

Université de Montréal

Le lactate et son récepteur GPR81/HCAR1 dans le développement du système nerveux

*Par*

Samuel Laroche

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, appliquées et cliniques

Mars 2021

© Samuel Laroche 2021

Université de Montréal

Unité académique : École d'optométrie

---

*Ce mémoire intitulé*

**Le lactate et son récepteur GPR81/HCAR1 dans le développement du système nerveux**

*Présenté par*

**Samuel Laroche**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Maurice Ptito**

Président-rapporteur

**Jean-François Bouchard**

Directeur de recherche

**Matthieu Vanni**

Membre du jury

## Résumé

Pendant le développement du système nerveux embryonnaire, des niveaux élevés d'énergie sont nécessaires à la croissance axonale des neurones et des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) vers leurs cibles cérébrales. Cette demande énergétique entraîne une augmentation des concentrations de lactate, ligand du récepteur GPR81/HCAR1. Cependant, le rôle du lactate et de son récepteur au cours du développement du système nerveux central (CNS) a été négligé. Ce mémoire de maîtrise rapporte la présence du récepteur GPR81 sur des neurones (CGR) pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte chez la souris. L'effet d'activation du GPR81 par manipulation pharmacologique permet de réguler la morphologie des cônes de croissance et augmente la croissance axonale des CGR sur les explants de rétine *in vitro*. L'utilisation de souris transgénique *gpr81<sup>-/-</sup>* rendant le récepteur GPR81 déficient nous a permis de confirmer ces résultats. De plus, l'injection *in vivo* de CTb-Alexa Fluor 555 dans l'œil gauche et de CTb-Alexa Fluor 647 dans l'œil droit a permis de visualiser les projections des CGR dans le cerveau des souris *gpr81<sup>+/+</sup>* et *gpr81<sup>-/-</sup>*. Les souris *gpr81<sup>-/-</sup>* présentent une diminution dans les projections ipsilatérales des CGR dans le corps géniculé latéral dorsal (CGLd). Toutefois, l'acuité visuelle testée à l'aide du réflexe oculomoteur ainsi que la sensibilité de la rétine suivant des flashes lumineux de différentes intensités mesurée par électrorétinogrammes (ERG) n'ont pas été modifiés chez les souris *gpr81<sup>-/-</sup>*. Ces résultats suggèrent un rôle important du récepteur GPR81 au niveau anatomique pendant le développement du système nerveux visuel.

**Mots-clés** : Lactate, GPR81, HCAR1, développement, cône de croissance, croissance axonale, 3,5-DHBA.

## Abstract

During the development of the embryonic nervous system, high energy levels are required for the axonal growth of neurons and retinal ganglion cell axons (RGCs) to their brain targets. This energy demand leads to an increase in the concentrations of lactate, a ligand for the GPR81 / HCAR1 receptor. However, the role of lactate and its receptor in the development of the central nervous system (CNS) has been overlooked. This manuscript reports, the presence of the GPR81 receptor on neurons (RGCs) during embryonic development and into adulthood in mice. The activating effect of GPR81 by pharmacological manipulation helps to regulate the morphology of growth cones and increases axonal growth of RGCs on retinal explants *in vitro*. The use of *gpr81*<sup>-/-</sup> transgenic mice rendering the GPR81 receptor deficient enabled us to confirm these results. In addition, *in vivo* injection of CTb-Alexa Fluor 555 in the left eye and CTb-Alexa Fluor 647 in the right eye made it possible to visualize the projections of RGCs in the brains of *gpr81*<sup>+/+</sup> and *gpr81*<sup>-/-</sup> mice. The *gpr81*<sup>-/-</sup> mice show a decrease in ipsilateral projections of RGCs in the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN). However, the visual acuity tested by the oculomotor reflex as well as the retinal sensitivity following light flashes of different intensities measured by electroretinograms (ERGs) were not modified in *gpr81*<sup>-/-</sup> mice compared to the wildtypes. These results suggest an important role of the GPR81 receptor at the anatomical level during the development of the visual nervous system.

**Keywords** : Lactate, GPR81, HCAR1, development, growth cone, axonal growth, 3,5-DHBA,

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des figures.....	8
Liste des sigles et abréviations.....	9
Remerciements.....	12
1 – Introduction.....	15
1.1– Le système visuel.....	15
1.1.1 – La rétine.....	15
1.1.2 – Projection du système nerveux visuel.....	17
1.2 – Développement embryonnaire.....	19
1.2.1 – Développement du système visuel.....	20
1.2.2 – Développement de la voie visuelle.....	22
1.2.3 – Développement de la rétine.....	24
1.2.4 – Le cône de croissance.....	24
1.3 – Lactate.....	27
1.3.1 – L’histoire de l’acide lactique.....	27
1.3.2 – Le lactate physiologique.....	30
1.3.3 – Lactate déshydrogénase (LDH).....	31
1.3.4 – Transporteur des Monocarboxylates (MCT).....	34
1.3.5 – Transport du lactate entre astrocyte et neurone (ANLS).....	35
1.3.6 – Récepteur du lactate GPR81/HCAR1.....	36
1.3.7 – Développement et lactate.....	38
1.3.8 – Lactate, blessure et inflammation.....	38

2 – Objectifs de recherche.....39

3 – Article .....41

    3.1 – Introduction .....41

    3.2 – Materials and Methods.....42

        3.2.1 – Ethics Statement and Animals .....42

        3.2.2 – Genotypic Screening .....43

        3.2.3 – Reagents.....43

        3.2.4 – Tissue Preparation for Immunohistochemistry .....43

        3.2.5 – Immunohistochemistry.....44

        3.2.6 – L-Lactate solution .....44

        3.2.7 – Retinal Explant Culture.....44

        3.2.8 – Growth Cone Behavior Assay.....44

        3.2.9 – Primary Neuron Culture .....45

        3.2.10 – Immunocytochemistry.....45

        3.2.11 – Western Blot Analysis.....45

        3.2.12 – Eye Specific Segregation .....46

        3.2.13 – Statistical Analysis.....46

    3.3. Results.....46

        3.3.1 – GPR81 is Expressed in the Retina .....46

        3.3.2 – GPR81 Influences GC Morphology and Axon Growth .....48

        3.3.3 – Lactate Increases PKC and PKA Phosphorylation.....50

        3.3.4 – GPR81 Affects Retinothalamic Projections In Vivo .....50

    3.4 – Discussion .....52

    3.5 – References.....54

4 – Discussion générale .....56

4.1 – Résumé des résultats .....	57
4.1.1– Présence du récepteur .....	57
4.1.2 – L’effet du GPR81 sur les CGR.....	58
4.1.3 – Mécanismes intracellulaires du GPR81 .....	59
4.1.4 – Impact de GPR81 sur les projections des CGR.....	61
4.1.5 – Impact de GPR81 sur les fonctions visuelles .....	61
4.2 – Perspective d’avenir.....	64
5 – Conclusion .....	65
Références bibliographiques .....	66
Annexes .....	73
Méthodes supplémentaires .....	73
Résultats supplémentaires .....	75

## Liste des figures

Figure 1. Couches de la rétine .....	16
Figure 2. Conversion du photon en signal nerveux.....	17
Figure 3. Coupe horizontale de la tête du nerf optique. ....	18
Figure 4. Processus de gastrulation .....	21
Figure 5. Formation du tube neural .....	21
Figure 6. Formation du cerveau .....	22
Figure 7. Organisation des projections rétinienne du système visuel chez la souris ....	23
Figure 8. Cône de croissance.....	25
Figure 9. Type de molécule impliqué dans le guidage du cône de croissance.....	26
Figure 10. Énantiomère du lactate.....	31
Figure 11. Réaction de la LDH .....	32
Figure 12. Cycle du NAD <sup>+</sup> /NADH lors de la glycolyse.....	33
Figure 13. Représentation de l'hypothèse ANLS avec le cycle du glutamate .....	36
Figure 14. Résumé des effets d'activation du GPR81 dans différents tissus .....	38

## Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

ANLS : Transport du lactate entre astrocyte-neurone

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

CGL : Corps géniculé latéral

CGLd : Corps géniculé latéral dorsal

CGR : Cellule ganglionnaire de la rétine

CNS : Système nerveux central

CTb : Sous-unité b de la toxine du choléra

DCC: Deleted in Colorectal Cancer

EAAT : Transporteurs d'acides aminés excitateurs

ERG : Électrorétinogramme

GLN : Glutamine

GLS : Glutamine synthétase

GLU : Glutamate

GLUR : Récepteur glutamatergique

GLUT : Transporteur du glucose

GMP : Guanosine monophosphate

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G

GS : Glutaminase

HCAR1 : Récepteur de l'acide hydroxycarboxylique 1

IL : Interleukine

LaH : Acide lactique

LDH : Lactate déshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharides

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCT : Transporteurs des Monocarboxylate

NAD<sup>+</sup> / NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PI3K: : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PKA: Protéine kinase A

PLC : Phospholipase C

TNF : Facteur de nécrose tumorale

3,5-DHBA: 3,5- acide dihydroxybenzoïque

*À la mémoire de Umit Keysan, compagnon de maîtrise décédé pendant ces études. De beaux moments restent gravés dans mes souvenirs.*

# Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Jean-François Bouchard pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire. En commençant lors de mon premier stage, tu m'as transmis la passion pour la neuro pharmacologie. Tu m'as fait confiance pour la poursuite de mon projet de recherche à la maîtrise. J'ai adoré apprendre à tes côtés. Même dans les moments les plus difficiles dus au COVID-19, les lab-meeting me redonnaient toujours de la motivation par ton enthousiasme. Merci particulièrement pour tes corrections, tes commentaires et de m'avoir guidé dans mon parcours académique.

Un gros merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont permis de m'épanouir et de rendre les journées agréables. Premièrement, merci à Aurélie Stil, tu as été une superviseure exceptionnelle. Tu es une personne attachante et j'ai aimé te côtoyer tous les jours pendant mes études. Tes conseils, ton expertise et ta bonne humeur m'ont aidé tous au long de mon apprentissage. Dès mon premier stage, tu m'as montré les fondements de la culture cellulaire neuronale et tu m'as transmis ta passion pour poursuivre la recherche à la maîtrise. Nos conversations enrichissantes nous auront permis d'améliorer notre recherche.

Merci à Bruno Cécyre, tu m'as montré tant de technique. J'ai apprécié le temps que tu as mis pour me former. Je vais toujours me souvenir de ton hospitalité et de nous avoir invité à glisser à ton chalet. Mais surtout à mettre de l'eau chaude sur de la glace sèche pour couvrir le plancher du lab de fumer.

Merci à Philippe Germain mon coéquipier de maîtrise et mon barman préféré. Ta présence est un réconfort au laboratoire. Nos longues conversations sur de multiples sujets nous ont permis de construire une camaraderie incroyable. De nombreux fous rires ont marqué nos journées ensemble. Sans toi, cette maîtrise n'aurait pas été aussi plaisante.

Un merci spécial à Hosni qui a pris de son précieux temps pour venir me montrer des techniques les soirs et les fins de semaine.

Merci à Nelson, Samuel, Geneviève et Ismaël d'être des personnes agréables à côtoyer.

Merci à mes stagiaires Odyle, Antoine, Fiona, Youssef et Christophe que j'ai pu former. Votre aide et votre contribution ont été essentielles pour mon projet.

Merci au membre du laboratoire de Sylvain Chemtob à Sainte-Justine, Xiaojuan Yang, Xin Hou, Christiane Quiniou et Sonja L'Espérance de m'avoir accordé leurs temps et leurs confiances pour la poursuite du projet sur les souris transgéniques.

Je voudrais remercier ma famille de m'avoir encouragé dans mes études. Mes parents Josée et Steve et ma sœur Katherine. Pour les nombreux repas, fromages et conseils qu'ils m'ont apportés.

Finalement merci à ma copine Maroua. Notre rencontre au laboratoire a été le commencement de cette belle relation. Ton support m'a été d'une grande aide et je chéris chaque moment que je passe avec toi.



# 1 – Introduction

## 1.1 – Le système visuel

La vision est un sens extrêmement conservé dans le règne animal. Au cours de l'évolution, la sélection naturelle a perfectionné l'œil et le système nerveux essentiel à l'analyse des signaux lumineux. Notre monde est rempli d'objets de multiples formes, couleurs et textures. Lorsque les photons composant la lumière frappent ces objets, certains sont absorbés, d'autres réfléchissent afin de converger vers l'œil. Certains objets sont comestibles, d'autres, dangereux, ou d'autres servent de protection. Le perfectionnement du capteur (l'œil) et du centre d'analyse (cerveau) de la vision aide à mieux discerner ces objets qui ont permis à nos ancêtres de survivre. Être une proie qui voit mieux son prédateur ou être le prédateur qui voit mieux sa proie constitue un avantage évolutif significatif. « L'origine des espèces » de Charles Darwin consacre un chapitre entier sur l'évolution de l'œil. L'œil de l'aigle, un organe d'extrême perfection provient d'un organe prototypique relativement simple constitué d'une cellule photoréceptrice entourée de cellules pigmentaires et recouvertes d'une couche tissulaire translucide sans lentille ni autre corps réfractif (1, 2).

L'avènement des technologies d'électrophysiologie, de microscopie, de traceurs fluorescents permet aujourd'hui de mieux comprendre de façon anatomique et physiologique comment ce sens fonctionne et se développe.

### 1.1.1 – La rétine

La rétine correspond à la surface sensible à la lumière tapissée à l'intérieur du globe oculaire. Lorsque les photons traversent la pupille de l'œil, ils passent au travers des différentes couches cellulaires de la rétine pour atteindre les photorécepteurs (figure 1). Les photorécepteurs incluent 2 types de cellules, soit, les cônes et les bâtonnets. Chez l'humain, il existe trois types de cônes qui sont spécialisés pour détecter le vert, le bleu et le rouge (vision photopique). Ils sont situés principalement à la macula qui correspond à la zone d'acuité maximale de l'œil. Les bâtonnets sont plus sensibles que les cônes à la lumière ce qui permet de voir dans des conditions de faible luminosité (vision scotopique),

mais ils ne permettent pas de distinguer les couleurs. Ils sont situés majoritairement en périphérie de la rétine (3).

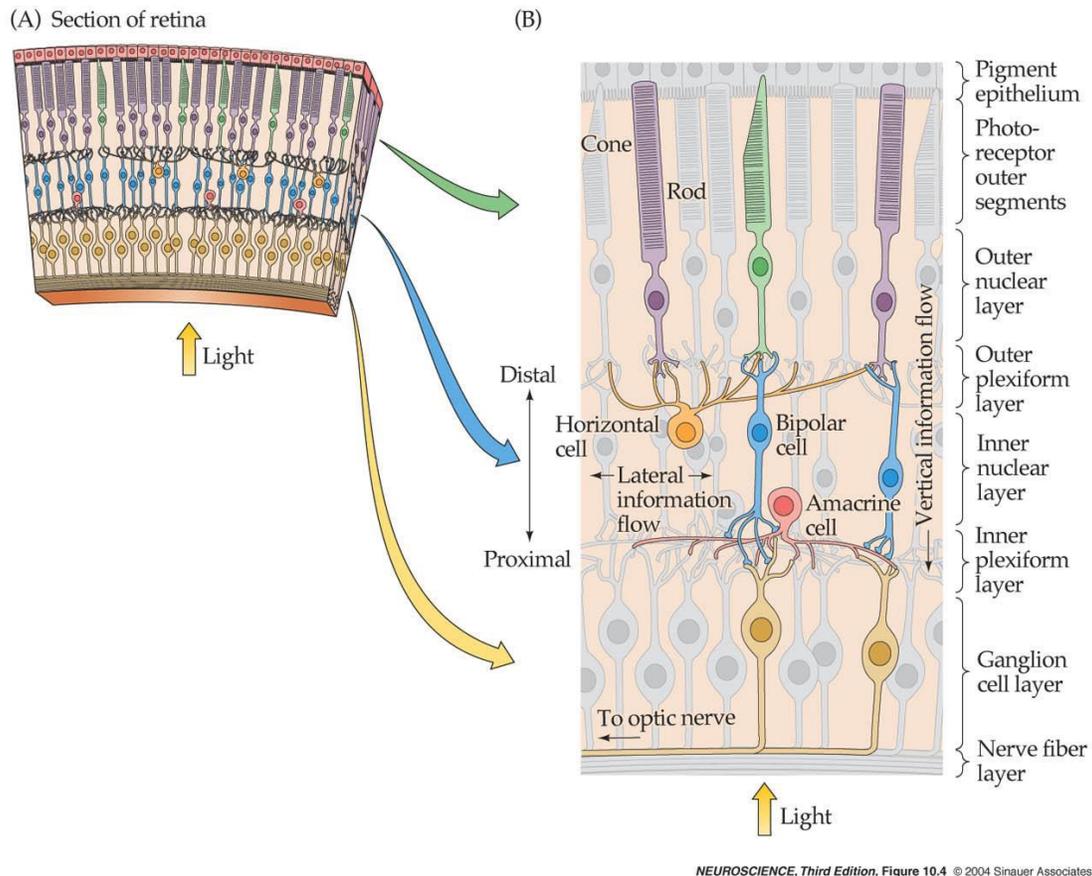


Figure 1. Couches de la rétine

La transduction du signal lumineux commence lorsque le photon frappe un pigment photosensible appelé rétinol. Le rétinol est fixé à une protéine nommée opsine qui possède sept passages transmembranaires. Ensembles, l'opsine et le rétinol forment la rhodopsine située dans les disques de la couche du segment externe des photorécepteurs. Le rétinol activé par le photon change de conformation ce qui active la protéine G transducine. Ce changement de conformation va activer l'enzyme phosphodiesterase qui va transformer, à son tour, le GMPc présent dans le cytosol en GMP. La diminution cytosolique du GMPc entraîne une fermeture des canaux sodiques et une hyperpolarisation de la membrane des photorécepteurs (figure 2). Ensuite, l'hyperpolarisation transmise aux terminaisons synaptiques des photorécepteurs diminue

la relâche du glutamate ce qui est intégré par les neurones bipolaires (ON/OFF) et les cellules horizontales dans la couche plexiforme externe. Les cellules horizontales projettent latéralement leur axone et modulent la transmission aux neurones bipolaires adjacents et participent ainsi à l'élaboration des champs récepteurs. Ils permettent d'augmenter le contraste des signaux visuels selon l'intensité et l'orientation lumineuses. Les corps cellulaires des cellules horizontales, bipolaires et amacrines forment la couche nucléaire interne. Les cellules amacrines jouent un rôle important dans la transformation des réponses des cellules bipolaires aux changements d'intensité lumineuse vers les CGR. L'enchevêtrement d'axones et des dendrites provenant des CGR, des neurones bipolaires et des cellules amacrines forment la couche plexiforme interne. Les cellules bipolaires transmettent le signal des photorécepteurs vers la couche des cellules ganglionnaires (figure 1) (3).

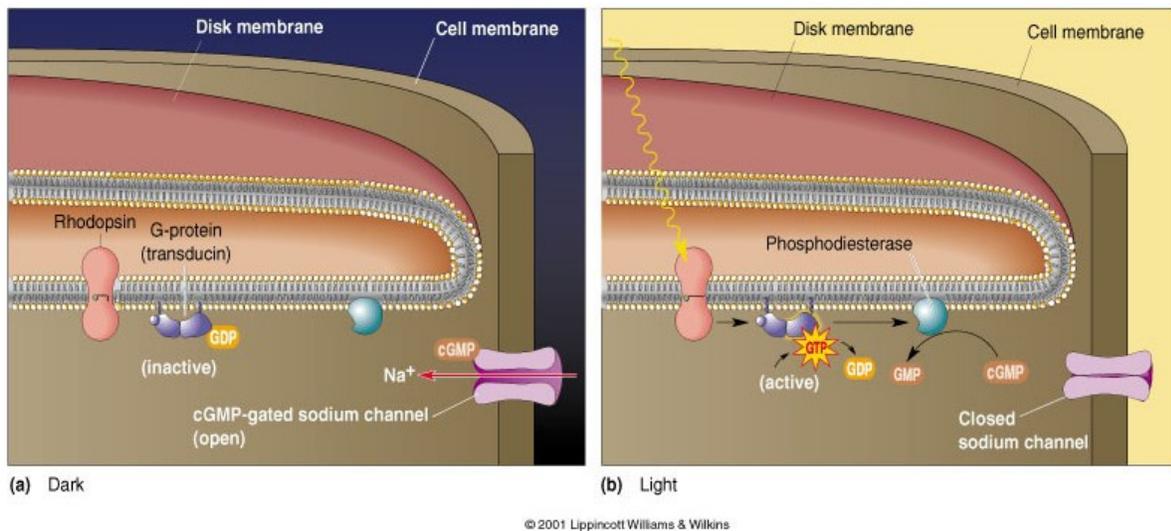


Figure 2. Conversion du photon en signal nerveux

### 1.1.2 – Projection du système nerveux visuel

Environ 1.2 million d'axones des CGR se regroupent pour former la tête du nerf optique à la base de l'œil. Après la *lamina cribrosa*, des oligodendrocytes autour fournissent une gaine myéline aux axones (figure 3). Cette gaine myéline permet d'augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux. Puis, une gaine méningée, qui contient du liquide céphalo-rachidien, protège des chocs physiques. Le nerf optique est finalement entouré de tissu conjonctif. Ensuite, le nerf de chaque œil passe à travers les

orbites crâniennes pour se croiser et former le chiasma optique. À partir du chiasma, les axones poursuivent leur chemin pour former le tractus optique qui va se projeter sur plusieurs structures sous-corticales. Les tractus optiques de la voie visuelle primaire contournent le mésencéphale pour atteindre les corps genouillés latéraux (CGL). Puis, une partie des axones vont se projeter vers les colliculi supérieurs et les radiations optiques. Les radiations optiques se dirigent dans les aires visuelles du cortex permettant le traitement et la reconnaissance des couleurs, des formes et du mouvement (4).

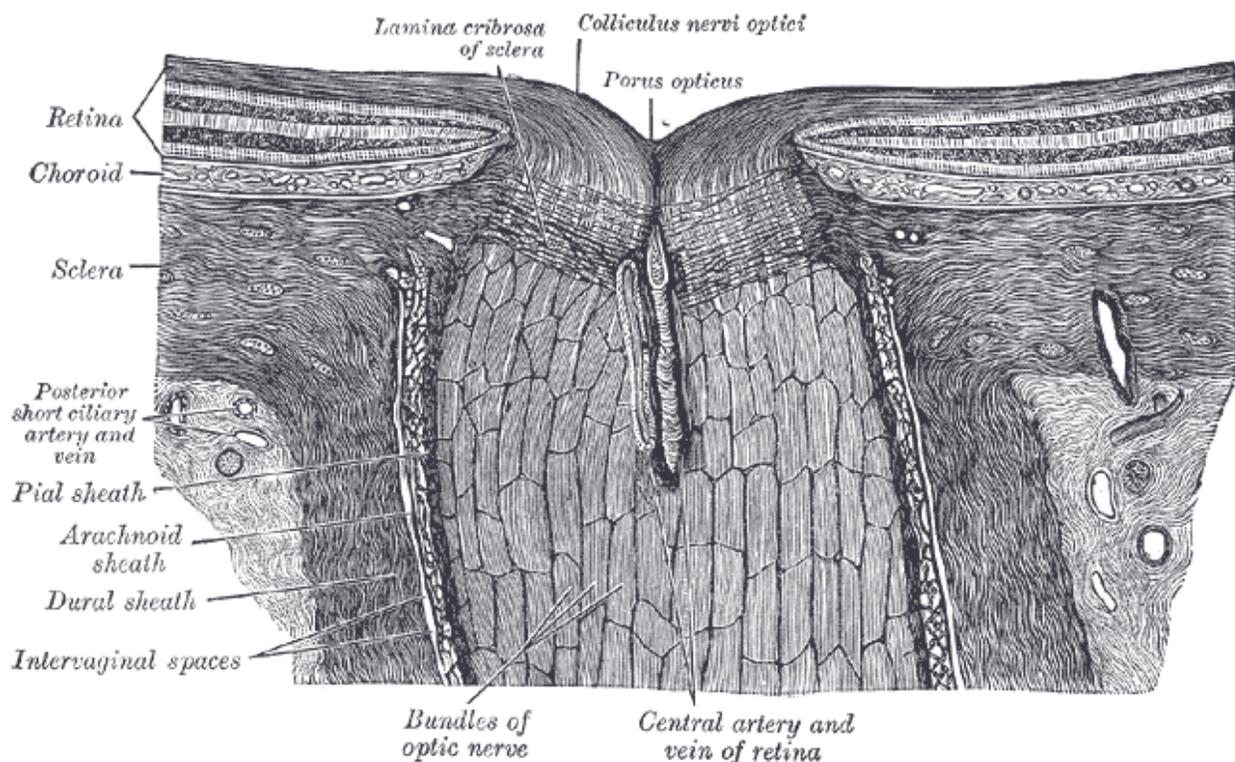


Figure 3. Coupe horizontale de la tête du nerf optique.

(Tirée de Henry Gray, Anatomy of the Human Body, figure 880, 1918)

Finalement, plusieurs conditions pathologiques peuvent influencer cette transmission de l'influx nerveux et provoquer la perte de la vision. Des maladies complexes comme le glaucome qui affectent la capacité de survie des CGR, aux simples lésions physiques du nerf optique. Des maladies neurodégénératives qui affectent négativement les processus biologiques normaux entraînent aussi une mort prématurée des neurones ce qui cause une cécité permanente (5).

