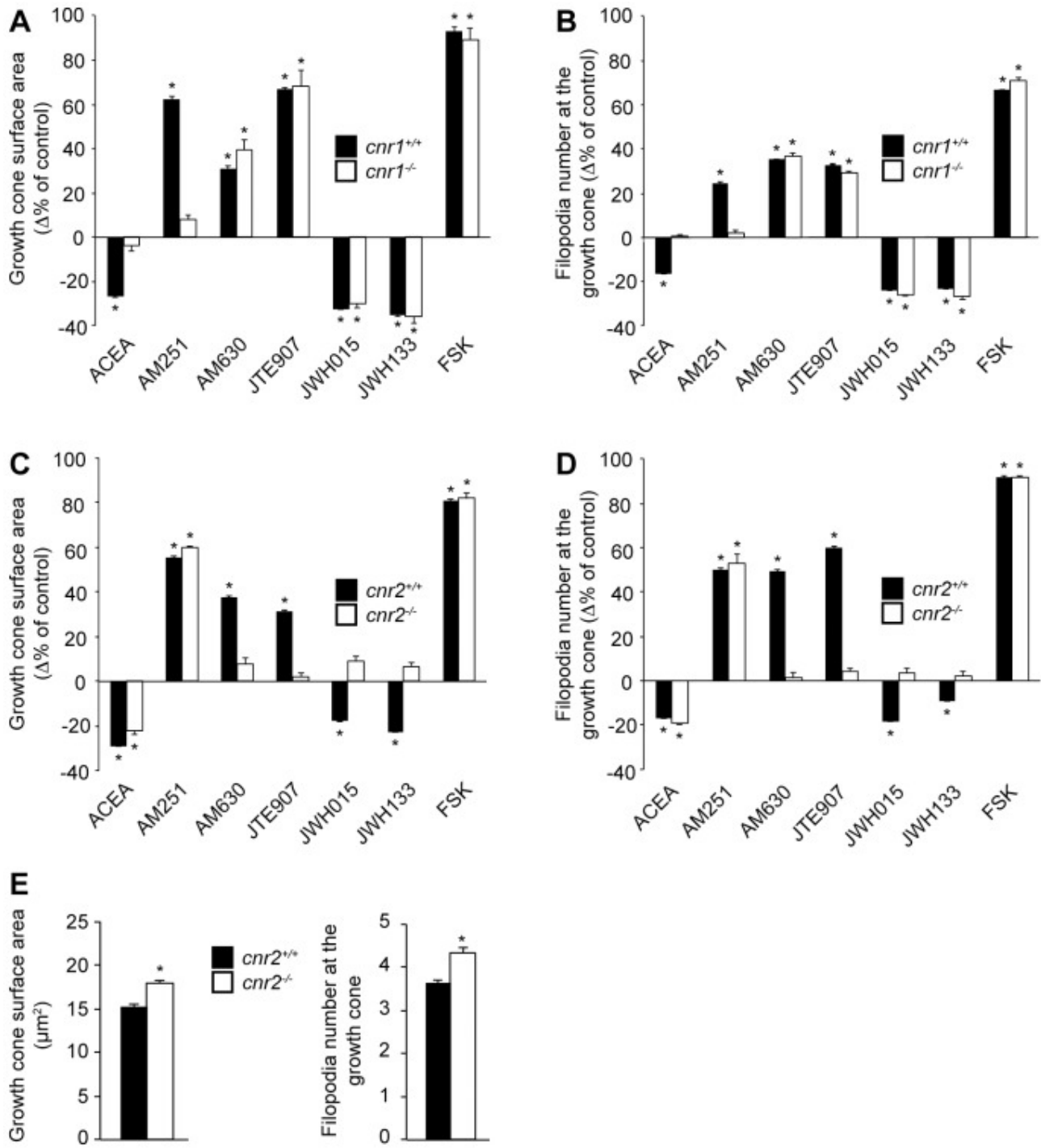




**Figure.4 CB2R Reorganizes the Growth Cone Morphology.**

## Figure.5 Confirmation that CB2R Modulates Growth Cone Morphology.

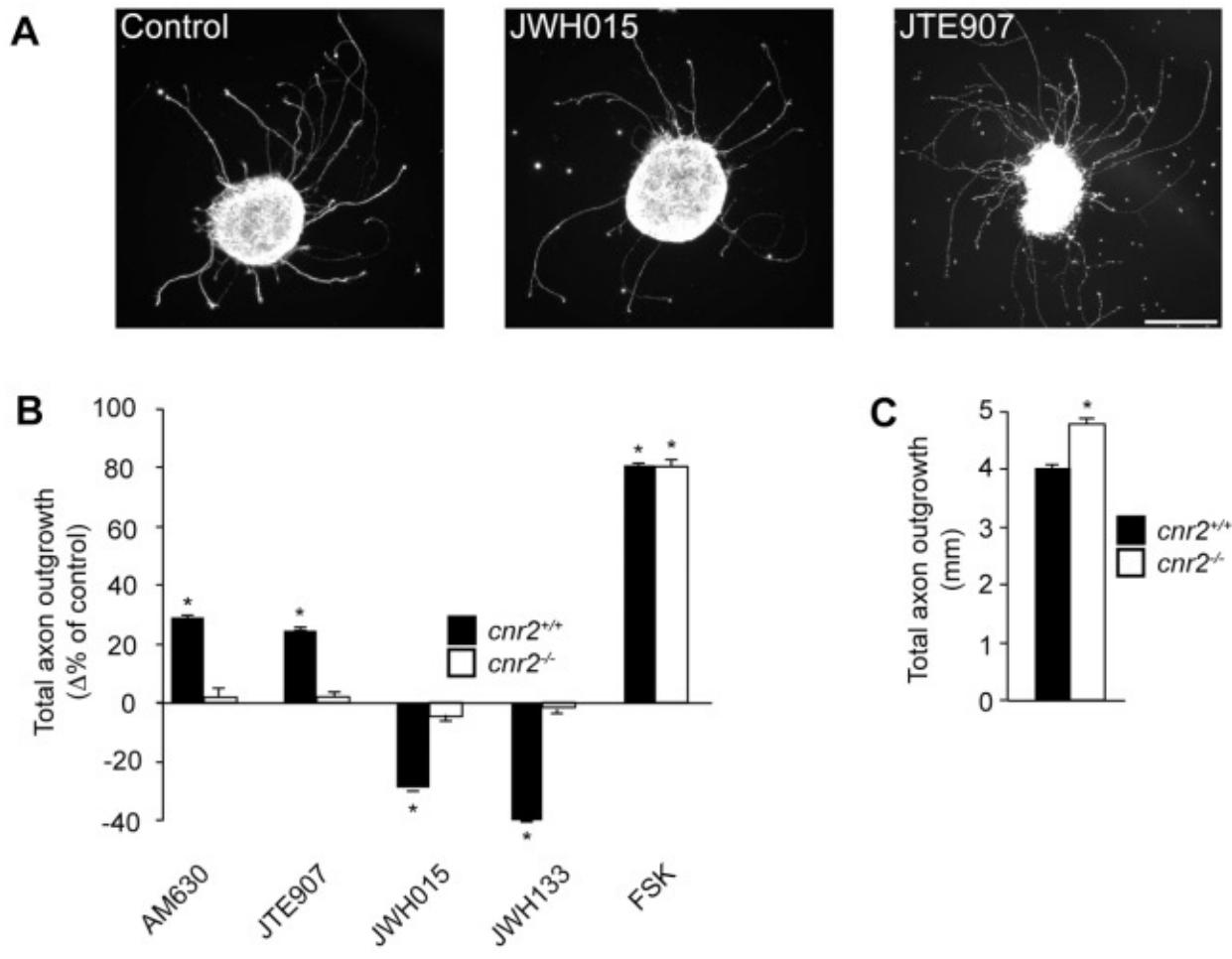
Retinal explants obtained from (*cnr1*<sup>+/+</sup> or *cnr1*<sup>-/-</sup>) (A and B) or (*cnr2*<sup>+/+</sup> or *cnr2*<sup>-/-</sup>) (C-E) embryos. In *cnr1*<sup>+/+</sup> or *cnr2*<sup>+/+</sup>, administration of AM251, AM630, JTE907, and FSK increased growth cone surface area (A, C) and filopodia number (B, D) while ACEA, JWH015, and JWH133 decreased them. In *cnr1*<sup>-/-</sup>, responses of CB<sub>1</sub>R ligands (ACEA and AM251) were abolished (mean ± SEM; (A and B) n=81 to 312 per condition, \*P<0.05 vs control). In *cnr2*<sup>-/-</sup> animals, growth cone surface area (C) and filopodia number (D) were only significantly modified by ACEA, AM251 and FSK while CB<sub>2</sub>R ligand (JWH015, JWH133, AM630, and JTE907) stimulation did not alter these endpoints (mean ± SEM; (C and D) n=125 to 264 per condition, \*P<0.05 vs control). (E) Growth cone surface area and filopodia number were increased in *cnr2*<sup>-/-</sup> compared to *cnr2*<sup>+/+</sup>. Mean ± SEM; n=120 to 150 per condition, \*P<0.05 vs control.



