

Université de Montréal

**Les récepteurs GPR91 et GPR99 et leur implication dans le développement du
système nerveux visuel**

par
Alex Bouchard

École d'optométrie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences de la vision
option sciences fondamentales et appliquées

Octobre 2015

© Alex Bouchard, 2015

Ce mémoire intitulé : Les récepteurs GPR91 et GPR99 et leur implication dans le
développement du système nerveux visuel

Présenté par : Alex Bouchard

À été évalué par un Jury composé de

Dre. Elvire Vaucher : Président-Rapporteur

Dr. Jean-François Bouchard : Directeur de recherche

Dr : Denis Boire : Membre du jury

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) démontrent de plus en plus de capacités à activer des mécanismes jusqu'alors associés à des facteurs de transcription ou des molécules d'adhésion. En effet, de nouvelles preuves rapportent qu'ils pourraient également participer au guidage axonal qui est le mécanisme permettant aux axones de cellules nerveuses de rejoindre leur cible anatomique. Le guidage axonal se fait par l'interaction entre les molécules de guidage et une structure particulière présente à l'extrémité de l'axone, le cône de croissance. Par exemple, les RCPGs participent au guidage des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR), dont les axones s'étendent de la rétine jusqu'au noyau cérébraux associés à la vision. Cet effet est observé avec des RCPGs tels que les récepteurs aux cannabinoïdes (CB1 et CB2) et celui du lysophosphatidylinositol, le GPR55. Les RCPGs GPR91 et GPR99, respectivement récepteurs au succinate et à l' α -cétoglutarate, se trouvent à la surface de ces CGRs, ce qui en font des candidats potentiels pouvant participer au guidage axonal. Dans ce mémoire, l'effet des ligands de ces récepteurs sur la croissance et la navigation des axones des CGRs fut analysé.

L'impact produit par ces récepteurs ainsi que leurs ligands sur la morphologie des cônes de croissance fut déterminé en mesurant leur taille et le nombre de filopodes présents sur ces cônes. Pour évaluer le rôle du succinate et de l' α -cétoglutarate sur la croissance globale des axones de CGRs, la longueur totale des projections axonales d'explants rétiniens a été mesurée. L'effet de ces ligands des récepteurs GPR91 et GPR99 sur le guidage axonal a également été évalué en temps réel à l'aide d'un gradient créé par un micro injecteur placé à 45° et à 100 μ m du cône de croissance. La distribution *in vivo* des récepteurs GPR91 et GPR99 sur la rétine a été étudié à l'aide d'expériences d'immunohistochimie.

Les résultats obtenus indiquent que l'ajout de 100 μ M de succinate produit une augmentation de la taille des cônes de croissance et du nombre de filopodes présents à leur surface. Il augmente également la croissance des axones. Ce type de réponse fut également observé lorsque les cellules furent soumises à 200 μ M d' α -cétoglutarate. Fait à noter, les deux récepteurs n'ont pas d'impact sur le guidage axonal.

Ces résultats indiquent donc que les agonistes des récepteurs GPR91 et GPR99 augmentent la croissance des cellules ganglionnaires lorsqu'ils sont présents lors du développement. Par contre, ils n'ont pas d'influence sur la direction prise par les cônes de croissance. Ces nouvelles données sont un pas de plus dans la compréhension des mécanismes qui gèrent et participent au développement et la croissance des CGRs, ce qui pourrait donner de nouvelles cibles thérapeutique pouvant mener à la régénération de nerfs optiques endommagés.

Mots-clés : GPR91, GPR99, système nerveux visuel, RCPG, développement.

Abstract

G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) show a greater role in activating mechanism usually associated to transcription factors or cell adhesion molecules. New evidence shows that some of these receptors have an impact on axon guidance, the mechanism by which neurons' axons are able to grow from their origin and reach their anatomical target. Guidance is mediated via a structure at the tip of the axon called the growth cone, which can interact with surrounding molecules. Axons from retinal ganglion cells (RGCs) navigating from the retina to the cerebral nuclei associated with vision, are sensitive to some of the GPCR ligands. These GPCRs are the cannabinoid receptors CB1 and CB2 and the GPR55, a receptor for lysophosphatidylinositol. GPR91 and GPR99, respectively receptors for succinate and α -ketoglutarate, are expressed in RGCs making them prime candidates to have an impact on axon guidance. In this thesis, we will test the role of GPR91 and GPR99 ligands on RCG axon growth and guidance.

To assess the impact of these receptors and their ligands on axon growth and guidance, first we evaluated their effects on growth cone morphology. To achieve this, we measured growth cone size and filopodia numbers, when exposed to 100 μ M of succinate or 200 μ M of α -ketoglutarate. The effects of these ligands on axon growth were evaluated by measuring the total axon outgrowth from retinal explants. The role of GPR91 and GPR99 on growth cone turning, was determined by exposing a growing axon to a gradient of these ligands, originating from a micropipette situated 100 μ m and 45° from the growth cone. The expression of these receptors in the retina was evaluated using immunohistochemistry. Results showed that the addition of 100 μ M succinate induced an increase in both growth cone size and filopodia number. It also increased total axon growth. α -ketoglutarate, at a concentration of 200 μ M, produced similar results. Noteworthy, both ligands had no effect on growth cone turning.

In brief, these results indicate that GPR91 and GPR99 agonists induce an increase in RGC growth when present during development. They, however, have no effects on RGC growth cone turning. These new data provide a better understanding of the mechanisms controlling RGC development.

Keywords: GPR91, GPR99, Visual nervous system, GPCR, RGC, Development.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles.....	vii
Remerciements.....	ix
1. Introduction.....	10
1.1 Le système nerveux visuel.....	11
1.1.1 La rétine.....	13
1.1.2 Le nerf optique et les noyaux visuels.....	15
1.1.3 Le cortex visuel.....	20
1.1.4 Le système optique accessoire.....	23
1.2 La formation du système nerveux visuel.....	24
1.2.1 Induction neurale.....	25
1.2.2 Les facteurs de transcription de l'identité rétinienne.....	26
1.2.3 Séparation du champ oculaire.....	29
1.2.4 Formation et polarisation de la cupule optique.....	30
1.2.5 Différentiation et développement des CGRs.....	32
1.3 Les récepteurs couplés aux protéines G.....	43
1.3.1 GPR91.....	45
1.3.2 GPR99.....	47
1.3.3 Le guidage axonal et les RCPGs.....	48
2. Objectifs de recherche.....	49
2.1 Méthodes et résultats préliminaires.....	50
2.1.1 Méthodes d'analyse.....	50
2.1.2 Résultats préliminaires.....	56
2.1.3 Résultats et expériences à ajouter.....	66
Discussion générale.....	68
3.1 Impacts présumés de GPR91 et GPR99 sur le développement du système nerveux visuel.....	68
3.1.1 Présence des récepteurs.....	68

3.1.2 L'effet du succinate sur les cônes de croissance.....	69
3.1.3 Le succinate et la croissance générale	70
3.1.4 L' α -cétoglutarate change la morphologie des cônes de croissance	71
3.1.5 L' α -cétoglutarate dans la croissance des CGRs.....	72
3.1.6 L'effet du succinate est médié par ERK1/2	73
3.1.7 Mécanismes intracellulaires de l'activité liée à GPR99	74
3.2 Impact de la recherche sur GPR91 et GPR99	74
Conclusion	76
Bibliographie.....	x

Liste des figures

Figure 1.1 : Le cheminement du système nerveux visuel chez la souris	12
Figure 1.2 : Les couches de la rétine et les cellules qui les composent	14
Figure 1.3 : Les connexions thalamus-corticales	19
Figure 1.4 : Organisation des couches de V1 et les projections afférentes du LGN.	21
Figure 1.5 : Les voies dorsale et ventrale du cortex extrastré.....	23
Figure 1.6 : Développement de l'œil et principaux facteurs de transcription.....	25
Figure 1.7 : Résumé des interactions entre facteurs de transcription	29
Figure 1.8 : L'actine forme deux types de structures dans le cône de croissance	35
Figure 1.9 : Les taux de nucléotides cycliques changent la réponse des cônes face à un ligand.....	36
Figure 1.10 : Zone d'expression des molécules régissant la voie des axones post-chiasma	40
Figure 1.11 : Direction des axones des CGRs et concentrations des molécules de guidage	43
Figure 1.12 : Fonction et cycle général des RCPGs	44
Figure 1.13 : Signalisation par $G_{\alpha q}$	45
Figure 1.14 : Mécanisme d'action du succinate sur l'hypervascularisation	47
Figure 2.1 : Marquage d'explant à l'aide de l' α -GPR91 de Novus (NLS33150).....	56
Figure 2.2 : Marquage d'explants avec α -GPR99 Santa-Cruz (84288).....	57
Figure 2.3 Marquage de coupes de rétine de souris à l' α -GPR91 et α -GPR99	58
Figure 2.4 : Photos comparatives de la croissance globale (α GAP-43).....	59
Figure 2.5 : Variation de la croissance des explants	60
Figure 2.6 : Représentation des variations de la morphologie des cônes de croissance (α GAP-43)	61
Figure 2.10: Immunobuvardage avec anticorps α P-ERK1/2	65

Liste des sigles

CA : Cellules amacrines

CBP : Cellules bipolaires

CGR : Cellules ganglionnaires de la rétine

CH : Cellules horizontales

PR : Photorécepteurs

LGN : Lateral Geniculate Nucleus, Corps genouillé latéral

LP : Noyau latéral postérieur

TRN : Noyau thalamique réticulé

SC : Colliculus supérieur

DS : Voie dorsale

VS : Voie ventrale

MTN : Medial Terminal Nucleus, Noyau terminal médial

LTN : Lateral Terminal Nucleus, Noyau terminal latéral

DTN : Dorsal Terminal Nucleus, Noyau terminal dorsal

EPR : Épithélium pigmenté de la rétine

HSPG : Heparan sulfate proteoglycan

SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1

SFRP-1 : Secreted frizzled-related protein 1

AMPC : adénosine-monophosphate cyclique

DCC : Deleted in colorectal carcinoma

RCPG : Récepteurs couplés à des protéines G

GPR91 : G-protein coupled receptor 91

GPR99: G-protein coupled receptor 99

CTb : Sous-unité b de la toxine du choléra

FBS : Fetal, Bovine Serum, Sérum foetal bovin

NDS : Normal Donkey Serum, Sérum normal d'âne

BSA : Bovine Serum Albumin, Albumine de sérum bovin

PBS : Phosphate-Buffered Saline, Tampon phosphate salin

SEM : Standard d'erreur sur la moyenne

À PA. B. et Y.L.

Remerciements

J'aimerais remercier les personnes qui m'ont soutenu contre vents et marées lors de mes études de maîtrise.

D'abord et avant tout, le plus grand merci à Jean-François Bouchard. Merci pour ton enthousiasme contagieux et apparemment infailible. Merci de m'avoir soutenu et de m'avoir permis d'aller jusqu'au bout avec bonne humeur. Je serai toujours ravi de te croiser pour un brin de jasette. L'occasion de travailler pour toi fut un grand bonheur pour moi et je t'en remercie grandement, et j'espère sincèrement avoir d'autres occasions de collaborer avec toi.

Merci à Bruno Cécyre de m'avoir épaulé à travers ma maîtrise en m'indiquant toujours les bonnes méthodes de travail, en m'aiguillant sur les bonnes notions expérimentales et en jetant un regard rigoureux sur mes techniques. J'ai grandement appris à tes côtés et j'ai eu énormément de plaisir à te côtoyer. Amuse-toi bien aux futurs congrès canadiens d'optométrie.

Merci à Hosni Chérif de m'avoir intégré dans ses recherches, de sa patience avec moi et de sa pédagogie sur les notions théoriques.

Merci à Geneviève Cyr pour ta bonne humeur, ta générosité et ton savoir sur tout ce qui touche au lab et, bien évidemment, les nombreux cafés.

Merci à François Fabi, Kevin Brasseur, Yan Bergeron, Jérôme Grenier-Naud, c'était un plaisir de vivre les aléas de la recherche avec vous malgré la distance.

Merci à René Bouchard et Danielle Coudé de m'avoir soutenu et d'être toujours là pour moi, sans autres considérations que mon bonheur.

Merci à Yvon Lévesque de m'avoir donné la chance de faire ce qui me passionnait et de m'y investir à 100%, merci également de m'avoir donné la motivation de clore cette boucle.

Merci aux Tas de feuilles (ce sont des gens) pour leur amitié.

Merci à Gabrielle Lévesque pour ton appui lors du dernier droit et ta compréhension.

1. Introduction

Le système nerveux visuel est un système complexe, hautement spécialisé qui régit l'ensemble de la fonction visuelle. La vision est, à l'aire des médias omniprésents, le sens le plus utilisé par l'être humain et sa compréhension n'en est que plus importante. Afin de bien comprendre les mécanismes intrinsèques de ce sens, il est primordial de comprendre non seulement son fonctionnement actif, mais également les mécanismes qui lui permette de se former et d'atteindre ce niveau de spécialisation qui lui donne la place privilégiée qu'il occupe dans nos vies et dans celles de tous les êtres vivants qui en bénéficient. La régulation du développement du système visuel est hautement conservée (Chow and Lang 2001) ce qui permet des études en profondeur sur la génétique et le phénotype du développement du système nerveux visuel. Les mécanismes de régulation du développement sont nombreux et redondants, c'est-à-dire que des mécanismes différents causent la même réponse, ce qui permet une certaine forme de compensation. Leur étude est primordiale pour comprendre et soigner les maladies du système nerveux visuel et c'est dans cette optique que le présent mémoire présentera d'abord le système nerveux visuel, les mécanismes globaux qui induisent sa formation lors du développement et finalement un point charnière des mécanismes cellulaires, les récepteurs couplés aux protéines G, spécifiquement, deux récepteurs suspectés d'avoir un rôle dans le développement des cellules qui forment le nerf optique, : le GPR91 et le GPR99

1.1 Le système nerveux visuel

Le système nerveux visuel comprend tout ce qui permet aux êtres vivants de percevoir et d'interpréter les fluctuations de lumière qui les entoure. Chez les mammifères, il comprend les yeux, les nerfs optiques, les tractus optiques et leurs cibles cérébrales qui sont le colliculus supérieur, le thalamus visuel et le cortex visuel, situé à l'arrière du cerveau ainsi que le système visuel accessoire. (Fig1.1)

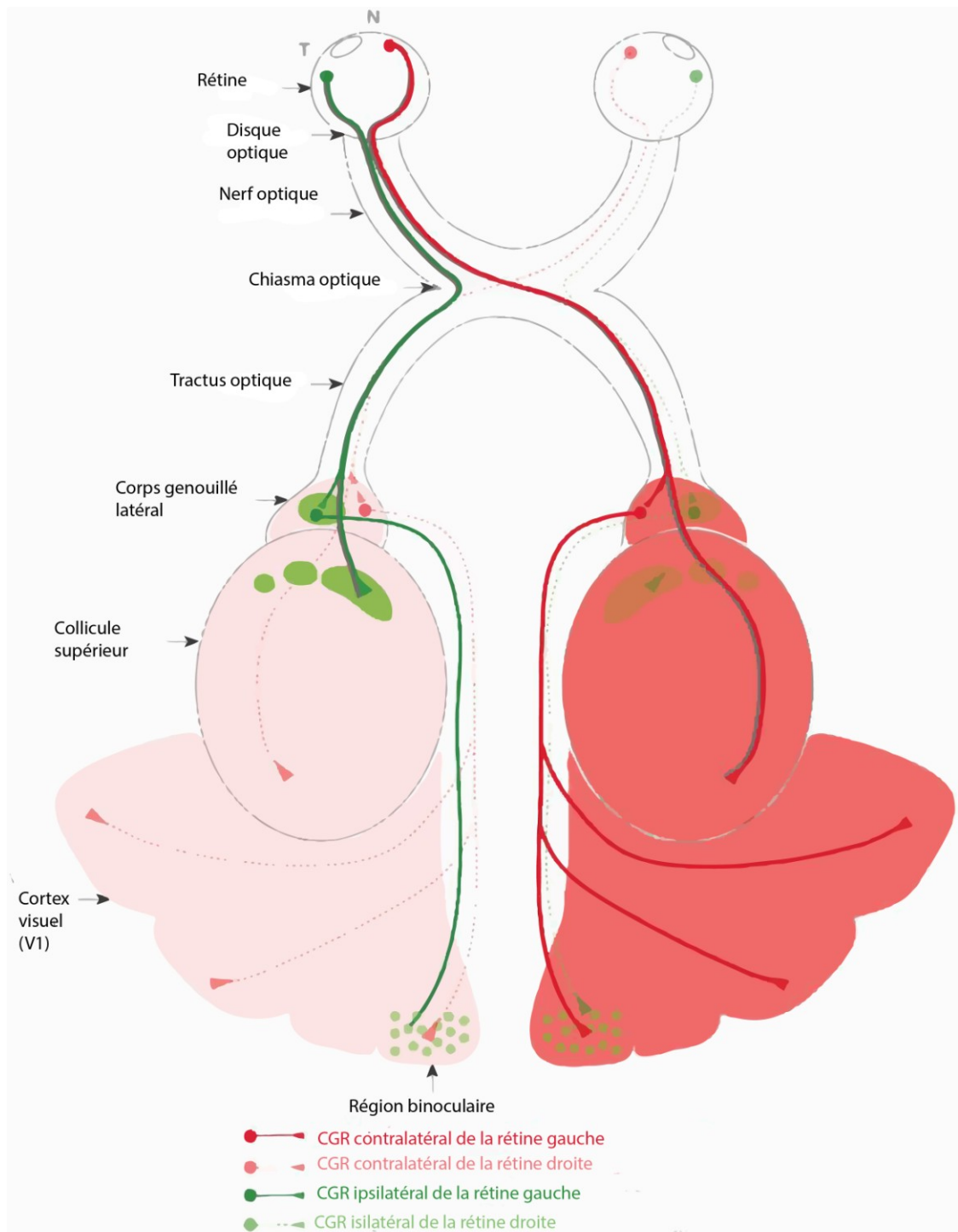


Figure 1.1 : Le cheminement du système nerveux visuel chez la souris

Rouge (solide) : axones contralatéraux de la rétine gauche. Rouge (effacé) : Axones contralatéraux de la rétine droite. Vert (solide) : axones ipsilatéraux de la rétine gauche. Vert (effacé) axones ipsilatéraux de la rétine droite. Tirée (Erskine and Herrera 2014)

1.1.1 La rétine

La rétine neuronale, la couche de cellules nerveuses qui tapisse l'intérieur du fond de l'œil, est composée de 10 types de cellules nerveuses qui permettent de capter un signal lumineux, de le transformer en signal électrique et de l'acheminer au nerf optique. De l'extérieur de la rétine vers l'intérieur, ces couches cellulaires sont l'épithélium pigmentaire, la couche des photorécepteurs (PRs), qui contient les parties réceptrices des cônes et des bâtonnets, la membrane limitante externe qui sépare la majeure partie des récepteurs de leurs corps cellulaires, qui eux se trouvent dans la couche nucléaire externe. La couche suivante se nomme la couche plexiforme externe et est l'endroit où se trouvent les synapses entre les segments terminaux des photorécepteurs et les dendrites des cellules bipolaires (CBPs), qui transmettent les signaux des cellules photoréceptrices aux cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) situées de façon plus interne dans la rétine. Suit la couche nucléaire interne qui elle contient les corps cellulaires des cellules horizontales (CHs), des interneurones qui régulent les signaux des PRs aux CBS, des cellules amacrines (CAs), d'autres interneurones qui eux modulent les signaux entre les CBs et les CGRs, et des CBs elles-mêmes. La couche suivante est la couche plexiforme interne qui elle contient les synapses entre les CBs, les CAs et les CGRs. On en vient à la couche des CGRs, qui contient évidemment les corps cellulaires des cellules dont elle porte le nom ainsi que quelques CAs déplacées (Fig1.2). Les axones des CGRs s'étendent et se rejoignent vers l'intérieur de l'œil pour former la couche des fibres nerveuses. La dernière couche de la rétine est composée d'astrocytes et des pieds des cellules de Müller, des cellules gliales supportant les neurones de la rétine et qui se retrouvent au travers de celle-ci. La couche se nomme membrane limitante interne (Purves 2012). Elle fait la séparation entre la rétine et l'humeur vitrée.

Sous l'influence de certains facteurs de croissance qui seront discutés plus amplement plus loin, les axones des CGRs se rejoignent en un point appelé le disque optique. Ce point correspond à la tête du nerf optique et c'est de là que les axones des CGRs quittent le globe oculaire pour rejoindre leurs cibles cérébrales spécifiques. Ces cibles sont déterminées par le sous-type de CGRs dont l'axone provient. On compte actuellement près de 20 sous-types (Dacey, Peterson et al. 2003, Coombs, Van Der List et al. 2007).

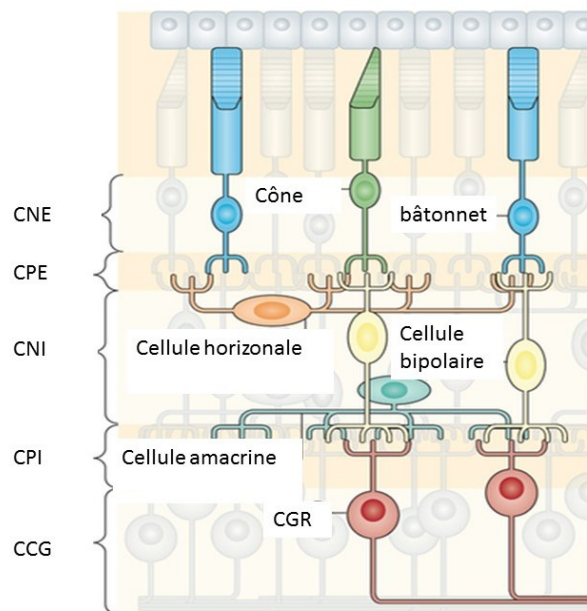


Figure 1.2 : Les couches de la rétine et les cellules qui les composent

La couche nucléaire interne (CNE) comprend les noyaux des photorécepteurs (PR). La couche plexiforme externe (CPE) présente les connexions entre les PRs, les cellules horizontales (CH) et les cellules bipolaires (CB). La couche nucléaire interne (CNI) et les noyaux des CHs, des cellules amacrines (CA) et des CBs. La couche plexiforme interne et les connexions entre les CBs, CAs et cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). La couche des cellules ganglionnaires (CCG) contient les corps cellulaires et les noyaux des CGRs. La membrane limitante interne, contenant les pieds des cellules de Müller, n'est pas représentée. (adaptée de (Cepko 2014))

1.1.2 Le nerf optique et les noyaux visuels

Les fibres du nerf optique suivent un chemin direct jusqu'au chiasma optique, où elles croisent les fibres de l'œil controlatéral. À ce point, la direction que prennent les fibres dépend du type de CGR dont elles proviennent ainsi que de l'emplacement dans la rétine de celles-ci. Un élément crucial dans la détermination de la direction que prendront les fibres est l'importance du champ de vision binoculaire dans l'espèce de vertébré à l'étude. Ainsi chez les primates, où l'évolution a mené à une disposition frontale des yeux, les axones provenant de CGR située sur la rétine temporale d'un œil sont dirigés de façon ipsilatérale, c'est-à-dire du même côté du cerveau, que cet œil. Les axones provenant de la rétine nasale s'orientent controlatéralement, soit du côté du cerveau opposé à l'œil dont elles proviennent. La proportion d'axones ipsilatéraux est similaire à celle des axones contralatéraux. Par contre, chez la souris, où les yeux sont disposés latéralement, et donc chez qui le champ binoculaire est réduit, la proportion d'axones ipsilatéraux est de l'ordre de 3% à 5% (Jeffery and Erskine 2005).

À partir de cet endroit, les axones suivent les tractus optiques jusqu'aux principaux noyaux visuels, c'est-à-dire les corps genouillés latéraux (LGN) et le colliculus supérieur (CS) qui a un rôle majeur dans l'attention et dans les mouvements de saccade des yeux (McPeck and Keller 2002). Chez les primates, les couches du LGN sont les cibles principales des axones de CGRs, alors que chez les rongeurs, le colliculus supérieur reçoit la plupart de ces axones (Erskine and Herrera 2014). Deux autres cibles thalamiques seront décrites, le noyau thalamique réticulé et le pulvinar (Saalman and Kastner 2011). Ce dernier n'est pas présent chez la souris, mais sa description est néanmoins intéressante en vue d'étude sur d'autres modèles animaux. Le noyau latéral postérieur est la structure homologue du pulvinar chez les rongeurs (Roth, Dahmen et al. 2016).

1.1.2.1 Le corps genouillé latéral

Considérons d'abord le corps genouillé latéral, une structure du thalamus qui sert non seulement de relais, mais également de modulateur des signaux reçu en fonction de l'attention donnée à ces derniers (O'Connor, Fukui et al. 2002). Son organisation cellulaire change selon les espèces. Chez la souris, il s'agit d'une structure fait de deux sous-régions définies par le type de CGRs qui les innervent (Clasca, Rubio-Garrido et al. 2012). La région externe (*Shell*), les 75 premiers μm de la structure, reçoit les afférences de neurones sélectifs à la direction, c'est-à-dire à des signaux lumineux ayant une orientation particulière (Nath and Schwartz 2016) et projette principalement dans les couches 1 et 2 du cortex visuel V1 (Zhao, Chen et al. 2013) (Kondo and Ohki 2016). Les cellules internes (*core*) reçoivent principalement des afférences dont les champs récepteurs sont sensibles au contraste selon l'organisation « centre-contour » (Piscopo, El-Danaf et al. 2013) et projettent dans la couche 4 de l'aire visuelle V1 (Cruz-Martin, El-Danaf et al. 2014).

Chez les primates, c'est une structure complexe composée de plusieurs couches cellulaires de différents types. On considère d'abord six couches principales qui reçoivent des signaux de l'un ou l'autre des yeux. Les quatre couches dorsales sont faites de neurones dits parvocellulaires (P), soit petits, qui répondent à des signaux soutenus et sont peu sensibles aux contrastes. Ces caractéristiques indiquent une utilité dans le traitement de la couleur et de la forme (Wiesel and Hubel 1966, Derrington, Krauskopf et al. 1984). Les deux couches ventrales quant à elles sont formées de neurones magnocellulaires (M), de taille plus importante et qui répondent à des signaux « *ON-OFF* » et possèdent une grande sensibilité aux contrastes. Les couches ventrales démontrent ainsi une utilité à discerner le mouvement et les distances (Wiesel and Hubel 1966, Derrington and Lennie 1984). À chacune de ces couches principales, il faut ajouter une mince sous-couche ventrale contenant de très petits neurones, les neurones koniocellulaires (K) (Kaas, Huerta et al.