## 1.2 – Développement embryonnaire

Le développement d'un nouvel être vivant est l'un des processus les plus complexes imaginables. Lorsque la première cellule fusionnée du matériel génétique des parents est créée, elle passe par différents mécanismes pour permettre la naissance de ce nouvel organisme. Ces mécanismes sont programmés dans notre ADN permettant la prolifération de cette cellule en un organisme complexe et multicellulaire. Pour atteindre la fin de sa maturation, ces cellules devront se différencier pour former les tissus et les organes du corps. Parmi tous les organes formés, l'un semble contrôler tous les autres. Il s'agit du système nerveux dont le principal élément est le cerveau. Le cerveau est composé de plusieurs types cellulaires permettant son bon fonctionnement. Lors du développement du système nerveux central embryonnaire, les cellules souches neurales multipotentes vont se différencier en cellules précurseurs gliales et neuronales. Les précurseurs gliaux forment entre autres les astrocytes et les oligodendrocytes tandis que les précurseurs neuronaux forment les différents types de neurones. Ensemble, les cellules gliales et neuronales travaillent en synergie afin de créer des réseaux complexes entre les nombreuses structures du cerveau qu'ils composent. Elles participent à la transmission efficace des influx nerveux entre les structures cérébrales nous permettant d'intégrer des informations sensorielles telles que la vision et de réagir en conséquence. Les neurones sont les principaux responsables de la transmission des influx nerveux. Leurs structures incroyablement variables et complexes incluant le corps cellulaire, les dendrites et l'axone peuvent être caractérisés en plus de 200 types de neurones différents. Malheureusement, après la maturation de l'organisme, ce type cellulaire ne permet pas une régénération complète de ces structures après une insulte. Le questionnement de cette capacité de régénération sera aussi abordé concernant les neurones nécessaires à la vision.

Les cellules ganglionnaires de la rétine ont les neurones présents dans la rétine et leurs axones forment le nerf optique. Ils transmettent les signaux lumineux captés par les photorécepteurs jusqu'au cerveau où l'interprétation de la vision se fait (6).

### **1.2.1 – Développement du système visuel**

La formation des yeux débute au stade embryonnaire chez les mammifères. Dans les premières semaines de gestation, une réorganisation cellulaire de la blastula sous forme sphérique va provoquer une invagination par le processus de gastrulation (figure 4). Les cellules à la surface de la sphère vont former l'ectoderme (futur épiderme et système nerveux) tandis que les cellules à l'intérieur vont former l'endoderme (futurs intestins, poumons et foie). Ensuite, une troisième couche de cellules se forme entre les deux couches pour faire place au mésoderme (futurs reins, organes reproducteurs, os, muscles et système vasculaire). L'étape suivante consiste à la neurulation, à partir d'une population de cellules antérieure de l'ectoderme, il y a formation de la plaque neurale. La plaque neurale va former la gouttière neurale en se transformant à son tour en tube neural (figure 5). Le tube neural se divise ensuite en trois vésicules primaires (prosencephale, mésencéphale et rhombencéphale) puis en cinq vésicules secondaires (télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale et myélocéphale). La vésicule télencéphalique se transforme en deux vésicules pour former les hémisphères cérébraux, puis les bulbes olfactifs. Le diencéphale forme le thalamus et l'hypothalamus. Puis, de chaque côté du diencéphale se développent deux vésicules secondaires nommées vésicules optiques. Ces vésicules optiques vont s'allonger et se replier vers l'intérieur pour former des pédoncules et les cupules optiques qui comprennent deux couches. La couche externe devient l'épithélium pigmentaire tandis que la couche interne devient la rétine. La surface dorsale du mésencéphale forme le tectum. Le tectum devient par la suite le colliculus supérieur responsable de recevoir les informations sensorielles de l'œil et participe aux mouvements oculaires (figure 6) (6, 7).

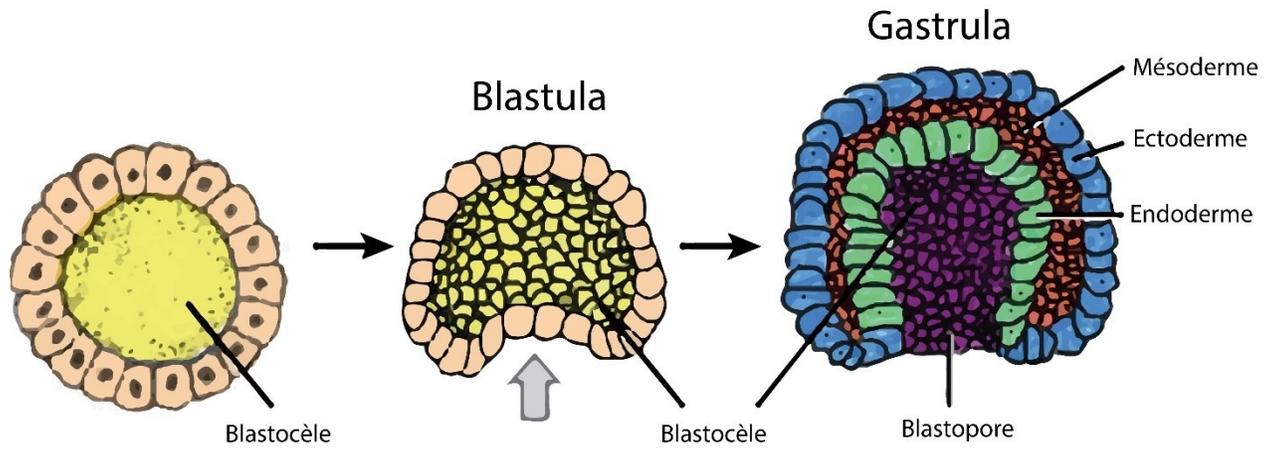


Figure 4. Processus de gastrulation

(Adaptée de Concepts of Biology-1st Canadian Edition – Molnar)

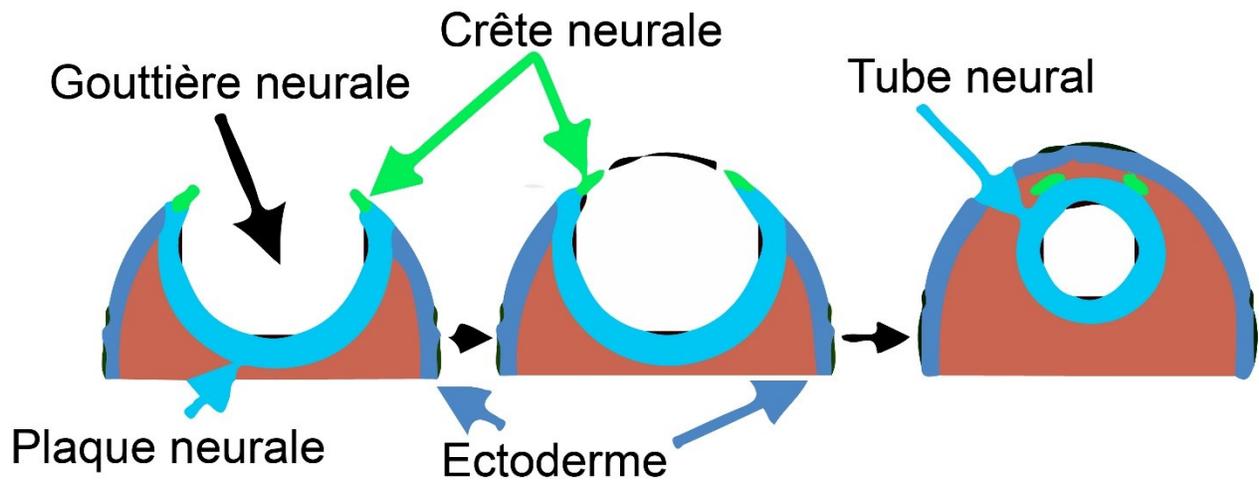


Figure 5. Formation du tube neural

(Adaptée de Neuroscience for Kid, Copyright © 1996-2015, Eric H. Chudler, University of Washington)

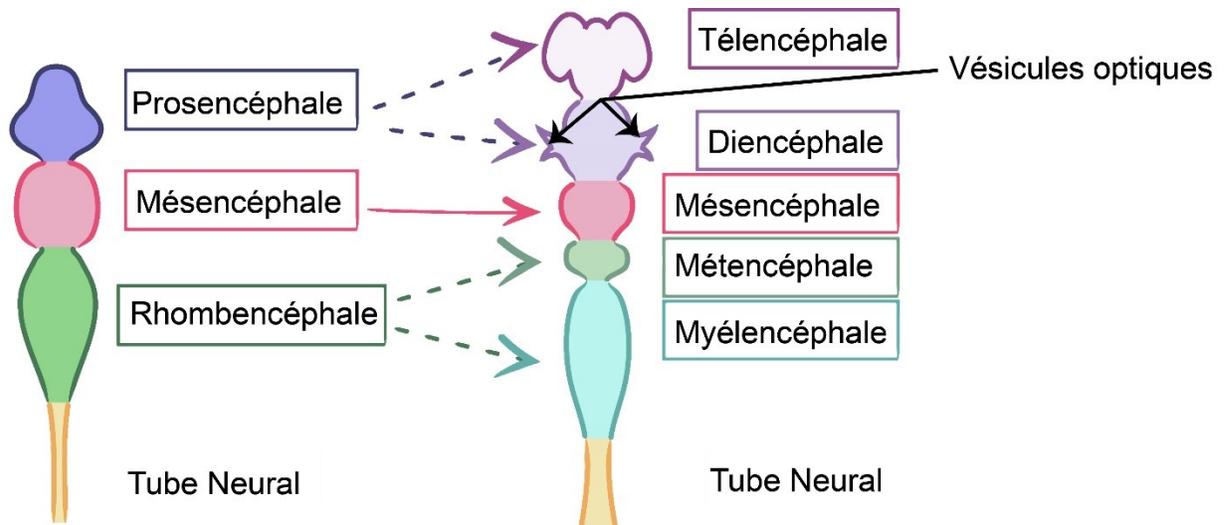


Figure 6. Formation du cerveau

(Adaptée de Draw It to Know It, Brain Vesicle Formation, Medical & Biological Sciences)

### 1.2.2 – Développement de la voie visuelle

Lorsque les CGR se développent, leurs cônes de croissance axonale vont converger pour former la tête du nerf optique. Un gradient de protéoglycane nommé chondroïtine sulfate aide à la différenciation des CGR et dirige la croissance axonale pour former la base de la tête du nerf optique (8). En suivant le signal de la nétrine-1 et des protéines d'adhésion, les fibres vont sortir de la cupule optique. À ce moment, Slit est une protéine présente qui influence la direction du nerf optique vers la base du cerveau pour former le chiasma optique (9). Le chiasma optique est l'endroit où les fibres du nerf optique de chaque œil décussent. Chez les mammifères, seules les CGR du côté ventro-temporal de la rétine ne croissent pas dans le chiasma optique. Les CGR du côté ventro-temporal expriment spécifiquement le récepteur aux éphrines EphB1 sur leurs cônes de croissance. Lorsqu'ils entrent en contact avec le ligand Ephrin-B2 sécrété par les cellules gliales radiales de la ligne médiane du chiasma, un effet chimiorépulsif les redirige pour projeter leurs axones vers le tractus optique ipsilatéral (10). Cela permet le traitement visuel binoculaire dans chaque hémisphère sans avoir besoin de connectivité

interhémisphérique. La majorité des autres fibres décussent au chiasma optique pour atteindre le côté contralatéral du tractus optique. Ce croisement des fibres permet l'innervation de chaque œil dans le côté opposé du corps géniculé latéral (CGL). Chez les primates, les fibres des CGR s'arborisent pour former une organisation laminaire dans le CGL qui est impliquée dans la formation de l'image. D'autres axones vont se séparer du tractus optique pour s'innover sur les noyaux du système accessoire médian terminal et dorsal terminal (11). Suivant le trajet du CGL, les axones des CGR continuent leurs projections sur le tectum qui participent au réflexe optocinétique avec les noyaux du système accessoire (figure 7). Puis, les projections en provenance du CGL s'étendent sur les aires visuelles corticales, où ils forment des cartes rétinotopiques (12).

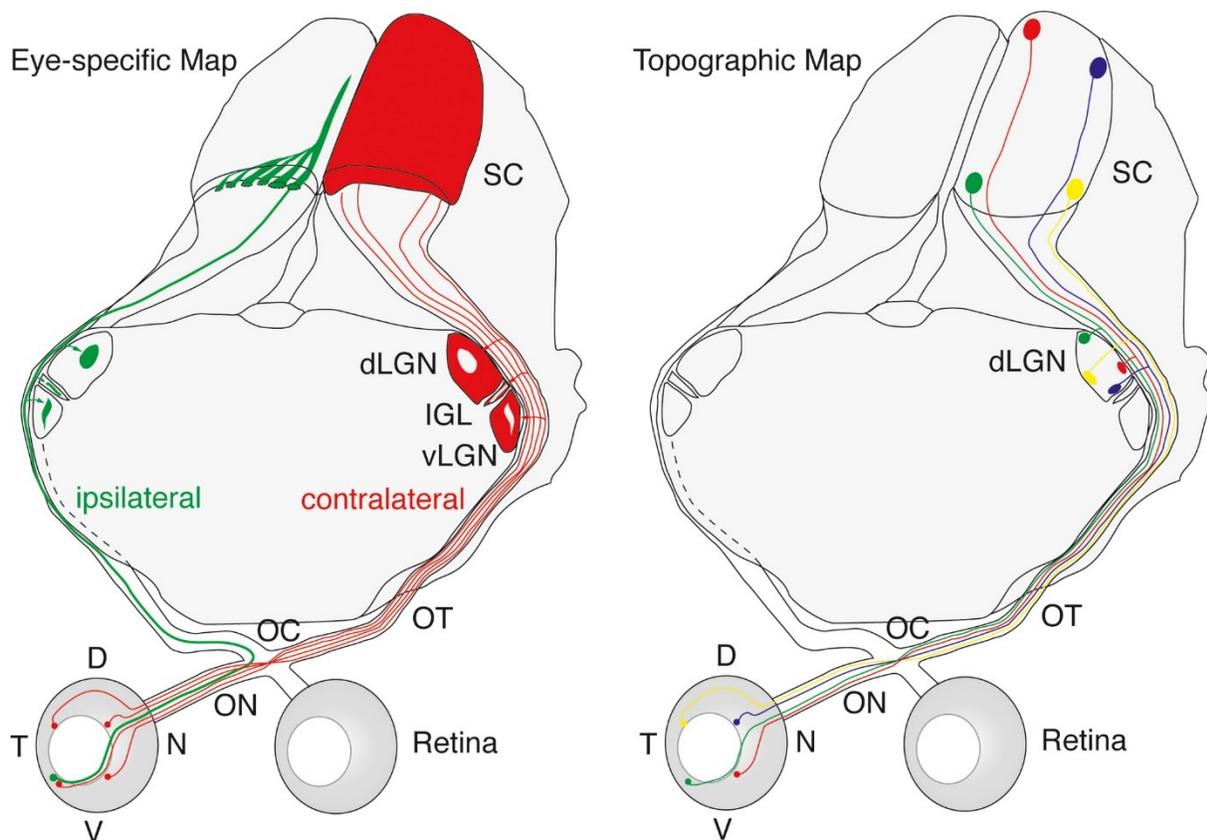


Figure 7. Organisation des projections rétiniennes du système visuel chez la souris

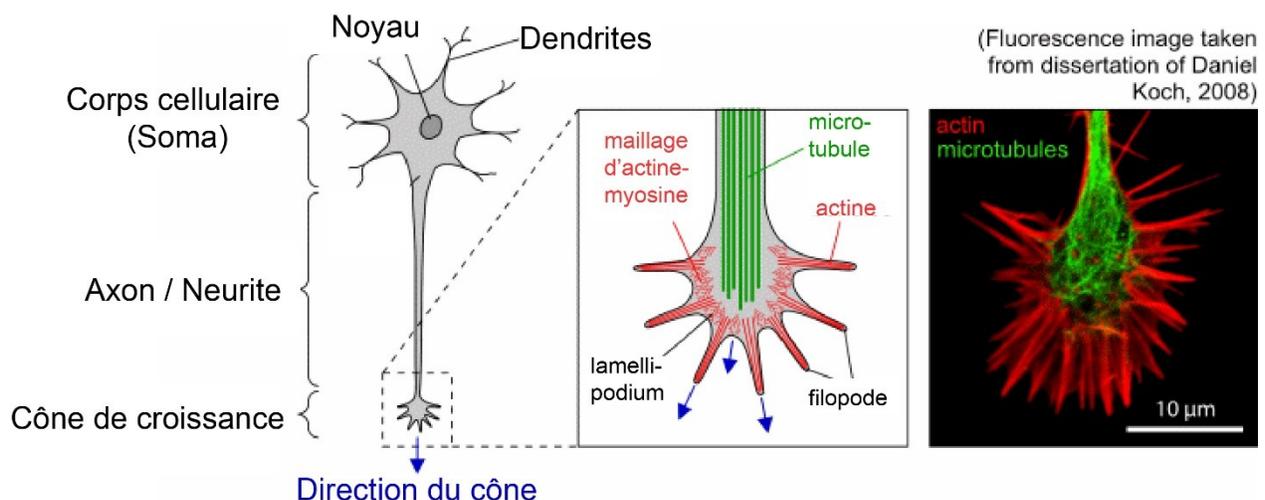
: ON: nerf optique, OC: chiasme optique, OT: tractus optique, vLGN: noyau géniculé latérale ventrale, dLGN: noyau géniculé latérale dorsal, IGL: feuillet intergéniculé; SC: collicule supérieur, D: dorsale, N: nasale, V: ventrale, T: temporale. (Tirée de Assali et coll., 2014)

### 1.2.3 – Développement de la rétine

Dans la rétine en développement, les cellules progénitrices rétiniennes neurales vont proliférer et se différencier en plusieurs types cellulaires dans des périodes temporelles qui se chevauchent. La première vague de neurogénèse est caractérisée par la production de CGR précoces. Puis les cellules amacrines apparaissent, les cellules horizontales, les cônes et plus tardivement arrive les bâtonnets et les cellules bipolaires. Le dernier type cellulaire à faire son apparition correspond aux cellules gliales de Müller. Cette machinerie développementale complexe est régulée par des facteurs de transcription intrinsèques et extrinsèques qui permettent la migration et la ségrégation des différentes couches de la rétine (13).

### 1.2.4 – Le cône de croissance

Pendant le développement, les neurones nouvellement différenciés doivent établir des connexions avec leurs cibles. Pour ce faire, leurs corps cellulaires développent des ramifications appelées neurites. Ces neurites expriment un cône de croissance sur leurs extrémités qui peut prendre différentes formes. Cette extension du neurone formée de microtubules et de filaments d'actine permet la formation des filopodes et des lamellipodes (figure 8). Ces structures dynamiques sont dotées de plusieurs récepteurs membranaires qui vont sentir l'environnement et guider la croissance vers leurs cibles (14, 15).



## Figure 8. Cône de croissance

(Adaptée de la thèse de Steve Pawlizak, 2009.)

Le guidage des cônes de croissance est un processus dynamique qui est influencé par une multitude de sources. En premier lieu, le cône de croissance doit avoir accès à une surface d'adhésion telle que les laminines, qui sont des glycoprotéines hétérotrimériques. Les laminines forment une dense matrice extracellulaire. Cette matrice sert de route pour les futurs axones et dendrites. Elle permet aussi l'activation des cascades signalétiques intracellulaires utilisées lors du guidage axonal. Inversement, d'autres molécules antiadhésives telles que Sema5a et les éphrines peuvent empêcher la croissance du cône. En agissant comme « garde-fou », elles empêchent une croissance anarchique des neurites. De plus, les signaux chimiotropes, agissant comme panneaux routiers, donnent les indications pour les accélérations, ralentissement et virages du cône. Ils incluent une grande variété de molécules telles que des neurotransmetteurs, des facteurs de transcriptions et des facteurs neurotrophiques. Par exemple, les nétrines sont une classe de protéines sécrétées qui vont médier une migration du cône des CGR vers son gradient. Cet effet chimioattractif est possible par la réception des nétrines par les récepteurs transmembranaires DCC (deleted in colorectal carcinoma). Il existe aussi des molécules chimiorépulsives comme Slit et Sema3A (figure 9) (16-18).

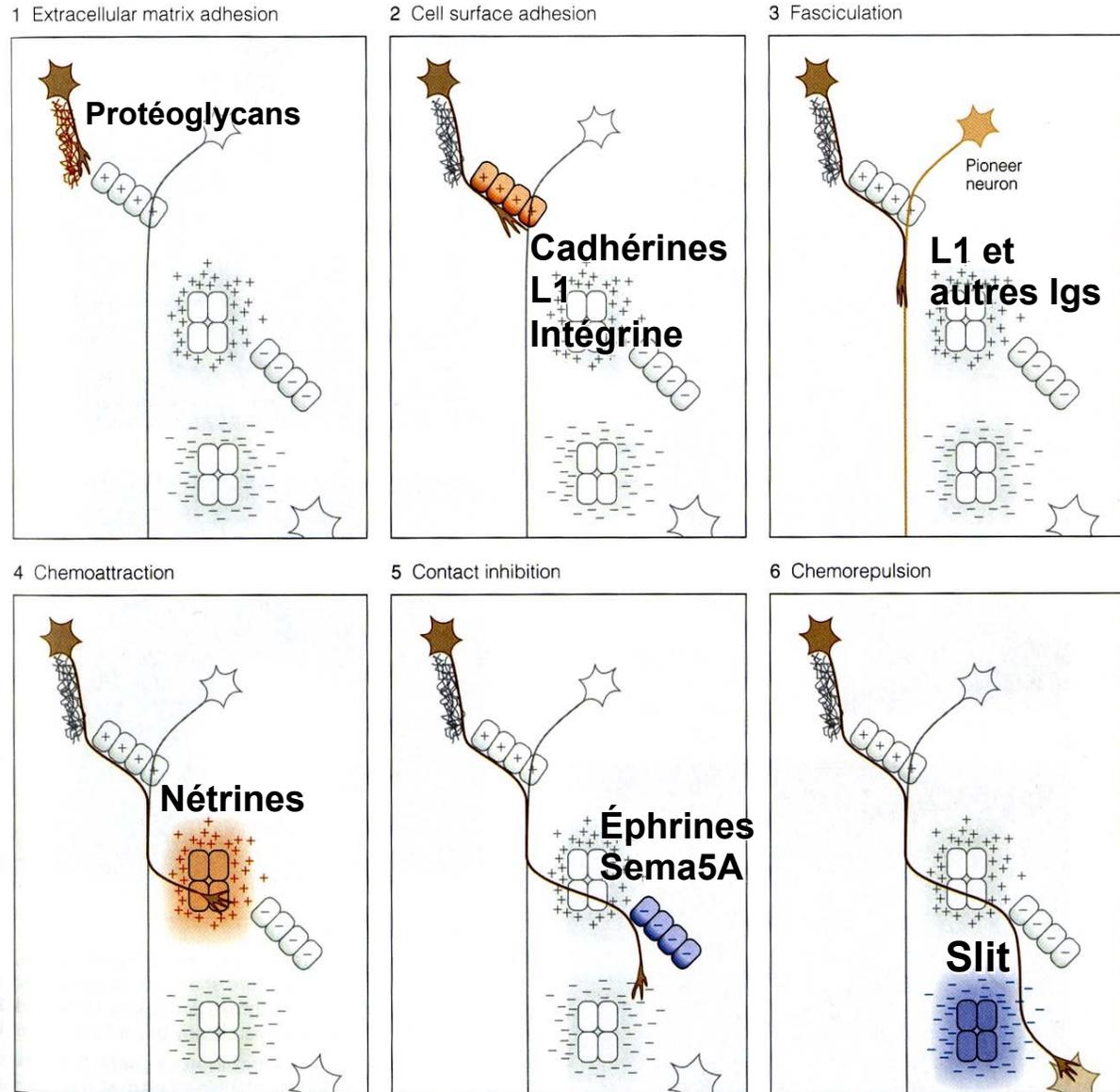


Figure 9. Type de molécule impliqué dans le guidage du cône de croissance

(Adaptée de Kandel ER, Principles of Neural Science, 5th Edition)

Cependant, différents types de neurones expriment différents récepteurs, qui modifient la réponse aux molécules de guidage. À titre d'exemple, ce qui est chemoattractif pour les CGR est répulsif pour les neurones moteurs. Cette variation d'attraction/répulsion pour différent type de neurones est essentielle pour que les bons neurones se connectent aux bonnes cibles (16-18).

Les mécanismes cellulaires impliqués dans le guidage sont complexes et encore étudiés à ce jour. Lorsqu'une molécule extracellulaire se lie à son récepteur transmembranaire, elle change la forme tridimensionnelle du récepteur pour l'activer. Ce changement de conformation provoque une modification intracellulaire de la protéine ce qui enclenche des voies de signalisation dépendant du type de récepteur et du type cellulaire. Dans le cas de la nétrine-1 et le récepteur DCC dans les CGR, l'activation de DCC interagit avec différents médiateurs tels que l'AMPc/PKA, PI3K, PLC $\gamma$ , GTPase Rho et MAPK. Ces voies signalétiques résultent à une réorganisation du cytosquelette du cône de croissance où leurs effets peuvent être visualisés sur les filopodes, les lamellipodes et la croissance axonale (17, 19).

Par le passé, des intermédiaires du cycle de Krebs se sont révélés à être des régulateurs de la croissance axonale. Le succinate et l' $\alpha$ -cétoglutarate activent respectivement les récepteurs GPR91 et GPR99. Ces récepteurs sont impliqués dans la modulation des projections des axones des CGR vers leurs cibles thalamiques. L'activation de ces GPCR augmente la phosphorylation de la voie ERK 1/2 qui est responsable de la croissance (20).

## **1.3 – Lactate**

### **1.3.1 – L'histoire de l'acide lactique**

Au 18<sup>e</sup> siècle, le chimiste suédois Carl Wilhelm Scheele isole l'acide lactique (LaH) à partir de lait fermenté qu'il nomme « Mjölksyra » (21, 22). Des années plus tard en 1807, LaH est découvert aussi dans les muscles d'animaux physiquement épuisés. Ce fut le premier indice qui a permis de croire que LaH est impliqué dans des mécanismes physiologiques. C'est en 1833 que la formule chimique  $C_3H_6O_3$  fut déterminée (23). En revanche, LaH venant des bactéries du lait fermenté avait des caractéristiques optiques différentes de celui retrouvé dans les animaux. Certains microorganismes comme ceux présents dans le lait fermenté produisent le D(-) lactate ou un mélange racémique des deux énantiomères tandis les tissus d'animaux produisent presque exclusivement l'énantiomère L(+) lactate. Par la suite, les origines métaboliques du lactate dans les animaux ont fait l'objet de plus intenses recherches. Des rapports, datant du 19<sup>e</sup> siècle,

montrent que la formation de lactate augmente en même temps que le glycogène est métabolisé. Cette augmentation de la concentration de lactate semble aussi être en corrélation avec la quantité de travail physique faite par l'animal (21).