**Figure.5 CB2R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector**

## Figure.6 CB<sub>2</sub>R Modulates Axon Outgrowth.

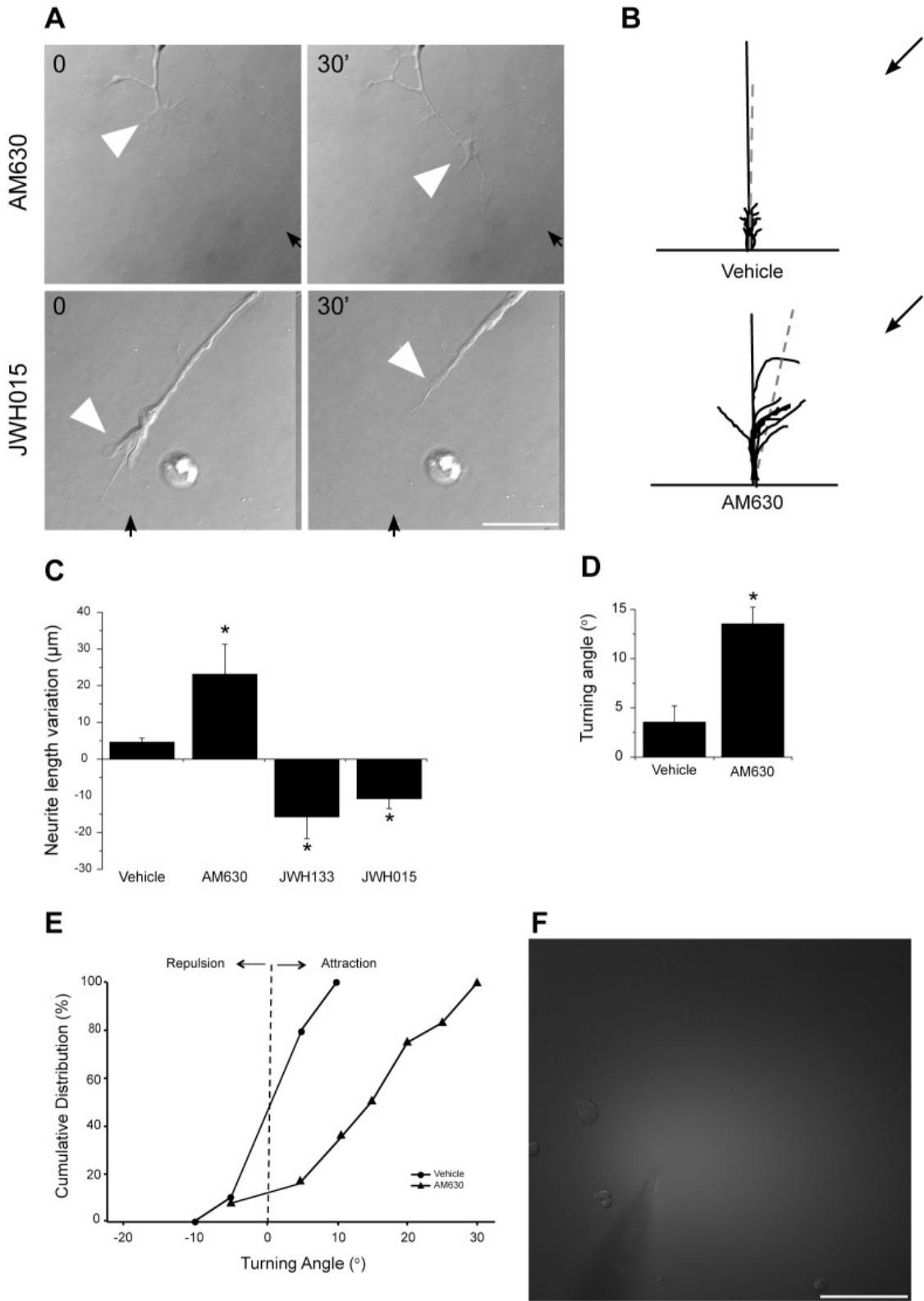
Retinal explants obtained from C57Bl/6-*cnr2*<sup>+/+</sup> or C57Bl/6-*cnr2*<sup>-/-</sup> mice were treated for 15 hours with 300 nM JWH015, 300 nM JWH133, 300 nM AM630 or 300 nM JTE907. Explants were labeled using anti-L1. **(A)**. Representative explants obtained from *cnr2*<sup>+/+</sup> mice. Scale bar, 200 μm. **(B)** Quantification of total axon outgrowth was normalized for explant area and expressed as percentage of the control group (mean ± SEM; n=20 to 129 explants per condition). Addition of CB<sub>2</sub>R agonists (JWH015 and JWH133) to *cnr2*<sup>+/+</sup> retinal explants decreased axon outgrowth, while treatment with CB<sub>2</sub>R inverse agonists (AM630 and JTE907) increased it. Pharmacological modulation of CB<sub>2</sub>R did not induce any significant changes in explant axon outgrowth obtained from *cnr2*<sup>-/-</sup> mouse embryos. \*P<0.05 vs control. **(C)** Under control conditions, deletion of *cnr2* significantly increased axon outgrowth. \*P<0.05 vs *cnr2*<sup>+/+</sup> (mean ± SEM; n=75 to 129 explants per condition).



**Figure.6 CB2R Modulates Axon Outgrowth.**

**Figure.7 CB<sub>2</sub>R Agonists Influence Growth Cone Behavior.**

(A) Time-lapse microscopy DIV1 mouse retinal explant growth cone exposed to AM630 or JWH015 gradients. Arrows and arrowheads show micropipette angle and growth cone position, respectively. The micropipette tip diameter was 2–3  $\mu\text{m}$  wide and positioned at 45° angle and 100  $\mu\text{m}$  from the growth cone of interest. (B) Superimposed RGC axon trajectories over the 30 min observation period; black arrows indicate the direction of the gradient. Histograms illustrate neurite length (C) and turning angle (D) of growth cone following treatment (mean  $\pm$  SEM; n=7 to 13 per condition, \* P<0.05 vs vehicle). (E) Turning angle cumulative frequency curves of RGC growth cones. The turning angle of each growth cone was plotted against the percentage of growth cones turning that angle or less. CB<sub>2</sub>R inverse agonist (AM630) increased axon growth and turning toward the pipette tip while CB<sub>2</sub>R agonists (JWH133 and JWH015) induced growth cone collapse, axon retraction. (F) Photomicrograph represents a microgradient created during drug application. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$  (A); 50  $\mu\text{m}$  (F).