1978). Ces petits neurones reçoivent et relaient l'information provenant des cônes qui réagissent aux courtes longueurs d'onde (S) (Roy, Jayakumar et al. 2009). La spécialisation des couches du LGN chez les primates est liée à la nature des axones de CGRs qui atteignent ces couches.(Dacey, Peterson et al. 2003). Les axones qui partent du LGN rejoignent tous des cibles dans l'aire visuelle primaire V1, principalement dans la couche IV (Blasdel and Lund 1983).

1.1.2.2 Le noyau latéral postérieur

Le noyau latéral postérieur (LP) est une structure importante de l'intégration des signaux sensoriels, qui reçoit des afférences de la rétine, du colliculus supérieur et du cortex visuel (Morin and Studholme 2014, Allen, Procyk et al. 2016, Roth, Dahmen et al. 2016). Les projections du cortex visuel proviennent des couches 5 et 6 de V1, ainsi que de couches 5 et 6 des aires corticales supérieures. Le noyau lui-même projette dans la couche 1 de V1, ainsi que dans les endroits dont il reçoit des afférences (Roth, Dahmen et al. 2016) (Tohmi, Meguro et al. 2014). Au point de vue fonctionnel, le LP sert à déterminer la saillance visuelle, à intégrer de l'information motrice et à gérer certaines réponses de stress et de peur, de concert avec le colliculus supérieur (Wei, Liu et al. 2015).

1.1.2.3 Le pulvinar

Le pulvinar constitue le plus gros noyau thalamique. Il est traditionnellement divisé selon ses caractéristiques anatomiques. On compte donc le pulvinar médial, latéral, inférieur et antérieur. Ces divisions représentent cependant mal les fonctions et les connexions de cette structure (Adams, Hof et al. 2000). Le pulvinar présente de nombreuses connexions avec le cortex visuel, en effet, les zones striées et extrastriées du cortex visuel projettent vers les zones latérale et inférieure du pulvinar. La zone temporelle moyenne (V5) du cortex visuel projette vers la zone médiale et latérale du pulvinar. Les cortex

frontaux et pariétaux projettent vers les portions dorsales du pulvinar latéral et médial (Adams, Hof et al. 2000, Gutierrez, Cola et al. 2000, Shipp 2001). De l'interconnectivité étendue entre le cortex et le pulvinar, on devine un rôle fondamental dans la régulation des connexions cortico-corticales (Sherman and Guillery 2002, Shipp 2003). Le pulvinar joue un rôle dans le maintien de l'attention, dans l'analyse sensorielle, dans le maintien d'un état actif du cortex (Zhou, Schafer et al. 2016) et d'intégration senso-motrice (Roth, Dahmen et al. 2016). Cette structure n'est pas présente chez la souris, chez qui la plupart de ces fonctions sont remplies par le LP.

1.1.2.4 Le noyau thalamique réticulé

Le TRN est divisé en secteurs relatifs aux afférences qu'il reçoit (McAlonan, Cavanaugh et al. 2006). Le TRN visuel reçoit des influx collatéraux de la couche 6 de V1 qui retournent au LGN (fig.1.3). Ces afférences sont excitatrices, en contraste avec les efférences du TRN qui sont inhibitrices (Cox, Huguenard et al. 1997, Kim, Sanchez-Vives et al. 1997). Les afférences du thalamus provenant des autres noyaux sont rigoureusement ségréguées. Ainsi les fibres provenant du LGN et de l'aire visuelle V1 terminent toutes dans les deux tiers latéraux de la portion caudale du TRN. Les fibres provenant du pulvinar quant à elles sont connectées avec le tiers médial du TRN (Conley and Diamond 1990). Les neurones provenant du TRN qui projettent dans le LGN de façon rétinotopique, ce qui suggère une influence sur l'analyse thalamique à des endroits spécifiques du champ visuel. Cependant, cette action ne se fait pas par le biais d'une modulation directe des couches cellulaires du LGN, considérant que chaque fibre du TRN s'arborise pour rejoindre les trois couches (M) (K) (P) du LGN (Uhlrich, Manning et al. 2003). Il existe également des connexions du TRN au pulvinar, elles ne sont cependant que faiblement organisées de façon rétinotopique (Fitzgibbon, Tevah et al. 1995). Le TRN forme principalement des

boucles ouvertes de connexions avec les neurones thalamo-corticaux. Comme ces derniers sont glutaminergiques et que les neurones du TRN sont GABAergiques, l'hypothèse d'un rôle de mécanisme d'inhibition latérale par le TRN est grandement supportée (Pinault and Deschenes 1998, Jones 2002). Les interactions entre les noyaux thalamiques et le cortex visuel sont représentées à la figure 1.3

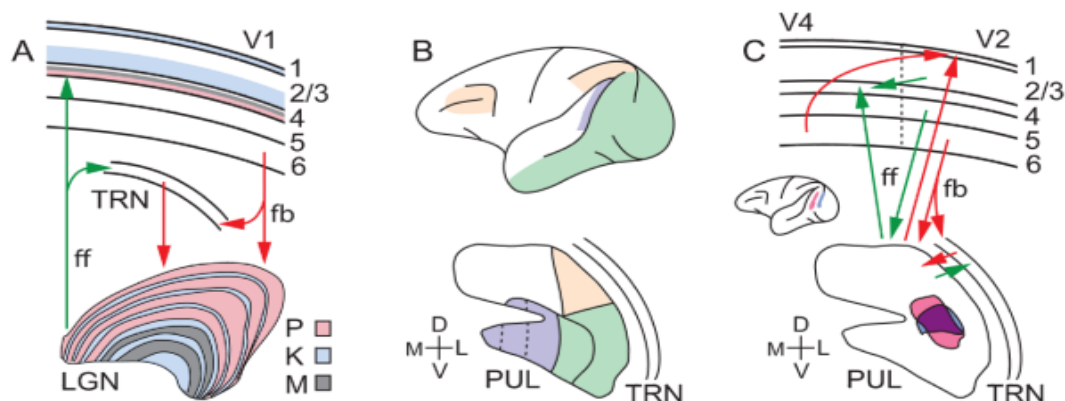


Figure 1.3 : Les connexions thalamus-corticales

(A) Les projections des couches parvo (P), magno (M) et koniocellulaires (K) du corps genouillé latéral (LGN) vers les couches de l'aire visuelle V1 ainsi que la rétroaction de la couche 6 de V1 vers le LGN. On observe également (B) les connexions entre le cortex et le pulvinar (PUL). (C) Les connexions cortico-corticales directes (haut) et les boucles cortico-thalamo-corticales indirectes, schématisées en circuit V2-Pulvino-V4. Des injections de traceurs dans V2, en bleu et V4, en rose montre un marquage qui se superpose, en violet, dans le pulvinar (bas). On observe des boucles de connexions fermées entre le TRN et le pulvinar. Tirée de (Saalmann and Kastner 2011), adaptée de (Adams, Hof et al. 2000)

1.1.2.5 Le colliculus supérieur

Un autre noyau visuel important chez les mammifères est le colliculus supérieur (SC), qui correspond au tectum optique chez les autres vertébrés. Il se situe dans le

mésencéphale, reçoit des projections axonales directement de la rétine. De ce fait, on l'associe depuis de nombreuses années à un rôle primordial dans la vision et la réponse motrice face à cette dernière (Wurtz and Albano 1980). C'est une structure faite de 7 couches cellulaires distinctes qui peuvent être subdivisées en couches superficielles et couches profondes. Les couches superficielles, la couche superficielle grise et la couche optique sont exclusivement dédiées aux influx nerveux du système visuel. Les couches profondes, qui sont les sous-couches grises et blanches des couches intermédiaires et profondes reçoivent quant à elles des influx somatiques, auditifs et visuels en plus d'être la source des commandes aux noyaux pré moteurs réticulés responsables de la coordination des mouvements vers les cibles de l'attention spatiale (Sparks and Hartwich-Young 1989, King 2004, Wolf, Lintz et al. 2015). Les projections axonales des CGRs au SC s'organisent de façon rétinotopique, ainsi les axones provenant de CGRs situées sur le côté nasal de la rétine projettent à des cibles au bout postérieur du SC, les CGRs temporales projettent au bout antérieur et les CGRs de l'axe dorsoventral s'alignent réciproquement sur l'axe médial latéral du SC (Wurtz and Albano 1980, Erskine and Herrera 2007).

1.1.3 Le cortex visuel

Le cortex visuel se situe dans le lobe occipital du cerveau et est composé de plusieurs aires. L'aire visuelle primaire, V1, aussi appelé cortex strié, est la zone du cortex qui reçoit les influx provenant du LGN. V1 reçoit en fait les influx du LGN ipsilatéral de façon topographique ce qui produit une représentation rétinotopique du champ visuel. Les aires visuelles V2, V3, V4 et V5, ou temporale moyenne (MT) forment le cortex extrastrié et reçoivent des influx directs de V1 et des influx de certains noyaux thalamiques comme le LP.

1.1.3.1 Le cortex visuel primaire (V1)

Correspondant à l'aire de Brodmann 17, l'aire visuelle primaire est régulièrement appelée cortex strié dû à une bande visible, une strie, situé dans la sous-couche 4 et appelée ligne de Gennari qui correspond aux afférences axonales du LGN à cet endroit (Hubel and Wiesel 1968). V1 est séparé en 6 sous-couches, simplement gradé de 1 à 6 (Hall, Kaas et al. 1971, Purves 2012), la sous-couche 1 étant la plus superficielle. La couche 4, qui reçoit les afférences du LGN est à nouveau séparée en sous-couches 4A, 4B et 4C α et 4C β . On remarque à l'aide de molécule de traçage antérograde que les axones du LGN conservent une certaine ségrégation dans les couches de V1. Ainsi, les cellules dont les caractéristiques de réponse correspondent à la voie parvocellulaire se terminent dans la couche 4C β tandis que celles qui correspondent à la voie magnocellulaire s'achèvent en 4C α . On observe certaines projections de la voie parvocellulaire dans 4A, qui serait des projections *blue-off* (Chatterjee and Callaway 2003). L'acheminement des axones du LGN vers V1 en fonction de leur réponse physiologie se retrouve à la figure 1.4

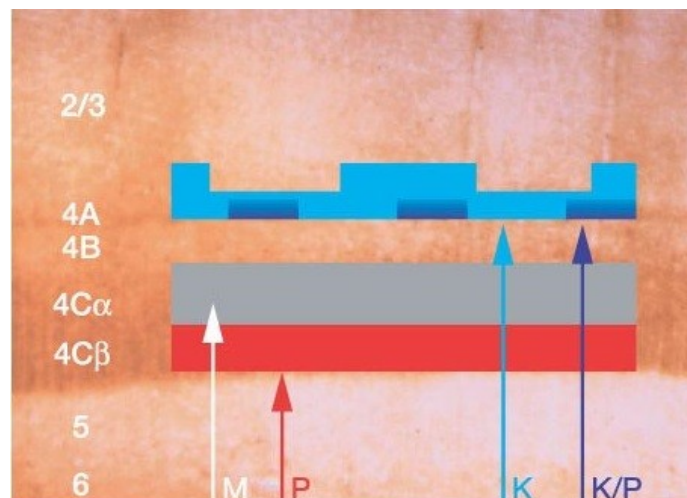


Figure 1.4 : Organisation des couches de V1 et les projections afférentes du LGN.

Sont représentées les couches de V1 et les projections du LGN en relation avec la réponse physiologique de couleurs de ces projections. La voie magnocellulaire (M) projette en 4C α de façon achromatique, La voie parvocellulaire se termine en 4C β

en rouge/vert. Les projections retrouvées en 4A sont d'origine koniocellulaire (K) bleu-on, on retrouve également certaines projections parvocellulaires bleu-off dans cette couche (P/K). Tirée de (Chatterjee and Callaway 2003)

1.1.3.2 Le cortex visuel extrastrié

Les aires visuelles V2, V3, V4 et V5 sont situées dans les aires de Brodmann 18 et 19. Ce sont les aires associatives du cortex visuel qui sont responsables de la reconnaissance des formes, des mouvements et des couleurs. Ils forment entre eux deux voies d'analyse des signaux visuels, la voie ventrale (Ventral Stream (VS)) et la voie dorsale (Dorsal Stream (DS)). On classe généralement ces voies comme suit : la voie ventrale qui suit V2 puis V4 et rejoint le cortex temporal (Ferrera, Nealey et al. 1994); la voie dorsale elle suit V2, V5 et rejoint le cortex pariétal (Maunsell and Van Essen 1983). La VS est associée à la reconnaissance d'objets et l'intégration de la mémoire à long terme, tandis que la DS est celle de la vision spatiale et des réponses motrices. L'aire V2 reçoit les influx directement de V1 et quelques influx indirects du pulvinar (Merigan, Nealey et al. 1993). La description exacte des connexions et la fonction des aires du cortex visuel extrastrié dépassent le cadre de ce document. La figure 1.5 représente un modèle de direction des influx à travers les cortex extrastriés

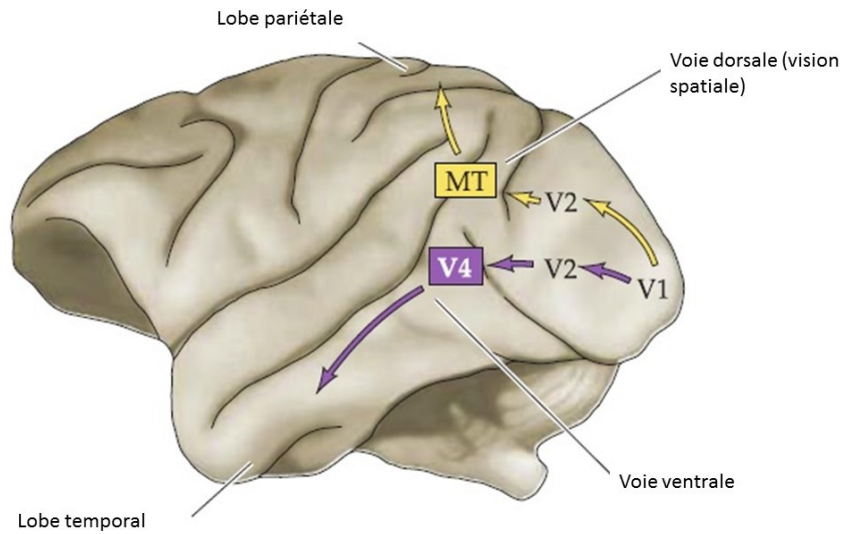


Figure 1.5 : Les voies dorsale et ventrale du cortex extrastré

La voie ventrale, dite la voie des « quoi? » intègre les signaux de V1 par V2 puis achemine l'information à V4 et le long de l'axe ventral jusqu'au lobe temporal. Le voie dorsale « où? » prend les mêmes signaux intégrés à V2, mais progresse à travers le cortex dorsal pour rejoindre l'aire MT, centre d'intégration spatial et continu le long de l'axe jusqu'au cortex pariétal. Tirée de (Purves 2012)

1.1.4 Le système optique accessoire

Le système optique accessoire est un système parallèle au système visuel primaire qui reçoit de nombreuses afférences de la rétine et qui occupe un rôle de stabilisateur de la fonction visuelle, en permettant un mouvement fluide des yeux par exemple (Simpson 1984). Le système est présent chez tous les mammifères, bien que comme le système visuel primaire, il existe des différences majeures d'une espèce à l'autre (Giolli 1963, Lin and Giolli 1979, Simpson 1984). Chez les rongeurs, son étude est particulièrement intéressante dû au faible nombre de projections rétiniennes au LGN dans ces espèces. Il comprend deux faisceaux de fibres nerveuses optiques qui rejoignent trois noyaux du mésencéphale antérieur qui sont les noyaux latéral terminal, dorsal terminal et médial

terminal (Simpson 1984). On constate que les fibres semblent être spécifiques à ces noyaux (Dann and Buhl 1987). Le faisceau inférieur est formé de fibres qui traversent tardivement du côté contralatéral et divergent du tractus optique médialement pour rejoindre la partie dorsale du noyau terminal médian (MTN) situé dans le mésencéphale (Hayhow, Webb et al. 1960). L'autre faisceau, appelé faisceau supérieur est plus important et plus superficiel. Il provient de la marge postérieure du tractus optique et de la marge inférieure du colliculus supérieur et une partie des fibres rejoint le noyau latéral terminal (LTN), tandis qu'une autre partie des fibres progresse jusqu'au noyau terminal dorsal (DTN). (Hayhow, Webb et al. 1960). L'importance de ces noyaux varie grandement d'une espèce à l'autre, chez les primates par exemple, la partie ventrale du MTN ne semble simplement pas exister et le DTN est nettement plus visible (Cooper, Baleyrier et al. 1990, Lui, Gregory et al. 1995)

Les noyaux accessoires reçoivent également des influx de certaines aires visuelles, bien que ces connexions varient selon l'espèce. Chez le chat, on observe des fibres directes de V1 au MTN (Marcotte and Updyke 1982). Chez les primates, certaines études observent des projections de V1 au DTN, mais ces observations sont irrégulières, probablement dû au fait que seules les zones rétinotopiques spécifiques de V1 projettent à ce noyau (Maioli, Squatrito et al. 1989, Lui, Gregory et al. 1995), revue par (Giolli, Blanks et al. 2006). Le LTN et le DTN sont utilisés dans certaines études afin de vérifier l'influence de certaines molécules sur la croissance des CGRs. (Argaw, Duff et al. 2008, Argaw, Duff et al. 2011).

1.2 La formation du système nerveux visuel

À la base, l'œil provient de l'interaction des tissus embryonnaires neuroectoderme et mésoderme (Gray, Standring et al. 2005). La première étape abordée sera l'établissement, lors du développement, d'une identité rétinienne, par une cascade de

facteurs de transcription primordiaux comme *Pax6* et *Six3* (Loosli, Winkler et al. 1999, Chow and Lang 2001). Par la suite, une revue des molécules classiques permettant aux CGRs de rejoindre leurs cibles thalamiques comme la nétrine-1 et les éphrines (Erskine and Herrera 2007) sera présentée. L'ensemble du développement et des molécules impliquées dans la formation des yeux est représenté à la figure 1.6

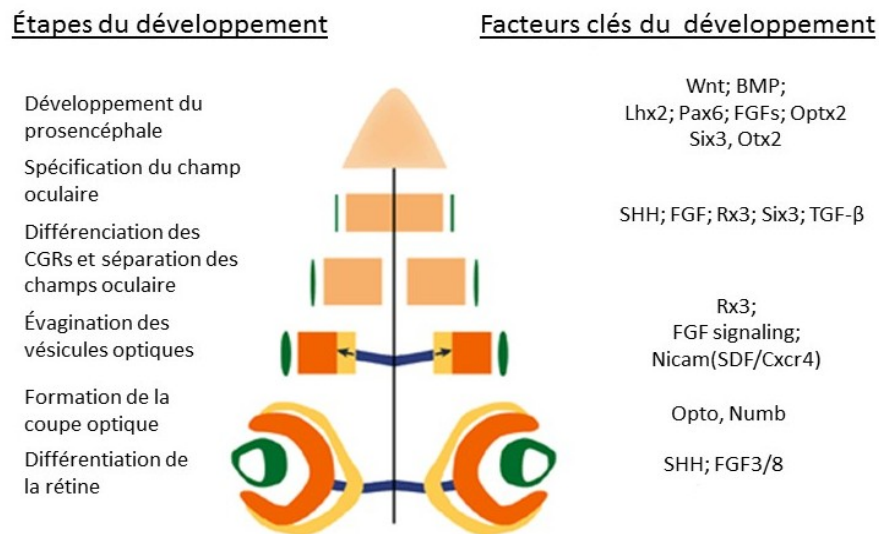


Figure 1.6 : Développement de l'œil et principaux facteurs de transcription

L'axe vertical représente le temps. Puisque cette succession est la même chez toutes les espèces, les durées absolues varient, mais les événements suivent le même ordre. Les étapes du développement sont représentées à gauche, à droite sont les facteurs agissants sur ces étapes. En orange, on observe les parties destinées à devenir la rétine, en vert le cristallin. Le bleu représente le tractus optique, le jaune le RPE. Tirée de (Sinn and Wittbrodt 2013) adaptée de (Wittbrodt, Shima et al. 2002)

1.2.1 Induction neurale

L'induction neurale est un phénomène présent chez tous les vertébrés et qui suit des mécanismes hautement conservés. Une des premières familles de molécules impliquées dans l'induction est celle des *Fibroblast Growth* factors (FGFs), qui activent le processus

de répression des *Bone morphogenic proteins* (BMPs) et des *Wingless-type* (Wnt) en activant des molécules telles que *Noggin*, *Chordin* et *Cerberus* (Hongo, Kengaku et al. 1999, Wilson, Graziano et al. 2000). La répression des BMPs et Wnts est fondamentale à la formation de la tête et de l'induction neurale, comme le démontrent les expériences de répression ectopiques de ces molécules qui causent la formation de têtes secondaires (Glinka, Wu et al. 1997, Niehrs 1999, Piccolo, Agius et al. 1999). Par la suite, une régulation gradée de Wnt à l'aide de l'*axin1* permet une division de la plaque neurale pour la formation de l'ouverture des yeux, du télencéphale et du diencephale (Heisenberg, Houart et al. 2001).

1.2.2 Les facteurs de transcription de l'identité rétinienne.

Les premières molécules qui ont un impact sont *Otx1/2*, des facteurs de transcription de la famille des *orthodenticles* (homologue d'*Otd* chez la drosophile), qui présentent tous un homéodomaine de classe bicoïde (Simeone, Acampora et al. 1993). Chez les mammifères tels que la souris, on retrouve *Otx1* et *Otx2* dans les précurseurs des organes sensitifs en développement, soit les vésicules optiques en ce qui concerne le système nerveux visuel. On les retrouve également dans le *Primordium* du prosencéphale. Après les premiers stages du développement, leur expression dans la vésicule optique se régionalise. *Otx1* se retrouve transcrit plus tard dans le développement au niveau de l'iris, des processus ciliaires et des glandes lacrymales. *Otx2* quant à lui est localisé de façon plus restreinte dans la partie dorsale de la vésicule optique et dans le territoire présumé de l'épithélium pigmenté (Sen, Reichert et al. 2013). Il est intéressant de noter que dans les embryons chimériques *Otx2*^{-/-}. L'expression des facteurs *Six3* et *Hesx1/Rpx*, des marqueurs importants de l'œil et du prosencéphale, est amorcée, mais n'est pas maintenue,

ce qui suggère qu'*Otx2* n'est pas requis dans l'activation de la transcription de ces facteurs, mais bien dans le maintien de ces derniers et de la spécialisation régionale (Rhinn, Dierich et al. 1998).

Hex1/Rpx est un facteur de transcription à domaine *paired-like* qui est exprimée dans la gastrula. D'abord présent dans la partie antérieure de la plaque neurale, son expression est par la suite limitée à la poche de Rathke, qui constitue le Primordium de l'hypophyse. (Hermesz, Mackem et al. 1996). Chez l'homme, une mutation de *Hex1/Rpx* induit une dysplasie septo-optique, une condition caractérisée par une hypoplasie du nerf optique et de l'hypophyse. Il est proposé que le facteur de transcription joue un rôle dans la régulation de la taille du prosencéphale, ce fait, additionné au fait que l'expression de *Hex1/Rpx* est restreinte à l'hypophyse par la suite, induit à penser que le rôle de cette molécule sur la taille du nerf optique est plutôt indirect et lié à la taille du prosencéphale (Dattani, Martinez-Barbera et al. 1998).

Un autre facteur de transcription de la famille *paired-liked*, *Pax6*, joue un rôle primordial dans le développement de l'œil. C'est un gène qui possède un taux conservation dramatiquement élevée à travers l'évolution. (Callaerts, Halder et al. 1997). Il est d'abord exprimé dans la plaque neurale antérieure vers la fin de la gastrulation. On sait que son rôle est critique, car lorsque le mode d'expression de ce facteur est modifié, en introduisant des loci supplémentaires du gène dans des animaux, le changement induit des défauts dans les yeux de ces derniers (Schedl, Ross et al. 1996). Un cas particulier de ces défauts d'expression est le pouvoir d'*eyeless*, l'homologue de *Pax6* chez la drosophile, à induire la formation d'yeux ectopiques sur les ailes, les pattes et les antennes (Halder, Callaerts et al. 1995). On peut également induire la formation de yeux ectopiques différenciés chez

Xenopus par la modification de l'expression de *Pax6*. Cette surexpression de *Pax6* mène également une expression ectopique de gènes de développement de l'œil comme *Otx2* et *Rx*. Plus encore, cette surexpression de *Pax6* induit une expression endogène de *Pax6*, c'est-à-dire que ce facteur de transcription force une rétro activation sur lui-même (Chow, Altmann et al. 1999). Ces découvertes ont amené plusieurs chercheurs à penser que *Pax6* et ses homologues jouaient le rôle de maîtres du développement des yeux (Halder, Callaerts et al. 1995).

Le rôle de facteur de transcription « maître » dans le développement des yeux pourrait également être attribué à *Six3*, un facteur de transcription grandement conservé chez les animaux bilatéraux et dont l'influence dans le développement du prosencéphale est primordiale (Lowe, Wu et al. 2003). Son expression est observée dans le neurectoderme antérieur à l'étape de la gastrula et se concentre dans le champ d'œil par la suite (Chow and Lang 2001, Kamijyo, Yura et al. 2015). Lorsque son expression est activée, *Six3* réprime également l'expression de *Wnt1* (Lagutin, Zhu et al. 2003). Cette répression est essentielle à la formation du prosencéphale chez les vertébrés. De plus, il faut noter que lorsque *Six3* est rendu muet par *knockdown*, le développement des yeux induit par *Pax6* n'est pas maintenu (Philips, Stair et al. 2005). Le rôle de *Six3* dans la régulation du développement du prosencéphale est hautement conservé à travers l'évolution (Sinigaglia, Busengdal et al. 2013)

Un autre facteur de transcription de type homeobox *paired-like* dont le rôle est fondamental dans la spécialisation de la rétine est *Rx*, pour *Retinal homeobox transcription factor*. Ce facteur est retrouvé chez tous les vertébrés et joue un rôle crucial dans la morphogénèse de la cupule optique, qui est une forme plus développée de la vésicule optique, et dans la différenciation des photorécepteurs (Mathers, Grinberg et al. 1997,

Chuang, Mathers et al. 1999). Les souris présentant le phénotype $Rx^{-/-}$ sont non seulement anophtalmiques, mais la formation de la cupule optique n'est même pas induite chez l'embryon (Zhang, Mathers et al. 2000).