Le paradigme stipulant qu'une grande quantité de lactate vient avec une faible quantité d'O<sub>2</sub> va faire son apparition après les observations de Louis Pasteur en 1861. Pasteur avait noté que la consommation en grammes de sucre chez les levures était plus grande dans les conditions aérobiques qu'anaérobiques. Une diminution dans la consommation de sucre en présence d'O<sub>2</sub> diminuait aussi le processus de fermentation par la quantité d'alcool produit. Par la suite en 1926, ce même phénomène a été observé dans les muscles squelettiques avec le glycogène et le lactate par Warburg qu'il nomme « l'effet Pasteur ». Le travail de Warburg et de Meyerhof contribue à l'analogie entre la fermentation chez les levures et le catabolisme anaérobique des carbohydrates dans les muscles ce qui renforce les croyances de l'accumulation de lactate en situation hypoxique. Ils réussissent à montrer que le lactate augmente après un exercice musculaire et lorsqu'ils oxygènent ces mêmes muscles, la concentration de lactate diminue. De plus, des problèmes méthodologiques lors de la préparation des échantillons musculaires au début du 20<sup>e</sup> siècle laissent croire que l'hypoxie est nécessaire à l'accumulation du lactate (21, 24).

Warburg s'intéresse aussi au métabolisme tumoral. Il constate que les tumeurs en condition aérobique métabolisent jusqu'à dix fois plus de glucose en lactate que dans les tissus normaux pour une même période de temps. Il postule donc l'hypothèse selon laquelle les cellules cancéreuses n'ont pas besoin d'un milieu riche en O<sub>2</sub> pour proliférer. Ce phénomène est maintenant connu sous le nom de « l'effet Warburg ». Il croit que cette adaptation est due en premier lieu à un dysfonctionnement irréversible de la respiration cellulaire dans les mitochondries. Ensuite, une diminution d'énergie modifie la morphologie des cellules à utiliser la glycolyse comme source énergétique. Le résultat de cette modification amène à une différenciation des cellules normales en cellules cancéreuses et à une prolifération anarchique (21, 24).

Toujours avec cette mentalité, en 1928, Jervell étudie le lactate dans le sang et l'urine dans les conditions physiologiques et pathologiques humaines. Il aborde la notion

« d'hyperlactémie » en condition pathologique lorsque ces conditions interfèrent avec l'oxygénation du corps. Quarante ans plus tard, le concept du « seuil anaérobie » fait son apparition qui est proposée par Wasserman et McIlroy. Leur but est de trouver une méthode non invasive afin de prévenir et détecter les maladies cardiovasculaires. Ils émettent donc cette hypothèse : étant donné que l'exigence en O<sub>2</sub> musculaire serait nettement augmentée par l'exercice, l'incapacité du cœur à transporter correctement l'O<sub>2</sub> entraînerait une acidose lactique (21, 25, 26).

Ce n'est qu'avec le développement des technologies et des techniques analytiques que le paradigme de l'accumulation du lactate en situation hypoxique va être contesté. En 1960, pendant que Wasserman mène ses recherches sur le seuil anaérobie, Stainsby et Welch s'intéressent à la production du lactate en réponse aux différents taux de contraction musculaire. Ils observent que les niveaux de lactate sont transitoires à la suite des contractions musculaires avec un taux d'oxygénation constant. Pendant une période de contraction de 40 à 60 minutes, les concentrations du lactate atteignent un maximum pour retourner aux concentrations initiales suivant les 15-20 premières minutes des contractions. Ils se demandent alors pourquoi ils observent un changement dans les niveaux de lactate même si l'oxygénation et les taux de contractions musculaires sont inchangés. C'est avec la collaboration de Frans Jöbsis, qui a inventé la technique de fluorescence pour la détection de NAD<sup>+</sup>/NADH, qu'ils vont approfondir le sujet. Cette expérience leur permet de confirmer que l'oxygénation est adéquate dans leur échantillon. Dans le cas contraire, en situation hypoxique, la phosphorylation oxydative serait ralentie ce qui diminuerait la réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH de la chaîne de transport des électrons mitochondrial. Ils ont plutôt observé que les muscles au repos contiennent la forme réduite NADH, tandis que la forme oxydée est plus abondante lors des contractions (21, 27, 28).

Par la suite, d'autres expériences vont venir critiquer la relation entre l'hypoxie et la production du lactate. Avec les techniques de mesure de pression d'O<sub>2</sub> intracellulaire (PiO<sub>2</sub>) qui font leurs apparitions. Il est possible de déterminer la quantité requise d'O<sub>2</sub> afin de prévenir l'inhibition des fonctions mitochondriales. Avec cette technique et l'isolation des mitochondries, Connett conclut que le lactate s'accumule bel et bien dans les muscles squelettiques même en présence suffisante d'O<sub>2</sub>. Il évalue la valeur minimale de PiO<sub>2</sub> à

0.5 Torr afin de ne pas affecter la phosphorylation oxydative des mitochondries. Sous cette valeur, il nomme cette condition dysoxie. Cette expérience va être confirmée plus récemment avec l'aide de la spectroscopie à résonance magnétique par Richardson (21, 29).

Encore aujourd'hui, il est possible de retrouver des magazines et des articles qui perpétuent le paradigme vieux de plus de 100 ans de la production du lactate en présence d'une faible quantité d'O<sub>2</sub> et décrivent encore le lactate comme un déchet métabolique. De plus, le lactate est souvent accusé de causer la douleur et la fatigue musculaire ce qui s'est démontré à être faux (21, 30, 31).

Après toutes ces années de controverse sur les origines du lactate, il est maintenant temps de présenter les mécanismes admis de sa production.

### **1.3.2 – Le lactate physiologique**

Il est important de souligner que dans les conditions physiologiques des tissus et du sang, LaH est sous la forme dissocié du lactate et de son proton (H<sup>+</sup>). Ce changement de forme est causé par la valeur de pH. La constante de dissociation (pKa) de LaH est de 3.86 à 20 °C ce qui rend l'anion lactate dissocié du H<sup>+</sup> à plus de 99% au pH sanguin. Dans le sérum sanguin, la concentration de la forme D(-)lactate est estimé entre 0.013 et 0.2 mM tandis que la concentration de la forme L(+)lactate est estimé entre 1.0 au repos et 15.0 mM après un court exercice à l'effort maximal. Le lactate n'est pas seulement créé lors de l'effort physique, il est le produit de la glycolyse qui se déroule constamment dans toutes les cellules de notre corps (21, 32, 33).

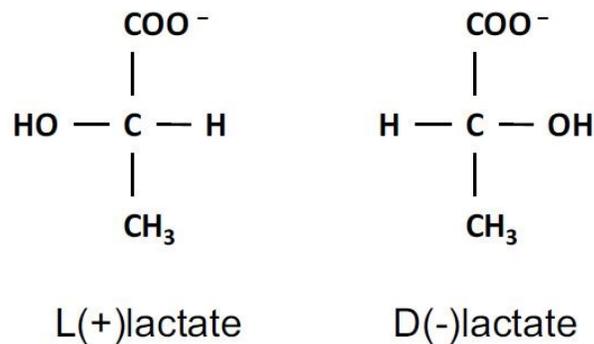


Figure 10. Énantiomère du lactate.

Les mécanismes cellulaires qui sont à l'origine de l'augmentation des concentrations du lactate en corrélation avec l'intensité de l'effort physique ont largement été étudiés dans les dernières années. Ils incluent :

- 1- Une accélération de la glycolyse
- 2- Une diminution de la conversion du lactate en pyruvate
- 3- Une augmentation de l'activité des fibres musculaires à contraction rapide

Dans des conditions de demandes énergétiques élevés, le lactate agit comme intermédiaire du pyruvate afin de désengorger le cycle de Krebs. Il permet aussi de régénérer rapidement le NAD<sup>+</sup> essentiel au fonctionnement de la glycolyse. Une accélération de la glycolyse aura toujours comme résultat une augmentation de la production de lactate à cause de l'équilibre enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH) (34).

### 1.3.3 – Lactate déshydrogénase (LDH)

Cette enzyme se trouve dans toutes les cellules vivantes du règne animal (vertébrés, invertébrés, végétaux, microbes, etc.) démontrant son importance évolutive. LDH est l'enzyme responsable de la conversion réversible du pyruvate et du lactate impliquant la réaction d'oxydo-réduction du NAD<sup>+</sup>/NADH (figure 11) (35).

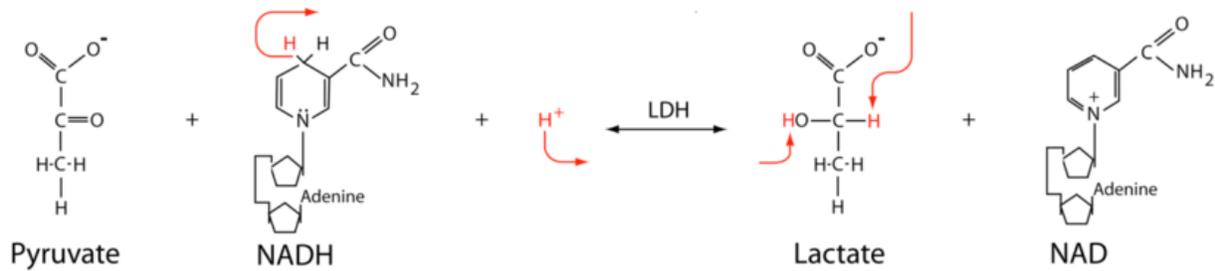


Figure 11. Réaction de la LDH

(Tirée de David Kennedy, 2011)

Contrairement à la croyance populaire, la production de « l'acide lactique » dans les muscles squelettiques provoquerait une acidose. Cette acidose serait à l'origine de la fatigue durant un exercice intense, mais causalité ne veut pas dire corrélation. Maintenant, il est clair que dans la réaction stœchiométrique de la LDH, le lactate agit comme tampon au proton  $H^+$  du NADH plutôt que jouer le rôle de l'acide (figure 11) (36).

Il existe cinq isoenzymes différentes nommées de LDH-1 à LDH-5. Les isoenzymes LDH sont composées de quatre sous-unités nommées tétramères. Les deux sous-unités principales sont LDH-M et LDH-H qui sont encodées par les gènes respectifs LDHA et LDHB. L'arrangement tridimensionnel des deux sous-unités H et M forment les cinq tétramères de LDH-1 à LDH-5 :  $H_4$ ,  $H_3M$ ,  $H_2M_2$ ,  $HM_3$  et  $M_4$ .

Les différentes LDH peuvent être séparées par électrophorèse. La sous-unité H migre plus rapidement que la sous-unité M. Cette caractéristique permet de déterminer la distribution de chaque LDH dans les tissus du corps et d'évaluer leur efficacité enzymatique. La sous-unité M est prédominante dans les tissus glycolytiques tels que les muscles, le foie et la rétine. Contrairement à la sous-unité M, la sous-unité H semble être plus présente dans les tissus oxygénés comme le cœur, le cerveau, etc. (35, 37, 38).

L'isoenzyme LDH-5 ( $M_4$ ) possède la plus grande vitesse catalytique favorisant la formation du lactate et du  $NAD^+$ . On retrouve principalement cette isoenzyme dans les tissus ayant une forte demande énergétique incluant la rétine. Afin de compenser à la

demande grandissante d'ATP, le long processus de la glycolyse caractérisée par la conversion du glucose en pyruvate nécessite du NAD<sup>+</sup>. Le NAD<sup>+</sup> génère du NADH qui est à son tour utilisé par la LDH afin de régénérer le NAD<sup>+</sup>. Ce cycle permet la formation d'ATP sans l'utilisation d'O<sub>2</sub> et permet de maintenir le gradient réactionnel de la glycolyse (figure 12). À son tour, l'isoenzyme LDH-1 qui semble être inhibée par le pyruvate favorise la réaction inverse de conversion du lactate en pyruvate par la même enzyme. Cela permet la translocation du pyruvate vers les mitochondries afin de fournir les métabolites nécessaires à la phosphorylation oxydative dans les tissus comme le cœur (39).

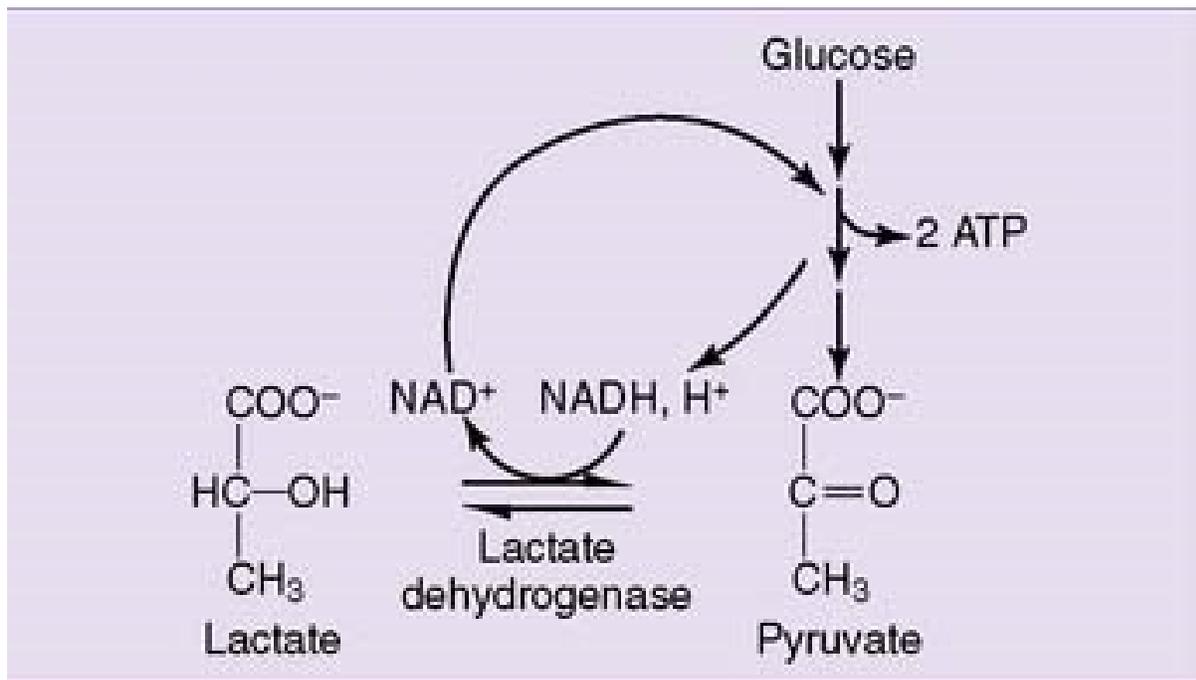


Figure 12. Cycle du NAD<sup>+</sup>/NADH lors de la glycolyse

(Tirée de BasicMedicalKey, Chapitre 21)

Au niveau du cerveau, il existe une relation métabolique importante entre les astrocytes et les neurones. La distribution de LDH-5 est prédominante dans les astrocytes tandis que LDH-1 est exprimé dans les neurones. Les astrocytes sont les principaux utilisateurs du glucose qu'ils peuvent convertir en glycogène ou en lactate selon la demande métabolique. Les neurones utiliseraient préférentiellement le lactate comme source d'énergie. Ce principe est la base de l'hypothèse ANLS (Astrocyte-Neuron Lactate

Shuttle, voir 1.3.5). Un autre élément important qui renforce cette hypothèse est la présence des différents transporteurs du lactate et du pyruvate (21, 39).

### **1.3.4 – Transporteur des Monocarboxylates (MCT)**

Le transport du lactate dans une cellule se fait principalement par diffusion suivant le gradient de concentration. En revanche, il nécessite la présence de transporteur afin de traverser la membrane des mitochondries et les parois cellulaires. Les MCT ou SLC16 sont une grande famille de transporteurs comportant 14 membres agissent comme des portes d'accès vers le corps entier. Il existe quatre principales isoformes de MCT (1-4) connues et caractérisées par leur substrat et inhibiteur chez les mammifères. Les MCT possèdent 12 domaines transmembranaires. Ils permettent le mouvement bidirectionnel des monocarboxylates à travers les barrières cellulaires selon leurs gradients de concentrations. Ces transporteurs permettent principalement la diffusion du lactate accompagné d'un proton. Ils peuvent aussi laisser passer d'autres métabolites comme le pyruvate, les oxoacides à chaîne ramifiée dérivés de la leucine, la valine et l'isoleucine, et les corps cétoniques acétoacétate,  $\beta$ -hydroxybutyrate et acétate (40-43). Une meilleure compréhension des mouvements migratoires du lactate dans la cellule et le corps permet d'apprécier l'importance de cette molécule.

MCT1 est exprimé dans la majorité des tissus. Il est important pour l'importation du lactate par le cœur et les muscles où le lactate peut être utilisé comme source énergétique. Il est aussi exprimé dans les cellules du foie et des reins pour permettre de régénérer le glucose par le processus de néoglucogenèse. La constante d'affinité ( $K_m$ ) est de 3 à 5 mM pour le L-lactate (21).

MCT2 est le transporteur le plus efficace avec un  $K_m$  de 0.1 mM pour le pyruvate et de 0.74 mM pour le L-lactate. Il semble aussi faciliter l'importation du L-lactate dans le foie et les reins. Il est aussi exprimé dans les neurones, plus précisément du côté des fentes postsynaptiques (21, 44).

MCT3 a une constante d'affinité similaire à MCT1. Son expression est limitée à la membrane basale de l'épithélium pigmentaire rétinien et de l'épithélium du plexus de la choroïde (45, 46).

MCT4 est exprimé dans la majorité des tissus liés à l'exportation du lactate tel que muscle squelettique à contraction rapide, les astrocytes, les globules blancs et les chondrocytes avec un  $K_m = 35 \text{ mM}$  (42, 47).

### 1.3.5 – Transport du lactate entre astrocyte et neurone (ANLS)

L'hypothèse neuroénergétique inspirée du transport du lactate entre les astrocytes et les neurones, nommé ANLS, fait son apparition après l'étude du cycle glutamatergique. Elle stipule que les astrocytes répondent à une augmentation de l'activité neuronale en augmentant l'absorption du glucose, ce qui augmente le processus de glycolyse et la libération de lactate dans l'espace extracellulaire. Lorsque les neurones relâchent le glutamate comme neurotransmetteur excitateur, les astrocytes reprennent le glutamate par leur transporteur EAAT. Le glutamate est alors converti par l'enzyme GS en glutamine qui est reprise par les neurones afin de refaire les réserves de glutamate dans les vésicules présynaptiques ce qui complète le cycle glutamate/glutamine. En parallèle, l'importation du glutamate par les astrocytes stimule l'importation du glucose ce qui accélère la glycolyse et la production de lactate. Le lactate serait ensuite utilisé comme substrat métabolique par les neurones pour la production d'ATP (figure 13) (48, 49).

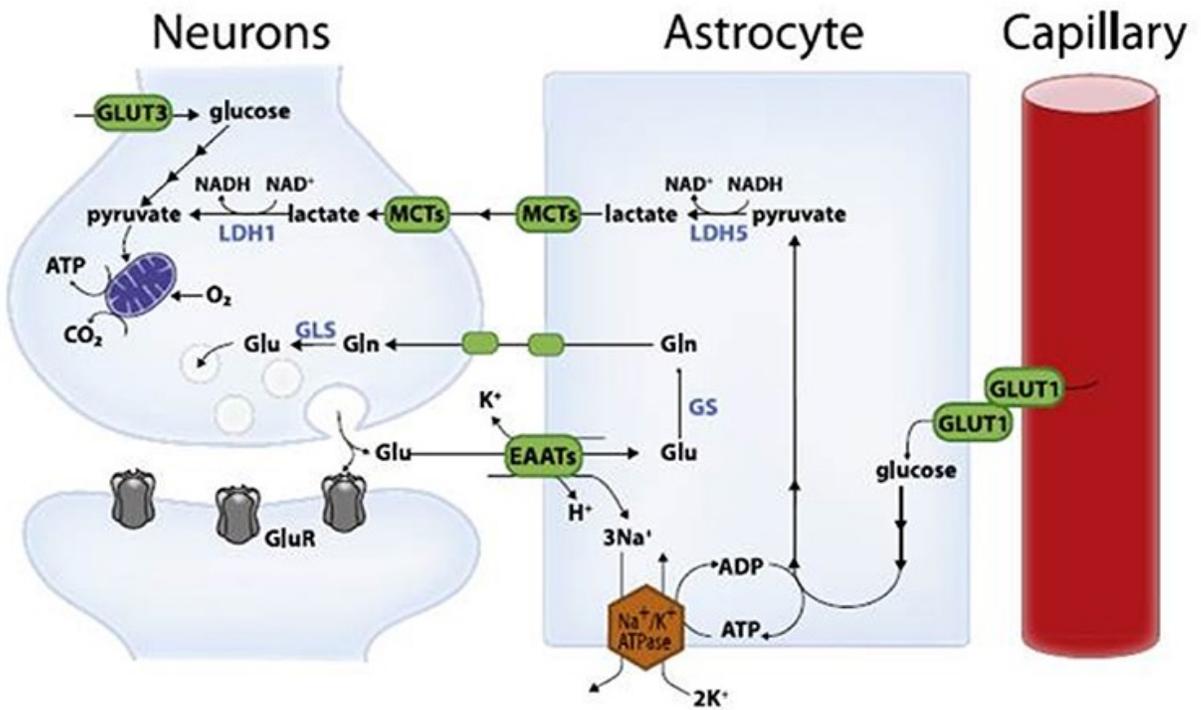


Figure 13. Représentation de l'hypothèse ANLS avec le cycle du glutamate

: Glu, glutamate; Gln, glutamine; GluR, récepteur glutamatergique; EAATs, transporteurs d'acides aminés excitateurs; GLUT, glucose transporteur; MCTs, monocarboxylate transporteurs; LDH, lactate déshydrogénase; GS, glutaminase; GLS, glutamine synthétase. (Tirée de Bélanger et coll.,2011)

Depuis l'apparition de cette hypothèse, d'autres études viennent appuyer son authenticité. La cinétique des différentes isoenzymes de la LDH retrouvées dans les astrocytes (LDH5 : cellules glycolytiques) et les neurones (LDH1 : métabolisme oxydatif) vont de concert avec cette hypothèse. De plus, la localisation des sous-types de MCT associé au transport du lactate prédit un afflux du lactate des astrocytes (MCT 1 et 4) vers les neurones (MCT2). Cependant, cette hypothèse est encore critiquée et une meilleure compréhension entre l'activité neuronale et la demande énergétique de ce système est requise (49, 50).

### **1.3.6 – Récepteur du lactate GPR81/HCAR1**

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont l'une des plus grandes familles de récepteurs exprimés dans l'ensemble du règne animal. Ils sont caractérisés par une structure comportant sept domaines à passage transmembranaire. Ils partagent un mécanisme d'action qui permet de traduire un signal à travers la membrane cellulaire. L'activation de ce type de récepteur par un ligand change la conformation tridimensionnelle afin d'activer la protéine G intracellulaire à laquelle ils sont liés. De cette façon, les cellules peuvent s'adapter aux stimulus extracellulaires en déclenchant une cascade de signalisation, ce qui aura comme résultat de modifier l'activité des canaux ioniques, de certaines enzymes et de réguler l'expression de certains gènes (51).

Dans le cas du GPR81, son ligand physiologique principal est le L-lactate avec un  $EC_{50} = 5 \text{ mM}$ . Le GPR81 est exprimé plus abondamment dans les tissus de la graisse. Chez l'humain, le rat et la souris, on retrouve également son expression dans le foie, les reins, les muscles squelettiques, le cœur, le cerveau, la rétine, etc. (52). Depuis la découverte du GPR81, d'autres agonistes spécifiques ont été développés tel que l'acide 3,5- dihydroxybenzoïque (3,5-DHBA) avec un  $EC_{50} = 150 \text{ }\mu\text{M}$  (53).

Après un effort physique, les concentrations de lactate augmentent dans le plasma afin d'atteindre des concentrations allant de 10 à 20 mM. À cette concentration, le lactate active efficacement le GPR81. Les résultats d'une activation du GPR81 par ses ligands active la protéine Gi/o ce qui inhibe la formation de l'AMPc par l'adénylate cyclase. L'activation de GPR81 dans les adipocytes des tissus adipeux résulte à une inhibition de la lipolyse (53, 54). Dans les muscles squelettiques, l'activation du GPR81 active la phosphorylation de la voie ERK1/2, ce qui a pour effet d'augmenter le diamètre des myotubes. Le lactate pourrait donc contribuer à l'augmentation de la taille des muscles après une activité physique à la suite de la réponse du GPR81 (55).

Dans la rétine, le GPR81 sur les cellules de Müller accélère la vascularisation interne par le relâche de facteur angiogénique tel que Wnt et la Norrin. Ces facteurs angiogéniques sont aussi relâchés à la suite de la phosphorylation de la voie ERK1/2. La voie de ERK1/2 est aussi connue dans la modulation de la croissance axonale (56). De plus, la signalisation Wnt est également importante dans le développement des axones, des dendrites et des synapses. Wnt n'est pas le seul ligand qui intervient dans l'angiogenèse et la croissance neuronale. Les intermédiaires du cycle de Krebs, succinate et  $\alpha$ -cétoglutarate, ont été identifiés pour agir sur la croissance vasculaire et neuronale via l'activation de GPR91 et GPR99 respectivement (20, 57). Cet exemple montre le lien étroit entre le développement des systèmes vasculaire et neuronal. Connaître l'effet angiogénique du GPR81 augmente l'intérêt qui a inspiré cette étude (58).