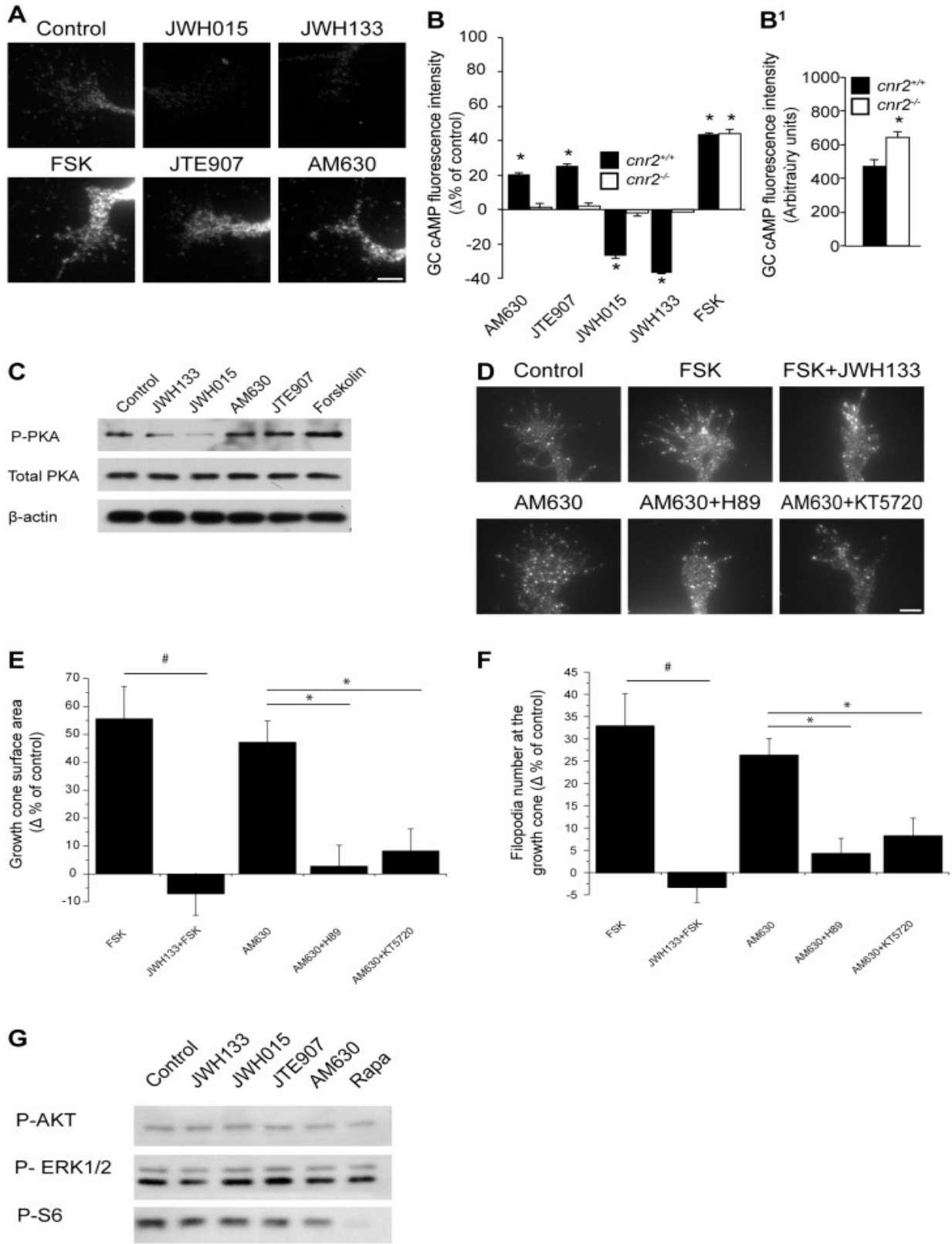


**Figure.7 CB2R Agonists Influence Growth Cone Behavior.**

**Figure.8 CB2R recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector.**

Growth cones were immunolabeled for intracellular cAMP following FSK, CB<sub>2</sub>R agonist (JWH015, JWH133), or CB<sub>2</sub>R inverse agonist (AM630, JTE907) application. **(A)** Representative photomicrographs. Scale bar, 5  $\mu$ m. **(B)** Quantification of cAMP fluorescence intensity at the *cnr2*<sup>+/+</sup> growth cone indicates a significant decrease in cAMP levels following treatment with JWH133 and JWH015 while the opposite was observed following stimulation with AM630, JTE907 or FSK. No significant variations of cAMP were observed in growth cones obtained from *cnr2*<sup>-/-</sup> after pharmacological treatments (mean  $\pm$  SEM; n=152 to 223 per condition, \*P<0.05 vs control). **(B<sup>1</sup>)** Under control conditions, cAMP levels in growth cones of *cnr2*<sup>-/-</sup> embryos were significantly higher than those observed in wildtype embryos (mean  $\pm$  SEM; n=152 to 175 per condition, \*P<0.05 vs control). **(C)** Western blot analysis indicates important changes in PKA phosphorylation levels following stimulation with CB<sub>2</sub>R agonists or inverse agonists. **(D)** For growth cone morphology analysis, neurons were exposed for 1 hour to FSK, FSK and JWH133, AM630, AM630 and H89 (a PKA inhibitor), or AM630 and KT5720 (another PKA inhibitor). Scale bar: 5  $\mu$ m. Neurons were fixed and immunolabeled for GAP-43. Histograms represent quantification of growth cone surface area **(E)** and filopodia number **(F)**. JWH133 abolished FSK induced increases in growth cone surface area and filopodia number and PKA inhibition abolished growth cone morphology modifications induced by AM630 (mean  $\pm$  SEM; n=from 160 to 360 per condition, # P<0.05 vs FSK group \*P<0.05 vs AM630 group). **(G)** Effect of the addition of CB<sub>2</sub>R agonists or inverse agonists on phosphorylation levels of AKT, ERK<sup>1/2</sup> and S6 (P-AKT, P-ERK<sup>1/2</sup> and P-S6).