Ce qui ressort de l'action de ces facteurs de transcription, c'est qu'une fois les facteurs de transcription liée au champ oculaire, la zone spécialisée du prosencéphale où se forme l'œil, activé par *Noggin* et *Otx2*, ils s'expriment en boucles superposées pour régulier la formation des structures primordiales de l'œil en développement (Zuber, Gestri et al. 2003). La relation en boucles superposées est représentée à la figure 1.7.

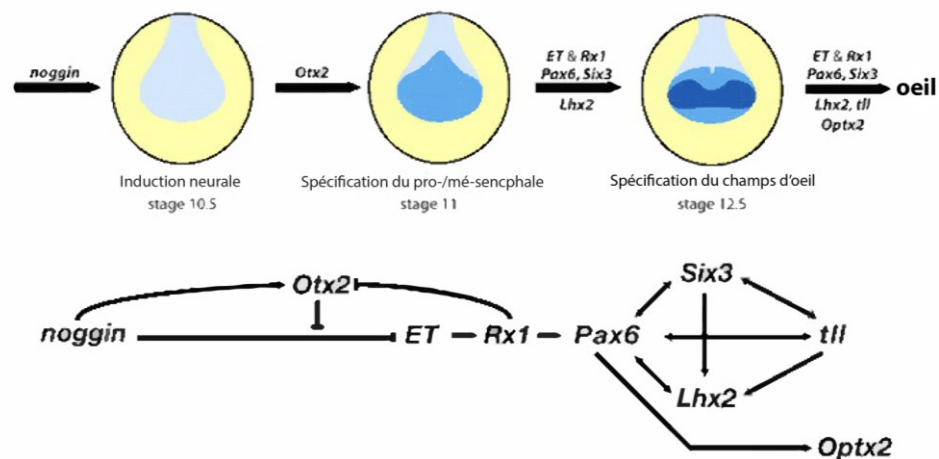


Figure 1.7 : Résumé des interactions entre facteurs de transcription

En bleu pâle, la plaque neurale. En bleu sont les zones d'expression d'*Otx2*. Le bleu foncé correspond au champ oculaire. Tiré de (Zuber, Gestri et al. 2003)

1.2.3 Séparation du champ oculaire

L'identité rétinienne du champ oculaire est établie à partir du moment où l'on observe en simultanément l'expression de *Rx*, *Pax6* et *Six3* dans le centre de ce dernier. C'est à partir de ce moment que le mésoderme sous-jacent exprime les TGF β , FGF et Shh (*sonic hedgehog*), notamment sous l'influence du facteur *cyclops* (*cyc*) qui permettent la séparation du champ oculaire en deux primordium rétiniens bilatéraux symétriques

(Rebagliati, Toyama et al. 1998, Schier 2003). Suite à la présence de ces facteurs, des cellules précurseurs hypothalamiques prospectives migrent d'une position postérieure vers le centre du champ oculaire et scindent ce dernier en deux (Hirose, Varga et al. 2004, England, Blanchard et al. 2006). C'est sur ces cellules, sensibilisées par FGF, que Shh, exprimé par la notochorde de la plaque du plancher, agit en haute concentration pour induire des identités cellulaires proximales, telle que la glie du tractus optique (Carl and Wittbrodt 1999). Les cellules qui réagissent à la présence de Shh expriment par la suite de nouveaux facteurs de transcription homeobox qui enclenche la détermination d'une lignée cellulaire dans un tissu. Ces facteurs sont *Vax1*, *Vax2* et *Pax2*, tous d'actifs participants dans la modélisation de l'œil en développement particulièrement dans la ventralisation de l'œil embryonnaire et le développement de la rétine neurale (Ou, Bharti et al. 2013), (Mui, Kim et al. 2005, Liu, Liu et al. 2008, Viringipurampeer, Ferreira et al. 2012).

L'expression territoriale gradée de Shh est accompagnée par une perte territoriale gradée de l'expression de *Six3* confirmant un rôle non seulement dans la prolifération des cellules de l'œil pour le facteur de transcription, mais également dans la modélisation des tissus de l'organe (Carl and Wittbrodt 1999, Sinn and Wittbrodt 2013). Le rôle de *Six3* est donc un équilibre entre la prolifération et la différenciation dans le développement de l'œil, rôle qui est accompli par l'interaction entre *Six3* et Geminin, un facteur d'inhibition précoce de la réplication (Del Bene, Tessmar-Raible et al. 2004).

1.2.4 Formation et polarisation de la cupule optique

À ce point, la prolifération des cellules progénitrices de la rétine (CPRs) est activée par le facteur Chx10 qui est exprimé par le contact de la coupe optique et de l'ectoderme de surface (Burmeister, Novak et al. 1996). La migration de d'autres CPRs est amorcée par le facteur Rx, ainsi que par une gamme de molécules d'adhésion moléculaire, les Nlcam

(CAM)(Brown, Keller et al. 2010). Cette migration cause l'évagination des vésicules optiques qui permet la formation de la coupe optique, faisant passer l'œil en formation d'une structure à 2 couches en forme de balle, à une structure multicouche en forme de coupe entourée de l'épithélium pigmenté de la rétine (EPR), qui s'est différencié de la rétine neurale à l'aide des facteurs sécrétés par le mésenchyme extracellulaire (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Ces facteurs sont peu connus, mais on reconnaît le rôle joué par des facteurs de la cascade de signalisation *Hippo*, soit *Yap* et *Taz* (Miesfeld, Gestri et al. 2015). On reconnaît la formation de l'EPR par la présence de facteurs spécifiques comme *Mitf* (Ou, Bharti et al. 2013, Steinfeld, Steinfeld et al. 2013). La morphogénèse de la coupe optique est régulée par les transcriptions du gène *ojoplano (opo)*, comme le démontrent les études de mutation sur ce gène, dans lesquels les sujets mutés ne peuvent amorcer la morphogénèse (Loosli, Del Bene et al. 2004, Martinez-Morales, Rembold et al. 2009) L'impact de *Opo* sur la formation passe par son interaction sur les adaptateurs des clathrines *numb* et *numbl*, ce qui module la synthèse de β -intégrine (Bogdanovic, Delfino-Machin et al. 2012).

La cupule optique se polarise sur l'axe dorso-ventral et l'axe antéro-postérieur suivant l'expression de facteurs spécifiques à cette polarité. Ainsi, sur la partie ventrale de la rétine neurale, on remarque l'expression de *Vax2* (Barbieri, Lupo et al. 1999, Schulte, Furukawa et al. 1999, Barbieri, Broccoli et al. 2002) et *Pax2* (Dressler, Deutsch et al. 1990, Nornes, Dressler et al. 1990) tandis que la partie dorsale exprime *Tbr-5* (Gibson-Brown, S et al. 1998, Isaac, Rodriguez-Esteban et al. 1998) et *Xbr-1* (Papalopulu and Kintner 1996). Dans la partie ventrale de la rétine, *Vax2* et *Pax2* ont un rôle primordial, car leur présence est synonyme de l'expression des récepteurs tyrosine kinase (RTK) EphB2 et EphB3, les récepteurs des éphrines, qui ont un rôle important dans le guidage des axones des cellules nerveuses (Inatani 2005) et dont les ligands sont exprimés dorsalement par la

présence de *Tbx5* (Schulte, Furukawa et al. 1999), permettant une organisation polarisée de la rétine sur l'axe dorso-ventral.

La polarisation sur l'axe antéro-postérieur, ou nasal-temporal en fonction de l'espèce à l'étude, est modélisé de façon évidente lors de l'expression de facteur de l'évagination optique de type *winged helix*, soit BF-1 (*Brain Factor-1*), restreint à la partie antérieure et BF-2, qui lui est présent dans la partie postérieure (Hatini, Tao et al. 1994).

1.2.5 Différentiation et développement des CGRs

1.2.5.1 Différentiation

Les CGRs sont les premières cellules neuronales à être différenciés dans la rétine (Young 1985, Turner, Snyder et al. 1990), cette différenciation survient sous l'influence de facteurs de la famille des FGFs, soit FGF-3 et FGF-8, sécrétée par un point spécifique de la rétine appelée le centre d'organisation de la neurogénèse et dont la position exacte varie selon l'espèce (Masai, Stemple et al. 2000, Martinez-Morales, Del Bene et al. 2005). Le facteur de transcription Notch agit à ce stage comme le régulateur de l'expression de gène de spécification cellulaire, notamment *Atoh7* (Maurer, Riesenber et al. 2014). Shh semble également avoir un rôle dans la première vague de différenciation, mais ce rôle est ambigu et semble être spécifique à l'espèce. Alors que chez le poisson-zèbre, il semble être un participant actif dans la différenciation (Neumann and Nusslein-Volhard 2000), il agit comme un répresseur chez le poussin et la souris (Zhang and Yang 2001, Wang, Dakubo et al. 2005). Comme la plupart de cellules neuronales de la rétine, les CGRs se différencient à partir d'une cellule pluripotente appelée progénitrice embryonnaire de la rétine. L'action du facteur de transcription Pou4f2 est primordiale pour établir l'identité des CGRs (Pacal and Bremner 2014). Peu après les dernières divisions cellulaires, les facteurs Brn3a, Brn3b et Brn3c sont exprimés et assurent la survie des CGRs ainsi que le maintien de leur lignée

(Erkman, Yates et al. 2000, Calissano and Latchman 2010). Ils ont également un rôle dans l'établissement du sous-type des CGRs sur lesquelles ils exercent leur influence (Shi, Kumar et al. 2013).

1.2.5.2 Morphogénèse

Les CGRs terminent leur différenciation près de la membrane de l'EPR, où elles sont des cellules apolaires sphériques. Elles doivent donc migrer vers la couche plus interne qui abritera leur noyau, la couche des CGRs, où elles se polarisent. Elles se mettent d'abord à former des dendrites et étendre leurs axones à travers ce qui deviendra la couche des fibres optiques (CFO) jusqu'au disque optique. Ce mécanisme s'effectue d'abord par l'extension du procès basal vers le vitré, le noyau voyage par ce procès basal pendant que du bout de ce dernier, à cette étape, un axone se forme et s'étend jusqu'à la CFO. Finalement, le procès apical se défait de l'EPR et la CGR est à ce point dans sa position naturelle. C'est à ce point que les dendrites commencent à se former, avant que les axones rejoignent leurs cibles (Zolessi, Poggi et al. 2006). Les molécules permettant ces actions sont associées à la signalisation Slit/Robo (Wong, Baudet et al. 2012) et les réarrangements cytosquelettiques qui permettent à l'axone de croître, par les Rho GTPase (Ruchhoeft, Ohnuma et al. 1999). La polarité des CGRs est induite par l'EPR, une conclusion tenue du fait que chez les mutants *nok* et *has*, qui ont comme particularité d'avoir un EPR dont la polarité est fortement désorganisée, la polarité des CGRs n'est pas maintenue et est très erratique (Pujic and Malicki 2004, Zolessi, Poggi et al. 2006).

1.2.5.3 Le cône de croissance

Avant d'entreprendre la description du trajet que suivent les axones des CGRs à travers le cerveau, il est important d'introduire un élément clé du système de guidage axonal : le cône de croissance. Il s'agit de la partir distale de l'axone, de forme amiboïde,

capable d'interagir avec certaines molécules de son environnement immédiat et d'y réagir (Kalil and Dent 2005). Le cône de croissance est formé d'un cytosquelette de microfilaments d'actine érigés sur la pointe des microtubules de l'axone (Yamada, Spooner et al. 1970). À certains endroits, les filaments d'actine se regroupent en ensemble et forment une fine protubérance appelée filopode, tandis qu'en d'autres parties ils forment une plaque de mailles qui se présente une lamelle dans le cône de croissance (Fig1.8). La nature changeante de l'actine, qui passe de filaments rigides polymérisés qui s'effondrent pour devenir de l'actine libre puis vice versa, fait que les filopodes et les lamelles ne sont pas des éléments fixes (Spooner, Yamada et al. 1971). C'est grâce à ces structures dynamiques que le cône de croissance se déplace dans son milieu (Dent, Gupton et al. 2011) en polarisant le cône dans une direction, ce qui crée une traction sur les microtubules de l'axone (Wessells, Spooner et al. 1973, Polackwich, Koch et al. 2015). Ces mouvements doivent donc être coordonnés par le cône en réponse au milieu environnant. Les cônes de croissance réagissent à plusieurs types de molécules, par exemple les molécules d'adhésion cellulaire, présentes sur la surface des autres cellules, ou encore certaines molécules présentes dans la matrice extracellulaire comme la laminine. Ces types de molécules fournissent non seulement une surface adéquate à adhérer et croître, mais activent également la machinerie intracellulaire qui guide le cône (Maness and Schachner 2007).

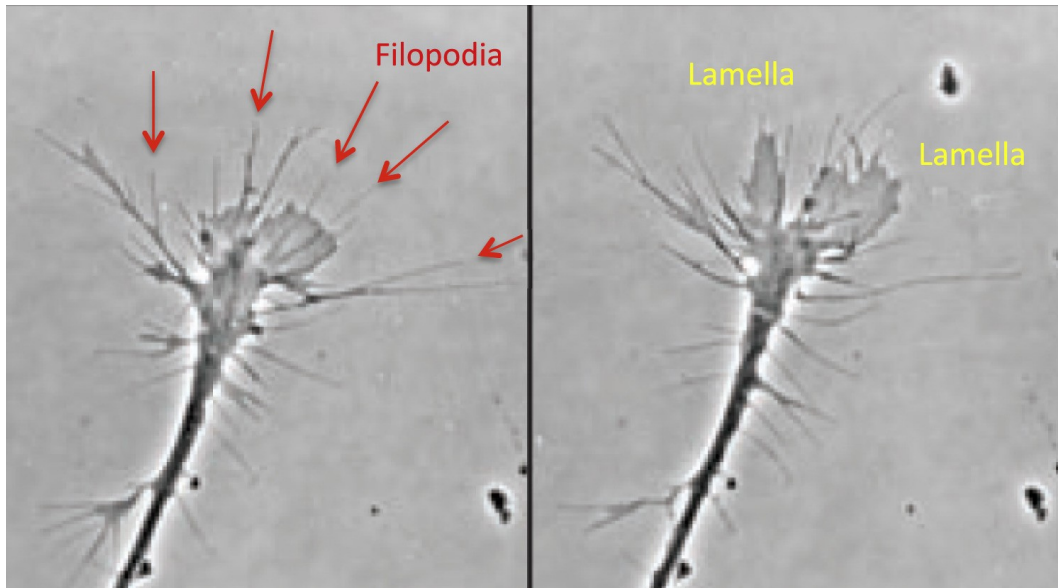


Figure 1.8 : L'actine forme deux types de structures dans le cône de croissance

(Gauche) Les filaments d'actine se regroupent en petits ballots pour former les filopodes, longs et fins. **(Droite)** Organisés en réseau de mailles, les filaments d'actine forment des lamelles. Adapté de (Pollard 2015)

De plus, des molécules chimiorépulsives de surface comme les *slits* et les éphrines arrivent à bloquer la croissance en repoussant les cônes, agissant comme une rampe de sureté sur le chemin des axones (Dickson 2002). Finalement, un grand ensemble de molécules chimiotropique peuvent influencer la direction et la portée des cônes de croissance. Cet ensemble inclut des facteurs de transcription, des facteurs morphogènes, des neurotransmetteurs ainsi qu'une variété de molécules sécrétées comme la nétrine, qui lorsqu'en contact avec le récepteur DCC présent sur le cône, affecte la direction de ce dernier (Dickson and Keleman 2002). En plus de ces molécules qui affectent directement, les taux internes de nucléotides cycliques peuvent inverser la réponse du cône de croissance aux molécules de guidage (Thompson, Pujic et al. 2011), ainsi la nétrine repousse les cônes de croissance lorsque les taux d'AMPC sont bas dans celui-ci (Fig.1.9) (Chilton 2006). Certaines protéines de surfaces peuvent également altérer la réponse

cellulaire d'un récepteur lorsque leurs domaines cytoplasmiques sont liés, comme ça semble être le cas pour UNC5 (Hong, Hinck et al. 1999).

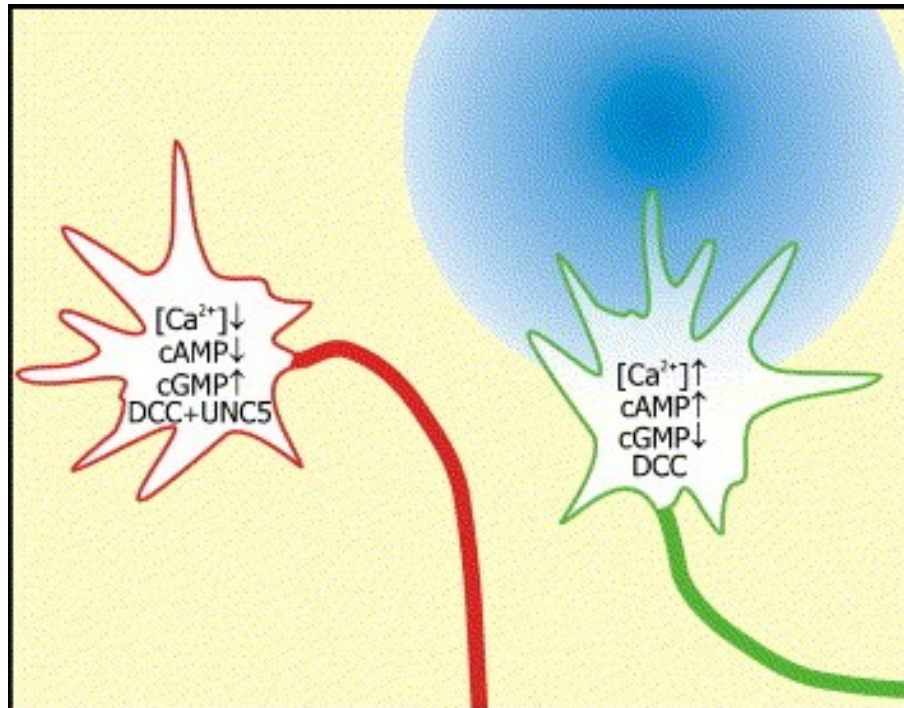


Figure 1.9 : Les taux de nucléotides cycliques changent la réponse des cônes face à un ligand.

Bleu : un gradient de nétrine, **Vert** : Cône de croissance dont les taux d'AMPC et de calcium sont élevés, la concentration de GMPc est basse, le récepteur DCC est présent.

Rouge : Cône de croissance dont les taux de calcium et d'AMPC sont bas, le taux de GMPc est élevé, le récepteurs DCC est présent, mais son domaine cytoplasmique est associé avec celui de UNC5. Tiré de (Chilton 2006)

1.2.5.4 Axonogenèse Guidage des axones

La croissance des axones à même la CFO est circonscrite d'un côté par la présence d'inhibiteurs dans les couches externes de la rétine, comme les slits, auxquelles les RCGs sont sensibles (Thompson, Camand et al. 2006), et les *chondroïtin-sulfate proteoglycans* (CSPG) présents dans l'EPR (Brittis and Silver 1995), et permise dans la

CFO par des promoteurs gliaux comme les NrCam et L1 et la laminine (Brittis, Lemmon et al. 1995, Stier and Schlosshauer 1995). L'action concertée des molécules inhibitrices qui forcent les axones vers l'intérieur de la rétine et des CAM permissives ne suffit pas à diriger les axones sur un axe radial vers le disque optique. C'est l'action de gradient de concentration de molécules telles que la chimiotaxine SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) (Li, Shirabe et al. 2005) et Shh (Kolpak, Zhang et al. 2005) qui guide les axones à travers la CFO vers le disque optique. Brn3b est également impliqué dans le maintien des trajectoires axonales (Erkman, Yates et al. 2000).

1.2.5.5 Sortie des axones de la rétine par la tête du nerf optique

Pour diriger les axones hors du disque optique, la molécule de guidage la plus importante est la nétrine, présent dans la matrice extracellulaire, qui agit sur le récepteur DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) (Deiner, Kennedy et al. 1997) présent sur les cônes de croissance des axones des CGRs. Le contact de la nétrine-1 avec le récepteur induit la phosphorylation des tyrosines tel que FAK (*focal adhesion kinase*) qui elle active les molécules de la famille des Src qui modulent la polymérisation de l'actine dans le cône de croissance de la l'axone (de la Torre, Hopker et al. 1997, Liu, Beggs et al. 2004, Argaw, Duff et al. 2008). L'attraction seule de la nétrine sur les cônes de croissance ne suffit pas à expliquer le brusque changement de direction vers l'extérieur de la rétine effectué de concert par tous les axones des CGRs au disque optique. Les taux élevés de laminine au disque optique induisent un changement sur la réponse des cônes de croissance en faisant diminuer le taux d'AMPc de ces derniers (Hopker, Shewan et al. 1999). Cette diminution change la réponse des cônes à la nétrine, elle cause maintenant une répulsion plutôt qu'une attraction et force les axones hors de l'œil, dans le tractus optique (Deiner, Kennedy et al. 1997, Lemons, Abanto et al. 2013).

1.2.5.6 Cheminement dans le nerf optique vers le chiasma optique

Les axones cheminant dans le nerf optique y sont maintenus par l'action de signaux inhibiteurs des Sema5a et de slit2 qui entourent le nerf optique et empêchent les axones de sortir de celui-ci (Plump, Erskine et al. 2002, Oster, Bodeker et al. 2003). De la sortie du nerf optique au chiasma optique, le facteur de transcription *Vax1* est exprimé par les cellules de la glie et joue un rôle crucial dans la croissance des axones. Chez les souris où il est muté, les axones n'arrivent pas à pénétrer le cerveau et ne traversent pas au chiasma optique. (Bertuzzi, Hindges et al. 1999). Une fois arrivé au chiasma optique, la conformation des cellules gliales change d'un aspect intrafasciculaire à un aspect radial, ce qui crée un croisement dans le tractus optique, où l'on observe une population de neurones diencephaliques exprimant l'antigène de surface SSEA-1 et CD44 qui forment la frontière postérieure du chiasma optique (Marcus, Blazeski et al. 1995, Marcus and Mason 1995) et dont l'ablation freine l'avancée des axones des CGRs (Sretavan, Pure et al. 1995). L'interaction entre les slits et leurs récepteurs robo ont également une influence sur le passage du chiasma par inhibition de la croissance (Fricke, Lee et al. 2001, Plachez, Andrews et al. 2008). La fonction des slits dans le chiasma est régulée par la présence du protéoglycane sulfate d'héparan (HSPG), qui les localise dans la matrice extracellulaire et aide la réponse de répulsion des cônes de croissance à ces facteurs de transcription (Piper, Anderson et al. 2006, Wright, Lyon et al. 2012). Un autre modulateur de la réponse des CGRs aux slits est le SDF-1, qui par son récepteur CXCR4 élève le taux d'AMPc dans le cône de croissance (Chalasani, Sabelko et al. 2003). Outre Slit, Shh agit sur le passage des axones dans le chiasma optique en présentant une zone de non-expression au point de passage, alors qu'il est exprimé dans l'ensemble de la ligne médiane du système nerveux central (Marcus, Shimamura et al. 1999). Le transfert lui-même des axones de l'autre côté de la ligne médiane est d'abord régi par la permissivité des CAM NrCam (Williams,

Grumet et al. 2006), puis par une réponse par un récepteur particulier, neuropilin-1 (NRP-1), un isoforme des récepteurs aux facteurs de croissance vasculaire endothéliale A (VEGFR-A). Le VEGF-A est exprimé sur la ligne médiane du chiasma. (Erskine, Reijntjes et al. 2011). NRP-1 agit donc comme un important facteur d'attraction pour les axones qui voyagent du côté contralatéral.

Les axones qui cheminent sur la voie ipsilatérale après avoir atteint le chiasma sont quant à eux dirigés, ou plutôt repoussés, par des molécules de la famille des éphrines, présentes à la surface des cellules gliales du chiasma et qui réagissent avec les récepteurs EphB, exprimés en haute concentration sur la surface des cônes de croissance des axones ipsilatéraux (Williams, Mann et al. 2003) par le facteur *zinc finger transcription Zic2* (Garcia-Frigola, Carreres et al. 2008) Shh semble également avoir un impact dans l'alignement des axones ipsilatéraux par le biais de son récepteur *boc* (Sanchez-Arrones, Cardozo et al. 2012, Cardozo, Sanchez-Arrones et al. 2014). Les processus de guidage qui dictent la voie que prennent les axones au chiasma optique sont schématisés à la figure 1.10

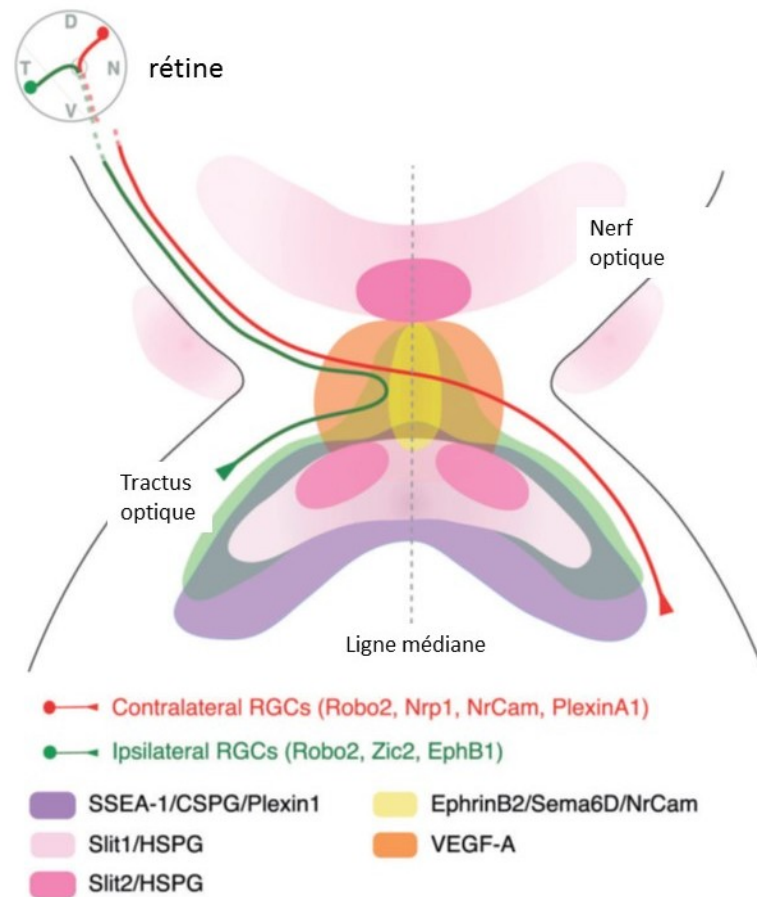


Figure 1.10 : Zone d'expression des molécules régissant la voie des axones post-chiasma

Les slits forment un corridor de croissance pour les axones afin qu'elles rejoignent le chiasma optique. Les neurones exprimant SSEA-1 situés sur le diencéphale ventral et aide à établir le sentier général du chiasma optique. Les axones ipsilatéraux (vert) expriment EphB1 sous l'influence de Zic2 et changent de direction à 90° sous l'influence d'ephrinB2. Les axones controlatéraux n'expriment pas EphB1, mais expriment plutôt NRP-1 qui leur permet de réagir à l'influence de VEGF-A dans la ligne médiane. Tiré de (Erskine and Herrera 2014).