Au niveau du cerveau, différents types de neurones tels que les neurones préfrontaux corticaux, les neurones pyramidaux de l'hippocampe, les interneurones, les cellules de Purkinje du cervelet ainsi que les astrocytes expriment le GPR81. L'activation du récepteur par les agonistes a diminué de manière réversible la fréquence des évènements spontanées par imagerie calcique (59-62).

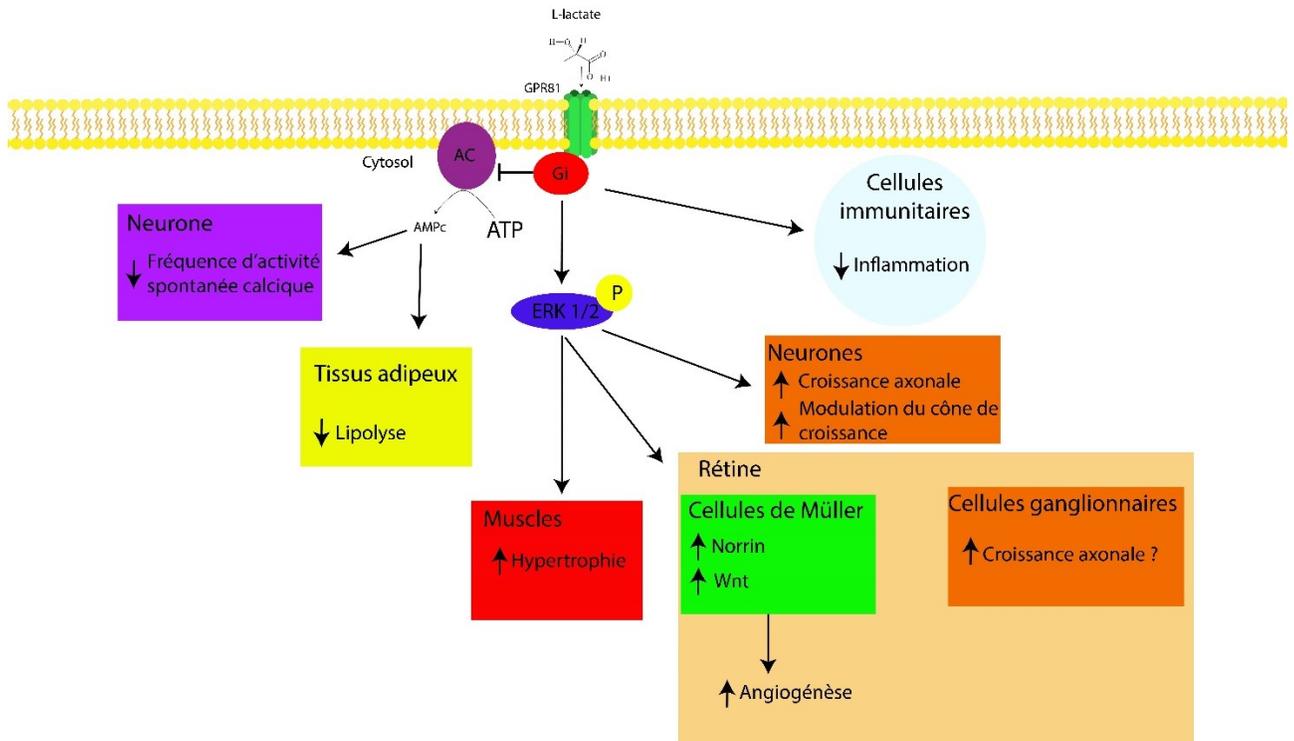


Figure 14. Résumé des effets d'activation du GPR81 dans différents tissus

### 1.3.7 – Développement et lactate

Précédemment, le lactate a attiré l'attention dans le métabolisme du fœtus comme substrat énergétique. Le niveau de lactate sanguin mesuré chez les fœtus est plus élevé que dans le sang maternel. Chez le fœtus, la concentration sanguine est de 7.8 mM tandis que la concentration maternelle se situe à 2.0 mM. Ces taux physiologiques sont suffisants à l'activation du GPR81. De plus, la capacité d'oxydation du lactate dans les tranches *in vitro* de cerveau en fin de gestation et dans les débuts de la période postnatale est plus élevée (environ 4.5  $\mu\text{mol/h}$  par gramme de tissus) que dans les jours suivant la vie l'accouchement (environ 2.5  $\mu\text{mol/h}$  par gramme de tissus) (63-65).

### 1.3.8 – Lactate, blessure et inflammation

Dans le but de régénérer le nerf optique, une meilleure compréhension des mécanismes de l'inflammation est essentielle. Par le passé, le lactate a été le sujet d'étude dans le domaine de l'inflammation et de la tolérance immunitaire. Lorsqu'il y a une blessure, le tissu en guérison produit du lactate qui peut être retrouvé dans le liquide

interstitiel à des concentrations qui peuvent atteindre 5 à 15 mM (66). Cette production de lactate a plusieurs implications. Elle est d'abord une source énergétique pour le système immunitaire inné et adaptatif (67). Cette concentration est aussi suffisante à l'activation du GPR81.

Les monocytes humains sont communément appelés globules blancs. Ils sont les précurseurs des cellules immunitaires incluant les macrophages et les cellules dendritiques. Ils expriment une grande variété de récepteurs utiles à la reconnaissance de composés tel que les lipopolysaccharides (LPS) présents sur les microbes. Lorsque ces récepteurs détectent la présence de microbes dans l'organisme, ils activent les fonctions effectrices des monocytes. Ces fonctions sont initiées par des cascades signalétiques telles que MAPK et PI3K. Dans des conditions où les monocytes sont activés par la présence de LPS et de lactate, la régulation positive des gènes pro-inflammatoires induits par les LDS tel que le TNF (Facteur de nécrose tumorale) est retardé. Une diminution dans la différenciation de monocytes en cellules dendritiques et une forte inhibition de l'activation des cellules T est alors observée (68, 69).

Les cellules dendritiques sont importantes pour leur capacité à présenter des antigènes responsables de l'activation des cellules T immatures provoquant une réponse immunitaire. Le traitement des cellules dendritiques avec du lactate augmente la production d'interleukine anti-inflammatoire IL-10 et diminue la production d'interleukine IL-12 pro-inflammatoire en culture (70).

## **2 – Objectifs de recherche**

L'objectif principal de cette recherche est d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la croissance des axones des CGR au cours du développement. Ces mécanismes permettront potentiellement de développer un traitement de la cécité provoquée par une lésion du nerf optique ou par toutes autres atteintes de la voie rétinotectale. La première étape était d'identifier une molécule ayant un effet potentiel dans la croissance cellulaire. Les effets angiogéniques préétablis du lactate et de son récepteur dans la rétine par le laboratoire

du Dr Chemtob ont inspiré cette recherche (56). Ensuite, afin de déterminer l'implication du lactate et de son récepteur GPR81 dans le développement du système nerveux visuel, la distribution du récepteur dans les différentes couches de la rétine a été évaluée par immunohistochimie. Pour déterminer les effets de l'activation du récepteur, des cultures d'explants de rétine *in vitro* ont reçu des traitements pharmacologiques avec des agonistes du GPR81 à différentes concentrations et temps d'incubation. Les effets ont été observés avec des protocoles d'immunocytochimie et l'utilisation de souris transgénique rendant le récepteur déficient a permis de confirmer ces résultats. À la suite de ces expériences, les conséquences de la délétion du gène codant le récepteur GPR81 chez les souris ont été observées *in vivo*. Le cheminement des axones des CGR vers les noyaux visuels thalamiques a été comparé entre les souris knock-out et les souris de souche sauvage.

## 3 – Article

Article

# Participation of L-lactate and Its Receptor HCAR1/GPR81 in Neurovisual Development

**Abstract:** During the development of the retina and the nervous system, high levels of energy are required by the axons of retinal ganglion cells (RGCs) to grow towards their brain targets. This energy demand leads to an increase of glycolysis and L-lactate concentrations in the retina. L-lactate is known to be the endogenous ligand of the GPR81 receptor. However, the role of L-lactate and its receptor in the development of the nervous system has not been studied in depth. In the present study, we used immunohistochemistry to show that GPR81 is localized in different retinal layers during development, but is predominantly expressed in the RGC of the adult rodent. Treatment of retinal explants with L-lactate or the exogenous GPR81 agonist 3,5-DHBA altered RGC growth cone (GC) morphology (increasing in size and number of filopodia) and promoted RGC axon growth. These GPR81-mediated modifications of GC morphology and axon growth were mediated by protein kinases A and C, but were absent in explants from *gpr81*<sup>-/-</sup> transgenic mice. Living *gpr81*<sup>-/-</sup> mice showed a decrease in ipsilateral projections of RGCs to the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN). In conclusion, present results suggest that L-lactate and its receptor GPR81 play an important role in the development of the visual nervous system.

**Keywords:** lactate 1; GPR81 2; HCAR1 3; retinal ganglion cells 4; growth cone 5; dLGN 6; retina 7; axon 8; 3,5-DHBA 9

---

### 3.1 – Introduction

The physiological significance of lactic acid and its conjugate base lactate have been a major source of controversy since their discovery in biological tissues. Lactic acid was long considered to be simply the waste product of anaerobic glycolysis. Mainly occurring as the L-enantiomer in physiological conditions, lactate is now known to have multiple effects on cell homeostasis, serving as a metabolic fuel and buffering agent, while also acting as a signaling molecule, also known as “Lactormone”. This signaling action is obtained via the hydroxycarboxylic acid receptor 1 (HCAR1) [1,2]. Also known as GPR81, this is a G-protein-coupled receptor activated by L-lactate and the exogenous agonist 3,5-dihydroxybenzoic acid (3,5-DHBA) [3]. GPR81 is expressed in diverse organs, including adipose tissues, skeletal muscle, liver, kidney, brain, and retina [4,5].

The retina and central nervous system have an inherently high energy demand due to the continuous depolarization of neuronal membranes [6]. During the development of the visual system, the axons of the retinal ganglion cells (RGCs) that form the optic nerves follow chemotropic molecules to grow toward and across the optic chiasma [7]. In mammals, most of the axons cross at the optic chiasm to reach the contralateral side of the optic tract while only axons from RGCs on the ventro-temporal side of the retina do not cross at the

optic chiasm. Vento-temporal RGCs specifically express the ephrin receptor (EphB1) on their GC. When the GCs come into contact with the Ephrin-B2 ligand secreted by radial glial cells in the midline of the optic chiasm, a chemorepulsive effect redirects them and the axons project to the ipsilateral optic tract [8]. Following the optic tract, some of RGC axons join the dorso-lateral geniculate nucleus (dLGN) in the thalamus, making synapses with dLGN neurons. These neurons project their axons to the layer 4 of the primary visual cortex [9].

The consequent high metabolic demand for ATP production is met by glycolysis, resulting in L-lactate generation, despite a rich endowment of mitochondria for aerobic respiration. ATP generation by oxidative phosphorylation is limited and high energy demand leads to an increase of glycolysis filling the ATP equilibrium [2,10]. It has been previously reported that the lactate dehydrogenase (LDH-1) subunit, which preferentially catalyzes the conversion of L-lactate to pyruvate, is found in neurons and astrocytes [11,12]. However, LDH-5, which is more highly expressed in astrocytes, preferentially favors the conversion of pyruvate back to L-lactate [11]; LDH-5 is also present in glycolytic tissues such as skeletal muscles [13,14]. This cell-type distribution of LDH subunits indicates a close link with characteristic features of L-lactate metabolism, which has implications for neuronal development, growth, and survival [6,11].

GPR81 has been reported to mediate effects of L-lactate in diverse processes, including wound healing, angiogenesis, neuroprotection, cancer cell survival, attenuation of inflammation, and antipolytic effects [5,15–20]. Recent studies have revealed the presence of GPR81 in Müller cells and retinal ganglion cells (RGCs) [21]. Its activation in these cells regulates angiogenic Wnt ligands and Norrin, which together participate in intra-retinal vascularization. Receptors specific for other metabolic intermediates have also been shown to govern angiogenesis and neuronal growth in the visual system. Thus, receptors for the Krebs cycle intermediates succinate (GPR91) and  $\alpha$ -ketoglutarate (GPR99) control vascular and axonal growth [22,23]. Hence, there is a close link between metabolism and cell signaling in regulating the development of vascular and neuronal systems. However, the role of L-lactate and its cell membrane target GPR81 during the development of the central nervous system (CNS) is yet to be explored. In this study, we built upon established findings in the CNS to investigate the role of GPR81 during development of the visual system. More specifically, we investigated the effects of L-lactate/GPR81 on axonal growth guidance in the developing mouse neuro-visual system.

## 3.2 – Materials and Methods

### 3.2.1 – Ethics Statement and Animals

All animal procedures were performed in accordance with the Animal Care Committee of the University of Montreal following the guidelines from the Canadian Council on Animal Care. The *gpr81*<sup>-/-</sup> mice were purchased from Lexicon Pharmaceuticals (The Woodlands, TX, USA). These mice were developed by the insertion of a 4-kb IRES-lacZ-neo cassette in the transmembrane domain 2 coding region (100 base pairs) of the *gpr81* gene on C57BL/6J mice [20], with control studies in C57BL/6J WT control mice. Other experiments were undertaken in golden Syrian hamsters (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada). All animals were maintained in an environmentally controlled room held at 21 ± 2 °C, and with 12 h dark/light cycle. Mice and hamsters of both sexes were used in this study. Food and water were provided ad libitum.

### 3.2.2 – Genotypic Screening

Mice were genotyped by PCR using the amputated tail tip for DNA extraction. Tail samples were immersed in 50 mM NaOH, incubated for 20 min at 95 °C, vortexed, and neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 8.0. The samples were then revortexed and centrifuged for eight minutes at 13,000 rpm in a Fisher Scientific™ accuSpin™ Micro R centrifuge. The supernatant was taken for DNA amplification and added to the PCR reagent mix containing PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix, Taq DNA polymerase, forward and reverse primers. PCR cycle conditions were: 5 min at 95.0 °C, 30 cycles of three steps (1 min at 50.0 °C, 1 min at 72.0 °C and 1 min at 95.0 °C). Genotype of the *Gpr81*<sup>-/-</sup> mice was confirmed using specific primers for wild-type (WT), with normal mouse DNA as a control. The primer pairs w (forward: 5'-CATCTTGTCTGCTCGGTCA-3' and reverse: 5'-GAGGAAGTAGAGCCTAGCCA-3') were used to amplify a 160 bp fragment present in the *gpr81*<sup>+/+</sup> genome but absent in the *gpr81*<sup>-/-</sup> mice.

### 3.2.3 – Reagents

L-(+)-lactic acid, bovine serum albumin (BSA), ciliary neurotrophic factor (CNTF), DNase, forskolin, insulin, laminin, poly-D-lysine, progesterone, selenium, putrescine, gelatin from porcine skin, chromium(III) potassium sulfate dodecahydrate, sucrose, sodium chloride (NaCl), PCR reagent mix, potassium chloride (KCl), hydrochloric acid (HCl), disodium hydrogen phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), *gpr81* primers, mouse anti-Brn-3a (MAB1585), rabbit anti-GPR81-S296 (SAB1300790), mouse anti-MAP2 (M9942), transferrin, trypsin, and triiodothyronine were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). B27, N2, fetal bovine serum (FBS), neurobasal medium (NB), penicillin-streptomycin, Minimum Essential Medium Eagle medium, Spinner Modification (S-MEM), and sodium pyruvate were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). The standard goat serum, Peroxidase-AffiniPure Donkey anti-rabbit IgG, and Peroxidase-AffiniPure Donkey anti-mouse IgG were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). N-acetyl cysteine (NAC) was acquired from EMD technologies (Saint-Eustache, QC, Canada). 3,5-DHBA was purchased from Tocris (Oakville, ON, Canada). Cholera toxin subunit B (CTb) recombinant conjugate with Alexa Fluor 555 (C34776) and 647 (C34778), GlutaMAX™ Supplement, green Neg-50 Frozen section medium, Hank's 1X Balanced Salt Solutions (HBSS), Tween 20, Triton X-100, paraformaldehyde (PFA), sucrose, TEMED, sodium hydroxide (NaOH), Tris base, Taq DNA Polymerase, Shandon Immuno-Mount, AlexaFluor donkey anti-mouse 488, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), AlexaFluor goat anti-rabbit 546, Alexa Fluor 546 goat anti-mouse, and Alexa Fluor 546 phalloidin were obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Rabbit anti-PKA C-α (#4782), rabbit anti-Phospho-PKA C (Thr197) (#4781), rabbit anti-PKCα (#2056), and rabbit anti-Phospho-PKC (pan) (βII Ser660) (#9371) were acquired from Cell Signalling Technology (Whitby, ON, Canada). Heparin and sterile saline solution (0.9%) were purchased from CDMV (St-Hyacinthe, QC, Canada).

### 3.2.4 – Tissue Preparation for Immunohistochemistry

Adult mice and postnatal day 5 (P5) golden Syrian hamsters were euthanized by an isoflurane overdose. A transcardial perfusion was conducted with 10 U/mL of heparin in 60 mL of phosphate-buffered 0.9% saline (PBS; 0.1 M, 4 °C, pH 7.4), followed by 60 mL phosphate-buffered 4% paraformaldehyde 4 °C (PFA). Following the harvesting of mouse embryos E14-16 extraction by Cesarean, they were deeply anesthetized by

hypothermia. The orbits were removed and two small holes were made in the cornea prior to immersion fixation in 4% PFA 4 °C for 60 min. The eyecups were washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in Neg 50 medium, flash-frozen, and kept at -80 °C until processing. Sections 14 µm-thick were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Exton, PA) and mounted on slides coated with gelatin/chromium (double-frosted microscope slides, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada).

### **3.2.5 – Immunohistochemistry**

Frozen sections were thawed, washed three times for five minutes each time in 10 mM PBS with 0.05% Tween 20(PBST), and then blocked in 1% BSA, gelatin, and 0.5% Triton X-100 in PBS for one hour. The sections were then co-incubated overnight with rabbit anti-GPR81 and mouse anti-Brn3a (a specific marker for RGCs). The next morning, sections were washed three times for five each time minutes in PBST and incubated for one h with secondary antibodies: AlexaFluor donkey anti-mouse 488 and AlexaFluor goat anti-rabbit 546. After three washes in PBST, the sections were slide mounted with Shandon Immu-Mount.

### **3.2.6 – L-Lactate solution**

Daily fresh solution of 100 mM L-lactate was made using 0.1 g of L-(+)-lactic acid (MW = 90.08 g/mol) dissolved in 10 mL of NB (vehicle). The pH was adjusted to  $7.4 \pm 0.1$  with NaOH, the volume reached 11 mL with NB, and the solution was filtered with Corning™ PES 0.20 µm pore Syringe Filters (09-754-29). The prepared L-lactate solution was equilibrated for at least one h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator before use in experiments in vitro.

### **3.2.7 – Retinal Explant Culture**

The retina were isolated from E14-E16 mouse embryos, dissected into small segments in HBSS, and plated on 12 mm diameter glass coverslips previously coated with poly-D-Lysine (20 µg/mL) and laminin (5 µg/mL) placed in 24-well plates. The explants were cultured in NB medium supplemented with 100 U/mL penicillin/streptomycin, 5 µg/mL NAC, 1% B27, 40 ng/mL selenium, 16 µg/mL putrescine, 0.04 ng/mL triiodothyronine, 100 µg/mL transferrin, 60 ng/mL progesterone, 100 µg/mL BSA, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine (glutaMAX™), 10 ng/mL CNTF, 5 µg/mL insulin, and 10 µM forskolin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. At 0 DIV, starting 1 h following plating, the explants were treated for 15 h for projection analysis or for 1 h at one day in vitro (DIV) for the growth cone morphology analysis. Photomicrographs were taken with a Olympus IX71 microscope (Olympus, Markham, ON, Canada) and the axonal projection and growth cone measurement analysis were made using ImageJ software. These analyses were performed by operators blind to the experimental condition.

### **3.2.8 – Growth Cone Behavior Assay**

Similarly, embryonic retinal explants were cultured in Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass with a borosilicate glass bottom (Lab-Tek; Rochester, NY, USA). After one or two DIV, explants were transferred to an incubator (Live cell chamber) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, mounted on an inverted Olympus IX71 microscope (Olympus, Markham, ON, Canada). A micropipette was positioned at a 45° angle about 100 µm from the growth cone of interest, as previously described [24–26]. A micro-injector (Harvard Apparatus, St-Laurent, QC, Canada) was used to deliver NB vehicle or L-lactate 20 mM (pH 7.4) at a rate of 0.1 µL/min of in the NB. Measurements

were performed with ImageJ software at baseline and after 60 min of these treatments.

### **3.2.9 – Primary Neuron Culture**

Primary cortical neurons were used in this study because of the ease in culturing and harvesting sufficient numbers for biochemical assays, which is technically difficult for RGCs. C57BL/6J WT pregnant mice were used to obtain E14-16 embryo brains. The superior layer of each cerebral cortex was isolated and transferred to 2 mL S-MEM containing 2.5% trypsin and 2 mg/mL DNase and incubated at 37 °C for 15 min. After trituration, the pellet was transferred to 10 mL S-MEM with 10% FBS and stored at 4 °C. The pellet was again transferred in 2 mL S-MEM supplemented with 10% FBS and triturated three or four times. The supernatant was transferred to 10 mL NB medium. Dissociated neurons were counted under a microscope and plated at a density of 100,000 cells per well on 12 mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (20 µg/mL) for immunocytochemistry, or at 250,000 cells per 35 mm Petri dish for western blot analysis. Neurons were cultured for two-four days in NB medium supplemented with 1% B-27, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 0.25% N2, and 0.5 mM of glutaMAX™. They were then treated with the GPR81 agonist L-lactate for 1 h to study acute effects on growth cone morphology, or for various other intervals for identifying the activation of signaling pathways by western blot analysis.

### **3.2.10 – Immunocytochemistry**

After treatment, retinal explants and primary cortical neuron cultures were washed with PBS (pH 7.4), fixed in 4% PFA (pH 7.4), and blocked with 2% normal goat serum (NGS) and 2% BSA in PBS containing 0.1% Tween 20 (pH 7.4) for 30 min at room temperature. The samples were then incubated overnight at 4 °C in a blocking solution containing anti-GPR81, anti-MAP2. The following day, the samples were washed and labeled with Alexa Fluor 488 and 546 secondary antibodies against the host species of the primary antibodies, Hoechst 33258, or AlexaFluor Phalloidin 546. The coverslips were mounted with Shandon Immu-Mount and photomicrographs were taken with an Olympus IX71 microscope (Olympus, Markham, ON, Canada) for quantitative analysis on ImageJ software.

### **3.2.11 – Western Blot Analysis**

Following L-lactate treatment at various time points, the primary cortical neurons were washed with cold 4 °C PBS (pH 7.4) and then lysed with 125 µL of laemmli sample buffer pre-warmed to 100 °C. The samples were then frozen at -20 °C until the day of Western blot analysis. On that day, the samples were thawed at 4 °C, placed in a 100 °C dry bath for 10 minutes, quickly vortexed and then centrifuged at 13,000 rpm at 4 °C. Twenty microliter samples were then resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel along with the trihalo compound from TGX Stain-Free Technology (Bio Rad, Mississauga, ON, Canada). During the electrophoresis, the trihalo compound covalently modifies tryptophan residues in the proteins to impart a fluorescence signal. Visualization of this signal was obtained by UV excitation in a Chemidoc imaging system (Bio-Rad). After this activation, gels were transferred onto a PVDF membrane with a TransBlot Turbo (Bio-Rad), and blots were imaged on the Chemidoc to reveal the total protein transferred on the membrane, which was used for later normalization of antibody signals to total protein. The blots were then blocked with 2% BSA in TBST (Tris 10 mM and NaCl 150 mM saline with 0.1% Tween 20) for 1 h and incubated overnight with antibodies against Phospho-PKA, PKA, Phospho-PKC, and PKC. They were then

exposed to the species-appropriate HRP-coupled secondary antibodies for two h in blocking buffer, and detected using the Chemidoc with Clarity Max ECL substrate from Bio-Rad. The target protein expressions were then analyzed on the Image Lab v.6.0.1 software. All procedures were completed according to Bio-Rad protocols [27].

### 3.2.12 – Eye Specific Segregation

In this in vivo experiment, *gpr81*<sup>+/+</sup> and *gpr81*<sup>-/-</sup> adult mice under anesthesia received an intraocular injection of 2  $\mu$ L of 1% (mg/mL) CTb in 0.9% sterile saline conjugated to AlexaFluor 555 into the left vitreous humor eye, and with CTb conjugated to AlexaFluor 647 into the right vitreous humor eye. Four days after the injections, the animals were anesthetized and perfused transcardially, as described in the tissue preparation section above. The brains were removed, post-fixed in PFA 4% overnight, and then cryoprotected by immersion in gradient sucrose solutions of 10%, 20%, and 30% until the brains sank, followed by storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Coronal sections 40  $\mu$ m thick were cut on glass slides in a cryostat, air-dried, and mounted with Shandon Immu-Mount. Fluorescent images of entire brain sections were taken using 561 and 640 nm laser emissions and a 4 $\times$  objective on an Fluoview FV3000 Olympus Confocal microscope to identify the three sections containing the largest ipsilateral projection. The dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) was scanned in these sections with a 20 $\times$  objective and 2 $\times$  amplification (total magnification of 40 $\times$ ). Z-stacks of 19 images with both lasers were taken from top to bottom of the signal emissions. The colocalization of both channels with a multi-threshold analysis was performed on CellSens Dimension software. The percentage of ipsilateral signal overlapping with the contralateral signal was measured for each stack. The mean for the 19 stacks in each section was reported for each threshold, and differences evaluated by two-way ANOVA with Tukey post hoc testing [28,29].