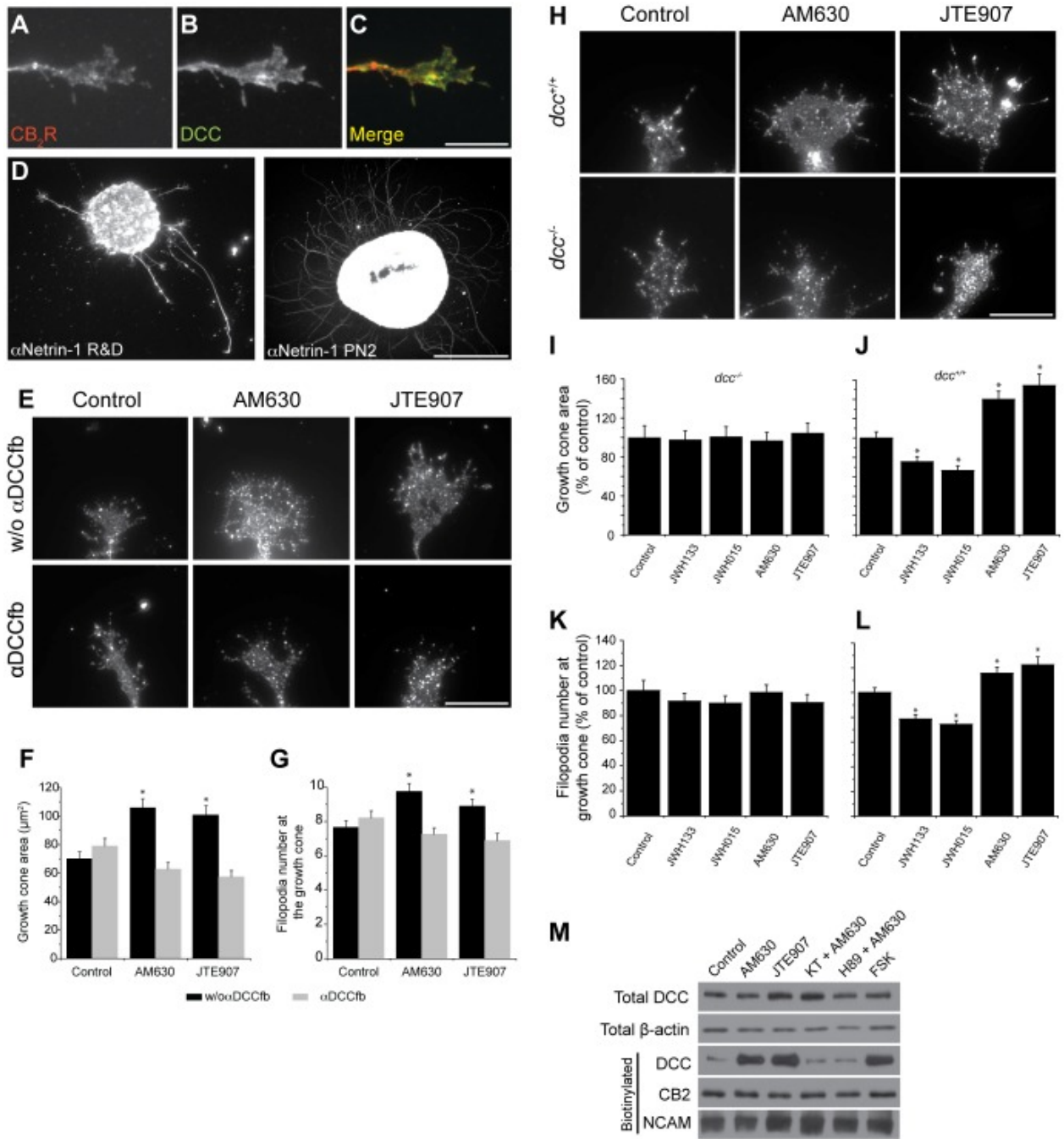




**Figure.8 CB2R recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector.**

**Figure.9 DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB<sub>2</sub>R Induced Reorganization of the growth cone.**