1.2.5.7 Du chiasma aux cibles

Hors du chiasma optique, les slits continuent de restreindre les axones en croissance à même le tractus optique par leur expression dans le télencéphale et le diencéphale. (Thompson, Barker et al. 2006). En ce point, leur expression est régulée par la présence de

facteurs tels que $\beta 1$ -intégrin (Stevens and Jacobs 2002) et N-cadhérine (Rhee, Mahfooz et al. 2002). Shh continue également à jouer un rôle de restriction sur la direction de la croissance des axones (Gordon, Mansh et al. 2010). La présence du facteur FGF-2, qui a une influence directe sur la croissance et la pénétration des fibres axonales à travers la glie, est primordiale pour guider les axones à leurs cibles (McFarlane, McNeill et al. 1995). En effet, lorsque le récepteur aux FGF est sous-exprimé par les axones des CGRs, ces derniers ne rejoignent pas leurs cibles adéquatement et évitent même le tectum optique chez *Xenopus* (McFarlane, Cornel et al. 1996). Un autre facteur important dans l'activité de croissance à même le tractus optique est le SFRP-1 (*secreted frizzled-related protein 1*) qui agit sur l'activité du cône de croissance comme un attractif, un effet qui peut être changé comme celui de la nétrine par une variation des taux d'AMPc dans le cône de croissance (Rodriguez, Esteve et al. 2005). La reconnaissance des cibles peut être liée à l'activité des S1P (*Sphingosine 1 phosphate*) sur les cônes de croissance. Lorsque l'expression de S1P est bloquée, les axones ont également un comportement d'évitement du tectum (Strochlic, Dwivedy et al. 2008). HSPG continue également de jouer un rôle fondamental dans la régulation et la localisation de tous les facteurs cités plus haut (Hussain, Piper et al. 2006). L'ajout d'enzyme de dégradation héparinase dans les tissus en formation induit des erreurs d'évitement du tectum (Walz, McFarlane et al. 1997).

1.2.5.8 Organisation des axones dans les cibles

Une fois leurs cibles atteintes, les axones des CGRs n'arrêtent pas leur croissance au même endroit. En effet, pour établir l'aspect rétinotopique des connexions les axones progressent à différents endroits en fonction de leur origine rétinienne (McLaughlin, Lim et al. 2014). Dans le SC, cible primordiale chez les rongeurs, les axones d'origine temporale s'achèvent rostralement, les axones dorsaux projettent sur le SC

latéral, les axones nasaux se terminent dans le SC caudal et finalement les axones d'origine ventrale projettent dans le SC médian (Erskine and Herrera 2014). Le mécanisme principal régissant la localisation des terminaisons axonales est lié au type et à la concentration des récepteurs Eph sur les cônes de croissances de ces axones, or ces spécifications dépendent de l'origine des axones (Carreres, Escalante et al. 2011). Ainsi, un gradient antéro-postérieur du ligand éphrine-A dans le colliculus supérieur (Frisen, Yates et al. 1998) ne permet pas aux axones exprimant de nombreux récepteurs EphA, comme les axones provenant de la rétine temporale, de traverser le colliculus jusqu'en position postérieure (Feldheim, Kim et al. 2000). Dans le même ordre d'idées, les relations entre les axones présentant de nombreux récepteurs EphB1/B2/B3, situés dorsalement dans la rétine, et le gradient croissant de concentration d'éphrine B sur l'axe latéral médial dans le colliculus supérieur dirigent les axones de l'axe dorso-ventral de la rétine. (Hindges, McLaughlin et al. 2002, McLaughlin, Lim et al. 2014). Sur le même axe, les hautes concentrations de *Wnt3* dans l'aire médiale repoussent les axones ventraux de la rétine, qui expriment fortement le récepteur *Ryk* (Schmitt, Shi et al. 2006) (Fig 1.11)

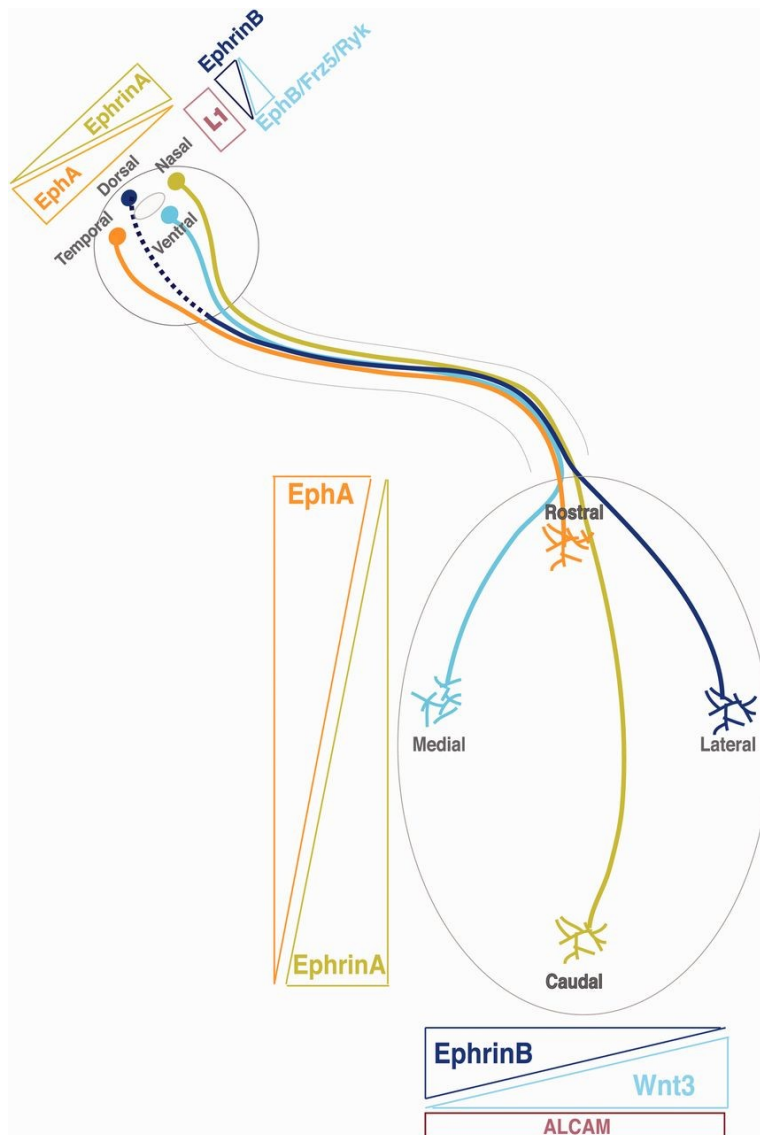


Figure 1.11 : Direction des axones des CGRs et concentrations des molécules de guidage

Représentation des concentrations de récepteurs axonaux en fonction de l'origine rétinienne de ces derniers et représentation des ligands dans le SC selon les axes antéro-postérieurs et médial-latéral. Tiré de (Erskine and Herrera 2014)

1.3 Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) forment la plus grande famille de récepteurs membranaires et régissent la majorité des réponses aux hormones et aux neurotransmetteurs des systèmes biologiques en plus d'être responsables de la vue, de l'odorat et du goût. La structure générale des RCPGs est formée de sept domaines

transmembranaires hélice- α reliés par des boucles extra et intra cellulaires (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009) Chez les vertébrés, ils sont divisés en 5 grandes familles selon leur méthode d'association à leurs ligands. Ces familles sont celles de la rhodopsine (famille A), de la sécrétine (famille B), du glutamate (famille C), d'adhésion et de *frizzled/taste2* (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003). L'effet des RCPGs sur les cellules est globalement régi par le type de sous-unité associé au récepteur. Par exemple, les RCPGs associés aux protéines $G_{\alpha s}$ activent l'adénylate cyclase et font augmenter le taux d'AMPc intracellulaire, tandis que les récepteurs associés aux sous-unités $G_{\alpha i/o}$ réduisent l'activité de l'adénylate cyclase (Fig1.12). Les sous-unités $G_{\alpha q}$ quant à elles sont responsables de l'activation de l'isoforme β de la phospholipase C et de l'activation de plusieurs MAP kinases (Sanchez-Fernandez, Cabezudo et al. 2014). (Fig1.13)

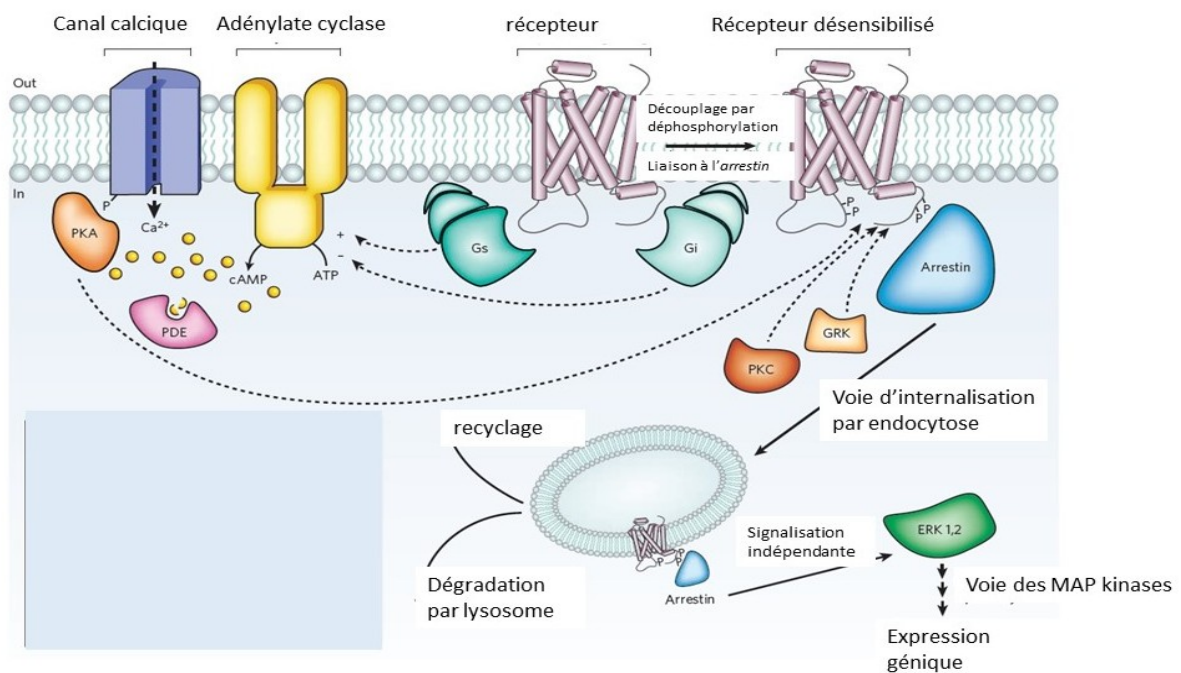


Figure 1.12 : Fonction et cycle général des RCPGs

Représentation classique des RCPGs et du fonctionnement de leur sous-unité αs et $\alpha i/o$ (gauche). La sous-unité αq n'est pas représentée. Internalisation des récepteurs désensibilisés (droite). Adapté de (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009)

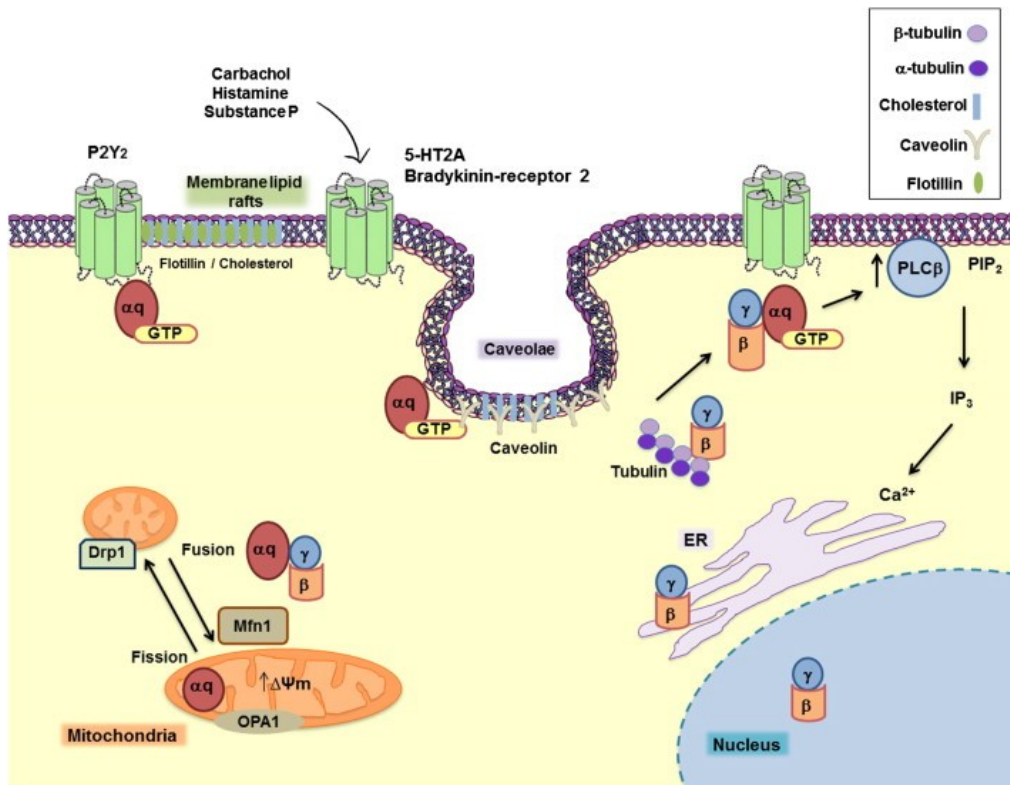


Figure 1.13 : Signalisation par G_{αq}

Principales interactions liées à l'activation des RCPG liées à une sous-unité G_{αq}. On observe notamment l'activation de PLCβ qui fait augmenter le taux de Ca²⁺ cytosolique.

1.3.1 GPR91

GPR91 est, comme son nom l'indique, un RCPG. Son ligand endogène est le succinate, ou acide succinique, un substrat du cycle des acides citriques et donc une molécule retrouvée de façon ubiquitaire dans les cellules (Krebs 1979, He, Miao et al. 2004). Ce récepteur lie également l'acide décarboxylique (Gonzalez, Communi et al. 2004). Chez la souris, l'expression du gène *gpr91* a été détectée par RT-PCR et hybridation *in situ* dans la région corticale du rein, la rate, le foie, les cellules endothéliales, les adipocytes (He, Miao et al. 2004). Elle fut également détectée par hybridation *in situ* et immunohistochimie dans la membrane apicale de l'épithélium pigmentaire rétinien, ainsi que dans la CCG de la rétine, tout comme dans la CNI de la

répine (Gnana-Prakasam, Ananth et al. 2011). Le récepteur est couplé à une protéine $G_{\alpha i}$ qui fait augmenter les taux de calcium intracellulaire par la voie des phospholipases C β (Sundstrom, Greasley et al. 2013). Le GPR91 joue un rôle dans la régulation des changements de niveaux énergétiques du corps. En effet, le succinate, son ligand, empêche la lipolyse des adipocytes qui expriment le récepteur, et ce même sous l'influence du glucagon (Regard, Sato et al. 2008). Ce fait est intéressant, sachant que le succinate est élevé dans les modèles de rongeurs du diabète sucré et du syndrome métabolique et de l'hypertension (Toma, Kang et al. 2008) (Sadagopan, Li et al. 2007). Un autre exemple de régulation par GPR91 est observé en situation hypoxique. En effet, la relâche de succinate comme signal d'alerte en situation de privation d'oxygène est documentée et l'interaction avec GPR91 permet une adaptation du milieu cellulaire à court et long terme (Lukyanova and Kirova 2015). Son intérêt dans le développement du système nerveux visuel provient de sa présence sur les cônes de croissance des CGRs et de son action particulière dans celles-ci. Il a été démontré qu'en situation d'ischémie, les métabolites intermédiaires tels que le succinate se retrouvent en excès dans les tissus atteints (Folbergrova, Ljunggren et al. 1974). Lorsque c'est le cas dans la rétine, le succinate agit sur GPR91 qui par la voie ERK1/2 induit la synthèse de VEGF par les CGRs ce qui provoque une hyper vascularisation de la rétine (Sapieha, Sirinyan et al. 2008)(Fig1.14). GPR91 assure donc un apport suffisant en oxygène dans le tissu, entre autres en favorisant la néo vascularisation. Dans un cas où le succinate est élevé pour des raisons comme le diabète sucré, une néovascularisation de la rétine peut endommager cette dernière et causer une rétinopathie (Rubic, Lametschwandtner et al. 2008). Comme on sait que les CGRs sont sensibles aux facteurs de croissance endothéliaux via entre autres le récepteur NRP1 (Erskine, Reijntjes et al. 2011), l'étude de l'impact de ce récepteur sur la croissance des CGRs, la morphologie des cônes de croissance et le guidage axonal devient intéressante.

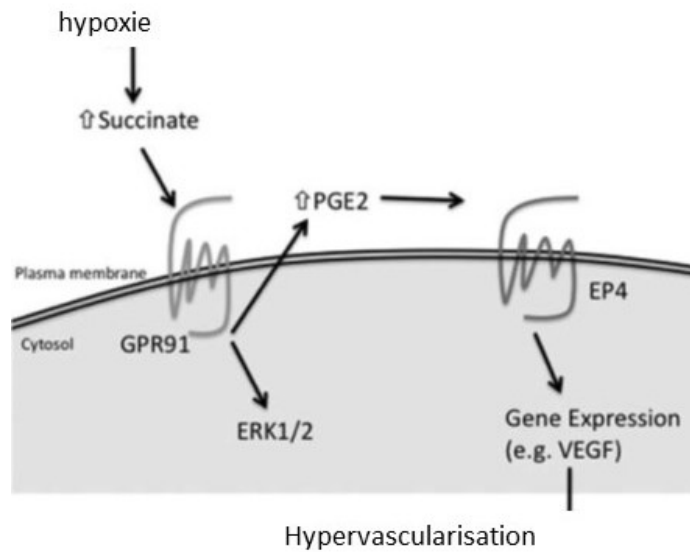


Figure 1.14 : Mécanisme d’action du succinate sur l’hypervascularisation

Le succinate extracellulaire augmente en situation d’hypoxie, interagit avec son récepteur qui provoque la synthèse de prostaglandines (PGE2) qui à leur tour provoquent la synthèse de VEGF. Tirée de (Hamel, Sanchez et al. 2014)

1.3.2 GPR99

GPR(80)99, est un récepteur récemment désorphanisé qui lie également un intermédiaire du cycle des acides citriques, l’ α -cétoglutarate, aussi appelé 2-oxoglutarate (He, Miao et al. 2004). Son rôle est mal défini, d’abord classé comme un récepteur purinergique P2Y(15) (Qi, Harden et al. 2004), on sait qu’il lie également l’acide décarboxylique(CO₂) (Gonzalez, Communi et al. 2004) comme c’est le cas pour GPR91. Récemment, il a été proposé comme un récepteur supplémentaire aux leucotriènes LT4 et aurait donc un impact lors de réactions inflammatoires et asthmatiques (Kanaoka, Maekawa et al. 2013). Les analyses par RT-PCR démontrent une expression dominante dans la trachée et les poumons, les reins et certains mastocytes (He, Miao et al. 2004, Inbe, Watanabe et al. 2004). Le récepteur interagit avec un régulateur des facteurs pro-hypertrophique, soit TYK2 (Omede, Oeandy et al. 2014). On peut supposé d’un rôle pour

GPR99 dans la modulation de l'hypertrophie pathologique du cœur. L'étude dans son action sur le développement des CGRs est intéressante vu les similarités de son ligand avec celui de GPR91 (Krebs, Salvin et al. 1938, He, Miao et al. 2004), à savoir si un mécanisme de compensation par GPR99 existe lorsque l'on bloque GPR91.

1.3.3 Le guidage axonal et les RCPGs

Bien que les récepteurs membranaires classiques associés au guidage axonal comme Robo, DCC, ou EphR ne sont pas des RCPGs (Park and Sanchez 1997, Dickinson and Duncan 2010, Finci, Kruger et al. 2014), de nombreuses études ont démontré que les RCPGs et leurs ligands ont un impact certain sur la morphologie des cônes de croissance (Xiang, Li et al. 2002), l'activité de l'AMPC dans ces derniers et sur la direction que prennent les axones en développement (Bouchard, Moore et al. 2004, Argaw, Duff et al. 2008, Cherif, Argaw et al. 2015) Il a notamment été observé que les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 et le récepteur GPR55, qui sont des RCPGs, jouent un rôle important dans la modulation de la croissance des axones des CGRs et dans le développement de la voie rétinothalamique (Argaw, Duff et al. 2011, Duff, Argaw et al. 2013, Cherif, Argaw et al. 2015).

2. Objectifs de recherche

L'objectif principal de la recherche est d'établir si les récepteurs GPR91 et GPR99 ont un impact sur le développement du système nerveux visuel, notamment en influençant le parcours des CGRs jusqu'aux cibles thalamiques de ces dernières. Comme GPR91 a un rôle connu dans l'angiogenèse (Sapieha, Sirinyan et al. 2008) à travers l'expression de VEGF, il est intéressant de savoir si l'activité de ce récepteur peut avoir un impact sur la croissance des CGRs. La compréhension des mécanismes de croissance des CGRs peut mener à de grands avancements dans le traitement de cécités liées à des dommages au nerf optique, ou à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Pour établir une compréhension exhaustive du récepteur et de son activité, on doit d'abord caractériser spécifiquement sa distribution dans la rétine, et si possible le long du tractus optique à l'aide d'anticorps spécifique et de marqueurs cellulaires. Il est important également de caractériser le comportement des axones en présence de gradients progressifs du ligand de ce récepteur. On doit aussi étudier la morphologie du cône de croissance lorsque soumis à différentes concentrations du ligand. De plus on tentera d'observer la croissance globale des CGRs soumises à des concentrations différentes du ligand et pendant des temps différents, afin de déterminer s'il existe une période critique d'action pour ce récepteur. Ces expériences sont effectuées selon des méthodes dites *ex vivo*, c'est-à-dire que les tissus sont tous prélevés chez des animaux (souris) au lieu de provenir de lignée cellulaire conservée. Suite à ces expériences, une seconde série de tests *in vivo* permettront d'établir l'impact du succinate dans le cheminement des axones vers les noyaux visuels thalamiques. Les mêmes expériences sont faites avec l' α -cétoglutarate et refaites à nouveau avec des combinaisons des deux ligands, parce que l'on suspecte qu'il existe un lien entre eux.

2.1 Méthodes et résultats préliminaires.

Afin de déterminer si les ligands des récepteurs GPR91 et GPR99 ont un impact sur le développement du système nerveux visuel dans son ensemble ou sur certaines parties de ce dernier, des techniques d'analyse établies sont réalisées sur des tissus murins de plusieurs âges, on utilise l'immunofluorescence, l'hybridation *in situ*, la culture d'explant, la culture de neurones primaires, l'étude de comportement de cône de croissance, l'immunocytochimie, l'immunobuvardage, les injections intraoculaires. La présente section décrira en détail les spécificités des expériences et la forme générale que prendront les résultats une fois les compilations terminées. Ces expériences sont effectuées sur des souris de souche sauvage (C57BL/6J WT, sur des souris où le gène codant pour GPR91 ou GPR99 a été supprimé (*gpr91* ou *gpr99* KO), et finalement chez qui les gènes codant pour GPR91 et GPR99 ont été simultanément supprimés (*gpr91/99* KO). Les souris KO ont été généreusement fournies par François Duhamel, B.Pharm, M.Sc. du laboratoire de Sylvain Chemtob, MD, PhD. Toutes les procédures ont été faites en accord avec les recommandations du Conseil canadien de protection des animaux et ont été approuvées par le comité d'éthique sur la recherche animale de l'Université de Montréal

2.1.1 Méthodes d'analyse

2.1.1.1 Réactifs

L'albumine de sérum bovin (BSA), facteur neutrophique ciliaire (CNTF), DNase, Forskolin (FSK), Hoechst 33258, insuline, laminine, anticorps monoclonal contre β -actine, anticorps monoclonal contre MAP kinase, poly-D-Lysine, progestérone, putrescine, pyruvate, sélénium, acide succinique, α -cétoglutarate, trypsine, triiodothyronine ont été achetés à Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Les sérums fœtal bovin (FBS),

glutamine, médium Neurobasal, pénicilline-streptomycine, S-MEM et pyruvate de sodium ont été obtenu d'Invitrogen (Burlington, ON, Canada) et le sérum normal d'âne (NDS) de Jackson Immuno (West Grove, PA, USA). L'anti-ERK1/2 et anti-GAP43 ont été acquis de EMD Millipore (Billerica, MA, USA). L'anti-RhoA, anti RhoA-phosphorylé anti GPR91 et anti GPR99 ont été achetées de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). L'anti PKA-Phosphorylée , anti-AKT et anti-AKT-Phosphorylé ont été obtenu de Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Les anticorps secondaires –HRP dirigés contre les IgGs (H+L) de lapin et IgMs de souris proviennent de Jackson Immuno (West Grove, PA, USA). Les anticorps secondaires conjugués à un fluorochrome Alexa 488 et Alexa 546 proviennent d'Invitrogen. Le fragment B de la toxine du choléra (CTb) et l'anticorps correspondant sont de List Biological Laboratories (Campbell, CA, USA).