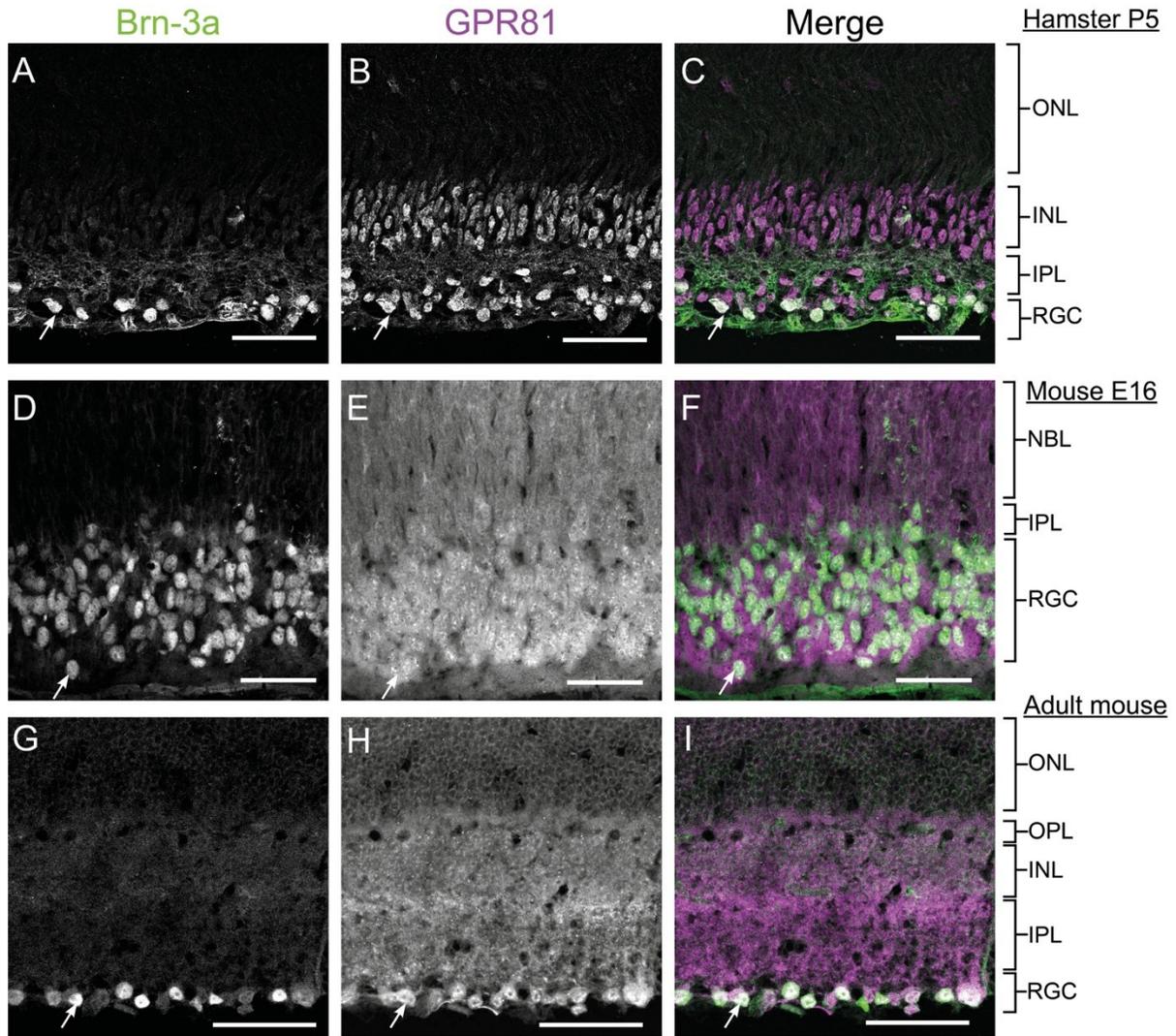
### 3.2.13 – Statistical Analysis

Data were imported in GraphPad Prism 8 software. Tests for normal distribution were performed by an Anderson–Darling test ( $\alpha = 0.05$ ). Depending on parametric or nonparametric distribution, the appropriate statistical analysis was computed. Values were reported as the mean  $\pm$  SEM.

## 3.3. Results

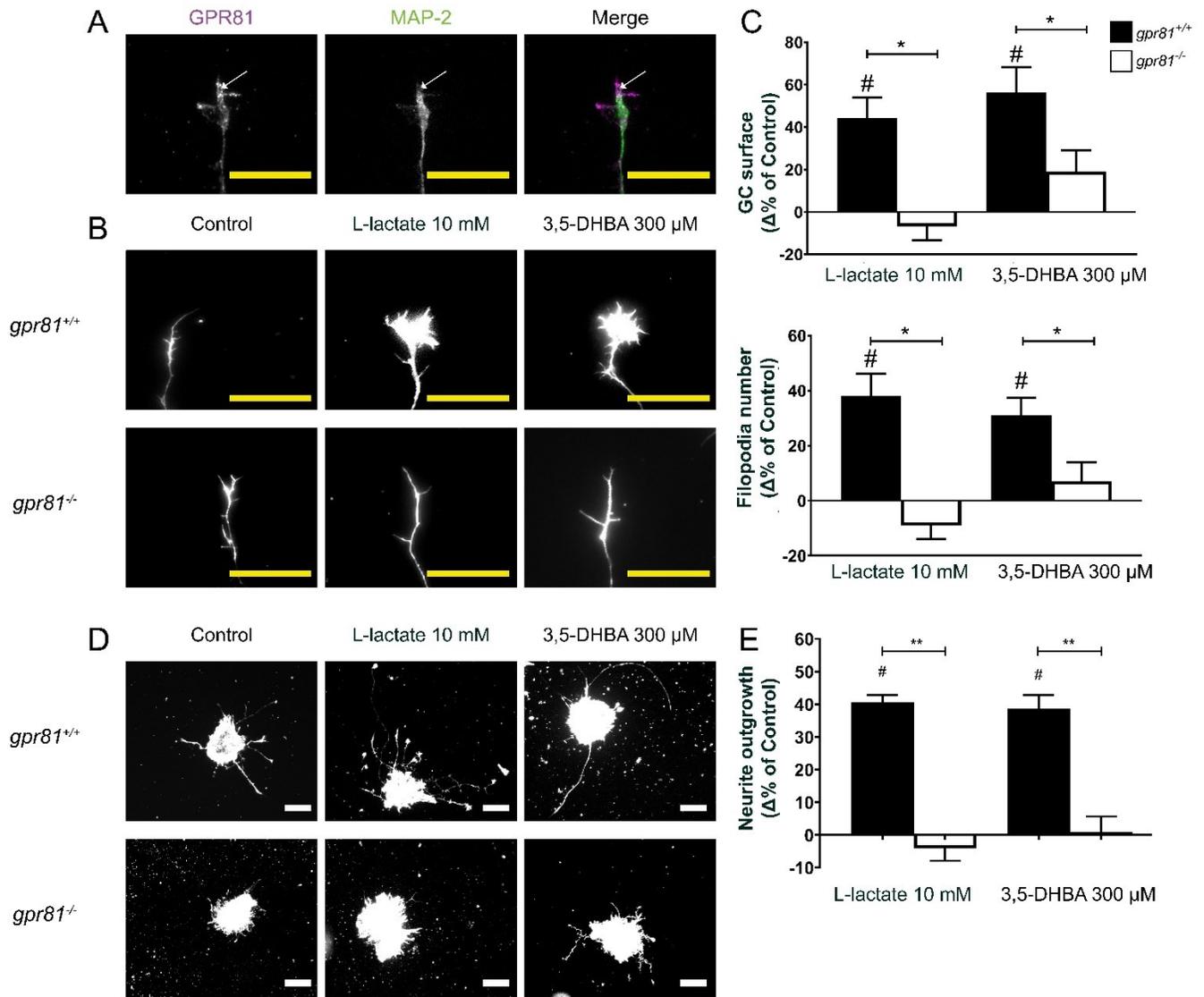
### 3.3.1 – GPR81 is Expressed in the Retina

We used rabbit anti-GPR81-S296 (SAB1300790) immunohistochemistry to identify the retinal laminar distribution of GPR81. Results in retina from P5 Syrian gold hamster pups, E16 mouse embryos, and adult mice all showed retinal GPR81 expression. GPR81 protein immunoreactivity was consistently detected in the Outer Nuclear Layer (ONL), Inner Nuclear Layer (INL), Inner Plexiform Layer (IPL), RGCs, and the RGC fiber layer of hamsters (Figure 1A–C). GPR81 immunoreactivity was detected in all layers of the embryonic and adult mouse retina (Figure 1D–I). The colocalization of GPR81 with the specific RGC marker Brn-3a showed that GPR81 is predominantly expressed in RGCs and in the RGC fiber layer. From this result, we inferred possible involvement of GPR81 in retinal development and in projection navigation towards brain innervation targets.



**Figure 1.** GPR81 is Expressed in the Retina. Expression of GPR81 in RGCs of retinal sections from P5 hamster pups (A–C) E16 WT mouse embryo (D–F), and adult mouse (G–I). ONL: outer nuclear layer, RGC: retinal ganglion cells, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, NBL: neuroblast layer, IPL: inner plexiform layer. The white arrows indicate colocalization of GPR81 and Brn-3a. Scale bars: 50  $\mu$ m.

Primary cortical neurons and retinal explant cultures in vitro also expressed the lactate receptor; GPR81 fluorescence signal was visualized on the neuronal soma, neurites, GC, and filopodia (Figure 2A, Figure S1).



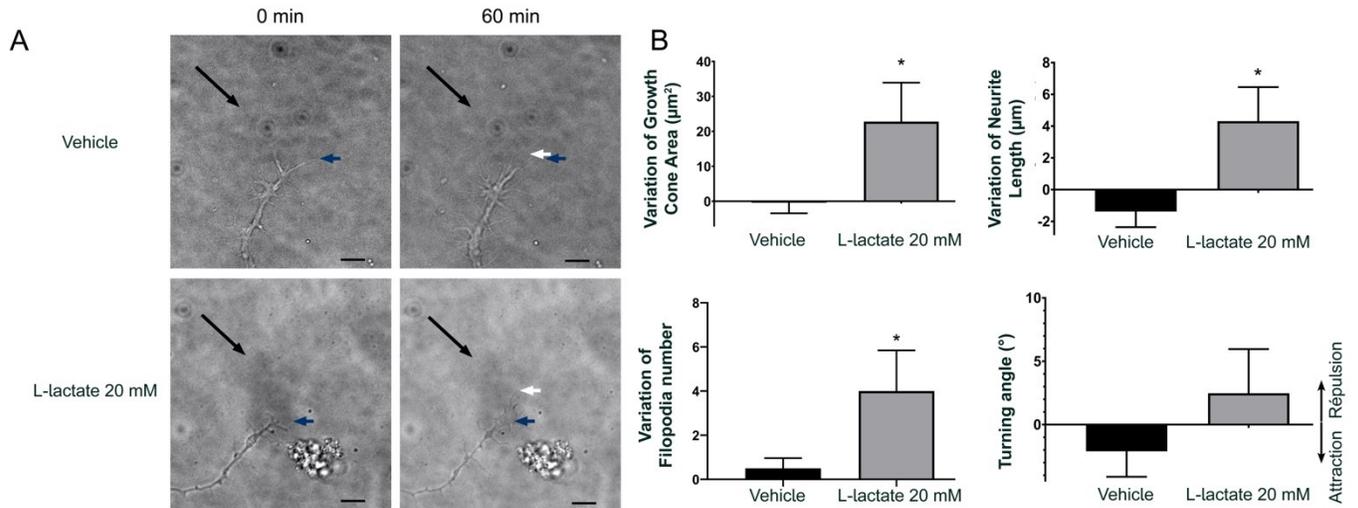
**Figure 2.** L-lactate and 3,5-DHBA influence GC dynamics and increase axon growth via GPR81 agonism. (A) GPR81 is expressed in GCs in vitro. (B) Microscopic photography of GCs following 1 h treatment with GPR81 agonists. Explants were marked with phalloidin conjugated with Alexa fluor 546. (C) Analysis of GC surface area and filopodia number ( $n = 48\text{--}147$  GCs per condition). Values are presented as the means  $\pm$  SEM. (D) Microscopic photography of retinal explants following 15 h treatment with the GPR81 agonists. Explants were marked with phalloidin conjugated with Alexa fluor 546. (E) Analysis of RGC axon projections ( $n = 278\text{--}2572$  axons per condition). Values are presented as the means  $\pm$  SEM. # Indicates significant changes compared to the control group. \* Indicates significant changes  $p < 0.05$  between *gpr81*<sup>+/+</sup> and *gpr81*<sup>-/-</sup> genotype. \*\* Indicates significant changes  $p < 0.01$  between *gpr81*<sup>+/+</sup> and *gpr81*<sup>-/-</sup> genotype. Statistical test used is the Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA. White scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . Yellow scale bar 25  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 – GPR81 Influences GC Morphology and Axon Growth

A number of GPCRs exert effects on axon guidance [22,24–26,30,31]. To determine the implication of GPR81 in regulating GC morphology, we cultivated embryonic retinal explants during 1 DIV. Afterwards, treatment for one h with the GPR81 agonist L-lactate (10 mM) significantly increased the RGC GC surface area by  $44.2 \pm 9.6\%$ , whereas 3,5-DHBA (300  $\mu\text{M}$ ) increased

surface area by  $56.1 \pm 12.0\%$  compared to the vehicle control. These same treatments increased filopodia numbers of GC by  $38.1 \pm 8.1\%$  and  $31.0 \pm 6.5\%$ , respectively on retinal explants obtained from *gpr81<sup>+/+</sup>* mice. The corresponding changes induced by GPR81 agonists were abrogated in similar retinal explants obtained from *gpr81<sup>-/-</sup>* mouse embryos (Figure 2B–C).

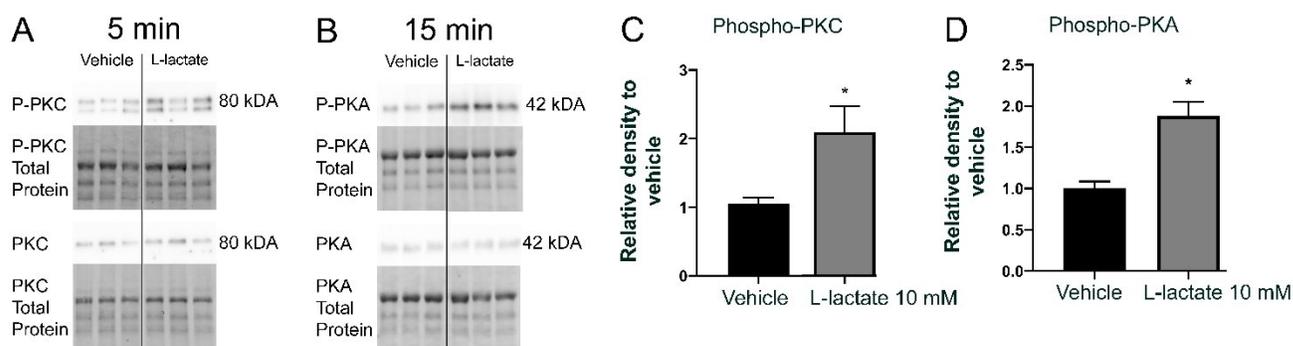
We next measured the effect of GPR81 agonists on axon growth of RGCs on retinal explants. Interestingly, RGCs from *gpr81<sup>+/+</sup>* mice incubated with GPR81 agonists for 15 h increased axon outgrowth by  $40.7 \pm 2.2\%$  (10 mM L-lactate) and  $38.7 \pm 4.2\%$  (300  $\mu\text{M}$  3,5-DHBA) (Figure 2D–E). As expected, RGCs obtained from *gpr81<sup>-/-</sup>* mice did not respond to the agonist treatment ( $-4.2 \pm 3.7\%$  and  $4.8 \pm 5.0\%$ , respectively) (Figure 2D–E). This impact of L-lactate on GC morphology and axon growth was confirmed with time-lapse live cell imaging in the GC behavior assay. Here, we exposed a GC of a retinal explant to a microgradient of L-lactate concentration to visualize any axon growth or guidance effects. In this experiment, we measured the GC surface area, filopodia numbers, axon length, and the angle between the GC and the micropipette at baseline (T0) and at 60 min of drug exposure (T60). The time-dependent differences were obtained by subtraction. At 60 min, the vehicle-treated explants (NB medium) showed negligible changes in the GC ( $-0.42 \pm 3.03 \mu\text{m}^2$  area),  $0.5 \pm 0.5$  filopodia, and  $-1.39 \pm 2.78 \mu\text{m}$  axon growth; in contrast, L-lactate-treated explants displayed mean increases of  $22.8 \pm 11.1 \mu\text{m}^2$  GC area,  $4.0 \pm 1.8$  in number of filopodia, and  $4.31 \pm 2.14 \mu\text{m}$  in axon growth. However, we did not observe any significant changes in the angle of orientation after the addition of lactate ( $-2.1 \pm 2.0^\circ$  for NB medium versus  $2.5 \pm 3.5^\circ$  for 20 mM L-lactate gradient; Figure 3).



**Figure 3.** L-lactate influences GC morphology and axon growth, but not turning. **(A)** Time-lapse microscopy time of a DIV1-2 mouse RGC growth cone before and at 60 min after the addition of L-lactate. The black arrows indicate the microgradient direction created by a micropipette with a tip of 2  $\mu\text{m}$  diameter and positioned at a  $45^\circ$  angle and around 100  $\mu\text{m}$  distal to the growth cone. The blue arrows indicate the tips of the growth cone before the application of L-lactate or vehicle (T0). The white arrows indicate the position of the growth cone 60 min later (T60). **(B)** Analysis of growth cone dynamics. The values of the growth cone area, filopodia number on the growth cone, axon length, and the angle of the growth within the L-lactate microgradient were measured before (T0) and at 60 min (T60) after the addition of L-lactate or vehicle. Bar graphs show the means  $\pm$  SEM of the effects induced by the treatments ( $n = 6-8$  cells per condition). \* Indicates significant changes compared to the vehicle group, compared by parametric unpaired t-test ( $p < 0.05$ ). Scale bar = 15  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 – Lactate Increases PKC and PKA Phosphorylation

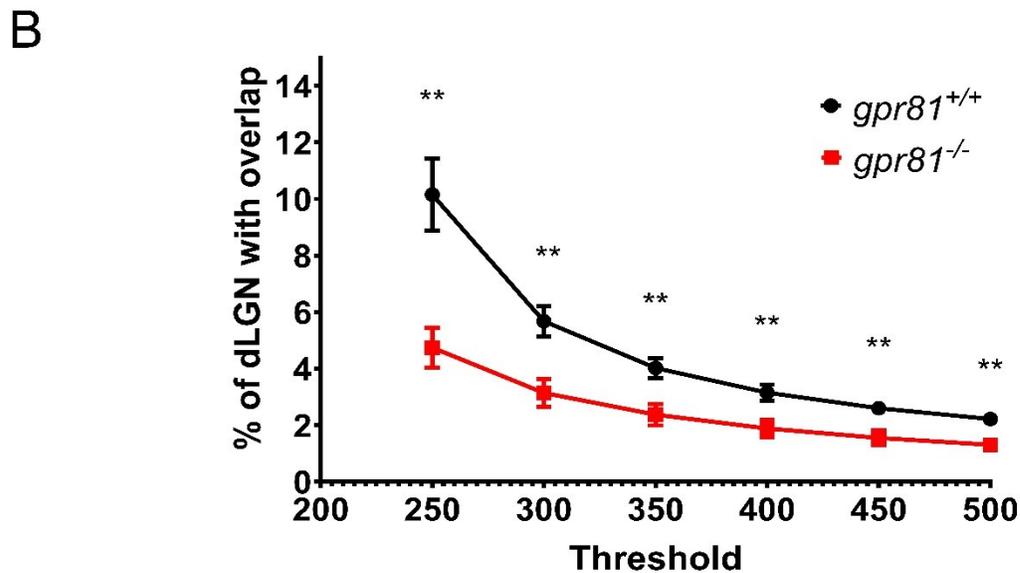
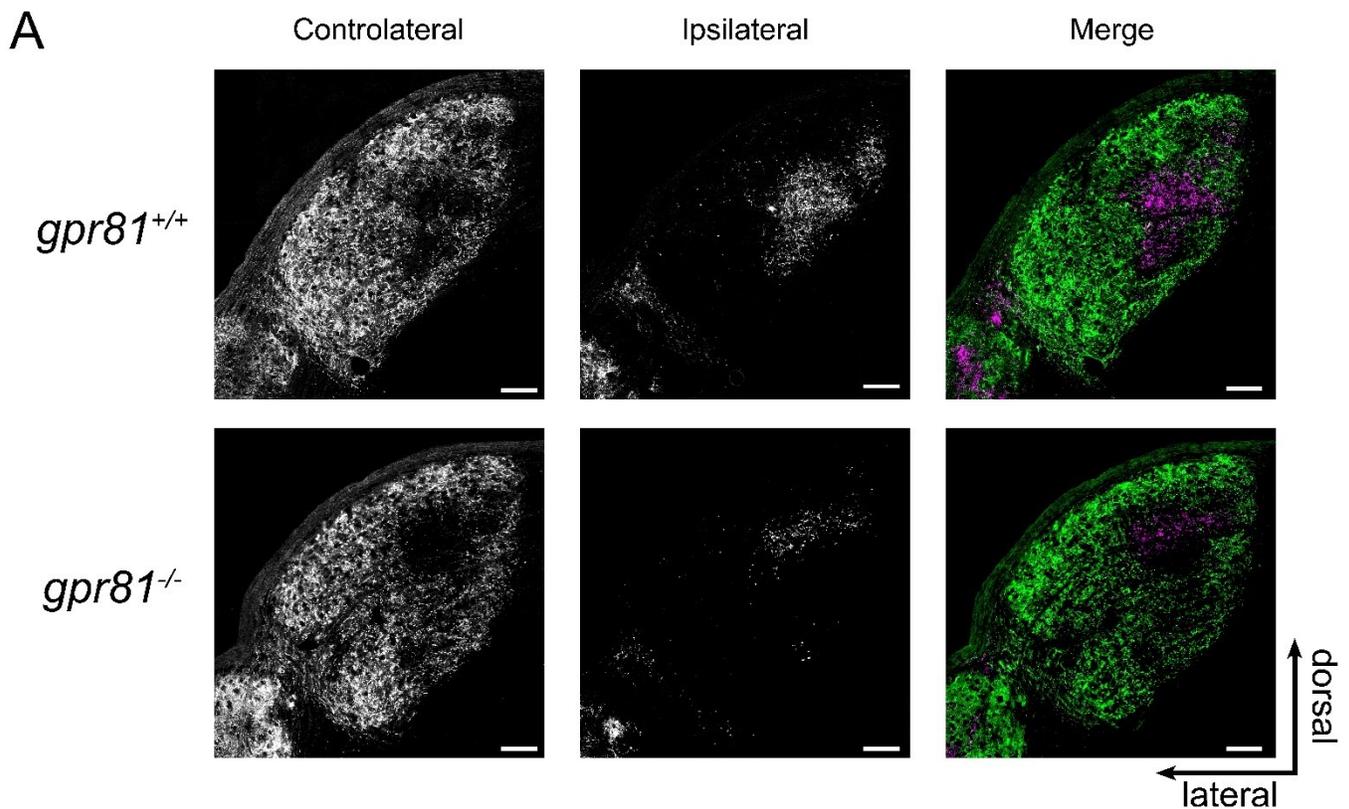
GPR81 is coupled to  $G_i$ , such that agonism induces  $Ca^{2+}$  release in CHO-K1 adipocytes, resulting in decreased lipolysis [32]. To determine the signaling pathway resulting in GPR81 activation, we treated primary neurons obtained from mouse embryos with a GPR81 agonist (10 mM L-lactate). Interestingly, there was an increase of PKC phosphorylation ( $2.1 \pm 0.4$  fold) after five minutes and an increase of PKA phosphorylation ( $1.9 \pm 0.2$  fold) at 15 min after the addition of 10 mM L-lactate (Figure 4A). These data show that GPR81 agonism stimulates the PKC and the PKA signaling pathways in primary neurons.



**Figure 4.** L-lactate increases PKC and PKA phosphorylation (A-B) Protein expression levels of P-PKC, PKC, P-PKA, PKA, and total proteins in primary neuron cultures incubated with L-lactate (10 mM) at 37 °C for five min (for PKC) and 15 min (for PKA). The total protein Western blots confirmed equal loading in all lanes with TGX Stain-Free Technology. (C-D) Values are presented as the means  $\pm$  SEM. \* Indicates significant changes compared to the control group, as compared by the nonparametric ANOVA Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ) with Dunn's post hoc correction.

### 3.3.4 – GPR81 Affects Retinothalamic Projections In Vivo

We next studied the contribution of GPR81 to the development of retinothalamic projections in living transgenic *gpr81*<sup>-/-</sup> mice. Left and right RGC projections were visualized with the neuron tracer CTb conjugated to Alexa fluorescent molecules. RGC projections normally segregate through various brain structures to join dLGN [33]. Interestingly, adult *gpr81*<sup>-/-</sup> mice had significantly fewer ipsilateral projections in the dLGN, irrespective of the intensity threshold used for the analysis (Figure 5). This observation demonstrates, for the first time, an essential role of GPR81 in the normal development of the rodent retinothalamic pathway.



**Figure 5.** GPR81 Affects Retinothalamic Projections in vivo. **(A)** Micrographs of the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) following the injection of CTb-Alexa 555 in the left eye and CTb-Alexa 647 in the right eye of *gpr81*<sup>+/+</sup> and *gpr81*<sup>-/-</sup> mice. Controlateral and ipsilateral projections from both eyes RGC segregate in the dLGN. RGC projections from both eyes are shown in the merged images. **(B)** Line graph shows the percentage of ipsilateral projections overlapping in the controlateral projections expressed as the mean  $\pm$  SEM. Percentage of overlapping signals is significantly lower in *gpr81*<sup>-/-</sup> mice irrespective of the intensity analysis threshold. \*\* Indicates significant changes between *gpr81*<sup>+/+</sup> ( $n = 18$ ) and *gpr81*<sup>-/-</sup> ( $n = 12$ ) genotypes, according to two-way ANOVA with Tukey post hoc test ( $p < 0.01$ ). Scale bars: 100  $\mu$ m.