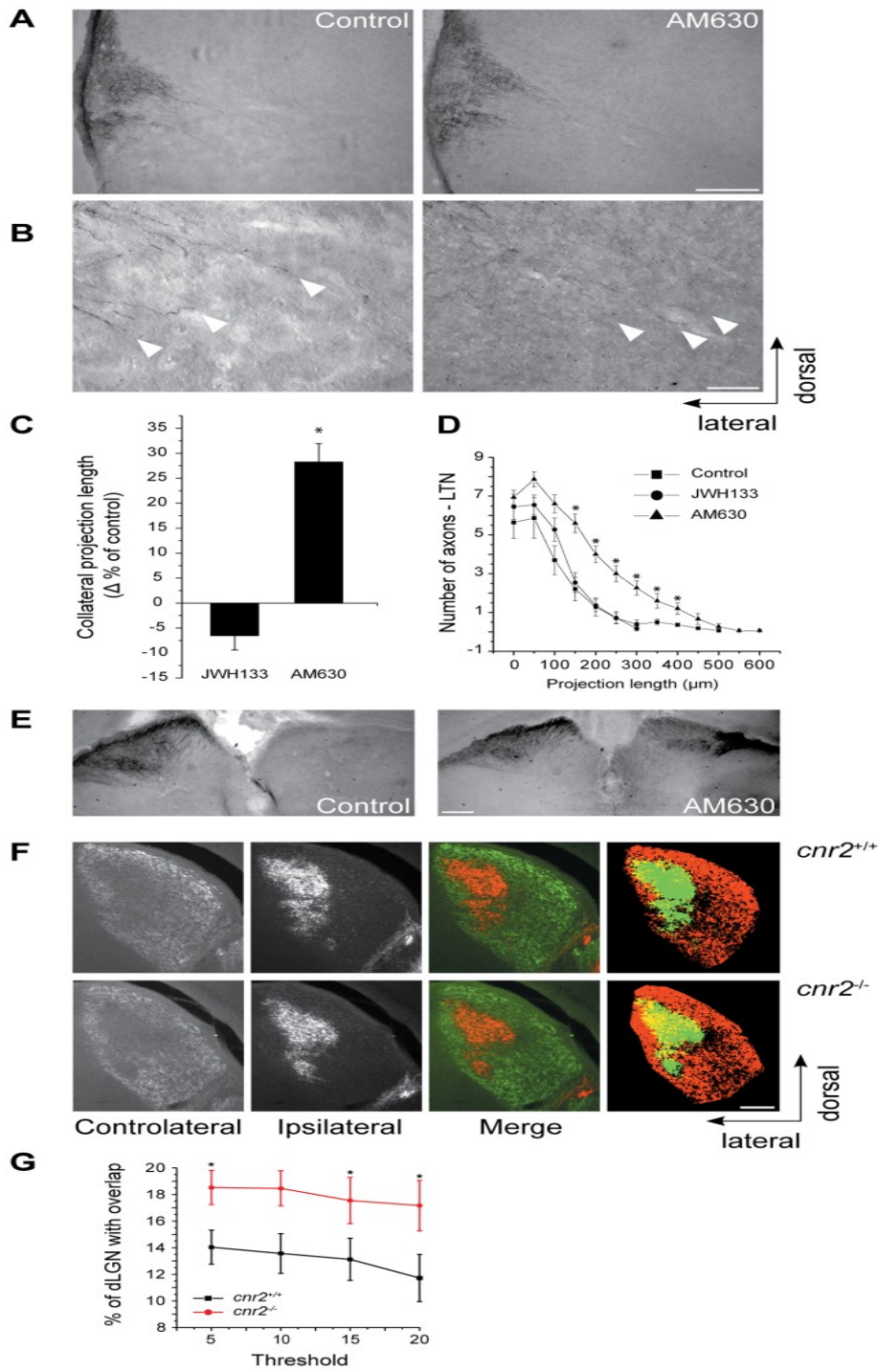
Retinal explants were grown for 1 DIV and growth cones were immunolabeled for CB<sub>2</sub>R (**A**) and DCC receptor (**B**). Merged image is presented in **C**. They were also immunostained for netrin-1, a ligand of DCC receptor (**D**). Dissociated neurons were cultured for 2 days *in vitro* and treated with pharmacological agents for 1 hour. (**E**) DCC function blocking ( $\alpha$ DCC<sub>fb</sub>) antibody 3.5  $\mu$ g/ml was added 15 minutes prior to AM630 or JTE907 stimulation.  $\alpha$ DCC<sub>fb</sub> abolished AM630 and JTE907 induced increases in growth cone surface area (**F**) and filopodia number (**G**) (mean  $\pm$  SEM; n=from 134 to 159 per conditions, \*P<0.05 vs control condition). (**H**) Photomicrographs of growth cone for *dcc*<sup>+/+</sup> or *dcc*<sup>-/-</sup> mice. Histograms showing the size of growth cone area and the filopodia numbers in *dcc*<sup>+/+</sup> and *dcc*<sup>-/-</sup> animals (**I-L**). Pharmacological modulation of the CB<sub>2</sub>R did not induce any significant changes in growth cone surface area nor filopodia number in primary neuron cultures obtained from *dcc*<sup>-/-</sup> mice embryos (**I** and **K**) whereas JWH133 and JWH015 induced a decrease in growth cone surface and filopodia number while AM630 and JTE907 augmented these endpoints in *dcc*<sup>+/+</sup> neuron cultures (**J** and **L**) (mean  $\pm$  SEM; 125 to 219 per conditions, \*P<0.05 vs control condition). (**M**) DIV2 neurons were treated with AM630, JTE907, AM630 and KT5720, AM630 and H89, or FSK for 15 minutes. Following biotinylation and western blot, expression of surface protein was assessed for DCC receptor, CB<sub>2</sub>R and NCAM. Scale bar: 10  $\mu$ m (**A-C**, **E**, **H**); 250  $\mu$ m (**D**).