2.1.1.2 Culture d'explants

Les rétines utilisées ont été isolées d'embryons de souris E14-15, correspondant à la période de croissance maximale des CGRs au cours du développement. Les rétines ont été disséquées en petits morceaux de tailles similaires (près de 300µm) dans du HBSS glacial et placées sur des microlamelles de verre enrobées de poly-D-Lysine (20µg/mL) et de laminine (5µg/mL) dans des plaques de 24 puits. Les explants sont cultivés dans du neurobasal supplémenté par 100 U/mL pénicilline, 100µg/mL de streptomycine. 1% de B27, 40ng/ml selenum. 16µg/ml de putrescine, 0,04ng/ml de triiodothyronine, 100µg/ml de transferrine, 60ng/ml de progestérone, 100µg/ml de BSA, 1mM de pyruvate de sodium, 2mM de glutamine, 10ng/ml de CNTF, 5µg/ml d'insuline et 10mM de FSK. Une fois les explants accrochés à la lamelle, soit de 1 à 2 heures suivant l'application sur cette dernière, les explants sont traités avec une dose de ligand pour des périodes de 8h, 10h, 12h et 16h pour l'étude de croissance globale. Les études de morphologie du cône sont effectuées

après que les explants aient reposé dans le milieu 24h et puis soumis pendant 1h au ligand. Suivant la mise en contact du ligand, les explants sont fixés à l'aide du paraformaldéhyde 4% et les microlamelles soumises à l'immunocytochimie puis montées sur lame pour analyse au microscope à fluorescence. Ce sont ces cultures qui permettent l'analyse de croissance globale et de morphologie du cône. Pour la croissance globale, on évalue la longueur totale des neurites par explant. Pour la morphologie du cône, on évalue le nombre de filopodes et l'aire du cône de croissance.

2.1.1.3 Culture de neurones primaire

On utilise les neurones corticaux primaires pour les essais biochimiques élémentaires à cause de leur grande disponibilité et de la facilité d'en faire la culture. On utilise le tissu cortical d'embryons de souris E14/15. Les cortex sont isolés de leurs méninges puis transférés dans 2 mL de S-MEM à 37°C, contenant 2,5% de trypsine et 2mg/ml DNase. Les tissus sont laissés dans cette solution de digestion enzymatique pendant 15 minutes puis la suspension est transférée dans 10 ml de S-MEM augmenté de 10% de FBS à 4°C pour stopper la réaction enzymatique. Après centrifugation, le dépôt est à nouveau transféré dans 2 ml de S-MEM 10% FBS où les tissus sont triturés. On retire le surnageant et l'injecte dans un milieu de Neurobasal, où les cellules dissociées sont comptées par l'analyse d'un échantillon sous microscope duquel on extrapole la concentration totale et dilué afin d'obtenir 50,000 cellules par puits contenant une microlamelle de 12mm enrobés de poly-D-lysine, ou 250 000 cellules par plat de pétri de 35mm également enrobés de poly-D-lysine. Les cultures sont mises en incubations pendant 48h après quoi on peut traiter les cultures avec les ligands de GPR91 et de GPR99 pendant 60 minutes pour les études de morphologie et pour des temps de 2, 5, 10 et 15 minutes pour l'étude de voies de signalisation par immunobuvardage.

2.1.1.4 Guidage axonal

Les explants rétiniens ont été placés en culture dans des chambres de borosilicate (Lab-Tek; Rochester, NY, USA) pour 24h. Nous les avons placés par la suite dans un incubateur monté sur un microscope inversé (Olympus IX71), où ils ont été maintenus dans un environnement à 37°C et 5% CO₂. À l'aide d'un micro-injecteur Picoplus (Harvard Apparatus, St-Laurent, QC, Canada), nous avons créé un microgradient du ligand des récepteurs dans le milieu de croissance. La micropipette de verre servant à acheminer le ligand a été fabriquée de sorte que l'ouverture est de 2 à 3 µm, ce qui permet une relâche régulière du liquide.

2.1.1.5 Immunocytochimie

Après le traitement, les cellules corticales et les explants rétiniens ont été lavés doucement avec un tampon phosphate salin, au pH ajusté à 7,4. Les sites de liaison non spécifiques ont par la suite été bloqués à l'aide d'une solution de sérum normal d'âne (NDS), d'albumine de sérum bovin (BSA), et de tween, un détergent cellulaire, à 0,1%. Le blocage est fait à température pièce pendant 30 minutes. On traite par la suite pendant toute une nuit avec un anticorps primaire spécifique à l'étude en question, soit anti-GAP-43 (1 :1000) pour les études de morphologie des cônes de croissance, anti-GPR91 et anti-GPR99 pour des études de détection de protéines. Après lavage au PBS, les cellules sont marquées avec des fluorochromes comme Alexa 488 ou 546 et à l'aide du Hoechst 33258, un marqueur nucléaire. Les microlamelles sont montées avec un milieu de montage Dabco-PVD selon un protocole interne.

2.1.1.6 Immunobuvardage (western blot)

Les neurones en culture dans les puits de 35mm étaient traités avec les ligands des récepteurs à l'étude pour des périodes de 2, 5, 10 et 15 minutes, soit des temps permettant de voir l'évolution de phosphorylation des facteurs de signalisation à l'étude (ERK1/2) (Cherif, Argaw et al. 2015), puis lysés par un tampon Laemmli (20% SDS, 1,5% β -Mercaptoéthanol, 1,5% DTT, 12% TRIS, 10% Glycérol, 1 goutte de bleu de bromophénol). Le lysat fut récupéré dans des tubes stériles, soumis à migration en gel de polyacrylamide et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Les anticorps primaires utilisés étaient dirigés contre des protéines type des voies de signalisations cellulaires et leur forme phosphorylée, le marquage à la β -actine servait à vérifier si tous les puits avaient été chargés avec la même quantité de protéines. Les résultats furent analysés par chimi-luminescence augmentée.

2.1.1.7 Perfusion

Les hamsters étaient anesthésiés et perfusés 4 jours après injection (P5). La perfusion était faite par injections transcardiaques d'une solution de 0,1M de PBS et 4% paraformaldéhyde suivant une dose d'héparine (20 μ L, 200U/mL). Les cerveaux furent récupérés et post-fixés pour 12h à 4°C, puis protégés contre la congélation par des tampons sucrés puis congelés à -80°C. La même méthode de perfusion fut utilisée sur les souris pour les expériences d'immunohistochimie.

2.1.1.8 Immunohistochimie

La présence et la répartition des récepteurs chez les souris et les hamsters étaient, si possible, établies par immunohistochimie. C'est également par cette méthode que nous avons révélé le marquage à la CTb. Les coupes de cerveau ou de rétine ont été lavées à

l'aide d'une solution de PBS 0,1M, puis post-fixés pour 5 minutes dans de l'éthanol 70%, puis rincé dans un PBS auquel on ajoute 0,03% de Triton X-100. Les sites de liaisons non spécifiques sont par la suite bloqués avec du PBS 10% NDS et 0,5% Triton X-100. Après le blocage, nous avons laissé baigner les tissus pour 12h dans une solution de blocage similaire, mais dans laquelle on ajoute l'anticorps primaire dirigé contre le récepteur à l'étude ou la CTb. Les coupes ont été par la suite lavées avec le PBS 0,1M et incubées pendant 1h avec un anticorps secondaire associé à un fluorochrome ou biotinylé. Nous avons monté immédiatement les coupes sur lesquelles un anticorps secondaire fluorescent a été utilisé, tandis que nous avons révélé le marquage CTb à l'aide de la réaction du complexe avidine-biotine-peroxydase commercial. Essentiellement, il s'agit d'incuber à la noirceur les coupes dans une solution de 3'-diaminobenzidine-tétrahydrochloride (DAB) diluée dans le PBS pour 5 minutes, puis d'ajouter 0,004% H₂O₂ à cette solution pour 2 à 4 minutes. La réaction fut arrêtée en plongeant les tissus dans le PBS froid à 5 reprises pour 1 minute, après quoi les coupes furent montées sur lames et déshydratées par des bains d'éthanol.

2.1.1.9 Méthodes de quantification

Les images de tissus ont été acquises à l'aide d'une caméra *Evolution VF* (MediaCybernetics) intégrée au microscope inversé (IX71, Olympus). Elles ont été par la suite quantifiées à l'aide du logiciel Image Pro Plus 5.1. Nous avons quantifié la croissance des axones à l'aide des images des coupes consécutives du cerveau où l'on observe le DTN. On a mesuré la distance entre le bord latéral du noyau d'intérêt et le bout du plus long axone. Le nombre d'axones collatéraux fut analysé à l'aide de la technique de Sholl, qui consiste à dessiner des demi-cercles concentriques au bord du noyau équidistant et de calculer le nombre d'axones qui traversent ces cercles.

2.1.2 Résultats préliminaires

Ici sont présentés certains résultats préliminaires, les résultats présentés ici sont sujets à changement.

2.1.2.1 Détection de GPR91 et GPR99 dans la rétine en développement

2.1.2.1.1 GPR91

La détection du récepteur sur des rétines en développement est faite sur des rétines perfusées d'embryons de souris E14-15 à l'aide de l'anticorps dirigé contre GPR91 de marque Novus (NLS3315) développé dans le lapin et dirigé contre le récepteur humain/primate, l'anticorps contre le récepteur murin n'étant pas sur le marché au moment des expériences. On observe toutefois le marquage des explants tel qu'exprimé à la figure 2.1. L'utilisation de cet anticorps n'a pas permis d'obtenir un marquage précis sur des sections de rétine, autant chez la souris adulte que chez l'embryon 14-15 jours, ces résultats sont observables sur la figure 2.3.

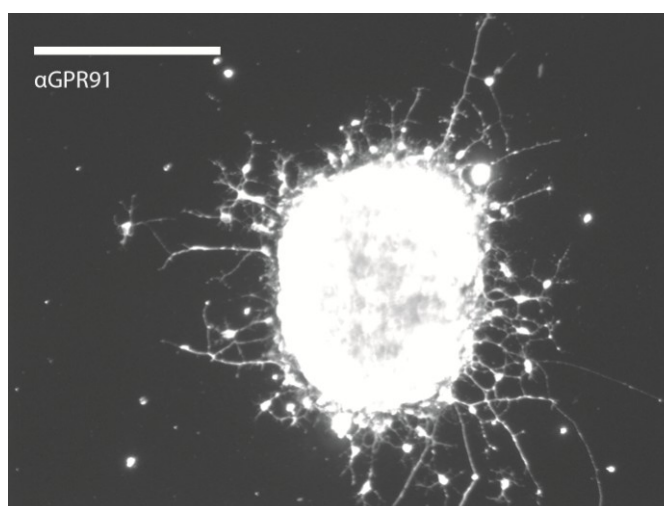


Figure 2.1 : Marquage d'explant à l'aide de l' α -GPR91 de Novus (NLS33150)

On remarque un signal sur les axones et leur cône de croissance respectif, ce qui pourrait permettre de supposer la présence du récepteur sur ces dernières.

Toutefois, la spécificité de l'anticorps ne permet pas d'établir cette relation avec certitude. La barre d'échelle représente 100µm.

2.1.2.1.2 GPR99

L'anticorps disponible au moment des expériences sur GPR99 provenait de la compagnie Santa Cruz (SC-84288). L'anticorps permet bel et bien un marquage des explants rétiniens, sans certitude sur la spécificité du marquage (Fig 2.2). Cependant, comme c'était le cas pour l'anticorps dirigé contre le récepteur GPR91, l'anticorps SC-84288 n'a pas permis d'obtenir un marquage spécifique sur des sections de rétines intactes, autant chez la souris adulte que l'embryon. L'anticorps permet bel et bien un marquage des explants rétiniens, il n'est cependant pas assez spécifique pour établir un patron précis de distribution à travers la rétine. (Fig 2.2). Cet anticorps n'est plus sur le marché.

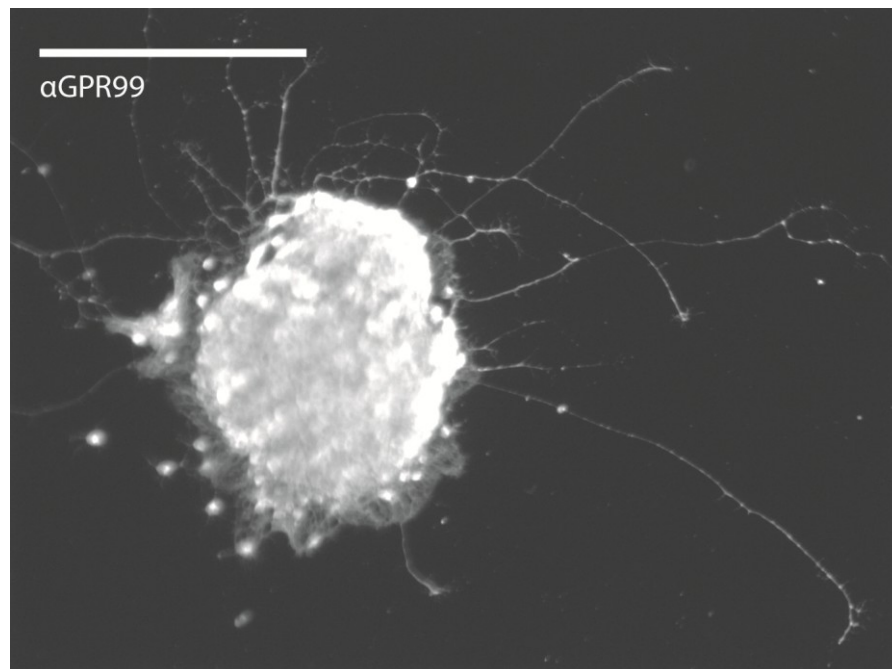


Figure 2.2 : Marquage d'explants avec α -GPR99 Santa-Cruz (84288)

Le centre de l'explant est bien marqué, mais comme l'anticorps n'est pas très spécifique, on ne peut conclure de la distribution du récepteur sur les cellules. La barre d'échelle représente 100 μ m.

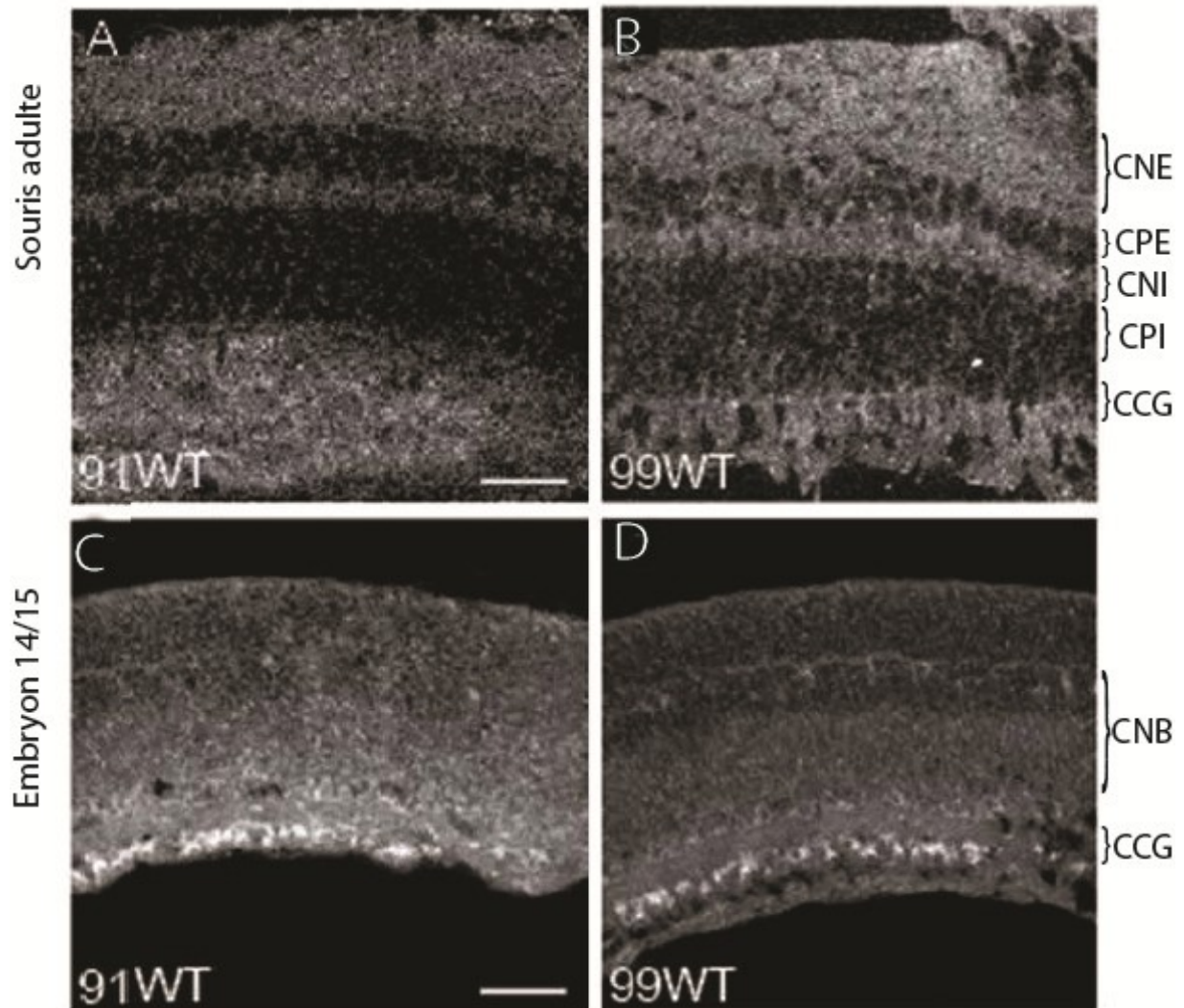


Figure 2.3 Marquage de coupes de rétine de souris à l' α -GPR91 et α -GPR99

(A-B) Marquage de rétine de souris adulte, l'anticorps dirigé contre GPR91 marque une grande majorité des couches cellulaires de la rétine (A), c'est le cas également pour (B) α GPR99. (C-D) Marquage de rétines d'embryons de souris E14-15. Les anticorps dirigés contre GPR91 (C) et GPR99 (D) marquent toute la rétine, il est difficile de faire la distinction des couches de la rétine en formation. CNE : Couche nucléaire externe ; CPE : Couche plexiforme externe ; CNI : Couche nucléaire interne ; CPI : Couche plexiforme interne ; CCG : Couche des cellules ganglionnaires ; CNB : Couche des neuroblastes. La barre d'échelle représente 75 μ m.

2.1.2.2. Croissance globale d'explants

La croissance globale des explants est évaluée après une mise en contact de 10h avec les ligands. Les explants évalués ont tous un diamètre de moins de 250 μ m. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne de la croissance en présence de ligands par rapport à la moyenne de croissance des contrôles \pm erreur type de la moyenne (SEM). La figure 2.3 montre une représentation des résultats exprimés à la figure 2.4. On remarque une augmentation de la longueur totale des neurites lorsque le milieu de culture des explants est supplémenté par 100 μ M de succinate. Un résultat similaire est observé lorsque le milieu de culture des explants contient 200 μ M d' α -cétoglutarate.

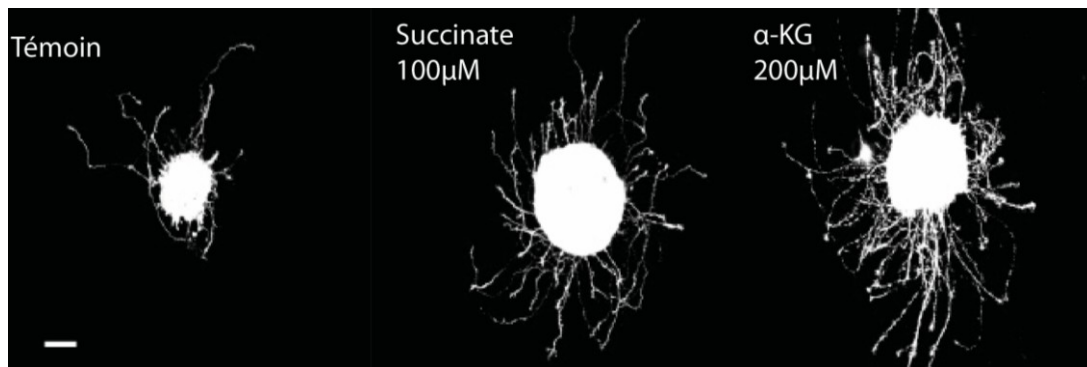


Figure 2.4 : Photos comparatives de la croissance globale (α GAP-43)

Les explants présentés ici ont été en contact avec leur ligand pendant 10h, on compare ici la longueur totale moyenne des axones par rapport au groupe témoin. Le succinate est à concentration 100 μ M dans le milieu, l' α -cétoglutarate à 200 μ M. Marquage du GAP-43. La barre d'échelle représente 100 μ m.

Variation globale de croissance ($\Delta\%$)

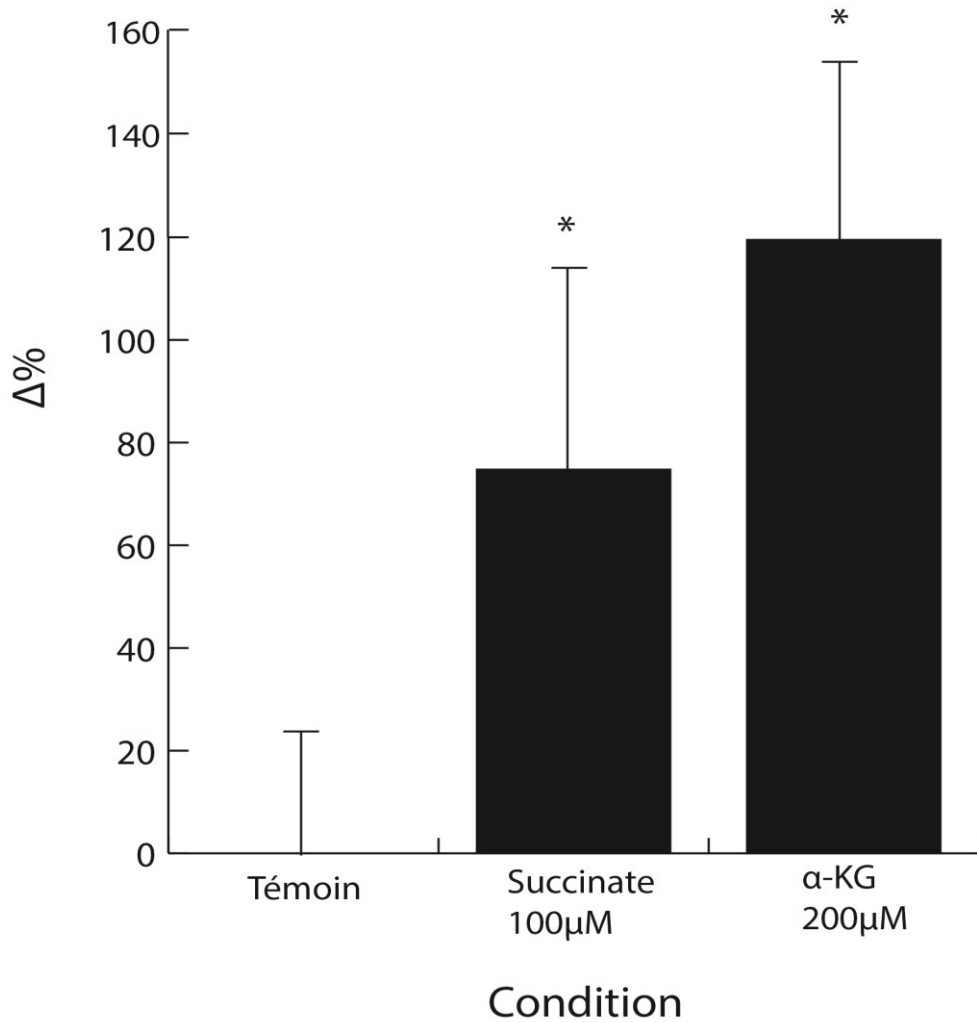


Figure 2.5 : Variation de la croissance des explants

On remarque une augmentation de près de 70% en présence de succinate 100 μ M est de 120% pour l' α -cétoglutarate 200 μ M. Les résultats sont présentés sous forme moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). Moyenne de 50 explants par conditions par expérience et les expériences ont été répétées 10 fois ($n = 10$) pour un n de 500 explants par condition; $p < 0,05$; * représente une différence significative par rapport au contrôle.

2.1.2.3 Morphologie des cônes de croissance

Les cônes de croissance sont observés après la mise en contact avec le ligand pendant 1h. L'aire globale des cônes soumis à la substance est comparée à celle des témoins \pm SEM (Fig 2.6). On compte également le nombre de filopodes sur les cônes soumis aux ligands, puis on le compare avec la moyenne du nombre de filopodes du groupe témoin \pm SEM (Fig 2.7). La figure 2.5 offre une représentation des résultats obtenus. On observe une augmentation de près de 100% de la taille du cône de croissance lorsque ce dernier est en contact pendant 1h avec le succinate ou l' α -cétoglutarate. Ces résultats démontrent un rôle pour GPR91 et GPR99 sur la morphologie des CGRs lorsque le milieu externe présente une certaine concentration de leur ligand respectif.

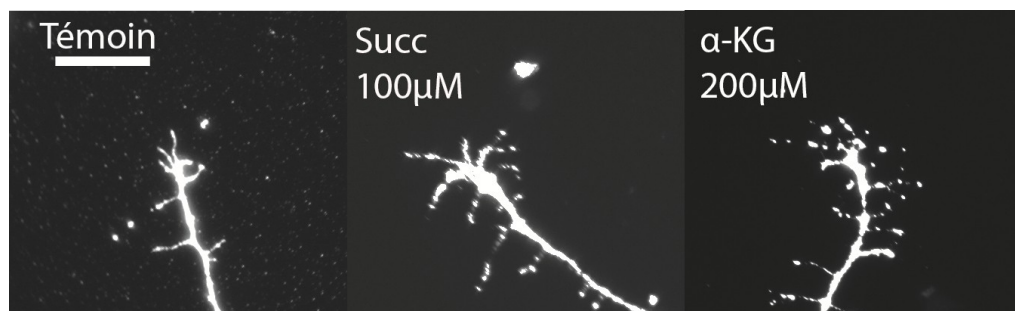


Figure 2.6 : Représentation des variations de la morphologie des cônes de croissance (α GAP-43)

De gauche à droite, image d'un cône témoin. Cône de croissance soumis à du succinate 100 μ M pour 1h. Cône de croissance soumis à l' α -cétoglutarate 200 μ M. Les cônes sont marqués au GAP-43. Cultures de 24h, la barre d'échelle représente 20 μ m.