## 3.4 – Discussion

Lactic acid and L-lactate have drawn considerable attention since the early days of metabolic research. Indeed, the indisputable importance of lactate in the glycolytic pathway may have led to persisting misconceptions about the bodily functions of L-lactate [1]. The introduction of the astrocyte-neuron Lactate shuttle hypothesis (ANLSH) [34] led to a more mature understanding of the importance of L-lactate metabolism in the CNS. According to this model, glucose is predominantly taken up by astrocytes during neuronal activation. The astrocytes produce and release L-lactate, which serves as the primary metabolic fuel for activated neurons [35]. Furthermore, glucose consumption by the outer retina forms L-lactate by aerobic glycolysis [36,37], in metabolic support of RGCs. The recent discovery of receptors for metabolic intermediates has brought new physiologic perspectives on the relevance of L-lactate concentrations in tissue. We undertook in this study to explore the localization and neural functions of GPR81 in the developing retina and its CNS projections. We show for the first time expression of the lactate receptor GPR81 in the retina of hamsters and mice, noting its high abundance in the RGC layer and in the RGC nerve fiber layer. This result was confirmed by studies *in vitro* using retinal explants and cortical neurons of embryonic mice, which both proved to express GPR81 on their soma, axons, GCs, and GC filopodia. We demonstrated that specific activation of the GPR81 receptor by its agonists modulates GC size, filopodia numbers, and axon growth of RGCs. *In vitro*, treatment with L-lactate at a physiological concentration increased phosphorylation of PKC and PKA, which are key mediators of the pathways that likely promote neurite growth effects [38]. Importantly, genetic absence of GPR81 curtailed formation of RGC projections to the dLGN, as evident in the *gpr81<sup>-/-</sup>* mouse *in vivo*. Altogether, these results suggest an essential involvement of L-lactate and its receptor GPR81 in the development of RGCs and their axon projections in the CNS.

Previous findings for GPR81 impart an extra layer of complexity with regard to its involvement in CNS development, especially for retinal projections. The colocalization of GPR81 with glutamine synthetase, a specific marker of Müller cells, was previously established in early postnatal mice (P8-17). GPR81 activation in Müller cells regulates Norrin and Wnt ligands, which in turn promote angiogenesis and produce stimulate production of neuroprotective growth factors in the retina [21]. In our present embryonic model (E15), Müller cells have not yet been differentiated in the developing retina. Accordingly, the mechanism responsible for axon growth at this development stage likely differs from the retinal angiogenic effects produced by Müller cells in postnatal rodents [39].

L-Lactate was long considered to be a metabolic waste of anaerobic glycolysis, but it is now known to be a metabolic fuel of aerobic glycolysis, especially in neurons [1,2]. In this capacity, L-lactate is converted by LDH to pyruvate, which then enters into the Krebs cycle for ATP generation in mitochondria [40]. In order to confirm that the present findings of L-lactate effect are not due trivially to an increase in the energy metabolite pool, we used 3,5-DHBA as a non-metabolized specific GPR81 agonist [3]. Activation of GPR81 by L-lactate and 3,5-DHBA of RGCs in retinal explants from embryonic mice positively modulated GC morphology and increased axon projection length. Interestingly, these effects of GPR81 agonist treatment were absent in explants from *gpr81<sup>-/-</sup>* mice. These findings support our claim that L-lactate and 3,5-DHBA act on RGCs through GPR81 agonism.

RGCs in the intact organism project their axons from retina to transmit visual information to CNS targets. GCs must detect and respond to a complex combination of chemotactic signals to direct their axons through the visual pathway. Our time-lapse microscopy experiments confirmed that L-lactate

concentration gradients modify GC morphology and increase axon growth without having a significant effect on axon guidance *per se*. However, L-lactate was without effect in explants from retinal mice genetically depleted of GPR81, thus suggesting a crucial role for GPR81 in the retinothalamic pathway formation.

We show in this study that L-lactate activates PKC and PKA through agonism at GPR81, as was reported previously. Indeed, PKC activation is well-known to participate in synaptic remodeling, presynaptic plasticity, and neuronal repair [41,42]. Some PKC isoforms are known to influence neurite adhesion and outgrowth in various neuronal cell types, including RGCs [43-44]. Activation of these second messenger pathways results in a reorganization of the growth cone cytoskeleton, which manifest to microscopic examination of the filopodia, lamellipodia, and axonal growth *in vitro* [45-47]. Our present results are thus also in accordance with studies showing that PKA activation increases GC area and filopodia numbers to promote RGC axon extension during development [48].

In conclusion, as demonstrated in this study for the first time, the GPR81 L-lactate receptors contribute critically to neuro-visual development in the rodent retina and CNS. This study thus provides a foundation for the ongoing investigation of these actors in broader aspects of central and peripheral nervous system development. Present results support the formulation of new hypotheses for elaborating effective therapies targeting the development and regeneration of the nervous system. In fact, our results suggest a possible therapeutic role of L-lactate and other GPR81 agonists in the neuroregenerative and neuroreparative field. First of all, L-lactate can act by itself as an efficient energy substrate [49]. It can also protect and attenuate neuronal death induces by oxygen and glucose deprivation following cerebral ischemia [50,51]. In traumatic brain injury model, preconditioning with L-lactate promotes plasticity-related expression helping to reduce neurological deficits effect via the GPR81 signaling pathway [52]. In accordance with our findings, the utilization of L-lactate or a GPR81 agonist could stimulate axon regeneration and prevent neuronal degeneration.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: GPR81 is expressed in DIV2 E15 cortical neuron.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.L., A.S., and J.-F.B.; methodology, S.L., A.S., H.C., and J.-F.B.; software S.L. and P.G.; validation, A.S. and J.-F.B.; formal analysis, S.L.; investigation, S.L. and J.-F.B.; resources, J.-F.B. and S.C.; writing—original draft preparation, Samuel Laroche; writing—review and editing, S.L., S.C., H.C., and J.-F. B.; supervision, J.-F.B.; project administration, J.-F.B.; funding acquisition, J.-F.B. and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, RGPIN-2020-05739 and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, PJT-156029) grants to Jean-François Bouchard

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Institutional Review Board of Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux ((CDEA) (20-052) date of approval: May 2020).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Acknowledgments:** We thank the Sylvain Chemtob laboratory members Xiaojuan Yang, Xin Hou, Sonja L'Espérance, and Christiane Quiniou for their precious help to acquire *gpr81*<sup>-/-</sup> mice. We thank Bruno Cécycy for his technical support and Paul Cumming for critical reading of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## 3.5 – References

1. Ferguson, B.S.; Rogatzki, M.J.; Goodwin, M.L.; Kane, D.A.; Rightmire, Z.; Gladden, L.B. Lactate metabolism: Historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2018**, *118*, 691–728, doi:10.1007/s00421-017-3795-6.
2. Sun, S.; Li, H.; Chen, J.; Qian, Q. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology* **2017**, *32*, 453–463, doi:10.1152/physiol.00016.2017.
3. Liu, C.; Kuei, C.; Zhu, J.; Yu, J.; Zhang, L.; Shih, A.; Mirzadegan, T.; Shelton, J.; Sutton, S.; Connelly, M.A.; et al. 3,5-Dihydroxybenzoic Acid, a Specific Agonist for Hydroxycarboxylic Acid 1, Inhibits Lipolysis in Adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *341*, 794, doi:10.1124/jpet.112.192799.
4. Madaan, A.; Chaudhari, P.; Nadeau-Vallee, M.; Hamel, D.; Zhu, T.; Mitchell, G.; Samuels, M.; Pundir, S.; Dabouz, R.; Howe Cheng, C.W.; et al. Muller Cell-Localized G-Protein-Coupled Receptor 81 (Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1) Regulates Inner Retinal Vasculature via Norrin/Wnt Pathways. (1525-2191 (Electronic)). *Am. J. Pathol.* **2019**, *189*, 1878–1896.
5. Liu, C.; Wu, J.; Zhu, J.; Kuei, C.; Yu, J.; Shelton, J.; Sutton, S.W.; Li, X.; Yun, S.J.; Mirzadegan, T.; et al. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2811–2822.
6. Wong-Riley, M.T.T. Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain* **2010**, *2*, 99–116, doi:10.2147/EB.S9078.
7. Plump, A.S.; Erskine, L.; Sabatier, C.; Brose, K.; Epstein, C.J.; Goodman, C.S.; Mason, C.A.; Tessier-Lavigne, M. Slit1 and Slit2 Cooperate to Prevent Premature Midline Crossing of Retinal Axons in the Mouse Visual System. *Neuron* **2002**, *33*, 219–232, doi:10.1016/S0896-6273(01)00586-4.
8. Nakagawa, S.; Brennan, C.; Johnson, K.G.; Shewan, D.; Harris, W.A.; Holt, C.E. Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron* **2000**, *25*, 599–610, doi:10.1016/s0896-6273(00)81063-6.
9. Reese, B.E. Development of the retina and optic pathway. *Vis. Res.* **2011**, *51*, 613–632, doi:10.1016/j.visres.2010.07.010.
10. Rogatzki, M.J.; Ferguson, B.S.; Goodwin, M.L.; Gladden, L.B. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 22–22, doi:10.3389/fnins.2015.00022.
11. Bittar, P.G.; Charnay, Y.; Pellerin, L.; Bouras, C.; Magistretti, P.J. Selective Distribution of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Neurons and Astrocytes of Human Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1996**, *16*, 1079–1089, doi:10.1097/00004647-199611000-00001.
12. Friede, R.L.; Fleming, L.M. A mapping of the distribution of lactic dehydrogenase in the brain of the rhesus monkey. *Am. J. Anat.* **1963**, *113*, 215–234, doi:10.1002/aja.1001130203.
13. Karlsson, J.; Frith, K.; Sjödin, B.; Gollnick, P.D.; Saltin, B. Distribution of LDH Isozymes in Human Skeletal Muscle. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **1974**, *33*, 307–312, doi:10.1080/00365517409082500.
14. Sjödin, B.; Thorstensson, A.; Frith, K.; Karlsson, J. Effect of Physical Training on LDH Activity and LDH Isozyme Pattern in Human Skeletal Muscle. *Acta Physiol. Scand.* **1976**, *97*, 150–157, doi:10.1111/j.1748-1716.1976.tb10247.x.
15. Porporato, P.E.; Payen, V.L.; De Saedeleer, C.J.; Pr eat, V.; Thissen, J.-P.; Feron, O.; Sonveaux, P. Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. *Angiogenesis* **2012**, *15*, 581–592, doi:10.1007/s10456-012-9282-0.
16. Schurr, A.; Payne, R.S.; Miller, J.J.; Tseng, M.T.; Rigor, B.M. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia. *Brain Res.* **2001**, *895*, 268–272, doi:10.1016/S0006-8993(01)02082-0.
17. Shen, Z.; Jiang, L.; Yuan, Y.; Deng, T.; Zheng, Y.-R.; Zhao, Y.-Y.; Li, W.-L.; Wu, J.-Y.; Gao, J.-Q.; Hu, W.-W.; et al. Inhibition of G Protein-Coupled Receptor 81 (GPR81) Protects Against Ischemic Brain Injury. *CNS Neurosci. Ther.* **2015**, *21*, 271–279, doi:10.1111/cns.12362.
18. Roland, C.L.; Arumugam, T.; Deng, D.; Liu, S.H.; Philip, B.; Gomez, S.; Burns, W.R.; Ramachandran, V.; Wang, H.; Cruz-Monserrate, Z.; et al. Cell Surface Lactate Receptor GPR81 Is Crucial for Cancer Cell Survival. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 5301, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0319.
19. Hoque, R.; Farooq, A.; Ghani, A.; Gorelick, F.; Mehal, W.Z. Lactate Reduces Liver and Pancreatic Injury in Toll-Like Receptor– and Inflammasome-Mediated Inflammation via GPR81-Mediated Suppression of Innate Immunity. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1763–1774, doi:10.1053/j.gastro.2014.03.014.
20. Madaan, A.; Nadeau-Vall e, M.; Rivera, J.C.; Obari, D.; Hou, X.; Sierra, E.M.; Girard, S.; Olson, D.M.; Chemtob, S. Lactate produced during labor modulates uterine inflammation via GPR81 (HCA1). *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2017**, *216*, 60.e1–60.e17, doi:10.1016/j.ajog.2016.09.072.
21. Kolko, M.; Vosborg, F.; Henriksen, U.L.; Hasan-Olive, M.M.; Diget, E.H.; Vohra, R.; Gurubaran, I.R.S.; Gjedde, A.; Mariga, S.T.; Skytt, D.M.; et al. Erratum to: Lactate Transport and Receptor Actions in Retina: Potential Roles in Retinal Function and Disease. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 1237–1237, doi:10.1007/s11064-016-1916-y.
22. Cherif, H.; Duhamel, F.; C ecyrc, B.; Bouchard, A.; Quintal, A.; Chemtob, S.; Bouchard, J.-F. Receptors of intermediates of carbohydrate metabolism, GPR91 and GPR99, mediate axon growth. *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e2003619, doi:10.1371/journal.pbio.2003619.

23. Sapieha, P.; Sirinyan, M.; Hamel, D.; Zaniolo, K.; Joyal, J.S.; Cho, J.H.; Honoré, J.C.; Kermorvant-Duchemin, E.; Varma, D.R.; Tremblay, S.; et al The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. (1546-170X (Electronic)). *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1067–1076, doi:10.1038/nm.1873.
24. Argaw, A.; Duff, G.; Zabouri, N.; Cécyre, B.; Chainé, N.; Cherif, H.; Tea, N.; Lutz, B.; Ptito, M.; Bouchard, J.-F. Concerted Action of CB1 Cannabinoid Receptor and Deleted in Colorectal Cancer in Axon Guidance. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 1489, doi:10.1523/JNEUROSCI.4134-09.2011.
25. Cherif, H.; Argaw, A.; Cécyre, B.; Bouchard, A.; Gagnon, J.; Javadi, P.; Desgent, S.; Mackie, K.; Bouchard, J.-F. Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation. *eNeuro* **2015**, *2*, doi:10.1523/ENEURO.0011-15.2015.
26. Duff, G.; Argaw, A.; Cecyre, B.; Cherif, H.; Tea, N.; Zabouri, N.; Casanova, C.; Ptito, M.; Bouchard, J.-F. Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70849, doi:10.1371/journal.pone.0070849.
27. Taylor, S.C.; Posch, A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 361590, doi:10.1155/2014/361590.
28. Torborg, C.L.; Feller, M.B. Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *J. Neurosci. Methods* **2004**, *135*, 17–26, doi:10.1016/j.jneumeth.2003.11.019.
29. Muir-Robinson, G.; Hwang, B.J.; Feller, M.B. Retinogeniculate Axons Undergo Eye-Specific Segregation in the Absence of Eye-Specific Layers. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 5259, doi:10.1523/JNEUROSCI.22-13-05259.2002.
30. Jassen, A.K.; Yang, H.; Miller, G.M.; Calder, E.; Madras, B.K. Receptor Regulation of Gene Expression of Axon Guidance Molecules: Implications for Adaptation. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 71, doi:10.1124/mol.105.021998.
31. Xiang, Y.; Li, Y.; Zhang, Z.; Cui, K.; Wang, S.; Yuan, X.-B.; Wu, C.-P.; Poo, M.-M.; Duan, S. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 843–848, doi:10.1038/nn899.
32. Cai, T.-Q.; Ren, N.; Jin, L.; Cheng, K.; Kash, S.; Chen, R.; Wright, S.D.; Taggart, A.K.P.; Waters, M.G. Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 987–991, doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.088.
33. Shanks, J.A.; Ito, S.; Schaevitz, L.; Yamada, J.; Chen, B.; Litke, A.; Feldheim, D.A. Corticothalamic Axons Are Essential for Retinal Ganglion Cell Axon Targeting to the Mouse Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 5252–5263, doi:10.1523/JNEUROSCI.4599-15.2016.
34. Chih, C.-P.; Roberts, E.L. Energy Substrates for Neurons during Neural Activity: A Critical Review of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**, *23*, 1263–1281, doi:10.1097/01.WCB.0000081369.51727.6F.
35. Pellerin, L.; Pellegrini, G.; Bittar, P.G.; Charnay, Y.; Bouras, C.; Martin, J.L.; Stella, N.; Magistretti, P.J. Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle. *Dev. Neurosci.* **1998**, *20*, 291–299, doi:10.1159/000017324.
36. Wang, L.; TÖRNquist, P.; Bill, A. Glucose metabolism of the inner retina in pigs in darkness and light. *Acta Physiol. Scand.* **1997**, *160*, 71–74, doi:10.1046/j.1365-201X.1997.00030.x.
37. Hurley, J.B.; Lindsay, K.J.; Du, J. Glucose, lactate, and shuttling of metabolites in vertebrate retinas. *J. Neurosci. Res.* **2015**, *93*, 1079–1092, doi:10.1002/jnr.23583.
38. Bouchard, J.-F.; Horn, K.E.; Stroh, T.; Kennedy, T.E. Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 398–417, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05609.x.
39. Sanes, D.H.; Reh, T.A.; Harris, W.A. 4-Determination and differentiation. In *Development of the Nervous System (Third Edition)*, Sanes, D.H., Reh, T.A., Harris, W.A., Eds; Academic Press: London, UK, **2012**; pp. 77–104, doi:10.1016/B978-0-12-374539-2.00008-2.
40. Mot, A.I.; Liddell, J.R.; White, A.R.; Crouch, P.J. Circumventing the Crabtree Effect: A method to induce lactate consumption and increase oxidative phosphorylation in cell culture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *79*, 128–138, doi:10.1016/j.biocel.2016.08.029.
41. Hsu, L.; Jeng, A.Y.; Chen, K.Y. Induction of neurite outgrowth from chick embryonic ganglia explants by activators of protein kinase C. *Neurosci. Lett.* **1989**, *99*, 257–262, doi:10.1016/0304-3940(89)90456-4.
42. Heacock, A.M.; Agranoff, B.W. Protein Kinase Inhibitors Block Neurite Outgrowth from Explants of Goldfish Retina. *Neurochem. Res.* **1997**, *22*, 1179–1185, doi:10.1023/A:1021916509858.
43. Kolkova, K.; Novitskaya, V.; Pedersen, N.; Berezin, V.; Bock, E. Neural Cell Adhesion Molecule-Stimulated Neurite Outgrowth Depends on Activation of Protein Kinase C and the Ras–Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 2238, doi:10.1523/JNEUROSCI.20-06-02238.2000.
44. Rosdahl, J.A.; Mourton, T.L.; Brady-Kalnay, S.M. Protein Kinase C  $\delta$  (PKC $\delta$ ) Is Required for Protein Tyrosine Phosphatase  $\mu$  (PTP $\mu$ )-Dependent Neurite Outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* **2002**, *19*, 292–306, doi:10.1006/mcne.2001.1071.
45. Cirulli, V.; Yebra, M. Netrins: Beyond the brain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 296–306, doi:10.1038/nrm2142.
46. Bouchard, J.-F.; Moore, S.W.; Tritsch, N.X.; Roux, P.P.; Shekarabi, M.; Barker, P.A.; Kennedy, T.E. Protein Kinase A Activation Promotes Plasma Membrane Insertion of DCC from an Intracellular Pool: A Novel Mechanism Regulating Commissural Axon Extension. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 3040, doi:10.1523/JNEUROSCI.4934-03.2004.

47. Barallobre, M.J.; Pascual, M.; Del Río, J.A.; Soriano, E. The Netrin family of guidance factors: Emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res. Rev.* **2005**, *49*, 22–47, doi:10.1016/j.brainresrev.2004.11.003.
48. Argaw, A.; Duff, G.; Boire, D.; Ptito, M.; Bouchard, J.-F. Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Exp. Neurol.* **2008**, *211*, 494–502, doi:10.1016/j.expneurol.2008.02.014.
49. Pellerin, L.; Magistretti, P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10625, doi:10.1073/pnas.91.22.10625.
50. Berthet, C.; Lei, H.; Thevenet, J.; Gruetter, R.; Magistretti, P.J.; Hirt, L. Neuroprotective Role of Lactate after Cerebral Ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2009**, *29*, 1780–1789, doi:10.1038/jcbfm.2009.97.
51. Berthet, C.; Castillo, X.; Magistretti, P.J.; Hirt, L. New Evidence of Neuroprotection by Lactate after Transient Focal Cerebral Ischaemia: Extended Benefit after Intracerebroventricular Injection and Efficacy of Intravenous Administration. *Cerebrovasc. Dis.* **2012**, *34*, 329–335, doi:10.1159/000343657.
52. Zhai, X.; Li, J.; Li, L.; Sun, Y.; Zhang, X.; Xue, Y.; Gao, Y.; Li, S.; Yan, W.; Yin, S.; et al. L-lactate preconditioning promotes plasticity-related proteins expression and reduces neurological deficits by potentiating GPR81 signaling in rat traumatic brain injury model. *Brain Res.* **2020**, *1746*, 146945, doi:10.1016/j.brainres.2020.146945.

## 4 – Discussion générale

Pendant longtemps, le lactate a été considéré comme un déchet métabolique. La remise en question de ce concept a permis de dévoiler les rôles importants de cette molécule. En premier lieu, le lactate est un substrat énergétique pour différents types cellulaires tels que les neurones (71). Ensuite, il s'est révélé être un agent neuroprotecteur et une molécule de signalisation neuronal par l'entremise de son récepteur GPR81 (34, 72). Pour faire la différence entre les effets énergétiques et signalétiques, notre modèle d'étude utilise le 3,5-DHBA comme agoniste spécifique du récepteur, mais sans les propriétés énergétiques du lactate (53). De plus, l'utilisation de souris transgéniques rendant le récepteur déficient permet d'évaluer les effets anatomiques spécifiques à inactivation.

À partir des résultats obtenus, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle le récepteur GPR81 a un impact important sur le développement du système nerveux visuel. Cette recherche offre une meilleure compréhension des mécanismes nécessaires à la croissance des CGR et dans l'établissement des projections rétiniennes vers leurs cibles cérébrales. Bien que chaque protocole expérimental comporte des limitations, l'ensemble des résultats obtenus avec l'appui de la littérature actuelle confirme le rôle important du GPR81 dans le système nerveux visuel.

## 4.1 – Résumé des résultats

### 4.1.1– Présence du récepteur

Afin de déterminer si le récepteur du lactate est impliqué dans le développement du système visuel, il faut d'abord établir sa présence dans la rétine. Dans ce mémoire, la distribution anatomique du récepteur du lactate a été évaluée dans la rétine de souris et de hamsters. L'utilisation de protocole d'immunohistochimie a permis de révéler la présence du récepteur GPR81 avec l'anticorps venant du lapin anti-GPR81-S296 (SAB1300790). En effectuant une colocalisation avec l'anticorps provenant de la souris anti-Brn-3a, un marqueur spécifique de CGR, il a été possible de visualiser l'expression du GPR81 sur ce type cellulaire. Chez la souris embryonnaire, adulte et le hamster P5, GPR81 est prédominant au niveau des CGR. Ce résultat appuie la présence du récepteur dans la couche des CGR ainsi que dans les fibres formant le nerf optique pendant les différentes étapes de la vie chez les rongeurs. Dans la littérature, l'expression du GPR81 avait été évaluée sur les cellules de Müller et sur les CGR chez des souris P17. Ces résultats sont aussi appuyés par la détection d'ARNm du GPR81 dans les tissus de rétine (56, 73).

L'anticorps contre GPR81 a été utilisé sur des cultures *in vitro* d'explant de rétine et de neurones corticaux E16. Les résultats montrent la présence du récepteur sur le corps cellulaire, sur les neurites jusqu'au bout des filopodes du cône de croissance. La distribution du GPR81 sur ces différents types de neurones pendant le développement embryonnaire ainsi que l'accumulation de lactate à cette période suggère un rôle potentiellement important pour la formation du CNS (63, 64).

Notre modèle de souris transgénique *gpr81<sup>-/-</sup>* a été développé par l'insertion d'une cassette plasmidique (IRES-lacZ-neo) dans la région du deuxième domaine transmembranaire du gène codant pour le récepteur GPR81 sur des souris de souche C57BL/6J. Cette modification a pour conséquence de rendre le récepteur tronqué et non fonctionnel. Il est possible de confirmer l'authenticité de cette insertion génique avec la technique de Réaction en chaîne par polymérase (PCR). Des amorces spécifiquement fabriquées pour amplifier la région modifiée du gène codant le GPR81 ont été utilisées

sur l'ADN isolé des souris *gpr81<sup>+/+</sup>* et *gpr81<sup>-/-</sup>*. Chez les souris de souche sauvage *gpr81<sup>+/+</sup>*, les amorces se lient à la région codant le gène du GPR81 ce qui permet l'amplification de la région d'intérêt par PCR afin de visualiser cette bande contrôle. Dans le cas des souris *gpr81<sup>-/-</sup>*, la modification génétique empêche l'amorce de se lier à l'endroit modifier de l'ADN et d'amplifier la région d'intérêt représentée par l'absence de bande (Fig. S1). Cependant, ces souris ne nous permettent pas de bien tester la spécificité de notre anticorps anti-GPR81. En effet, l'antigène de cet anticorps est conçu pour se lier à une région des acides aminés non modifiés de la souris *gpr81<sup>-/-</sup>*. L'anticorps peut alors se lier normalement au récepteur tronqué sans prouver sa spécificité (Fig. S2).

#### 4.1.2 – L'effet du GPR81 sur les CGR

Pour déterminer si l'activation du GPR81 influence le développement et le guidage des CGR, des explants de rétine *gpr81<sup>+/+</sup>* et *gpr81<sup>-/-</sup>* ont été cultivés *in vitro* en présence d'agonistes du récepteur. Après un traitement de 1h avec le L-lactate ou le 3,5-DHBA, la taille moyenne des cônes de croissance était significativement plus élevée comparativement au traitement témoin. De plus, le nombre moyen de filopodes sur les cônes a aussi augmenté. Ces résultats sont toutefois abolis chez les explants provenant des souris *gpr81<sup>-/-</sup>*. Ce genre d'impact sur la morphologie des cônes de croissance est un premier indice vers l'implication du GPR81 dans la croissance et potentiellement établir le rôle du L-lactate dans la navigation chimiotactique. Par le passé, il a été montré qu'une modulation positive de ces paramètres est liée avec une augmentation de la croissance et des effets chimioattractifs du guidage (20, 74-78).