**Figure.9 DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB2R Induced Reorganization of the growth cone.**

**Figure.10 CB2R Modulates RGC Projection Development In Vivo and Eye-Specific Segregation in the Lateral Geniculate Nucleus.**

Hamsters at P1 were injected in the eye with CTb-FITC and 300  $\mu$ M AM630, 300  $\mu$ M JWH133 or vehicle control. Perfusion and brain fixation were done at P5. CTb revelation was performed with anti-CTb, enhanced with ABC Kit and revealed with DAB-Nickel kit. Photomicrographs of the lateral terminal nucleus (LTN) for the control and the AM630 groups **(A)** and terminal magnifications are shown **(B)**. Quantification for collateral projection length is expressed as mean  $\pm$  SEM percentage versus the control group **(C)**. Quantification for axon branch density was also performed. AM630 increased axon growth **(C)** and collateral branch number **(D)** (n=4 to 5 brains per condition, \*P<0.05 versus control group). **(E)** Photomicrographs showing SC for the control and the treated groups. In the AM630 treated group, the presence of aberrant projections is illustrated by labeling in both hemispheres. **(F)** Fluorescence images of the dLGN for *cnr2*<sup>+/+</sup> and *cnr2*<sup>-/-</sup> mice showing contralateral projections from right eye injected with CTb-Alexa-546 and ipsilateral projections from left eye injected with CTb-Alexa-488. Merged images show all projections from both eyes to the dorsal lateral geniculate nucleus, overlaying projections are shown in yellow **(F)**. **(G)** Graphic shows percentage of the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) receiving overlapping inputs as mean  $\pm$  SEM (n=4 to 5 brains per condition, \*P<0.05 versus control group). Quantification of the percentage of overlapping inputs in *cnr2*<sup>-/-</sup> and *cnr2*<sup>+/+</sup> adult mice indicating a significant increase in overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of *cnr2*<sup>-/-</sup> mice. Scale bars, 200  $\mu$ m **(A, F)**; 50  $\mu$ m **(B)**; 600  $\mu$ m **(E)**.



**Figure.10 CB2R Modulates RGC Projection Development In Vivo and Eye-Specific Segregation in the Lateral Geniculate Nucleus.**

## **Annexe II. Publications, présentations, bourses et prix**

### A- Publications:

1. Role of GPR91 and GPR99 in growth and axonal guidance of retinal ganglions. **H. Cherif**, Francois Duhamel, Bruno Cécyre, Alex Bouchard, sylvain Chemtob, Jean-François Bouchard. Article soumis à la revue Nature Neuroscience.
2. Role of GPR55 during axon growth and target innervation. **Hosni Cherif**, Anteneh Argaw, Bruno Cécyre, Alex Bouchard, Jonathan Gagnon, Pasha Javadi, Sébastien Desgent, Ken Mackie, Jean-François Bouchard. eNeuro. 2015 Nov 9;2(5). pii: ENEURO.0011-15.2015.
3. Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance. Gabriel Duff , Anteneh Argaw , Bruno Cécyre, **Hosni Cherif**, Nicolas Tea, Nawal Zabouri, Christian Casanova, Maurice Ptito, Jean-François Bouchard. PloS One, (Aout 2013). 9; 8(8):e70849.
4. Concerted Action of CB1 Cannabinoid Receptor and Deleted in Colorectal Cancer in Axon Guidance. Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cécyre B, Chainé N, **Cherif H**, Tea N, Lutz B, Ptito M, Bouchard JF. J. Neuroscience, (Jan 2011); 31(4):1489-1499.

### B- Prix et bourses:

1. Prix de la meilleure publication du Réseau Vision/FRSQ, Montréal, Décembre 2015.
2. Bourse de fin d'études doctorales de la faculté d'études supérieures et postdoctorales (FESP), Janvier 2015.
3. Bourse d'excellence FESP-EOUM, Avril 2015.
4. Bourse d'excellence FESP-EOUM, Avril 2014.
5. Bourse d'excellence FESP-EOUM, Avril 2013.
6. Bourse d'excellence FESP-EOUM, Avril 2012
7. Prix de la meilleure présentation par Affiche, réunion réseau vision-FRSQ, Montréal, Novembre 2012
8. Nominé pour le prix Hans-Seyle, réunion du club de recherches cliniques du Québec, Orford, Octobre 2012.
9. Prix de la meilleure présentation par Affiche, réunion réseau vision-FRSQ, Québec, Novembre 2011.
10. Bourse d'excellence FESP-EOUM, Avril 2011.
11. Bourse de recrutement du réseau vision/FRSQ, Janvier 2010.
12. Bourse de soutien FESP-EOUM, Janvier 2009.

### C- Conférences:

Durant mon doctorat j'ai participé à 27 activités de rayonnement, les plus récentes sont présentées ci-dessous et la suite dans l'Annexe 1 ci-joint à cette demande.