Variation de la taille des cônes de croissance ($\Delta\%$)

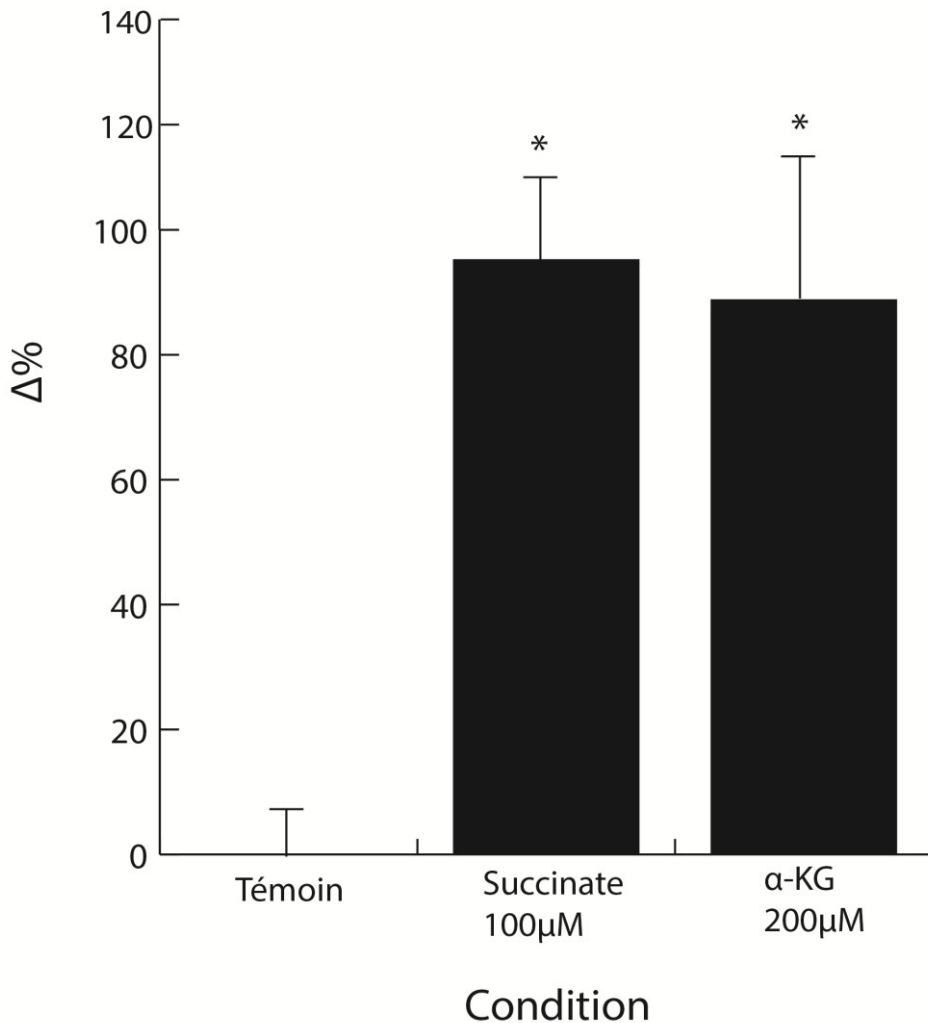


Figure 2.7 : Variation de l'aire des cônes de croissance en présence des ligands de GPR91 et GPR99

Les cônes soumis à 100 μ M de succinate (Succ) pendant 1h sont près de 100% plus gros que ceux des témoins. Les cônes soumis à 200 μ M d' α -Cétoglutarate (α KG) réagissent de façon similaire. Les résultats sont présentés sous forme moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). Moyenne de 50 explants par conditions par expérience, n = 10 ; p < 0,05 ; * représente une différence significative par rapport au contrôle.

Variation du nombre de filopodes ($\Delta\%$)

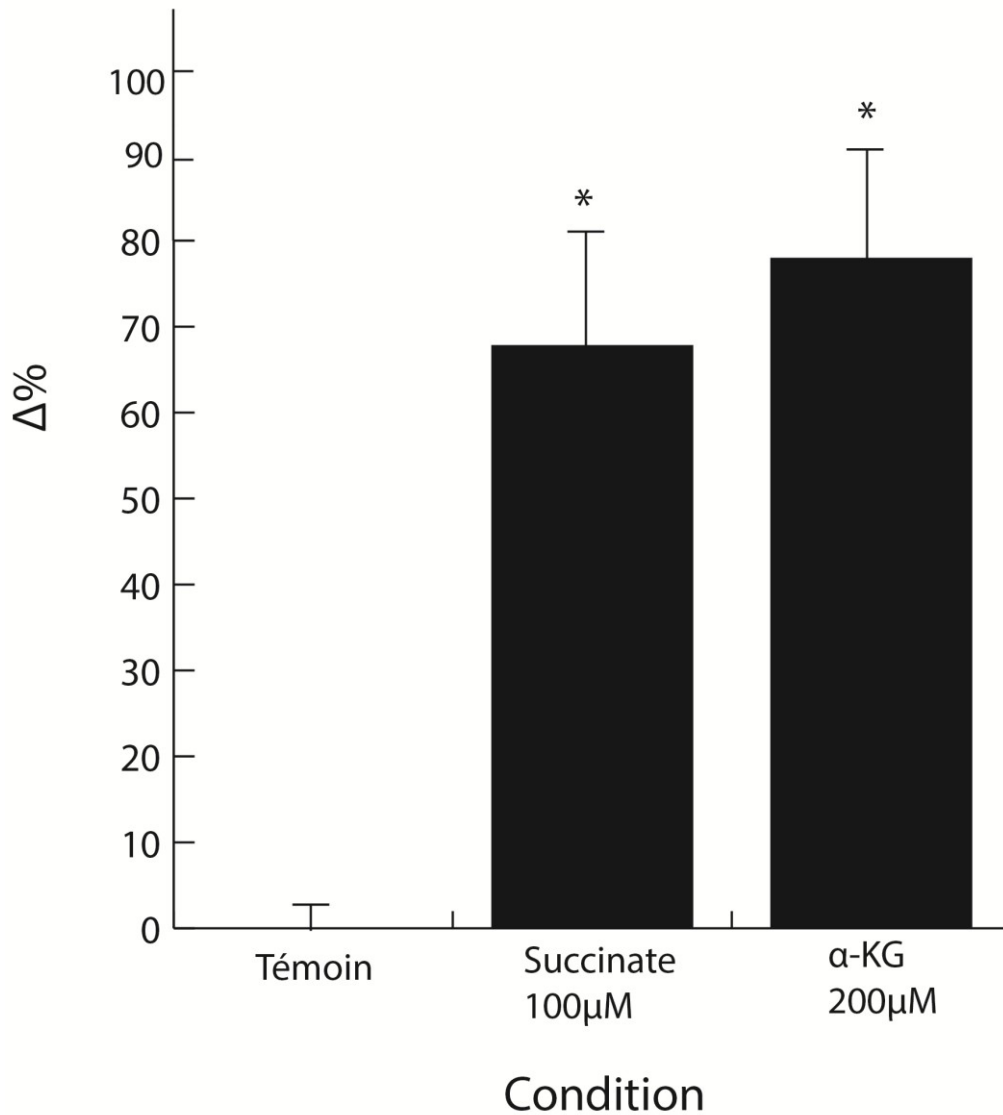


Figure 2.8 : Variation du nombre de filopodes en présence des ligands de GPR91 et GPR99

Le nombre de filopodes augmente lorsque le cône de croissance est soumis à 100 μ M de succinate (Succ) ou 200 μ M d' α -cétoglutarate (aKG) pendant 1h. Les résultats sont présentés sous forme moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). Moyenne de 60 cônes par conditions par expérience, N = 10 ; p < 0,05 ; * représente une différence significative par rapport au témoin.

2.1.2.4 Guidage axonal

Les axones soumis à un gradient de concentration de succinate migrent plus rapidement et plus loin que les axones témoins, ils ne changent pas de direction de migration cependant. Ainsi les axones adoptent un comportement de croissance. L' α -cétoglutarate ne cause pas de changement par rapport au témoin. Une compilation schématisée des comportements des axones est représentée à la figure 2.8.

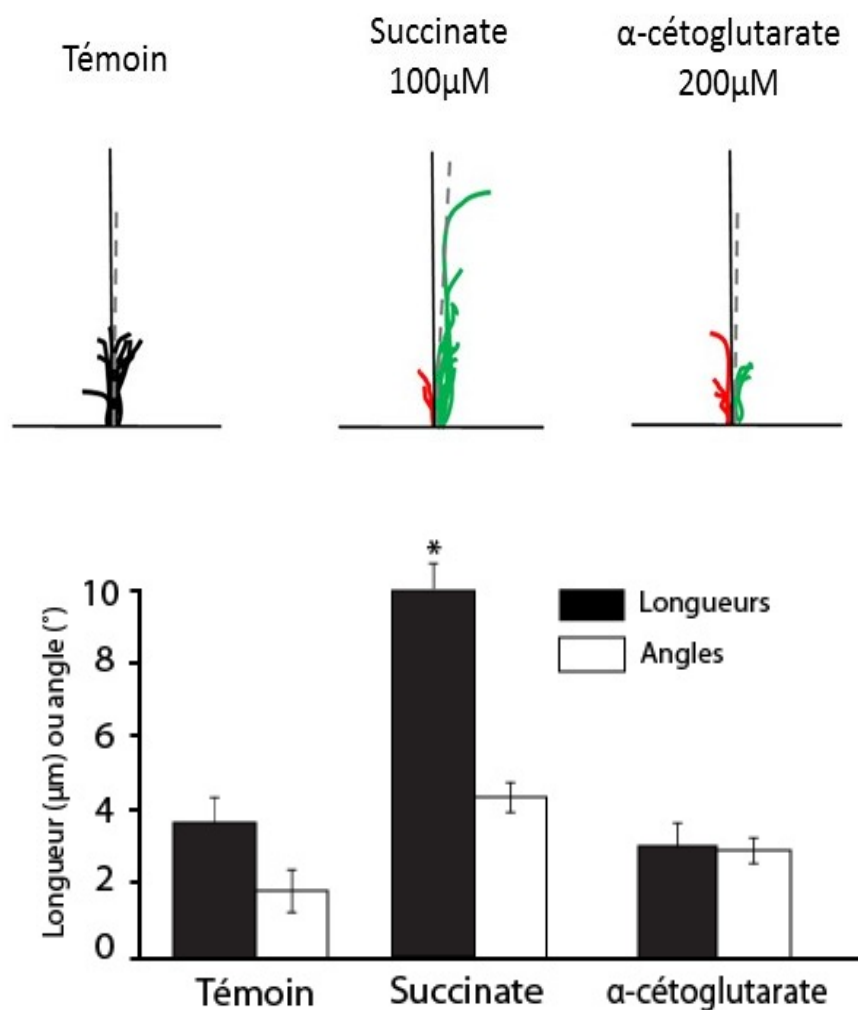


Figure 2.9 : Modélisation du guidage des axones

(haut) L'axe principal représente la direction de l'axone au temps 0. Une croissance en vert indique une redirection vers le gradient, donc une attraction. En

rouge, il s'agit d'une répulsion. Le pointillé représente la moyenne des tracés. Chaque tracé représente une répétition de l'expérience. **(Bas)** Le succinate (100 μ m) fait croître les axones de 10 μ m de plus que le témoin. Les valeurs sont présentées moyenne \pm erreur type de la moyenne ; $p < 0,0001$

2.1.4.5 Immunobuvardage (Western Blot)

L'immunobuvardage fut utilisé pour détecter la présence des récepteurs et les voies de signalisation activées par ces derniers. Le marquage de la forme phosphorylée de la kinase ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases*) indique une augmentation de l'activité de cette enzyme autant en présence de succinate que d' α -cétoglutarate. Cette augmentation perdure pour 15 minutes en présence de succinate, tandis que l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 causée par l' α -cétoglutarate diminue après 5 minutes seulement (Fig.2.9). Le marquage avec les anticorps dirigés contre GPR91 et GPR99 utilisés jusqu'à maintenant en immunobuvardage n'est pas spécifique.

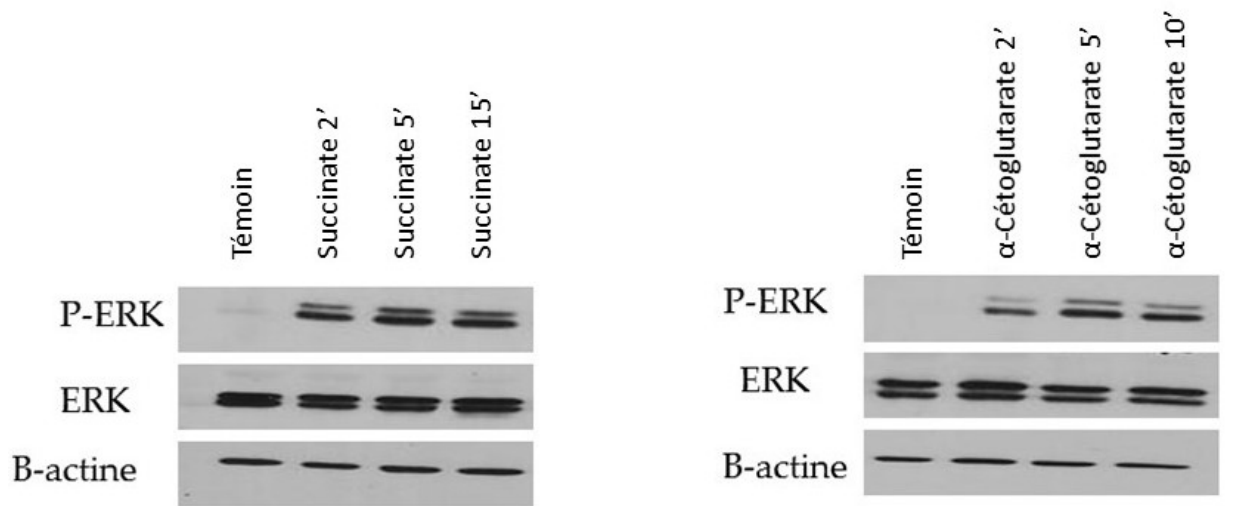


Figure 2.10: Immunobuvardage avec anticorps α P-ERK1/2

On dénote une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 pendant 15 minutes lorsque les neurones corticaux sont en contact avec 100 μ M de succinate (gauche). Lorsque l'on place les mêmes cellules en présence de 200 μ M d' α -cétoglutarate, on

observe une augmentation de la phosphorylation, mais cette dernière diminue après 5 minutes (droite). n = 10

2.1.3 Résultats et expériences à ajouter

Afin d'évaluer que l'impact des ligands de GPR91 et GPR99 sont bien responsables de l'effet observé dans les résultats démontrés plus haut, de nouvelles séries d'expériences et de résultats sont à ajouter. De plus, les expériences *in vivo* doivent être réalisées et quantifiées.

2.1.3.1 Expérience avec souris KO

La première étape à venir est de refaire les expériences présentées plus haut avec des souris dont le gène d'expression du récepteur en question est modifié afin que le récepteur soit non-fonctionnel ou absent. Ce qu'on attend de ces manipulations est une perte de l'effet observé sur la morphologie des cônes de croissance et la croissance générale. Dans l'éventualité où l'on n'observerait pas une telle diminution, on procéderait à une série d'expériences sur des souris où les deux récepteurs sont tronqués. Ces expériences permettraient d'obtenir des résultats qui révéleraient si la non-diminution de la modulation sur les souris KO est due à une interaction entre le ligand d'un des récepteurs à l'étude, GPR91 par exemple, et l'autre, soit GPR99 dans cette situation. Cette interaction est possible vu la similitude des ligands et des récepteurs, ainsi que la capacité des deux récepteurs de lier le même ligand, le dioxyde de carbone (CO₂). Les expériences de marquage sur les souris KO permettraient également d'obtenir de l'information sur la spécificité des anticorps dirigés contre ces récepteurs et donc, de la distribution exacte des récepteurs dans la rétine, la rétine en développement et même les différentes zones du cerveau.

Un autre aspect qui est intéressant à évaluer est l'activité des autres kinases intracellulaires impliquées dans l'activité et la croissance des cellules, comme PKA, AKT, ou de petites protéines G comme la RhoA, toujours en utilisant les souris KO, on peut tracer un portrait complet de la réponse cellulaire suivant l'interaction avec le ligand de GPR91 et GPR99.

2.1.3.2 Expériences *in vivo*

Les résultats des expériences *in vivo* décrites dans les méthodes telles que les injections intraoculaires unilatérales servent à tracer le développement des CGRs lorsque le corps cellulaire de celles-ci est en présence du ligand des récepteurs. Chez la souris, lorsqu'on marque les axones du côté injecté d'une façon particulière et celle de l'autre côté avec une autre méthode, on peut observer le comportement ipsi/controlatéral des axones en observant le SC. En considérant que chez les rongeurs 90% des axones traversent du côté controlatéral, un changement de ce rapport indique une modulation du comportement des axones dans les conditions posées. Un simple traçage à la CTb couplé à un fluorochrome différent dans chacun des yeux d'animaux WT et *GPR91*^{-/-} ou *GPR99*^{-/-}, puis une comparaison au microscope à fluorescence soit des colliculi supérieurs, soit du dLGN permettrait de constater s'il existe une différence dans la ségrégation des axones rétiniens chez les souris dont les gènes sont mutés.

Discussion générale

3.1 Impacts présumés de GPR91 et GPR99 sur le développement du système nerveux visuel

À partir des résultats préliminaires obtenus, on peut spéculer sur l'impact des récepteurs GPR91 et GPR99 sur le développement du système nerveux visuel, un effet qui est induit par l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2, une kinase intracellulaire hautement impliquée dans l'activité et la croissance des cellules. Ces révélations ouvrent la voie à une plus grande compréhension du comportement des CGRs en croissance, du développement du système nerveux visuel et des mécanismes qui peuvent altérer le développement optimal de ce dernier. La discussion portera sur les raisons qui mènent à ce raisonnement, ce qui est à attendre de prochains résultats, des études suivantes et finalement des applications futures de tels résultats.

3.1.1 Présence des récepteurs

Bien que la présence des récepteurs GPR91 sur les cellules ganglionnaires de la rétine a été bien établie par des méthodes d'hybridation *in situ* du récepteur, de RT-PCR et d'immunobuvardage de tissus rétiniens de rat et de souris (Sapieha, Sirinyan et al. 2008), sa distribution exacte sur les CGRs et à travers la rétine n'est toujours pas établie. Pour déterminer efficacement la distribution de la protéine sur la cellule, il serait nécessaire de refaire les expériences d'hybridation et d'immunohistochimie en utilisant des co-marqueurs spécifiques aux différents types cellulaires. Comme les souris *gpr91KO* expriment une forme tronquée du récepteur, plutôt que rien du tout, il est possible que les expériences de marquage chez ces sujets n'aient pas les résultats escomptés. En effet, si l'anticorps n'est pas dirigé spécifiquement sur la partie tronquée de la protéine, il a de fortes chances de se

lier au récepteur. C'est pourquoi le protocole d'identification et de localisation du récepteur dans ces tissus devra comprendre plusieurs méthodes. D'abord, le marquage régulier par immunobuvardage et par immunohistochimie, pour compenser le marquage probable des souris KO dans ce cas, l'utilisation d'un peptide bloquant, c'est-à-dire l'antigène qui forme un complexe avec l'anticorps, peut servir de contrôle négatif du marquage. Dans le même ordre d'idée, l'hybridation *in situ* s'avèrerait également une technique adéquate à fournir des résultats complémentaires, à condition que la sonde d'ARN utilisée soit bien dirigée contre une partie tronquée du génome murin. L'ensemble de ces méthodes permettront de caractériser précisément la distribution de GPR91. Pour GPR99, les mêmes problèmes se posent quant à la spécificité des anticorps, mais un problème supplémentaire se pose, aucune publication jusqu'à maintenant ne répertorie spécifiquement le récepteur dans la rétine. La première étape est donc de prouver sa présence qui n'est que soupçonnée jusqu'à présent. L'immunobuvardage des tissus à l'étude est une bonne première étape, utilisé conjointement avec l'amplification génétique de l'ARNm (RT-PCR) des CGRs, on pourrait établir sans doute la présence du récepteur sur les CGRs. Par la suite, les mêmes expériences décrites pour GPR91 serviront à établir la distribution du récepteur sur la cellule. Pour affiner les résultats, une étude de spécificité des anticorps telle que décrite par Cécyre (Cecyre, Thomas et al. 2014) permettrait un modèle complet et précis de la présence et la distribution des récepteurs dans la rétine et sur les CGRs.

3.1.2 L'effet du succinate sur les cônes de croissance

Le succinate module le comportement des CGRs en croissance, sa présence dans le milieu où croît la cellule cause une augmentation de l'aire de son cône de croissance et du nombre de filopodes présents sur ce dernier. Ce genre d'impact est caractéristique des

modulateurs de la croissance des CGRs (Argaw, Duff et al. 2008). Afin de s'assurer que ces résultats sont bel et bien dus à l'activation de GPR91, il sera d'abord primordial d'effectuer les mêmes expériences de morphologie des cônes de croissance avec les souris *gpr91KO*. On s'attend à voir disparaître l'effet d'augmentation de l'aire des cônes et du nombre de filopodes chez les souris présentant ce phénotype. Si c'est bel et bien le cas, on pourra témoigner avec certitude de l'impact du succinate sur l'activité des cônes de croissance et de là, établir un rôle pour le ligand dans la réponse aux facteurs chimiotactiques dirigeant les axones au cours du développement. Il sera grandement intéressant d'évaluer le comportement des axones des CGRs face aux molécules de guidage classique comme la nétrine, les éphrines et SF-1. Comme on sait que le comportement des axones face à ces molécules change selon, par exemple, les taux d'AMPC, on pourra en déduire un rôle important dans le développement. En effet, comme le succinate est largement présent dans les tissus hypoxiques, ses effets sur le comportement des axones chez des animaux soumis à des conditions faibles en oxygène sont d'un intérêt particulier.

3.1.3 Le succinate et la croissance générale

Lorsque les explants sont en culture dans un milieu contenant 100µM de succinate, on remarque un plus grand nombre de neurites, autrement dit d'axones, qui poussent hors du centre de l'explant où se situent les corps cellulaires. La longueur totale des neurites par rapport à la taille de l'explant est aussi plus grande, tel que le démontre les expériences de croissance globale, ce qui indique une activité cellulaire augmentée. Les expériences de guidage montrent des axones plus dynamiques face à un gradient croissant de succinate, mais pas une tendance à prendre une direction. Ce qu'on observe du comportement des CGRs est réellement celui d'un accélérateur de croissance. Un des éléments qui sera

important à départager lors des expériences sur les souris *gpr91KO* est si c'est augmentation de l'activité est réellement médiée par le récepteur, ou si la cellule parvient à intégrer le succinate d'une autre façon et à utiliser le substrat lui-même pour augmenter son activité. C'est donc dire que si les expériences sur les souris KO donnent des résultats similaires, l'hyperactivité cellulaire n'est peut-être pas médiée par le récepteur. Un autre bon indicateur de l'impact du succinate sur la croissance des CGRs sera la croissance des axones dans les noyaux terminaux. Suivant les expériences *ex vivo*, on devrait observer une apparition dans ces noyaux de manière plus précoce par rapport à l'âge pour les axones provenant d'un œil ayant été injecté avec le succinate. On doit par la suite comparer l'innervation de ces noyaux par les axones à différents âges pour constater à quel point les axones soumis à un contact avec le succinate rejoignent leurs cibles plus rapidement. Il sera également important de vérifier le rapport de transfert des axones du côté contralatéral à l'injection, l'accélération de la croissance pourrait avoir un impact sur la capacité des cônes à capter les signaux extracellulaires qui forcent à traverser le chiasma optique. Ce sont les coupes du colliculus supérieur des animaux injectés intraoculairement qui donneront le meilleur diagnostic quant à ce point.

3.1.4 L' α -cétoglutarate change la morphologie des cônes de croissance

Comme c'est le cas pour le succinate, l' α -cétoglutarate augmente l'aire et le nombre de filopodes des cônes de croissance des CGRs *in vitro*. Il est proposé à ce point que c'est un effet similaire au succinate, mais médié par GPR99 qui cause cette augmentation. La présence du récepteur n'est toutefois pas clairement établie sur les CGRs et le fort taux d'homologie de GPR99 avec GPR91 (Gonzalez, Communi et al. 2004) pourrait être en cause ici, il est possible que GPR91 lie également l' α -cétoglutarate et soit

donc partiellement ou totalement activé par ce dernier. À nouveau, les expériences sur les souris exprimant une forme défectueuse du récepteur donneront les indices nécessaires pour établir un plan général de ces relations. Si l'augmentation observée diminue ou disparaît totalement chez les souris *gpr99KO*, il est clair que l'augmentation de la taille du cône de croissance est due à la liaison du récepteur avec son propre ligand. Si une certaine réponse subsiste tout de même, la tâche à venir se complexifiera. D'abord on devra reprendre les mêmes expériences de morphologie avec la souris *gpr91KO* pour vérifier si la réponse à l' α -cétoglutarate n'est pas liée à ce récepteur, puis encore une fois avec des souris double KO (*gpr91/99KO* qui n'expriment pas la forme fonctionnelle des deux récepteurs. C'est de cette façon que l'on pourra rendre compte de la spécificité de la réaction des cônes de croissance en présence d' α -cétoglutarate

3.1.5 L' α -cétoglutarate dans la croissance des CGRs

Le ligand de GPR99 a également un impact sur la croissance globale des explants. Les neurites sont plus nombreuses et leur longueur totale est plus importante par rapport à la taille des explants lorsque l' α -cétoglutarate est présent dans le milieu de culture. À nouveau, cette réponse au ligand peut être non spécifique au récepteur ici discuté. On devra donc encore une fois comparer les résultats déjà obtenus avec les résultats d'explant provenant de souris *gpr99KO*, *gpr91KO* et double KO *gpr91/99* pour départager l'impact du ligand et celui du récepteur lui-même. Un fait demeure cependant intéressant et pourrait donner une piste de solution quant à la présence du récepteur sur les CGRs. En effet, les expériences de guidage axonal avec un gradient d' α -cétoglutarate ne démontrent pas de différence avec des études de guidage témoin. Or il a été établi que ce dernier a un impact sur la morphologie des cônes. On peut donc spéculer certaines choses, notamment de la disposition du récepteur sur la cellule. Lors des expériences de guidage, le microgradient

est créé à partir d'un point situé à environ 100µm du cône de croissance avec un angle de 45° par rapport à l'axe de croissance de ce dernier. Les cônes de croissance des neurites sont relativement éloignés (>150 µm) du centre des explants et donc, des corps cellulaires des CGRs. Il est possible que le récepteur ne soit pas présent sur les axones de ces cellules que seulement sur leur soma, ce qui expliquerait l'absence d'hyperactivité des cônes face au gradient, le ligand ne peut nullement interagir avec le corps cellulaire lors de ce type d'expériences.