Avec une technique d'imagerie en temps réel des cellules vivantes, il est possible de tester les propriétés chimioattractives ou chimiorépulsives permettant la navigation des CGR. Les cônes de croissance des explants rétiniens ont été soumis à un gradient de L-lactate propulsé par une micropipette soigneusement placé à une distance de 100 µm et à un angle d'environ 45° du cône de croissance d'intérêt. Les mesures de la taille du cône de croissance, le nombre de filopodes, l'angle entre la pipette et le cône et la distance parcourue ont été pris avant et après 1h. Les films en temps réel montrent clairement que les cônes de croissance soumis au gradient de L-lactate augmentent la taille, le nombre de filopodes ainsi que la distance parcourue du cône de croissance. Ces résultats

corroborent ainsi avec les données précédentes et de l'implication du lactate dans la modulation de la morphologie des cônes de croissance. En revanche, aucun effet chimiotactique mesuré par la variation de l'angle vers le gradient de L-lactate a été significatif. Cette expérimentation suggère alors que le L-lactate et son récepteur n'ont pas d'effet sur le guidage axonal, mais confirme l'influence du L-lactate sur la croissance des axones des CGR. Par le passé, des résultats similaires ont été publiés avec d'autres métabolites intermédiaires du cycle de Krebs. Les actions du succinate et de l' $\alpha$ -cétoglutarate sur leur récepteur respectif GPR91 et GPR99 exprimés sur les CGR régulaient aussi la morphologie des cônes de croissance, mais n'avaient pas d'effet sur le guidage (20).

Dans le même ordre d'idée, un traitement plus long devrait moduler positivement la croissance axonale des CGR. Lorsque les explants *gpr81<sup>+/+</sup>* sont traités pendant 15h avec les agonistes du GPR81, la longueur moyenne des axones était significativement plus élevée que les témoins non traités. En connaissant le potentiel énergétique du lactate, il est possible de se demander si cette augmentation est réellement causée par l'effet du récepteur. Si c'était le cas, l'augmentation de la croissance axonale serait spécifique au L-lactate, mais pas au 3,5-DHBA. De plus, les expériences sur les souris *gpr81<sup>-/-</sup>* permettent d'appuyer que l'effet du récepteur stimule cette croissance. Comme attendu, l'inactivation du GPR81 chez les explants *gpr81<sup>-/-</sup>* empêche l'augmentation précédemment mesurée des traitements aux différents agonistes de GPR81. Ces résultats appuient ainsi le rôle neurotrophique du L-lactate et de son récepteur lors de la croissance des CGR.

### **4.1.3 – Mécanismes intracellulaires du GPR81**

L'activation des GPCR par leur ligand provoque des cascades signalétiques qui modulent les activités intracellulaires à l'origine des effets morphologiques. Ces cascades intracellulaires peuvent être mesurées par la technique d'immunobuvardage (Western Blot). Lorsqu'un GPCR s'active, il permet le transfert de groupement phosphorylé hautement énergétique à certaines protéines ce qui leur donne l'énergie nécessaire pour effectuer leurs fonctions. L'état phosphorylé ou non phosphorylé de ces protéines est

déecté par l'utilisation d'anticorps spécifique à son état de phosphorylation. Malheureusement, la technique d'immunobuvardage nécessite un grand nombre de cellules qui est difficilement atteignable avec les CGR. Comme le GPR81 a été détecté dans les cultures de neurones corticaux primaires et que le L-lactate médie les mêmes effets que les CGR sur la morphologie du cône, nous avons utilisé ces cellules en immunobuvardage. Après un traitement au L-lactate, nous avons mesuré une augmentation de la phosphorylation de PKC et de PKA. Sans surprise, la phosphorylation de ces voies cellulaires a été associée au remodelage du cytosquelette. Dans le cas de PKC, l'activation de cette voie est principalement impliquée dans la modulation des canaux calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ), dans le remodelage synaptique et induit une synthèse protéique. PKC est aussi un précurseur à la phosphorylation de la voie MAPK et ERK1/2 (79-81). Précédemment, la voie ERK1/2 s'est montré être essentielle dans la croissance axonale et pourrait être à l'origine des effets observés par le L-lactate (20). Ce résultat concorde avec la littérature, où les traitements de L-lactate engendraient une phosphorylation de ERK1/2 (55, 56, 82). Dans le cas de PKA, il a été établi que sa phosphorylation est nécessaire à la régulation de plusieurs processus physiologiques tels que la croissance axonale et la plasticité synaptique (83). Chez les CGR, il a été démontré que la modulation de la voie de la PKA affecte le développement normal des axones (74). Néanmoins, même si le L-lactate augmente la phosphorylation de PKC et PKA, il serait intéressant de mesurer si le 3,5-DHBA produit les mêmes effets. Il serait attendu qu'un traitement aux agonistes du GPR81 sur des cellules provenant des souris *gpr81*<sup>-/-</sup> bloque l'augmentation de la phosphorylation précédemment mesurée. De plus, l'utilisation d'inhibiteur de phosphorylation des voies PKC et PKA pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la croissance axonale.

Maintenant que les impacts de la croissance axonale et des mécanismes intracellulaires du L-lactate ont été vérifiés. Il est nécessaire d'établir le rôle du récepteur dans l'établissement des projections des CGR vers les cibles cérébrales du système visuel.

#### **4.1.4 – Impact de GPR81 sur les projections des CGR**

Nous avons montré *in vitro* que le récepteur GPR81 a une activité importante dans la croissance axonale des CGR. La modification du gène codant pour GPR81 provoque un déficit dans la croissance axonale. Pour vérifier les conséquences de cette modification génétique sur les projections du système nerveux visuel dans le cerveau des souris *gpr81<sup>-/-</sup>*, nous avons injecté un traceur neuronal couplé avec une molécule fluorescente différente dans chaque œil. Cette technique permet de comparer les projections des CGR dans les différents noyaux cérébraux chez la souris *gpr81<sup>+/+</sup>* et *gpr81<sup>-/-</sup>*. La déficience fonctionnelle du GPR81 *in vivo* a causé une diminution des projections ipsilatérales dans le CGLd. Il a été démontré par le passé que les projections ipsilatérales du CGLd proviennent des CGR ventro-temporale. La navigation normale de ces projections est régulée par la présence du récepteur aux éphrines EphB1 sur leurs cônes de croissance. Un effet chimiorépulsif les redirige pour projeter leurs axones vers le tractus optique ipsilatéral lorsqu'ils entrent en contact avec le ligand Ephrin-B2 sécrété par les cellules gliales radiales de la ligne médiane du chiasma optique (10, 84). De plus, nos résultats sur le guidage ne montrent aucun effet chimiotactique du L-lactate sur les cônes de croissance des CGR. Alors, qu'est-ce qui explique cette diminution de projection ipsilatérale chez les souris *gpr81<sup>-/-</sup>* ? Précédemment, il a été montré que l'expression du GPR81 dans les cellules gliales de la rétine (cellule de Müller) influençait la relâche de facteur de croissance et angiogénique tels que Norrin et Wnt (56). Peut-être que l'inactivation du GPR81 influence aussi la relâche du ligand Ephrin-B2 des cellules gliales radiales de la ligne médiane du chiasme responsable de la redirection des CGR. Bien que les souris *gpr81<sup>-/-</sup>* nous donnent un indice sur les mécanismes derrière l'établissement du système nerveux visuel. Il serait intéressant d'approfondir les causes de ce changement anatomique.

#### **4.1.5 – Impact de GPR81 sur les fonctions visuelles**

Pour déterminer l'impact de ce changement anatomique sur les fonctions visuelles, des expériences comportementales ont été faites. Le réflexe optomoteur des souris *gpr8<sup>+/+</sup>* et *gpr81<sup>-/-</sup>* a été comparé pendant leur développement jusqu'à l'âge adulte. L'utilisation du réflexe optomoteur provoqué par un mouvement permet de mesurer

l'acuité visuelle des animaux. L'animal placé au centre d'un cylindre est exposé à des bandes verticales noires et blanches qui vont se déplacer en rotation à une vitesse constante générée par le système OptoMotry produit par Cerebral Mechanics. Lorsque l'animal perçoit le mouvement des bandes, il bouge la tête du même sens de la rotation. Dans le cas où la taille des bandes devient trop mince pour la perception, l'animal ne peut pas suivre le mouvement de la tête. L'acuité visuelle représente ainsi le seuil perceptible par l'animal (85). Comme les souris *gpr81<sup>-/-</sup>* développent moins de projections ipsilatérales dans le CGLd et que l'origine physiologique du réflexe optomoteur est en partie sous-corticale. Il serait attendu d'observer une diminution dans les mesures d'acuité visuelle. Cependant, cette expérience n'a montré aucune différence dans le développement de l'acuité visuelle entre les souris *gpr81<sup>+/+</sup>* et *gpr81<sup>-/-</sup>* (Fig. S3). Ce résultat nous indique que le réflexe optomoteur n'est peut-être pas exclusivement d'origine sous-corticale comme il été précédemment démontré (86, 87). Un phénomène compensatoire dû à la plasticité neuronale des composantes corticales pourrait permettre à ces souris de répondre normalement à ce test. De plus, les résultats de ce test découlent des observations subjectives de l'expérimentateur induisant un certain biais. L'évaluation des mesures par un logiciel d'intelligence artificielle pourrait permettre éventuellement de réduire ce biais, mais ces systèmes ne sont malheureusement pas encore au point.

Afin d'évaluer si l'inactivation du GPR81 avait une implication dans la neurophysiologie de la rétine et l'intégration neuronale des signaux visuels, les souris ont été stimulées par des flashes lumineux de différentes intensités en condition scotopique et photopique. La réponse au flash lumineux se traduit par une modification du potentiel électrique de la rétine qui peut être mesuré à l'aide de l'électrorétinographie (ERG). Les ondes extraites de l'ERG sont typiquement composées d'une onde-a négative suivie d'une onde-b positive. Des ondes transitoires de hautes fréquences appelées potentiels oscillatoires (PO) peuvent être aussi mesurées dans la pente ascendante de l'onde-b. Il est possible de mesurer les différents paramètres caractérisant les ondes. Premièrement, l'amplitude ainsi que le temps nécessaire à atteindre l'amplitude maximale (latence) de la réponse sont mesurés aux différentes intensités de flash lumineux. Nos résultats ne montrent aucune différence de tous ces paramètres entre les souris des deux génotypes en condition scotopique et photopique pour les différentes intensités de flash lumineux

(Fig. S4-S5). Il n'est pas étonnant d'observer aucune différence quant aux mesures de l'onde-a. Cette onde provient de l'hyperpolarisation de l'activation des photorécepteurs par le flash (88). Techniquement, cette onde ne devrait pas être influencée par l'inactivation du GPR81 puisque cette couche de la rétine ne montre pas la présence du récepteur dans les tranches d'immunohistochimie.

Ensuite, l'onde-b résulte majoritairement à une dépolarisation des cellules bipolaires. Une partie de l'onde-b serait originaire des cellules de Müller (89, 90). Un déficit des effets du GPR81 pourrait influencer les paramètres d'amplitude et de latence de cette onde-b comme il a été récemment montré. Dans cette étude, il avait observé une diminution anormale de l'amplitude de l'onde-b chez les souris *gpr81<sup>-/-</sup>* âgées de 6 mois en condition scotopique (luminance de 0.01 cd-secondes/m<sup>2</sup>) et photopique (luminance de 3.0 cd-secondes/m<sup>2</sup>). Ce déficit fonctionnel était attribué à une mort cellulaire rétinienne médiée par l'inactivation GPR81 qui survient tôt au cours du développement. Ces effets délétères aboutissant à un retard du développement vasculaire interne conduiraient à une hémodynamique perturbée et à la mort des cellules rétiniennes (56). Dans notre cas, aucune différence n'a été mesurée quant à l'amplitude de l'onde-b avec des souris du même âge. Qu'est-ce qui pourrait expliquer cette différence entre nos études pourtant conduites sur les mêmes souches murines. Lorsque l'on compare l'amplitude de l'onde-b entre nos deux études pour une même luminance, la différence entre nos amplitudes mesurées est frappante. L'ordre de grandeur de l'amplitude mesuré dans (56) est d'environ 1 à 3  $\mu$ V tandis que dans notre modèle l'amplitude est située entre 100 à 300  $\mu$ V. Dans notre modèle, une différence dans l'ordre des 1-2  $\mu$ V serait négligeable entre les 2 génotypes puisque la variation biologique de l'amplitude pour un même génotype se place dans les dizaines de  $\mu$ V. De plus, lorsque l'on compare nos deux études avec la littérature, on observe que l'ordre de grandeur de l'amplitude des réponses rétiniennes se rapporte plutôt dans les centaines de  $\mu$ V (88, 89, 91).

Du côté des PO, l'origine de ces ondes est encore sujet à débats. À l'exception des photorécepteurs et des cellules de Müller, toutes les cellules de la couche plexiforme interne influencent les PO (92). Pourtant, aucun effet n'a été mesuré par l'inactivation du GPR81 (Fig. S6).

## 4.2 – Perspective d'avenir

Avoir une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la formation du système nerveux visuel est essentiel afin de proposer un traitement aux maladies qui affectent la dégénérescence du nerf optique. Jusqu'à maintenant, aucun traitement ne permet une régénération du nerf optique laissant des millions de personnes dans la cécité. Cette recherche met en lumière le rôle du L-lactate et son récepteur GPR81 comme des éléments qui pourraient contribuer un jour à développer un cocktail de molécules stimulant la régénération. Le L-lactate offre de nombreux avantages qui ont été démontrés dans ce mémoire. C'est d'abord une molécule endogène qui est produite en grande quantité lors d'un effort physique intense. Elle se distribue facilement partout dans le corps et dans les cellules par la présence de ces transporteurs. Elle est utile comme substrat énergétique, réduit l'inflammation et augmente la croissance neuronale par l'intermédiaire de son récepteur. Ces caractéristiques rendent cette molécule encore plus intéressante dans une panoplie de maladies et méritent l'attention des chercheurs.

## 5 – Conclusion

Dans ce mémoire, le développement et les fonctions du système visuel ont été revus avec une emphase sur les CGR. Les mécanismes du guidage axonal permettant aux CGR d'établir leurs cibles thalamiques ont été présentés. L'histoire de la découverte de l'acide lactique, le paradigme de son accumulation en situation hypoxique et sa relation avec l'O<sub>2</sub> ont été revus pour mieux comprendre l'origine des croyances associées au lactate. Ensuite, les différents facteurs entourant le métabolisme du lactate physiologique incluant les enzymes, les transporteurs et le récepteur ont montré le rôle important du lactate dans l'organisme et plus précisément dans le CNS. Pour la première fois, l'implication du récepteur du lactate dans le développement du système nerveux visuel a été abordée. Cet ouvrage a permis de caractériser les effets délétères causés par l'inactivation fonctionnelle du GPR81 dans le développement des CGR chez la souris *gpr81<sup>-/-</sup>*.

## Références bibliographiques

1. Gehring WJ. The evolution of vision. *WIREs Developmental Biology*. 2014;3(1):1-40.
2. Darwin C. *Origin of Species by Means of Natural Selection, The*: John Murray; 1882.
3. Halterman MW. *Neuroscience, 3rd Edition. Neurology*. 2005;64(4):769.
4. May CA, Lütjen-Drecoll E. Morphology of the Murine Optic Nerve. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43(7):2206-12.
5. Agostinone J, Alarcon-Martinez L, Gamlin C, Yu W-Q, Wong ROL, Di Polo A. Insulin signalling promotes dendrite and synapse regeneration and restores circuit function after axonal injury. *Brain*. 2018;141(7):1963-80.
6. Dubuc B, al. e. *le cerveau à tous les niveaux: McGill*; [cited 2018 09/12]. Available from: <http://lecerveau.mcgill.ca/index.php>.
7. Chow RL, Lang RA. Early Eye Development in Vertebrates. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001;17(1):255-96.
8. Brittis PA, Canning DR, Silver J. Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*. 1992;255(5045):733.
9. Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, et al. Slit1 and Slit2 Cooperate to Prevent Premature Midline Crossing of Retinal Axons in the Mouse Visual System. *Neuron*. 2002;33(2):219-32.
10. Nakagawa S, Brennan C, Johnson KG, Shewan D, Harris WA, Holt CE. Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron*. 2000;25(3):599-610.
11. Burke W, Hayhow WR. Disuse of a Central Synapse and Spontaneous Activity in the Optic Nerve. *Nature*. 1960;188(4751):668-9.
12. Reese BE. Development of the retina and optic pathway. *Vision Res*. 2011;51(7):613-32.
13. Sanes DH, Reh TA, Harris WA. 4 - Determination and differentiation. In: Sanes DH, Reh TA, Harris WA, editors. *Development of the Nervous System (Third Edition)*. London: Academic Press; 2012. p. 77-104.
14. Kalil K, Dent EW. Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Current Opinion in Neurobiology*. 2005;15(5):521-6.
15. Sanes DH, Reh TA, Harris WA. 5 - Axon growth and guidance. In: Sanes DH, Reh TA, Harris WA, editors. *Development of the Nervous System (Third Edition)*. London: Academic Press; 2012. p. 105-42.
16. Lowery LA, Vactor DV. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(5):332-43.
17. Cirulli V, Yebra M. Netrins: beyond the brain. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(4):296-306.
18. Bouchard J-F, Moore SW, Tritsch NX, Roux PP, Shekarabi M, Barker PA, et al. Protein Kinase A Activation Promotes Plasma Membrane Insertion of DCC from an Intracellular Pool: A Novel Mechanism Regulating Commissural Axon Extension. *The Journal of Neuroscience*. 2004;24(12):3040.
19. Barallobre MJ, Pascual M, Del Río JA, Soriano E. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Research Reviews*. 2005;49(1):22-47.

20. Cherif H, Duhamel F, Cécyre B, Bouchard A, Quintal A, Chemtob S, et al. Receptors of intermediates of carbohydrate metabolism, GPR91 and GPR99, mediate axon growth. *PLOS Biology*. 2018;16(5):e2003619.
21. Ferguson BS, Rogatzki MJ, Goodwin ML, Kane DA, Rightmire Z, Gladden LB. Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *European Journal of Applied Physiology*. 2018;118(4):691-728.
22. Kompanje EJO, Jansen TC, van der Hoven B, Bakker J. The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814-1869) in January 1843. *Intensive Care Med*. 2007;33(11):1967-71.
23. Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004;287(3):R502-R16.
24. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(5):325-37.
25. Von Muralt A. The development of muscle-chemistry, a lesson in neurophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1950;4:126-9.
26. Wasserman K, McIlroy MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *American Journal of Cardiology*. 1964;14(6):844-52.
27. Barnard RJ, Holloszy JO. The Metabolic Systems: Aerobic Metabolism and Substrate Utilization in Exercising Skeletal Muscle. In: Tipton CM, editor. *Exercise Physiology: People and Ideas*. New York, NY: Springer New York; 2003. p. 292-321.
28. Brooks G, Gladden L. The Metabolic Systems: Anaerobic Metabolism (Glycolytic and Phosphagen). 2003. p. 322-60.
29. Connett RJ, Gayeski TE, Honig CR. Lactate accumulation in fully aerobic, working, dog gracilis muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1984;246(1):H120-H8.
30. Nalos M, Leverve XM, Huang SJ, Weisbrodt L, Parkin R, Seppelt IM, et al. Half-molar sodium lactate infusion improves cardiac performance in acute heart failure: a pilot randomised controlled clinical trial. *Critical Care*. 2014;18(2):R48.
31. Richardson RS, Noyszewski EA, Leigh JS, Wagner PD. Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular P O<sub>2</sub>. *Journal of Applied Physiology*. 1998;85(2):627-34.
32. Komesu A, Oliveira JARd, Martins LHdS, Wolf Maciel MR, Maciel Filho R. Lactic Acid Production to Purification: A Review. 2017. 2017;12(2):20.
33. Hasegawa H, Fukushima T, Lee J-A, Tsukamoto K, Moriya K, Ono Y, et al. Determination of serum d-lactic and l-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003;377(5):886-91.
34. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol*. 2004;558(Pt 1):5-30.
35. Markert CL. Lactate dehydrogenase. *Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. Cell Biochemistry and Function*. 1984;2(3):131-4.
36. Robergs R, Kennedy D. Metabolic acidosis and fatigue: Where to from here? *Regulation of Fatigue in Exercise*. 2011:41-61.

37. Maekawa M. Lactate dehydrogenase isoenzymes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1988;429:373-98.
38. Acosta M, Fletcher E, Azizoglu S, Foster L, Farber D, Kalloniatis M. Early makers of retinal degeneration in rd/rd mice. *Molecular vision*. 2005;11:717-28.
39. Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. Selective Distribution of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Neurons and Astrocytes of Human Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1996;16(6):1079-89.
40. Juel C. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. (0031-9333 (Print)).
41. Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochemical Journal*. 1999;343(2):281-99.
42. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family—Structure and functional characterization. *IUBMB Life*. 2012;64(1):1-9.
43. Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1993;264(4):C761-C82.
44. Ovens MJ, Manoharan C, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP. The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochem J*. 2010;431(2):217-25.
45. Yoon H, Fanelli A, Grollman EF, Philp NJ. Identification of a Unique Monocarboxylate Transporter (MCT3) in Retinal Pigment Epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;234(1):90-4.
46. Philp NJ, Yoon H, Lombardi L. Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2001;280(5):C1319-C26.
47. Bergersen LH. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience*. 2007;145(1):11-9.
48. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular Bases of Brain Energy Metabolism and Their Relevance to Functional Brain Imaging: Evidence for a Prominent Role of Astrocytes. *Cerebral Cortex*. 1996;6(1):50-61.
49. Mason S. Lactate Shuttles in Neuroenergetics—Homeostasis, Allostasis and Beyond. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11(43).
50. Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism*. 2018;27(4):757-85.
51. Hanson MA, Stevens RC. Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure*. 2009;17(1):8-14.
52. Liu C, Wu J, Fau - Zhu J, Zhu J, Fau - Kuei C, Kuei C, Fau - Yu J, Yu J, Fau - Shelton J, Shelton J, Fau - Sutton SW, et al. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. 2009(0021-9258 (Print)).
53. Liu C, Kuei C, Zhu J, Yu J, Zhang L, Shih A, et al. 3,5-Dihydroxybenzoic Acid, a Specific Agonist for Hydroxycarboxylic Acid 1, Inhibits Lipolysis in Adipocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012;341(3):794.
54. Offermanns S. Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2017;28(3):227-36.

55. Ohno Y, Oyama A, Kaneko H, Egawa T, Yokoyama S, Sugiura T, et al. Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells. *Acta Physiologica*. 2018;223(2):e13042.
56. Madaan A, Chaudhari P, Nadeau-Vallée M, Hamel D, Zhu T, Mitchell G, et al. Müller Cell–Localized G-Protein–Coupled Receptor 81 (Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1) Regulates Inner Retinal Vasculature via Norrin/Wnt Pathways. *The American Journal of Pathology*. 2019;189(9):1878-96.
57. Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal J-S, Cho J-H, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature Medicine*. 2008;14(10):1067-76.
58. He C-W, Liao C-P, Pan C-L. Wnt signalling in the development of axon, dendrites and synapses. *Open Biol*. 2018;8(10):180116.
59. de Castro Abrantes H, Briquet M, Schmuziger C, Restivo L, Puyal J, Rosenberg N, et al. The Lactate Receptor HCAR1 Modulates Neuronal Network Activity through the Activation of G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  Subunits. *The Journal of Neuroscience*. 2019;39(23):4422.
60. Lauritzen KH, Morland C, Puchades M, Holm-Hansen S, Hagelin EM, Lauritzen F, et al. Lactate Receptor Sites Link Neurotransmission, Neurovascular Coupling, and Brain Energy Metabolism. *Cerebral Cortex*. 2013;24(10):2784-95.
61. Mächler P, Wyss Matthias T, Elsayed M, Stobart J, Gutierrez R, von Faber-Castell A, et al. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metabolism*. 2016;23(1):94-102.
62. Bozzo L, Puyal J, Chatton J-Y. Lactate Modulates the Activity of Primary Cortical Neurons through a Receptor-Mediated Pathway. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e71721.
63. Girard JR, Cuendet GS, Marliss EB, Kervran A, Rieutort M, Assan R. Fuels, Hormones, and Liver Metabolism at Term and during the Early Postnatal Period in the Rat. *The Journal of Clinical Investigation*. 1973;52(12):3190-200.
64. Arizmendi C, Medina JM. Lactate as an oxidizable substrate for rat brain in vitro during the perinatal period. *Biochemical Journal*. 1983;214(2):633-5.
65. Juanes MC, Arizmendi C, Medina JM. Attenuation of Postnatal Hypoxia in the Premature Newborn Rat by Maternal Treatment with Dexamethasone: Its Relationship with Lung Phospholipid Content. *Neonatology*. 1986;50(6):337-44.
66. Hunt TK, Conolly WB, Aronson SB, Goldstein P. Anaerobic metabolism and wound healing: An hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds. *The American Journal of Surgery*. 1978;135(3):328-32.
67. Sun S, Li H, Chen J, Qian Q. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology*. 2017;32(6):453-63.
68. Peter K, Rehli M, Singer K, Renner-Sattler K, Kreutz M. Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;457(3):412-8.
69. Errea A, Cayet D, Marchetti P, Tang C, Kluza J, Offermanns S, et al. Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine Macrophages in a GPR81-Independent Manner. *PLOS ONE*. 2016;11(11):e0163694.