1. **H. Cherif** et al. Rôle de GPR55 dans la croissance et l'innervation des axones des cellules ganglionnaires au cours du développement. 21<sup>e</sup> Journée scientifique du RRSV (2015), Québec.
2. Duhamel F, Zhu T, Tahiri H, **H Cherif**, Bouchard JF, Chemtob S. Implication du récepteur GPR55 dans l'angiogénèse rétinienne; nouveau rôle pour des lipides issus du stress oxydatif. Journée de recherche Gabriel L. Plaa, Mai 2015, Montréal, Québec.
3. J-F Bouchard, **H. Cherif**, et al. GPR55: a new mediator of axon guidance. Axon Guidance, Synapse formation & Regeneration Meeting, Cold Spring Harbour Laboratory, USA, Septembre (2014).
4. **H. Cherif** *et al.* Role of GPR55 in the development of the central nervous system. 8th Annual Meeting of the Canadian Association for Neuroscience (2014).
5. **H. Cherif**, Anteneh Argaw, Bruno Cécyre, Alex Bouchard, Jonathan Gagnon, Pasha Javadi, Sébastien Desgent, Ken Mackie et Jean-François Bouchard. Effets des ligands de GPR55 sur les cellules ganglionnaires pendant le développement (2014). 20<sup>e</sup> réunion annuelle du RRSV, Montréal, Qc.
6. **H. Cherif** et al. GPR55 et le développement du système neurovisuel. 11<sup>e</sup> Journée scientifique du GRSV (2014).
7. **H. Cherif** et al. GPR55 a new actor in RGC axon guidance during the development. Canadian Optometry Schools research conference –COSRC (2013), Waterloo.
8. **H. Cherif** et al. GPR55 participates to the development of the nervous system. Annual meeting in neuroscience: society for neuroscience-SfN (2013), San Francisco, USA.
9. **H. Cherif** et al. Modulation de la croissance et du développement du système neurovisuel par GPR55. Journée scientifique du RQRM (2013).
10. **H. Cherif** et al. Étude du récepteur GPR55 comme cible thérapeutique potentielle. 6<sup>ième</sup> Journée scientifique du Groupe de recherche universitaire sur le médicament (2013).
11. **H. Cherif** et al. Le rôle du récepteur GPR55 dans la croissance et le guidage axonal des cellules ganglionnaires de la rétine au cours du développement. Journée scientifique du groupe de recherche scientifique en vision-GRSV(2013)
12. **H. Cherif** et al. Rôle du récepteur GPR55 dans le système visuel. Journée scientifique de l'école d'optométrie (2013).

13. **H. Cherif**, Alexandre Talbot et Jean-François Bouchard. Effets des ligands de GPR55 sur le cerveau visuel au cours du développement. Journée scientifique de l'axe cerveau et perception du réseau vision, Montréal, Mai 2012.
14. **H. Cherif.**, Argaw A., Desgent S., Talbot A., Gagnon J. et Bouchard J-F. Le récepteur GPR55 module le développement du système nerveux. 54<sup>ième</sup> réunion annuelle du club de recherche clinique du Québec. Mont Orford, Québec 2012. Nominé du prix Hans-Seyle.
15. **H. Cherif**, Argaw A., Desgent S., Talbot A., Gagnon J. et Bouchard J-F. Le récepteur GPR55 module le développement du système nerveux visuel. 18<sup>ième</sup> réunion annuelle du réseau vision-FRSQ, Hôtel Hilton Bonaventure Montréal, Québec 2012. Prix de la meilleure présentation par affiche.
16. **H. Cherif.**, Argaw A., Desgent S., Talbot A., Gagnon J. et Bouchard J-F. Le récepteur GPR55 cible pharmacologique lors du développement du système visuel? 2<sup>ième</sup> Journée scientifique RQRM- Pharmacam, Université du Québec à Montréal, Septembre 2012.
17. **H. Cherif**, Alexandre Talbot et Jean-François Bouchard. GPR55 dans le guidage axonal au cours du développement. Journée scientifique du groupe de recherche scientifique en vision –GRSV, Université de Montréal, Montréal, Québec 2012.
18. **H. Cherif**, Alexandre Talbot et Jean-François Bouchard. Modulation par les ligands de GPR55 du guidage et la croissance des éléments rétinotthalmiques en développement. Journée scientifique du réseau vision-FRSQ, Université de Laval, Québec 2011. Prix de la meilleure présentation par affiche.
19. **H. Cherif**, Anteneh Argaw, Bruno Cécyre, Hosni Cherif, Nicolas Tea, and J.-F. Bouchard. Participation of cannabinoid receptor 2 in axon patterning. Abstract #045, 8th IBRO World Congress on Neuroscience, Firenze, Italy, Juillet 2011.
20. **H. Cherif**, Alexandre Talbot et Jean-François Bouchard. Effet de GPR55 sur la croissance et le guidage axonal. 53<sup>ième</sup> réunion annuelle du club de recherche clinique du Québec. Mont Gabriel 2011.
21. **H. Cherif**, Alexandre Talbot et Jean-François Bouchard. GPR55 de la rétine au cerveau et son effet au cours du développement du système neurovisuel. Journée scientifique de l'axe rétine-cerveau du réseau vision. Montréal 2011.
22. **H. Cherif**, Alexandre Talbot et Jean-François Bouchard. GPR55 dans le système neurovisuel en développement. Huitième journée scientifique de l'école d'optométrie de l'université de Montréal. Montréal 2011.
23. **H. Cherif**, Alexandre Talbot et Jean-François Bouchard. GPR55, une cible pharmacologique lors du guidage axonal. 5<sup>ème</sup> journée étudiante du GRUM, Université de Montréal 2010.
24. **H. Cherif** et Jean-François Bouchard. Modulation par GPR55 de la croissance neuronale. Réunion annuelle du club de recherche clinique du Québec, Bromont 2010.



25. **H. Cherif** et Jean-François Bouchard. Role of GPR55 in the development of the neurovisuel system. 7<sup>e</sup> symposium canadien en optométrie, Montréal 2010.
26. **H. Cherif** et Jean-François Bouchard. Modulation du guidage axonal par GPR55 dans le système nerveux visuel en développement. Réunion annuelle du réseau vision-FRSQ, Montréal 2010.
27. **H. Cherif** et Jean-François Bouchard. Rôle du système cannabinoïde et de GPR55 au cours du développement du système neurovisuel chez la souris. Journée scientifique de l'Université du Québec à Montréal, 2009.