3.1.6 L'effet du succinate est médié par ERK1/2

L'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 lorsque les neurones corticaux primaires sont traités avec le succinate est un signe direct que ce dernier provoque une augmentation de l'activité intracellulaire d'ERK1/2, une kinase dont l'activité est largement associée à la croissance et l'activité mitogène (Sabio and Davis 2014). Il n'est pas anormal de voir une augmentation de sa phosphorylation lorsqu'une cellule est en croissance et change de forme. Il serait cependant fort pertinent de pousser plus loin ces études, car l'activité du cytosquelette est généralement liée à l'AMPC et la PKA (Kimura, Kodama et al. 2004, Argaw, Duff et al. 2008). Il est donc à prévoir des études d'activité des autres voies cellulaires telles que PKA, AKT et RhoA. Ainsi, un immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de ces molécules permettrait d'avoir un point de vue plus général de la réponse cellulaire face au succinate. De surcroit, des études comparatives de croissance et de morphologie du cône en présence du ligand et d'un ou plusieurs inhibiteurs de ces voies révéleraient de façon nettement plus précise les mécanismes qui permettent les changements de morphologie et l'hyperactivité des cellules en présence de succinate. Évidemment les mêmes expériences devraient être reproduites

sur des cellules de souris où le récepteur est non fonctionnel, toujours dans le but de déterminer si la réaction est bel et bien liée à l'activation de ce dernier. Une diminution de la phosphorylation induite par le ligand est attendue sur les cellules provenant d'animaux KO pour le récepteur GPR91.

Les résultats obtenus sur les cellules corticales sont conséquents avec ce qui avait déjà été observé dans la littérature sur les CGRs (Hu, Li et al. 2015) (Sapieha, Sirinyan et al. 2008). Il est donc correct d'assumer que c'est un modèle alternatif pour ce genre d'expériences. Il a comme avantage d'assurer une quantité suffisante de neurones dans les lysats, le processus de purifications des cellules ganglionnaires de la rétine donnant un nombre très faible de cellules pour pouvoir effectuer les essais biochimiques.

3.1.7 Mécanismes intracellulaires de l'activité liée à GPR99

On observe également l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 en présence d' α -cétoglutarate. Cette différence peut être liée à la moins grande quantité de récepteurs de ce type à la surface des cellules corticales primaires, ou même de l'absence totale de ces derniers, l'augmentation de la phosphorylation pourrait être liée à une interaction du ligand de GPR99 avec GPR91. Les études sur les tissus KO pourront éclaircir ces hypothèses. Une fois de plus, d'autres marques des voies de signalisation devront être étudiées si l'on souhaite obtenir une compréhension exhaustive des mécanismes impliqués dans la réponse à l' α -cétoglutarate par les CGRs. ERK1/2 semblent définitivement en cause, mais la mesure de son implication reste à établir.

3.2 Impact de la recherche sur GPR91 et GPR99

La recherche sur GPR91 permet plusieurs choses. D'abord en améliorant la compréhension de ce récepteur que l'on sait présent sur les CGRs, on ouvre la voie à

différentes approches pour gérer les impacts d'une situation d'hypoxie dans les tissus rétiniens lors du développement, mais également par la suite. En effet, comme l'hypervascularisation de la rétine est en cause dans le développement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, qui cause la perte des CGRs et donc de la vue, on peut imaginer un rôle à jouer pour ce récepteur dans l'éradication de cette pathologie. Soit par action directe préventive, en l'empêchant d'induire la sécrétion de VEGF. Soit sous forme thérapeutique en utilisant ses capacités de modulation des CGRs dans le guidage axonal pour tenter de rétablir un tissu rétinien ou un nerf optique endommagé.

GPR99 est quant à lui un récepteur peu connu, principalement détecté dans le rein jusqu'à présent (Gonzalez, Communi et al. 2004). Il est cependant curieux qu'un récepteur dont le ligand est aussi répandu dans les organismes vivants, étant substrat du cycle des acides citriques, soit si peu présent. Son rôle dans le système immunitaire semble se préciser (Kanaoka, Maekawa et al. 2013) et les mécanismes de guidage de ce système présentent certaines similitudes avec celle du guidage axonal. L' α -cétoglutarate est présent partout et son récepteur est peu étudié, ce qui laisse présager une tâche encore substantielle pour bien caractériser son rôle dans le changement de morphologie des CGRs.

Conclusion

Le système nerveux visuel a été brièvement revu, avec une attention particulière aux relais entre la rétine, le cortex primaire et les noyaux thalamiques. Un survol du développement du système nerveux visuel et de ses mécanismes a été présenté pour bien comprendre ce qui permet aux CGRs de rejoindre leurs cibles thalamiques. Une brève explication de ce qu'est un RCPG fut donnée afin d'introduire GPR91 et GPR99 pour mener à la recherche effectuée et présentée dans ce mémoire. GPR91 et GPR99 sont des récepteurs dont l'étude à encore tout à venir, cet ouvrage permet d'établir un rôle potentiel de ces derniers dans le développement du système nerveux visuel et d'établir une marche à suivre afin de rigoureusement caractériser ce rôle. On propose également quelques pistes futures pour approfondir la connaissance de ces récepteurs en général et les applications pratiques de ces recherches.

Bibliographie

Adams, M. M., P. R. Hof, R. Gattass, M. J. Webster and L. G. Ungerleider (2000). "Visual cortical projections and chemoarchitecture of macaque monkey pulvinar." J Comp Neurol **419**(3): 377-393.

Allen, A. E., C. A. Procyk, M. Howarth, L. Walmsley and T. M. Brown (2016). "Visual input to the mouse lateral posterior and posterior thalamic nuclei: photoreceptive origins and retinotopic order." J Physiol **594**(7): 1911-1929.

Argaw, A., G. Duff, D. Boire, M. Ptito and J. F. Bouchard (2008). "Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development." Exp Neurol **211**(2): 494-502.

Argaw, A., G. Duff, N. Zabouri, B. Cecyre, N. Chaine, H. Cherif, N. Tea, B. Lutz, M. Ptito and J. F. Bouchard (2011). "Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance." J Neurosci **31**(4): 1489-1499.

Barbieri, A. M., V. Broccoli, P. Bovolenta, G. Alfano, A. Marchitello, C. Mocchetti, L. Crippa, A. Bulfone, V. Marigo, A. Ballabio and S. Banfi (2002). "Vax2 inactivation in mouse determines alteration of the eye dorsal-ventral axis, misrouting of the optic fibres and eye coloboma." Development **129**(3): 805-813.

Barbieri, A. M., G. Lupo, A. Bulfone, M. Andreazzoli, M. Mariani, F. Fougerousse, G. G. Consalez, G. Borsani, J. S. Beckmann, G. Barsacchi, A. Ballabio and S. Banfi (1999). "A homeobox gene, vax2, controls the patterning of the eye dorsoventral axis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10729-10734.

Bertuzzi, S., R. Hindges, S. H. Mui, D. D. O'Leary and G. Lemke (1999). "The homeodomain protein vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain." Genes Dev **13**(23): 3092-3105.

Blasdel, G. G. and J. S. Lund (1983). "Termination of afferent axons in macaque striate cortex." J Neurosci **3**(7): 1389-1413.

Bogdanovic, O., M. Delfino-Machin, M. Nicolas-Perez, M. P. Gavilan, I. Gago-Rodrigues, A. Fernandez-Minan, C. Lillo, R. M. Rios, J. Wittbrodt and J. R. Martinez-Morales (2012). "Numb/Numbl-Opo antagonism controls retinal epithelium morphogenesis by regulating integrin endocytosis." Dev Cell **23**(4): 782-795.

Bouchard, J. F., S. W. Moore, N. X. Tritsch, P. P. Roux, M. Shekarabi, P. A. Barker and T. E. Kennedy (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**(12): 3040-3050.

Brittis, P. A., V. Lemmon, U. Rutishauser and J. Silver (1995). "Unique changes of ganglion cell growth cone behavior following cell adhesion molecule perturbations: a time-lapse study of the living retina." Mol Cell Neurosci **6**(5): 433-449.

- Brittis, P. A. and J. Silver (1995). "Multiple factors govern intraretinal axon guidance: a time-lapse study." Mol Cell Neurosci **6**(5): 413-432.
- Brown, K. E., P. J. Keller, M. Ramialison, M. Rembold, E. H. Stelzer, F. Loosli and J. Wittbrodt (2010). "Nlcam modulates midline convergence during anterior neural plate morphogenesis." Dev Biol **339**(1): 14-25.
- Burmeister, M., J. Novak, M. Y. Liang, S. Basu, L. Ploder, N. L. Hawes, D. Vidgen, F. Hoover, D. Goldman, V. I. Kalnins, T. H. Roderick, B. A. Taylor, M. H. Hankin and R. R. McInnes (1996). "Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation." Nat Genet **12**(4): 376-384.
- Calissano, M. and D. S. Latchman (2010). "Cell-specific regulation of the pro-survival Brn-3b transcription factor by microRNAs." Mol Cell Neurosci **45**(4): 317-323.
- Callaerts, P., G. Halder and W. J. Gehring (1997). "PAX-6 in development and evolution." Annu Rev Neurosci **20**: 483-532.
- Cardozo, M. J., L. Sanchez-Arrones, A. Sandonis, C. Sanchez-Camacho, G. Gestri, S. W. Wilson, I. Guerrero and P. Bovolenta (2014). "Cdon acts as a Hedgehog decoy receptor during proximal-distal patterning of the optic vesicle." Nat Commun **5**: 4272.
- Carl, M. and J. Wittbrodt (1999). "Graded interference with FGF signalling reveals its dorsoventral asymmetry at the mid-hindbrain boundary." Development **126**(24): 5659-5667.
- Carreres, M. I., A. Escalante, B. Murillo, G. Chauvin, P. Gaspar, C. Vegar and E. Herrera (2011). "Transcription factor Foxd1 is required for the specification of the temporal retina in mammals." J Neurosci **31**(15): 5673-5681.
- Cecyre, B., S. Thomas, M. Ptito, C. Casanova and J. F. Bouchard (2014). "Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **387**(2): 175-184.
- Cepko, C. (2014). "Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny." Nat Rev Neurosci **15**(9): 615-627.
- Chalasan, S. H., K. A. Sabelko, M. J. Sunshine, D. R. Littman and J. A. Raper (2003). "A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding." J Neurosci **23**(4): 1360-1371.
- Chatterjee, S. and E. M. Callaway (2003). "Parallel colour-opponent pathways to primary visual cortex." Nature **426**(6967): 668-671.
- Cherif, H., A. Argaw, B. Cécyre, A. Bouchard, J. Gagnon, P. Javadi, S. Desgent, K. Mackie and J.-F. Bouchard (2015) "Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation." eNeuro DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0011-15.2015>.

- Cherif, H., A. Argaw, B. Cecyre, A. Bouchard, J. Gagnon, P. Javadi, S. Desgent, K. Mackie and J. F. Bouchard (2015). "Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation." eNeuro **2**(5).
- Chilton, J. K. (2006). "Molecular mechanisms of axon guidance." Dev Biol **292**(1): 13-24.
- Chow, R. L., C. R. Altmann, R. A. Lang and A. Hemmati-Brivanlou (1999). "Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate." Development **126**(19): 4213-4222.
- Chow, R. L. and R. A. Lang (2001). "Early eye development in vertebrates." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 255-296.
- Chuang, J. C., P. H. Mathers and P. A. Raymond (1999). "Expression of three Rx homeobox genes in embryonic and adult zebrafish." Mech Dev **84**(1-2): 195-198.
- Clasca, F., P. Rubio-Garrido and D. Jabaudon (2012). "Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes." Eur J Neurosci **35**(10): 1524-1532.
- Conley, M. and I. T. Diamond (1990). "Organization of the Visual Sector of the Thalamic Reticular Nucleus in Galago." Eur J Neurosci **2**(3): 211-226.
- Coombs, J. L., D. Van Der List and L. M. Chalupa (2007). "Morphological properties of mouse retinal ganglion cells during postnatal development." J Comp Neurol **503**(6): 803-814.
- Cooper, H. M., C. Baleyrier and M. Magnin (1990). "Macaque accessory optic system: I. Definition of the medial terminal nucleus." J Comp Neurol **302**(2): 394-404.
- Cox, C. L., J. R. Huguenard and D. A. Prince (1997). "Nucleus reticularis neurons mediate diverse inhibitory effects in thalamus." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8854-8859.
- Cruz-Martin, A., R. N. El-Danaf, F. Osakada, B. Sriram, O. S. Dhande, P. L. Nguyen, E. M. Callaway, A. Ghosh and A. D. Huberman (2014). "A dedicated circuit links direction-selective retinal ganglion cells to the primary visual cortex." Nature **507**(7492): 358-361.
- Dacey, D. M., B. B. Peterson, F. R. Robinson and P. D. Gamlin (2003). "Fireworks in the primate retina: in vitro photodynamics reveals diverse LGN-projecting ganglion cell types." Neuron **37**(1): 15-27.
- Dann, J. F. and E. H. Buhl (1987). "Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat." J Comp Neurol **262**(1): 141-158.
- Dattani, M. T., J. P. Martinez-Barbera, P. Q. Thomas, J. M. Brickman, R. Gupta, I. L. Martensson, H. Toresson, M. Fox, J. K. Wales, P. C. Hindmarsh, S. Krauss, R. S. Beddington and I. C. Robinson (1998). "Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse." Nat Genet **19**(2): 125-133.
- de la Torre, J. R., V. H. Hopker, G. L. Ming, M. M. Poo, M. Tessier-Lavigne, A. Hemmati-Brivanlou and C. E. Holt (1997). "Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC." Neuron **19**(6): 1211-1224.

- Deiner, M. S., T. E. Kennedy, A. Fazeli, T. Serafini, M. Tessier-Lavigne and D. W. Sretavan (1997). "Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia." *Neuron* **19**(3): 575-589.
- Del Bene, F., K. Tessmar-Raible and J. Wittbrodt (2004). "Direct interaction of geminin and Six3 in eye development." *Nature* **427**(6976): 745-749.
- Dent, E. W., S. L. Gupton and F. B. Gertler (2011). "The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(3).
- Derrington, A. M., J. Krauskopf and P. Lennie (1984). "Chromatic mechanisms in lateral geniculate nucleus of macaque." *J Physiol* **357**: 241-265.
- Derrington, A. M. and P. Lennie (1984). "Spatial and temporal contrast sensitivities of neurones in lateral geniculate nucleus of macaque." *J Physiol* **357**: 219-240.
- Dickinson, R. E. and W. C. Duncan (2010). "The SLIT-ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system." *Reproduction* **139**(4): 697-704.
- Dickson, B. J. (2002). "Molecular mechanisms of axon guidance." *Science* **298**(5600): 1959-1964.
- Dickson, B. J. and K. Keleman (2002). "Netrins." *Curr Biol* **12**(5): R154-155.
- Dressler, G. R., U. Deutsch, K. Chowdhury, H. O. Nornes and P. Gruss (1990). "Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system." *Development* **109**(4): 787-795.
- Duff, G., A. Argaw, B. Cecyre, H. Cherif, N. Tea, N. Zabouri, C. Casanova, M. Ptito and J. F. Bouchard (2013). "Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance." *PLoS One* **8**(8): e70849.
- England, S. J., G. B. Blanchard, L. Mahadevan and R. J. Adams (2006). "A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia." *Development* **133**(23): 4613-4617.
- Erkman, L., P. A. Yates, T. McLaughlin, R. J. McEvelly, T. Whisenhunt, S. M. O'Connell, A. I. Krones, M. A. Kirby, D. H. Rapaport, J. R. Bermingham, D. D. O'Leary and M. G. Rosenfeld (2000). "A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system." *Neuron* **28**(3): 779-792.
- Erskine, L. and E. Herrera (2007). "The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance." *Dev Biol* **308**(1): 1-14.
- Erskine, L. and E. Herrera (2014). "Connecting the retina to the brain." *ASN Neuro* **6**(6).
- Erskine, L., S. Reijntjes, T. Pratt, L. Denti, Q. Schwarz, J. M. Vieira, B. Alakakone, D. Shewan and C. Ruhrberg (2011). "VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm." *Neuron* **70**(5): 951-965.

- Feldheim, D. A., Y. I. Kim, A. D. Bergemann, J. Frisen, M. Barbacid and J. G. Flanagan (2000). "Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping." Neuron **25**(3): 563-574.
- Ferrera, V. P., T. A. Nealey and J. H. Maunsell (1994). "Responses in macaque visual area V4 following inactivation of the parvocellular and magnocellular LGN pathways." J Neurosci **14**(4): 2080-2088.
- Finci, L. I., N. Kruger, X. Sun, J. Zhang, M. Chegkazi, Y. Wu, G. Schenk, H. D. Mertens, D. I. Svergun, Y. Zhang, J. H. Wang and R. Meijers (2014). "The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bifunctionality of netrin-1 as a guidance cue." Neuron **83**(4): 839-849.
- Fitzgibbon, T., L. V. Tevah and A. J. Sefton (1995). "Connections between the reticular nucleus of the thalamus and pulvinar-lateralis posterior complex: a WGA-HRP study." J Comp Neurol **363**(3): 489-504.
- Folbergrova, J., B. Ljunggren, K. Norberg and B. K. Siesjo (1974). "Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex." Brain Res **80**(2): 265-279.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-1272.
- Fricke, C., J. S. Lee, S. Geiger-Rudolph, F. Bonhoeffer and C. B. Chien (2001). "astray, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance." Science **292**(5516): 507-510.
- Frisen, J., P. A. Yates, T. McLaughlin, G. C. Friedman, D. D. O'Leary and M. Barbacid (1998). "Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system." Neuron **20**(2): 235-243.
- Fuhrmann, S., E. M. Levine and T. A. Reh (2000). "Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick." Development **127**(21): 4599-4609.
- Garcia-Frigola, C., M. I. Carreres, C. Vegar, C. Mason and E. Herrera (2008). "Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms." Development **135**(10): 1833-1841.
- Gibson-Brown, J. J., I. A. S, L. M. Silver and V. E. Papaioannou (1998). "Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis." Mech Dev **74**(1-2): 165-169.
- Giolli, R. A. (1963). "An Experimental Study of the Accessory Optic System in the Cynomolgus Monkey." J Comp Neurol **121**: 89-107.
- Giolli, R. A., R. H. Blanks and F. Lui (2006). "The accessory optic system: basic organization with an update on connectivity, neurochemistry, and function." Prog Brain Res **151**: 407-440.

Glinka, A., W. Wu, D. Onichtchouk, C. Blumenstock and C. Niehrs (1997). "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*." Nature **389**(6650): 517-519.

Gnana-Prakasam, J. P., S. Ananth, P. D. Prasad, M. Zhang, S. S. Atherton, P. M. Martin, S. B. Smith and V. Ganapathy (2011). "Expression and iron-dependent regulation of succinate receptor GPR91 in retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(6): 3751-3758.

Gonzalez, N. S., D. Communi, S. Hannedouche and J. M. Boeynaems (2004). "The fate of P2Y-related orphan receptors: GPR80/99 and GPR91 are receptors of dicarboxylic acids." Purinergic Signal **1**(1): 17-20.

Gordon, L., M. Mansh, H. Kinsman and A. R. Morris (2010). "*Xenopus* sonic hedgehog guides retinal axons along the optic tract." Dev Dyn **239**(11): 2921-2932.

Gray, H., S. Standring, H. Ellis and B. K. B. Berkovitz (2005). Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice. Edinburgh ; New York, Elsevier Churchill Livingstone.

Gutierrez, C., M. G. Cola, B. Seltzer and C. Cusick (2000). "Neurochemical and connectional organization of the dorsal pulvinar complex in monkeys." J Comp Neurol **419**(1): 61-86.

Halder, G., P. Callaerts and W. J. Gehring (1995). "Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*." Science **267**(5205): 1788-1792.

Halder, G., P. Callaerts and W. J. Gehring (1995). "New perspectives on eye evolution." Curr Opin Genet Dev **5**(5): 602-609.

Hall, W. C., J. H. Kaas, H. Killackey and I. T. Diamond (1971). "Cortical visual areas in the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*): a correlation between cortical evoked potential maps and architectonic subdivisions." J Neurophysiol **34**(3): 437-452.

Hamel, D., M. Sanchez, F. Duhamel, O. Roy, J. C. Honore, B. Noueihed, T. Zhou, M. Nadeau-Vallee, X. Hou, J. C. Lavoie, G. Mitchell, O. A. Mamer and S. Chemtob (2014). "G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(2): 285-293.

Hatini, V., W. Tao and E. Lai (1994). "Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina." J Neurobiol **25**(10): 1293-1309.

Hayhow, W. R., C. Webb and A. Jervie (1960). "The accessory optic fiber system in the rat." J Comp Neurol **115**: 187-215.

He, W., F. J. Miao, D. C. Lin, R. T. Schwandner, Z. Wang, J. Gao, J. L. Chen, H. Tian and L. Ling (2004). "Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors." Nature **429**(6988): 188-193.

Heisenberg, C. P., C. Houart, M. Take-Uchi, G. J. Rauch, N. Young, P. Coutinho, I. Masai, L. Caneparo, M. L. Concha, R. Geisler, T. C. Dale, S. W. Wilson and D. L. Stemple (2001). "A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon." Genes Dev **15**(11): 1427-1434.

Hermesz, E., S. Mackem and K. A. Mahon (1996). "Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo." Development **122**(1): 41-52.

Hindges, R., T. McLaughlin, N. Genoud, M. Henkemeyer and D. O'Leary (2002). "EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping." Neuron **35**(3): 475-487.

Hirose, Y., Z. M. Varga, H. Kondoh and M. Furutani-Seiki (2004). "Single cell lineage and regionalization of cell populations during Medaka neurulation." Development **131**(11): 2553-2563.

Hong, K., L. Hinck, M. Nishiyama, M. M. Poo, M. Tessier-Lavigne and E. Stein (1999). "A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion." Cell **97**(7): 927-941.

Hongo, I., M. Kengaku and H. Okamoto (1999). "FGF signaling and the anterior neural induction in *Xenopus*." Dev Biol **216**(2): 561-581.

Hopker, V. H., D. Shewan, M. Tessier-Lavigne, M. Poo and C. Holt (1999). "Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1." Nature **401**(6748): 69-73.

Hu, J., T. Li, S. Du, Y. Chen, S. Wang, F. Xiong and Q. Wu (2015). "The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells." Int J Mol Med **36**(1): 130-138.

Hubel, D. H. and T. N. Wiesel (1968). "Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex." J Physiol **195**(1): 215-243.

Hussain, S. A., M. Piper, N. Fukuhara, L. Strohlic, G. Cho, J. A. Howitt, Y. Ahmed, A. K. Powell, J. E. Turnbull, C. E. Holt and E. Hohenester (2006). "A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit- robo signaling." J Biol Chem **281**(51): 39693-39698.

Inatani, M. (2005). "Molecular mechanisms of optic axon guidance." Naturwissenschaften **92**(12): 549-561.

Inbe, H., S. Watanabe, M. Miyawaki, E. Tanabe and J. A. Encinas (2004). "Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine." J Biol Chem **279**(19): 19790-19799.

Isaac, A., C. Rodriguez-Esteban, A. Ryan, M. Altabef, T. Tsukui, K. Patel, C. Tickle and J. C. Izpisua-Belmonte (1998). "Tbx genes and limb identity in chick embryo development." Development **125**(10): 1867-1875.

- Jeffery, G. and L. Erskine (2005). "Variations in the architecture and development of the vertebrate optic chiasm." Prog Retin Eye Res **24**(6): 721-753.
- Jones, E. G. (2002). "Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1428): 1659-1673.
- Kaas, J. H., M. F. Huerta, J. T. Weber and J. K. Harting (1978). "Patterns of retinal terminations and laminar organization of the lateral geniculate nucleus of primates." J Comp Neurol **182**(3): 517-553.
- Kalil, K. and E. W. Dent (2005). "Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton." Curr Opin Neurobiol **15**(5): 521-526.
- Kamijyo, A., K. Yura and A. Ogura (2015). "Distinct evolutionary rate in the eye field transcription factors found by estimation of ancestral protein structure." Gene **555**(2): 73-79.
- Kanaoka, Y., A. Maekawa and K. F. Austen (2013). "Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand." J Biol Chem **288**(16): 10967-10972.
- Kim, U., M. V. Sanchez-Vives and D. A. McCormick (1997). "Functional dynamics of GABAergic inhibition in the thalamus." Science **278**(5335): 130-134.
- Kimura, K., A. Kodama, Y. Hayasaka and T. Ohta (2004). "Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post-ecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster*." Development **131**(7): 1597-1606.
- King, A. J. (2004). "The superior colliculus." Curr Biol **14**(9): R335-338.
- Kolpak, A., J. Zhang and Z. Z. Bao (2005). "Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration." J Neurosci **25**(13): 3432-3441.
- Kondo, S. and K. Ohki (2016). "Laminar differences in the orientation selectivity of geniculate afferents in mouse primary visual cortex." Nat Neurosci **19**(2): 316-319.
- Krebs, H. (1979). "Citric acid cycle: a chemical reaction for life." Nurs Mirror **149**(7): 30-32.
- Krebs, H. A., E. Salvin and W. A. Johnson (1938). "The formation of citric and alpha-ketoglutaric acids in the mammalian body." Biochem J **32**(1): 113-117.
- Lagutin, O. V., C. C. Zhu, D. Kobayashi, J. Topczewski, K. Shimamura, L. Puelles, H. R. Russell, P. J. McKinnon, L. Solnica-Krezel and G. Oliver (2003). "Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development." Genes Dev **17**(3): 368-379.
- Lemons, M. L., M. L. Abanto, N. Dambrouskas, C. C. Clements, Z. Deloughery, J. Garozzo and M. L. Condic (2013). "Integrins and cAMP mediate netrin-induced growth cone collapse." Brain Res **1537**: 46-58.

- Li, Q., K. Shirabe, C. Thisse, B. Thisse, H. Okamoto, I. Masai and J. Y. Kuwada (2005). "Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish." J Neurosci **25**(7): 1711-1717.
- Lin, H. and R. A. Giolli (1979). "Accessory optic system of rhesus monkey." Exp Neurol **63**(1): 163-176.
- Liu, G., H. Beggs, C. Jurgensen, H. T. Park, H. Tang, J. Gorski, K. R. Jones, L. F. Reichardt, J. Wu and Y. Rao (2004). "Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction." Nat Neurosci **7**(11): 1222-1232.
- Liu, M., Y. Liu, Y. Liu, G. Lupo, L. Lan, G. Barsacchi and R. He (2008). "A role for Xvax2 in controlling proliferation of Xenopus ventral eye and brain progenitors." Dev Dyn **237**(11): 3387-3393.
- Loosli, F., F. Del Bene, R. Quiring, M. Rembold, J. R. Martinez-Morales, M. Carl, C. Grabher, C. Iquel, A. Krone, B. Wittbrodt, S. Winkler, T. Sasado, C. Morinaga, H. Suwa, K. Niwa, T. Henrich, T. Deguchi, Y. Hirose, N. Iwanami, S. Kunimatsu, M. Osakada, T. Watanabe, A. Yasuoka, H. Yoda, C. Winkler, H. Elmasri, H. Kondoh, M. Furutani-Seiki and J. Wittbrodt (2004). "Mutations affecting retina development in Medaka." Mech Dev **121**(7-8): 703-714.
- Loosli, F., S. Winkler and J. Wittbrodt (1999). "Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina." Genes Dev **13**(6): 649-654.
- Lowe, C. J., M. Wu, A. Salic, L. Evans, E. Lander, N. Stange-Thomann, C. E. Gruber, J. Gerhart and M. Kirschner (2003). "Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system." Cell **113**(7): 853-865.
- Lui, F., K. M. Gregory, R. H. Blanks and R. A. Giolli (1995). "Projections from visual areas of the cerebral cortex to pretectal nuclear complex, terminal accessory optic nuclei, and superior colliculus in macaque monkey." J Comp Neurol **363**(3): 439-460.
- Lukyanova, L. D. and Y. I. Kirova (2015). "Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia." Front Neurosci **9**: 320.
- Maioli, M. G., S. Squatrito and R. Domeniconi (1989). "Projections from visual cortical areas of the superior temporal sulcus to the lateral terminal nucleus of the accessory optic system in macaque monkeys." Brain Res **498**(2): 389-392.
- Maness, P. F. and M. Schachner (2007). "Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration." Nat Neurosci **10**(1): 19-26.
- Marcotte, R. R. and B. V. Updyke (1982). "Cortical visual areas of the cat project differentially onto the nuclei of the accessory optic system." Brain Res **242**(2): 205-217.
- Marcus, R. C., R. Blazeski, P. Godement and C. A. Mason (1995). "Retinal axon divergence in the optic chiasm: uncrossed axons diverge from crossed axons within a midline glial specialization." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3716-3729.

- Marcus, R. C. and C. A. Mason (1995). "The first retinal axon growth in the mouse optic chiasm: axon patterning and the cellular environment." J Neurosci **15**(10): 6389-6402.
- Marcus, R. C., K. Shimamura, D. Sretavan, E. Lai, J. L. Rubenstein and C. A. Mason (1999). "Domains of regulatory gene expression and the developing optic chiasm: correspondence with retinal axon paths and candidate signaling cells." J Comp Neurol **403**(3): 346-358.
- Martinez-Morales, J. R., F. Del Bene, G. Nica, M. Hammerschmidt, P. Bovolenta and J. Wittbrodt (2005). "Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center." Dev Cell **8**(4): 565-574.
- Martinez-Morales, J. R., M. Rembold, K. Greger, J. C. Simpson, K. E. Brown, R. Quiring, R. Pepperkok, M. D. Martin-Bermudo, H. Himmelbauer and J. Wittbrodt (2009). "ojoplano-mediated basal constriction is essential for optic cup morphogenesis." Development **136**(13): 2165-2175.
- Masai, I., D. L. Stemple, H. Okamoto and S. W. Wilson (2000). "Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish." Neuron **27**(2): 251-263.
- Mathers, P. H., A. Grinberg, K. A. Mahon and M. Jamrich (1997). "The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development." Nature **387**(6633): 603-607.
- Maunsell, J. H. and D. C. Van Essen (1983). "Functional properties of neurons in middle temporal visual area of the macaque monkey. I. Selectivity for stimulus direction, speed, and orientation." J Neurophysiol **49**(5): 1127-1147.
- Maurer, K. A., A. N. Riesenberger and N. L. Brown (2014). "Notch signaling differentially regulates Atoh7 and Neurog2 in the distal mouse retina." Development **141**(16): 3243-3254.
- McAlonan, K., J. Cavanaugh and R. H. Wurtz (2006). "Attentional modulation of thalamic reticular neurons." J Neurosci **26**(16): 4444-4450.
- McFarlane, S., E. Cornel, E. Amaya and C. E. Holt (1996). "Inhibition of FGF receptor activity in retinal ganglion cell axons causes errors in target recognition." Neuron **17**(2): 245-254.
- McFarlane, S., L. McNeill and C. E. Holt (1995). "FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system." Neuron **15**(5): 1017-1028.
- McLaughlin, T., Y. S. Lim, A. Santiago and D. D. O'Leary (2014). "Multiple EphB receptors mediate dorsal-ventral retinotopic mapping via similar bi-functional responses to ephrin-B1." Mol Cell Neurosci **63**: 24-30.
- McPeck, R. M. and E. L. Keller (2002). "Saccade target selection in the superior colliculus during a visual search task." J Neurophysiol **88**(4): 2019-2034.
- Merigan, W. H., T. A. Nealey and J. H. Maunsell (1993). "Visual effects of lesions of cortical area V2 in macaques." J Neurosci **13**(7): 3180-3191.

- Miesfeld, J. B., G. Gestri, B. S. Clark, M. A. Flinn, R. J. Poole, J. R. Bader, J. C. Besharse, S. W. Wilson and B. A. Link (2015). "Yap and Taz regulate retinal pigment epithelial cell fate." Development **142**(17): 3021-3032.
- Morin, L. P. and K. M. Studholme (2014). "Retinofugal projections in the mouse." J Comp Neurol **522**(16): 3733-3753.
- Mui, S. H., J. W. Kim, G. Lemke and S. Bertuzzi (2005). "Vax genes ventralize the embryonic eye." Genes Dev **19**(10): 1249-1259.
- Nath, A. and G. W. Schwartz (2016). "Cardinal Orientation Selectivity Is Represented by Two Distinct Ganglion Cell Types in Mouse Retina." J Neurosci **36**(11): 3208-3221.
- Neumann, C. J. and C. Nusslein-Volhard (2000). "Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity." Science **289**(5487): 2137-2139.
- Niehrs, C. (1999). "Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer." Trends Genet **15**(8): 314-319.
- Nornes, H. O., G. R. Dressler, E. W. Knapik, U. Deutsch and P. Gruss (1990). "Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis." Development **109**(4): 797-809.
- O'Connor, D. H., M. M. Fukui, M. A. Pinsk and S. Kastner (2002). "Attention modulates responses in the human lateral geniculate nucleus." Nat Neurosci **5**(11): 1203-1209.
- Omede, A., D. Oceandy, M. Mamas, E. Cartwright, M. Zi, S. Prehar and A. Maqsood (2014). "177 The Alpha-ketoglutarate Receptor GPR99 Regulates Pathological Cardiac Hypertrophy." Heart **100**(Suppl 3): A100.
- Oster, S. F., M. O. Bodeker, F. He and D. W. Sretavan (2003). "Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development." Development **130**(4): 775-784.
- Ou, J., K. Bharti, A. Nodari, S. Bertuzzi and H. Arnheiter (2013). "Vax1/2 genes counteract Mitf-induced respecification of the retinal pigment epithelium." PLoS One **8**(3): e59247.
- Pacal, M. and R. Bremner (2014). "Induction of the ganglion cell differentiation program in human retinal progenitors before cell cycle exit." Dev Dyn **243**(5): 712-729.
- Papalopulu, N. and C. Kintner (1996). "A Xenopus gene, Xbr-1, defines a novel class of homeobox genes and is expressed in the dorsal ciliary margin of the eye." Dev Biol **174**(1): 104-114.
- Park, S. and M. P. Sanchez (1997). "The Eek receptor, a member of the Eph family of tyrosine protein kinases, can be activated by three different Eph family ligands." Oncogene **14**(5): 533-542.

- Philips, G. T., C. N. Stair, H. Young Lee, E. Wroblewski, M. A. Berberoglu, N. L. Brown and G. S. Mastick (2005). "Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type." *Dev Biol* **279**(2): 308-321.
- Piccolo, S., E. Agius, L. Leyns, S. Bhattacharyya, H. Grunz, T. Bouwmeester and E. M. De Robertis (1999). "The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals." *Nature* **397**(6721): 707-710.
- Pinault, D. and M. Deschenes (1998). "Anatomical evidence for a mechanism of lateral inhibition in the rat thalamus." *Eur J Neurosci* **10**(11): 3462-3469.
- Piper, M., R. Anderson, A. Dwivedy, C. Weinl, F. van Horck, K. M. Leung, E. Cogill and C. Holt (2006). "Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of Xenopus retinal growth cones." *Neuron* **49**(2): 215-228.
- Piscopo, D. M., R. N. El-Danaf, A. D. Huberman and C. M. Niell (2013). "Diverse visual features encoded in mouse lateral geniculate nucleus." *J Neurosci* **33**(11): 4642-4656.
- Plachez, C., W. Andrews, A. Liapi, B. Knoell, U. Drescher, B. Mankoo, L. Zhe, E. Mambetisaeva, A. Annan, L. Bannister, J. G. Parnavelas, L. J. Richards and V. Sundaresan (2008). "Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain." *Mol Cell Neurosci* **37**(4): 719-730.
- Plump, A. S., L. Erskine, C. Sabatier, K. Brose, C. J. Epstein, C. S. Goodman, C. A. Mason and M. Tessier-Lavigne (2002). "Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system." *Neuron* **33**(2): 219-232.
- Polackwich, R. J., D. Koch, R. McAllister, H. M. Geller and J. S. Urbach (2015). "Traction force and tension fluctuations in growing axons." *Front Cell Neurosci* **9**: 417.
- Pollard, T. D. (2015). "New Light on Growth Cone Navigation." *Dev Cell* **35**(6): 672-673.
- Pujic, Z. and J. Malicki (2004). "Retinal pattern and the genetic basis of its formation in zebrafish." *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 105-114.
- Purves, D. (2012). *Neuroscience*. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Qi, A. D., T. K. Harden and R. A. Nicholas (2004). "GPR80/99, proposed to be the P2Y(15) receptor activated by adenosine and AMP, is not a P2Y receptor." *Purinergic Signal* **1**(1): 67-74.
- Rebagliati, M. R., R. Toyama, P. Haffter and I. B. Dawid (1998). "cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 9932-9937.
- Regard, J. B., I. T. Sato and S. R. Coughlin (2008). "Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression." *Cell* **135**(3): 561-571.
- Rhee, J., N. S. Mahfooz, C. Arregui, J. Lilien, J. Balsamo and M. F. VanBerkum (2002). "Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion." *Nat Cell Biol* **4**(10): 798-805.

- Rhinn, M., A. Dierich, W. Shawlot, R. R. Behringer, M. Le Meur and S. L. Ang (1998). "Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification." Development **125**(5): 845-856.
- Rodriguez, J., P. Esteve, C. Weigl, J. M. Ruiz, Y. Fermin, F. Trousse, A. Dwivedy, C. Holt and P. Bovolenta (2005). "SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor." Nat Neurosci **8**(10): 1301-1309.
- Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen and B. K. Kobilka (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." Nature **459**(7245): 356-363.
- Roth, M. M., J. C. Dahmen, D. R. Muir, F. Imhof, F. J. Martini and S. B. Hofer (2016). "Thalamic nuclei convey diverse contextual information to layer 1 of visual cortex." Nat Neurosci **19**(2): 299-307.
- Roy, S., J. Jayakumar, P. R. Martin, B. Dreher, Y. B. Saalman, D. Hu and T. R. Vidyasagar (2009). "Segregation of short-wavelength-sensitive (S) cone signals in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus." Eur J Neurosci **30**(8): 1517-1526.
- Rubic, T., G. Lametschwandtner, S. Jost, S. Hinteregger, J. Kund, N. Carballido-Perrig, C. Schwarzler, T. Junt, H. Voshol, J. G. Meingassner, X. Mao, G. Werner, A. Rot and J. M. Carballido (2008). "Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity." Nat Immunol **9**(11): 1261-1269.
- Ruchhoeft, M. L., S. Ohnuma, L. McNeill, C. E. Holt and W. A. Harris (1999). "The neuronal architecture of Xenopus retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo." J Neurosci **19**(19): 8454-8463.
- Saalman, Y. B. and S. Kastner (2011). "Cognitive and perceptual functions of the visual thalamus." Neuron **71**(2): 209-223.
- Sabio, G. and R. J. Davis (2014). "TNF and MAP kinase signalling pathways." Semin Immunol **26**(3): 237-245.
- Sadagopan, N., W. Li, S. L. Roberds, T. Major, G. M. Preston, Y. Yu and M. A. Tones (2007). "Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease." Am J Hypertens **20**(11): 1209-1215.
- Sanchez-Arrones, L., M. Cardozo, F. Nieto-Lopez and P. Bovolenta (2012). "Cdon and Boc: Two transmembrane proteins implicated in cell-cell communication." Int J Biochem Cell Biol **44**(5): 698-702.
- Sanchez-Fernandez, G., S. Cabezudo, C. Garcia-Hoz, C. Beninca, A. M. Aragay, F. Mayor, Jr. and C. Ribas (2014). "Galphaq signalling: the new and the old." Cell Signal **26**(5): 833-848.
- Sapieha, P., M. Sirinyan, D. Hamel, K. Zaniolo, J. S. Joyal, J. H. Cho, J. C. Honore, E. Kermorvant-Duchemin, D. R. Varma, S. Tremblay, M. Leduc, L. Rihakova, P. Hardy, W. H. Klein, X. Mu, O. Mamer, P. Lachapelle, A. Di Polo, C. Beausejour, G. Andelfinger, G. Mitchell, F. Sennlaub and S. Chemtob (2008). "The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis." Nat Med **14**(10): 1067-1076.

- Schedl, A., A. Ross, M. Lee, D. Engelkamp, P. Rashbass, V. van Heyningen and N. D. Hastie (1996). "Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities." Cell **86**(1): 71-82.
- Schier, A. F. (2003). "Nodal signaling in vertebrate development." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 589-621.
- Schmitt, A. M., J. Shi, A. M. Wolf, C. C. Lu, L. A. King and Y. Zou (2006). "Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping." Nature **439**(7072): 31-37.
- Schulte, D., T. Furukawa, M. A. Peters, C. A. Kozak and C. L. Cepko (1999). "Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map." Neuron **24**(3): 541-553.
- Sen, S., H. Reichert and K. VijayRaghavan (2013). "Conserved roles of ems/Emx and otd/Otx genes in olfactory and visual system development in Drosophila and mouse." Open Biol **3**(5): 120177.
- Sherman, S. M. and R. W. Guillery (2002). "The role of the thalamus in the flow of information to the cortex." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1428): 1695-1708.
- Shi, M., S. R. Kumar, O. Motajo, F. Kretschmer, X. Mu and T. C. Badea (2013). "Genetic interactions between Brn3 transcription factors in retinal ganglion cell type specification." PLoS One **8**(10): e76347.
- Shipp, S. (2001). "Corticopulvinar connections of areas V5, V4, and V3 in the macaque monkey: a dual model of retinal and cortical topographies." J Comp Neurol **439**(4): 469-490.
- Shipp, S. (2003). "The functional logic of cortico-pulvinar connections." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1438): 1605-1624.
- Simeone, A., D. Acampora, A. Mallamaci, A. Stornaiuolo, M. R. D'Apice, V. Nigro and E. Boncinelli (1993). "A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo." EMBO J **12**(7): 2735-2747.
- Simpson, J. I. (1984). "The accessory optic system." Annu Rev Neurosci **7**: 13-41.
- Sinigaglia, C., H. Busengdal, L. Leclere, U. Technau and F. Rentzsch (2013). "The bilaterian head patterning gene six3/6 controls aboral domain development in a cnidarian." PLoS Biol **11**(2): e1001488.
- Sinn, R. and J. Wittbrodt (2013). "An eye on eye development." Mech Dev **130**(6-8): 347-358.
- Sparks, D. L. and R. Hartwich-Young (1989). "The deep layers of the superior colliculus." Rev Oculomot Res **3**: 213-255.

Spooner, B. S., K. M. Yamada and N. K. Wessells (1971). "Microfilaments and cell locomotion." J Cell Biol **49**(3): 595-613.

Sretavan, D. W., E. Pure, M. W. Siegel and L. F. Reichardt (1995). "Disruption of retinal axon ingrowth by ablation of embryonic mouse optic chiasm neurons." Science **269**(5220): 98-101.

Steinfeld, J., I. Steinfeld, N. Coronato, M. L. Hampel, P. G. Layer, M. Araki and A. Vogel-Hopker (2013). "RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling." Development **140**(24): 4959-4969.

Stevens, A. and J. R. Jacobs (2002). "Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals." J Neurosci **22**(11): 4448-4455.

Stier, H. and B. Schlosshauer (1995). "Axonal guidance in the chicken retina." Development **121**(5): 1443-1454.

Strohlic, L., A. Dwivedy, F. P. van Horck, J. Falk and C. E. Holt (2008). "A role for S1P signalling in axon guidance in the *Xenopus* visual system." Development **135**(2): 333-342.

Sundstrom, L., P. J. Greasley, S. Engberg, M. Wallander and E. Ryberg (2013). "Succinate receptor GPR91, a Galpha(i) coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLCbeta." FEBS Lett **587**(15): 2399-2404.

Thompson, A. W., Z. Pujic, L. J. Richards and G. J. Goodhill (2011). "Cyclic nucleotide-dependent switching of mammalian axon guidance depends on gradient steepness." Mol Cell Neurosci **47**(1): 45-52.

Thompson, H., D. Barker, O. Camand and L. Erskine (2006). "Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract." Dev Biol **296**(2): 476-484.

Thompson, H., O. Camand, D. Barker and L. Erskine (2006). "Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina." J Neurosci **26**(31): 8082-8091.

Tohmi, M., R. Meguro, H. Tsukano, R. Hishida and K. Shibuki (2014). "The extrageniculate visual pathway generates distinct response properties in the higher visual areas of mice." Curr Biol **24**(6): 587-597.

Toma, I., J. J. Kang, A. Sipos, S. Vargas, E. Bansal, F. Hanner, E. Meer and J. Peti-Peterdi (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): 2526-2534.

Turner, D. L., E. Y. Snyder and C. L. Cepko (1990). "Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina." Neuron **4**(6): 833-845.

Uhrich, D. J., K. A. Manning and S. L. Feig (2003). "Laminar and cellular targets of individual thalamic reticular nucleus axons in the lateral geniculate nucleus in the prosimian primate Galago." J Comp Neurol **458**(2): 128-143.

- Viringipurampeer, I. A., T. Ferreira, S. DeMaria, J. J. Yoon, X. Shan, M. Moosajee, K. Gregory-Evans, J. Ngai and C. Y. Gregory-Evans (2012). "Pax2 regulates a fadd-dependent molecular switch that drives tissue fusion during eye development." Hum Mol Genet **21**(10): 2357-2369.
- Walz, A., S. McFarlane, Y. G. Brickman, V. Nurcombe, P. F. Bartlett and C. E. Holt (1997). "Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system." Development **124**(12): 2421-2430.
- Wang, Y., G. D. Dakubo, S. Thurig, C. J. Mazerolle and V. A. Wallace (2005). "Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina." Development **132**(22): 5103-5113.
- Wei, P., N. Liu, Z. Zhang, X. Liu, Y. Tang, X. He, B. Wu, Z. Zhou, Y. Liu, J. Li, Y. Zhang, X. Zhou, L. Xu, L. Chen, G. Bi, X. Hu, F. Xu and L. Wang (2015). "Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway." Nat Commun **6**: 6756.
- Wessells, N. K., B. S. Spooner and M. A. Luduena (1973). "Surface movements, microfilaments and cell locomotion." Ciba Found Symp **14**: 53-82.
- Wiesel, T. N. and D. H. Hubel (1966). "Spatial and chromatic interactions in the lateral geniculate body of the rhesus monkey." J Neurophysiol **29**(6): 1115-1156.
- Williams, S. E., M. Grumet, D. R. Colman, M. Henkemeyer, C. A. Mason and T. Sakurai (2006). "A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways." Neuron **50**(4): 535-547.
- Williams, S. E., F. Mann, L. Erskine, T. Sakurai, S. Wei, D. J. Rossi, N. W. Gale, C. E. Holt, C. A. Mason and M. Henkemeyer (2003). "Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm." Neuron **39**(6): 919-935.
- Wilson, S. I., E. Graziano, R. Harland, T. M. Jessell and T. Edlund (2000). "An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo." Curr Biol **10**(8): 421-429.
- Wittbrodt, J., A. Shima and M. Scharl (2002). "Medaka--a model organism from the far East." Nat Rev Genet **3**(1): 53-64.
- Wolf, A. B., M. J. Lintz, J. D. Costabile, J. A. Thompson, E. A. Stubblefield and G. Felsen (2015). "An integrative role for the superior colliculus in selecting targets for movements." J Neurophysiol: jn 00262 02015.
- Wong, G. K., M. L. Baudet, C. Norden, L. Leung and W. A. Harris (2012). "Slit1b-Robo3 signaling and N-cadherin regulate apical process retraction in developing retinal ganglion cells." J Neurosci **32**(1): 223-228.
- Wright, K. M., K. A. Lyon, H. Leung, D. J. Leahy, L. Ma and D. D. Ginty (2012). "Dystroglycan organizes axon guidance cue localization and axonal pathfinding." Neuron **76**(5): 931-944.

- Wurtz, R. H. and J. E. Albano (1980). "Visual-motor function of the primate superior colliculus." Annu Rev Neurosci **3**: 189-226.
- Xiang, Y., Y. Li, Z. Zhang, K. Cui, S. Wang, X. B. Yuan, C. P. Wu, M. M. Poo and S. Duan (2002). "Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors." Nat Neurosci **5**(9): 843-848.
- Yamada, K. M., B. S. Spooner and N. K. Wessells (1970). "Axon growth: roles of microfilaments and microtubules." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(4): 1206-1212.
- Young, R. W. (1985). "Cell differentiation in the retina of the mouse." Anat Rec **212**(2): 199-205.
- Zhang, L., P. H. Mathers and M. Jamrich (2000). "Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice." Genesis **28**(3-4): 135-142.
- Zhang, X. M. and X. J. Yang (2001). "Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog." Development **128**(6): 943-957.
- Zhao, X., H. Chen, X. Liu and J. Cang (2013). "Orientation-selective responses in the mouse lateral geniculate nucleus." J Neurosci **33**(31): 12751-12763.
- Zhou, H., R. J. Schafer and R. Desimone (2016). "Pulvinar-Cortex Interactions in Vision and Attention." Neuron **89**(1): 209-220.
- Zolessi, F. R., L. Poggi, C. J. Wilkinson, C. B. Chien and W. A. Harris (2006). "Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo." Neural Dev **1**: 2.
- Zuber, M. E., G. Gestri, A. S. Viczian, G. Barsacchi and W. A. Harris (2003). "Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors." Development **130**(21): 5155-5167.

Annexe 1: Prix et publications de l'auteur

A.1.1 Bourses

- Bourse Banting and Best 2014 (IRSC)
- Bourse d'excellence de la FESP-ÉOUM 2013
- Bourse de performance du réseau vision 2013 (FRSQ)

A.1.2 Présentations

- Hosni 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. 20^e Réunion annuelle du Réseau de recherche en santé de la vision du FRQ-S, Montréal, Canada, 2014
- A. Bouchard (Octobre 2014). *GPR91, GPR99(80) et leurs impacts sur le développement des cellules ganglionnaires de la rétine*. Séminaire de maîtrise. École d'optométrie de l'université de Montréal
- Hosni Cherif*, Anteneh Argaw*, Bruno Cécyre*, Sébastien Desgent, Alex Bouchard*, Jonathan Gagnon*, Ken Mackie, **Jean-François Bouchard**. Role of GPR55 in the development of the central nervous system. Poster 2-A-3, 8th Annual Meeting of the Canadian Association for Neuroscience, Montreal, Canada, 2014.
- H. Chérif, A. Argaw, B. Cécyre, S. Desgent, **A. Bouchard**, J. Gagnon, K. Mackie, J-F. Bouchard (Décembre 2013). *GPR55, a new actor of the RCG axon guidance during the development*. 8e symposium canadien universitaire en optométrie, Waterloo (Canada)
- H. Chérif, A. Argaw, B. Cécyre, S. Desgent, **A. Bouchard**, J. Gagnon, K. Mackie, J-F. Bouchard (Novembre 2013). *GPR55, a new actor of the RCG axon guidance during the development*. Soc. Neuroscience. San Diego (USA)

- H. Chérif, A. Argaw, B. Cécyre, S. Desgent, **A. Bouchard**, J. Gagnon, K. Mackie, J-F. Bouchard (septembre 2013). *Modulation de la croissance et du développement du système neurovisuel par GPR55*. Réseau québécois de recherche sur le médicament. Montréal (Canada).

A.1.3 Publications

- H. Cherif, A. Argaw, B. Cécyre, **A. Bouchard**, J. Gagnon, P. Javadi, S. Desgent, K. Mackie, J-F. Bouchard (Octobre 2015) *Role of GPR55 during axon growth and target innervation*. eNeuro. DOI: 10.1523/ENEURO.0011-15.2015