70. Nasi A, Fekete T, Krishnamurthy A, Snowden S, Rajnavölgyi E, Catrina AI, et al. Dendritic Cell Reprogramming by Endogenously Produced Lactic Acid. *The Journal of Immunology*. 2013;191(6):3090.
71. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(22):10625-9.
72. Barros LF. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends in Neurosciences*. 2013;36(7):396-404.
73. Kolko M. Lactate Transport and Receptor Actions in Retina: Potential Roles in Retinal Function and Disease. *Neurochemical Research*. 2015.
74. Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F. Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Experimental Neurology*. 2008;211(2):494-502.
75. Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cécycy B, Chainé N, Cherif H, et al. Concerted Action of CB1 Cannabinoid Receptor and Deleted in Colorectal Cancer in Axon Guidance. *The Journal of Neuroscience*. 2011;31(4):1489.
76. Cherif H, Argaw A, Cécycy B, Bouchard A, Gagnon J, Javadi P, et al. Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation. *eneuro*. 2015;2(5):ENEURO.0011-15.2015.
77. Duff G, Argaw A, Cecyrcy B, Cherif H, Tea N, Zabouri N, et al. Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e70849.
78. Bouchard J-F, Horn KE, Stroh T, Kennedy TE. Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *Journal of Neurochemistry*. 2008;107(2):398-417.
79. Stea A, Soong TW, Snutch TP. Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron*. 1995;15(4):929-40.
80. Nelson TJ, Sun M-K, Hongpaisan J, Alkon DL. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *European Journal of Pharmacology*. 2008;585(1):76-87.
81. Wierda KDB, Toonen RFG, de Wit H, Brussaard AB, Verhage M. Interdependence of PKC-Dependent and PKC-Independent Pathways for Presynaptic Plasticity. *Neuron*. 2007;54(2):275-90.
82. Cerda-Kohler H, Henríquez-Olguín C, Casas M, Jensen TE, Llanos P, Jaimovich E. Lactate administration activates the ERK1/2, mTORC1, and AMPK pathways differentially according to skeletal muscle type in mouse. *Physiol Rep*. 2018;6(18):e13800-e.
83. Sadana R, Dessauer CW. Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals*. 2009;17(1):5-22.
84. Assali A, Gaspar P, Rebsam A. Activity dependent mechanisms of visual map formation - From retinal waves to molecular regulators. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;35:136-46.
85. Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. Rapid Quantification of Adult and Developing Mouse Spatial Vision Using a Virtual Optomotor System. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45(12):4611-6.
86. Liu B-H, Huberman AD, Scanziani M. Cortico-fugal output from visual cortex promotes plasticity of innate motor behaviour. *Nature*. 2016;538(7625):383-7.

87. Guzik-Kornacka A, van der Bourg A, Vajda F, Joly S, Christ F, Schwab ME, et al. Nogo-A deletion increases the plasticity of the optokinetic response and changes retinal projection organization in the adult mouse visual system. *Brain Structure and Function*. 2016;221(1):317-29.
88. Smith NP, Lamb TD. The a-wave of the human electroretinogram recorded with a minimally invasive technique. *Vision Res*. 1997;37(21):2943-52.
89. Stockton RA, Slaughter MM. B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *Journal of General Physiology*. 1989;93(1):101-22.
90. Miller RF, Dowling JE. Intracellular responses of the Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*. 1970;33(3):323-41.
91. Cécyre B, Bachand I, Papineau F, Brochu C, Casanova C, Bouchard J-F. Cannabinoids affect the mouse visual acuity via the cannabinoid receptor type 2. *Scientific Reports*. 2020;10(1):15819.
92. Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1998;17(4):485-521.



# Annexes

## Méthodes supplémentaires

### Optomotor Response (OMR) Measurements

The OptoMotry System from CerebralMechanics (Lethbridge, AB, Canada) was used to measure the visual threshold in the development of *gpr81<sup>-/-</sup>* and *gpr81<sup>+/+</sup>*. As previously described in (Prusky et al., 2004), the mice stood freely on the platform tracking a rotating grating with 100% contrast. The head movement of the mouse in concert with the rotation of the grating was judged that the animal could see the grating. A 1-up-1-down staircase testing protocol was used until head tracking was no longer perceived. The visual acuity was defined as the highest spatial frequency of the grating that the mouse could see and is expressed as cycle/degree. Both eyes were tested individually by changing the direction of the visual stimulus. The same experimenter assessed all the mice by monitoring in the video window the animal, the animation of the rotating grating and a stationary crosshair on the animal's head used to judge the head movement. All experiments were carried out at light opening (8 a.m.). Since many mice would get agitated when they came to the testing platform for the first time, they were acclimatized by being placed on the OMR platform for about 10 minutes the day before the OMR test (85).

### Electroretinography (ERG)

Following a 12h overnight dark adaptation, mice were anaesthetized by isoflurane inhalation. The mice were placed on a heating pad in a Ganzfeld dome that housed a photo stimulator. The corneas were anesthetized with a drop of 0.5% proparacaine hydrochloride and the pupils were dilated with a drop of 1% tropicamide. The ERGs were recorded using an electrode in gold inserted in a corneal lens adapted for mice (LKC Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Reference and ground electrodes (E2 subdermal

electrode; Grass Instruments) were inserted subcutaneously in the forehead and in the tail. Broadband ERGs and oscillatory potentials (OPs) were recorded simultaneously (bandwidth, 1–1,000 Hz; 10,000x; P511, Grass, West Warwick, RI, USA). Signals were fed to an analog-digital interface (1401, CED, Cambridge, UK) and were acquired using the software Signal (v.3.01x, CED, Cambridge UK). In scotopic condition, the average of 5 flashes with a 30-second interval was recorded in response to progressively brighter stimuli starting at  $-3.83$  to  $1.48$  log photo.cd.s.m<sup>-2</sup>. In photopic condition, the mice were adapted to light background of  $30$  cd.m<sup>-2</sup> for 20 minutes. The average of 15 flashes with 3 seconds interval was recorded in response to progressively brighter stimuli starting at  $-0.64$  to  $1.48$  log photo.cd.s.m<sup>-2</sup>. Analysis of the ERG waveforms was performed using a 60 Hz low pass digital filter to eliminate the contaminating noise from OPs when analyzing the a- and b-waves. The amplitude of the a-wave was measured from the baseline to the most negative trough, whereas the b-wave amplitude was measured from the trough of the a-wave to the highest positive peak of the retinal response. The latency was measured from the flash onset to the peak of the waves. OPs were analyzed using a 60 Hz high pass digital filter to eliminate the a- and b-waves.

## Résultats supplémentaires

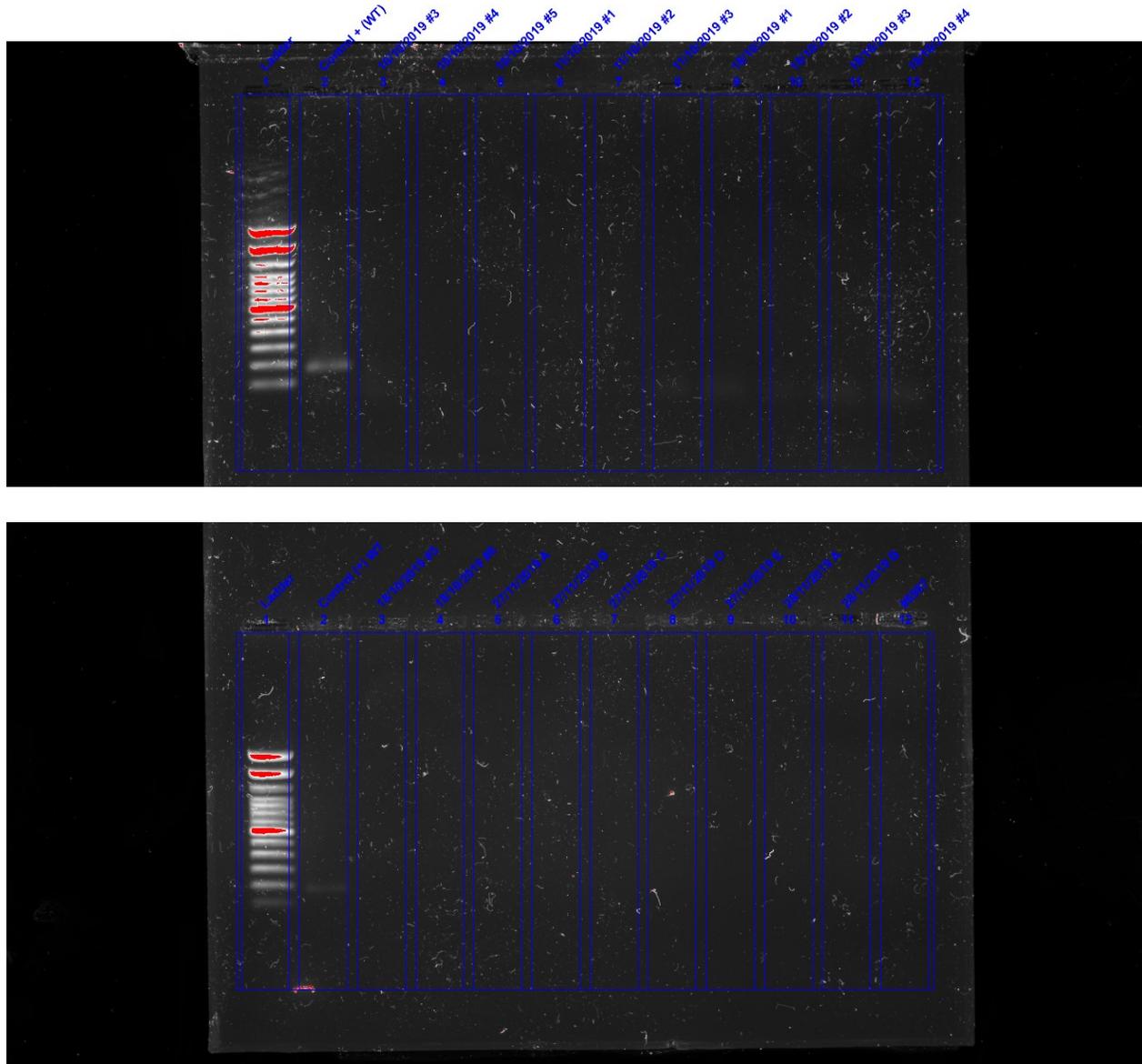
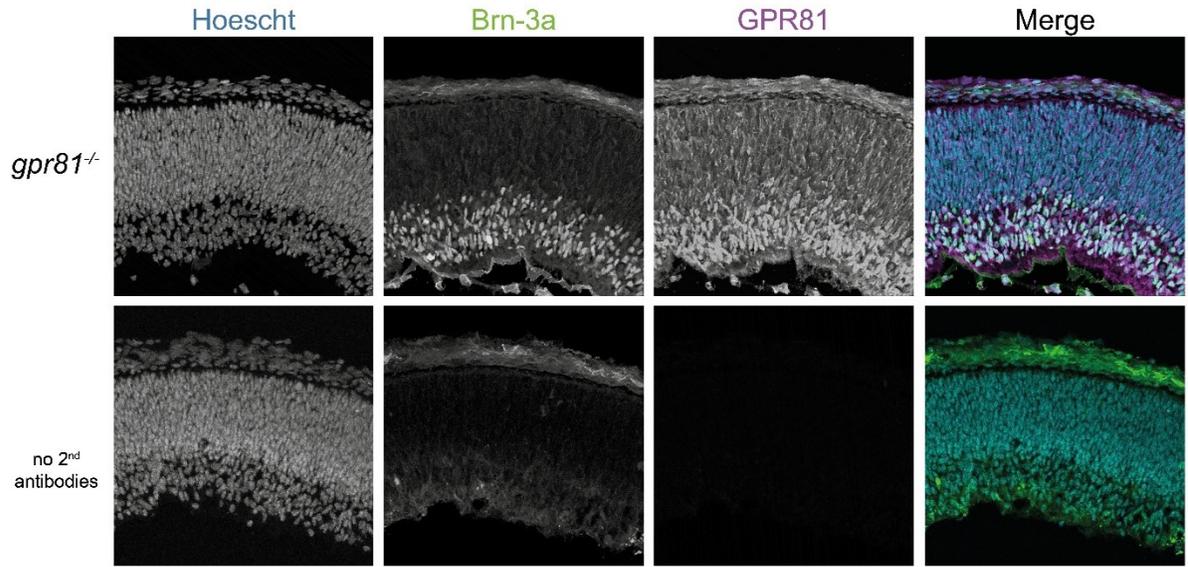
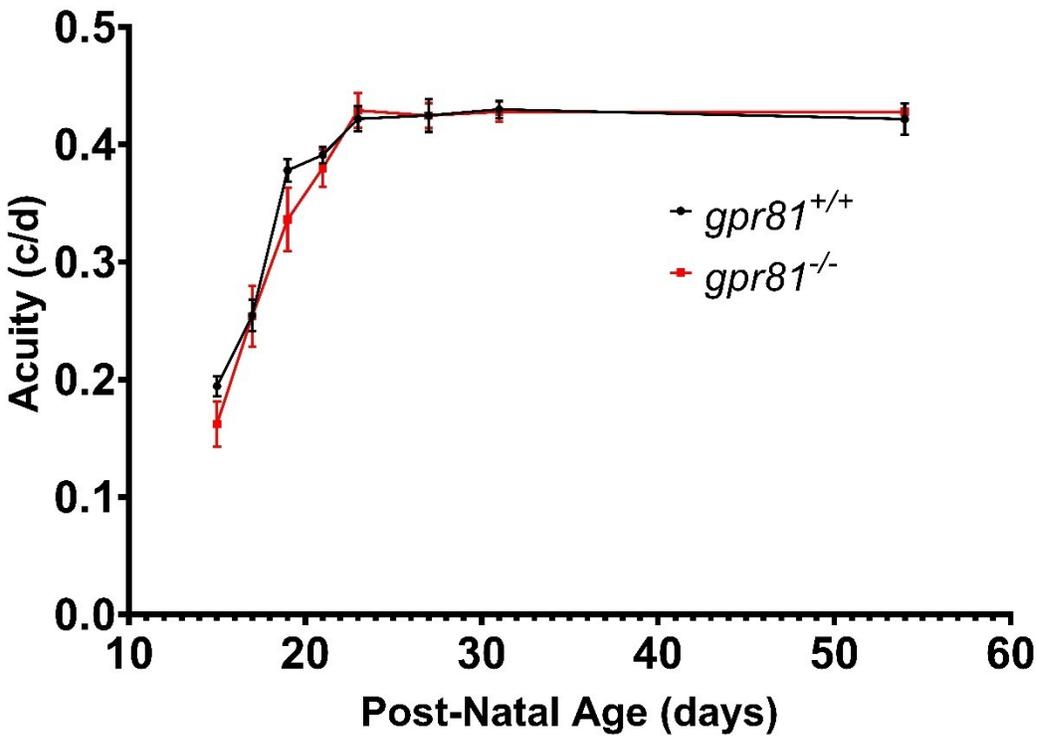


Figure S1. PCR of the primer pair forward: 5'-CATCTTGTCTGCTCGGTCA-3' and reverse: 5'-GAGGAAGTAGAGCCTAGCCA-3' were used to amplify a 160 bp fragment specific to the *gpr81*<sup>+/+</sup> mouse genome and absent in the *gpr81*<sup>-/-</sup> mice. Control (+) WT was the positive control showing the *gpr81*<sup>+/+</sup> gene amplification. All the other lane represents *gpr81*<sup>-/-</sup> mice confirming the absence of gene amplification for the *gpr81* gene.



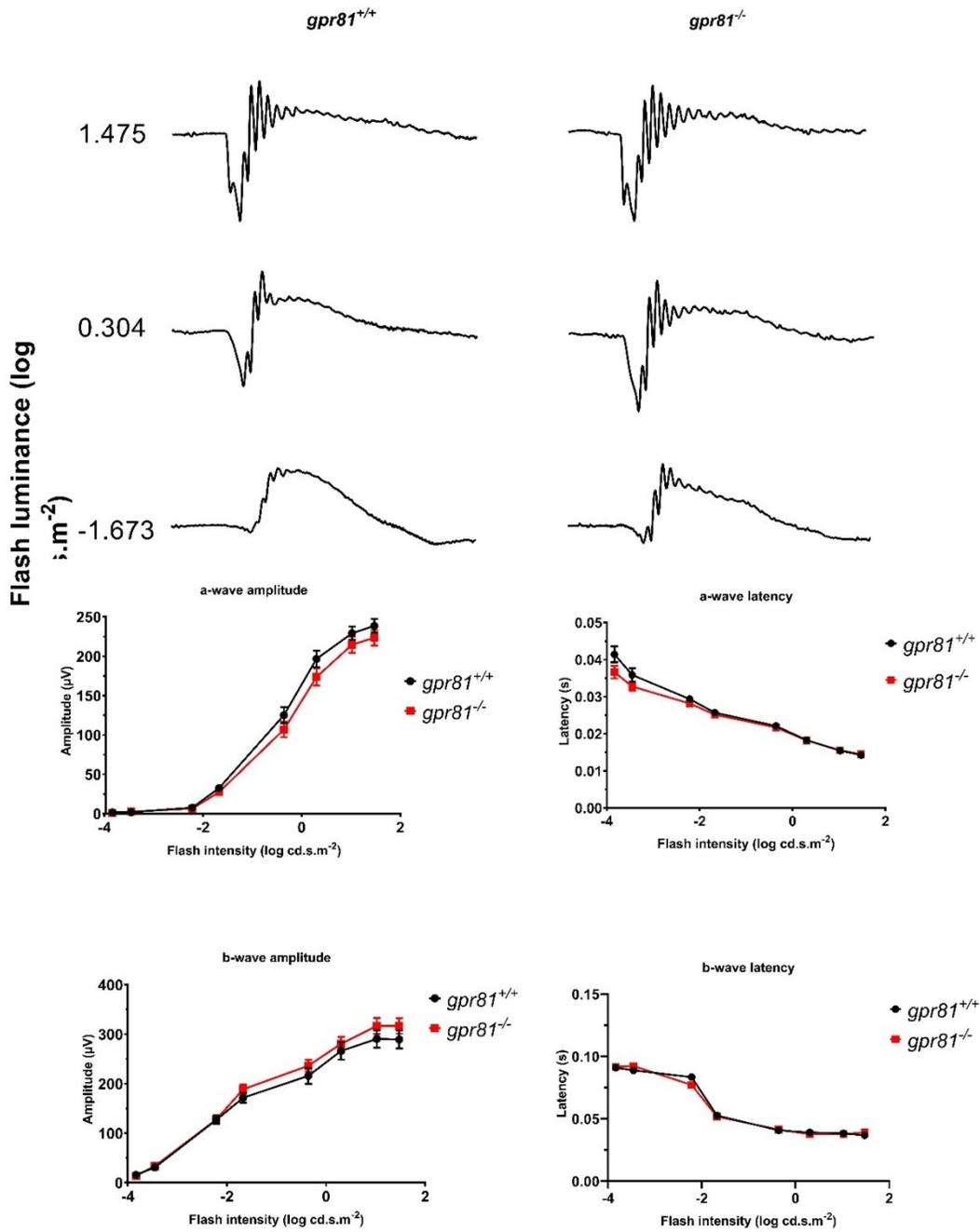
**Figure S2. Antibodies test on *gpr81*<sup>-/-</sup> mouse retina.** For the 488-emission laser, Brn-3a shows a little of autofluorescence without the second antibody anti-mouse Alexa Fluor 488. A strong signal of rabbit anti-GPR81-S296 (SAB1300790) on *gpr81*<sup>-/-</sup> mouse but no autofluorescence without secondary antibody anti-rabbit Alexa Fluor 546.

No Differences in the Development of Visual Acuity in *gpr81*<sup>-/-</sup> Mice

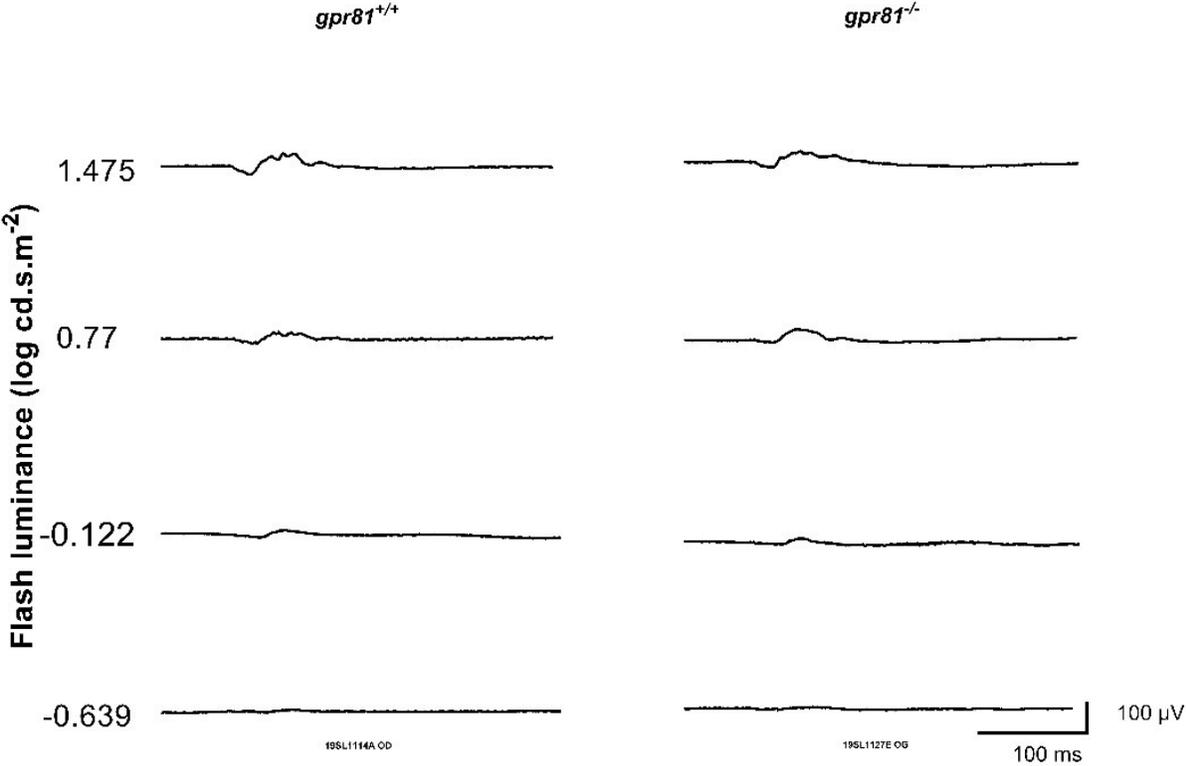


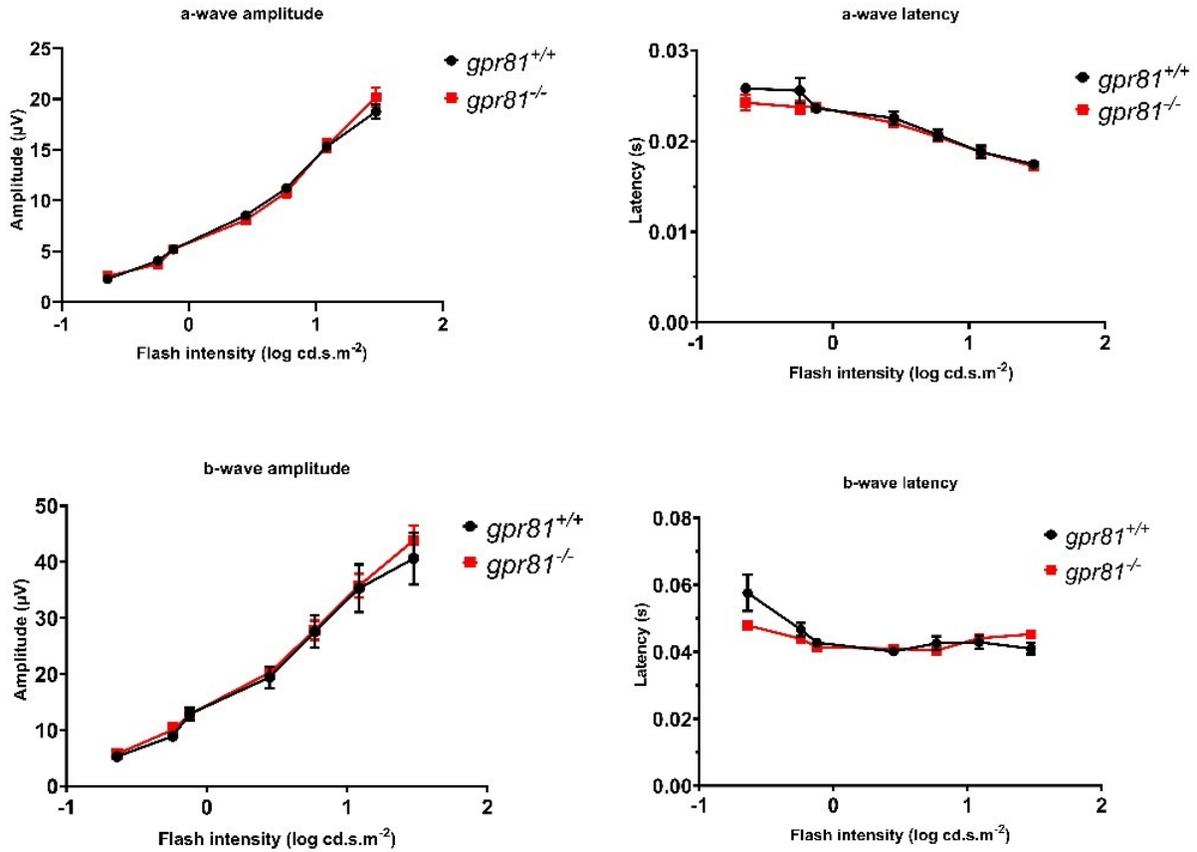
**Figure S3. Deletion of *gpr81* has no effect on visual acuity.** After the first day of eye opening (P15), the average visual acuity threshold expressed as cycle/degree (c/d) was measured until P54. No differences were detected between *gpr81*<sup>-/-</sup> and *gpr81*<sup>+/+</sup> mice (n=38 eyes in the *gpr81*<sup>-/-</sup> group and n=6 eyes in the *gpr81*<sup>+/+</sup> group). Vertical bars represent SD.

GPR81 Deletion Does Not Change the Retinal Function in Scotopic and Photopic Conditions

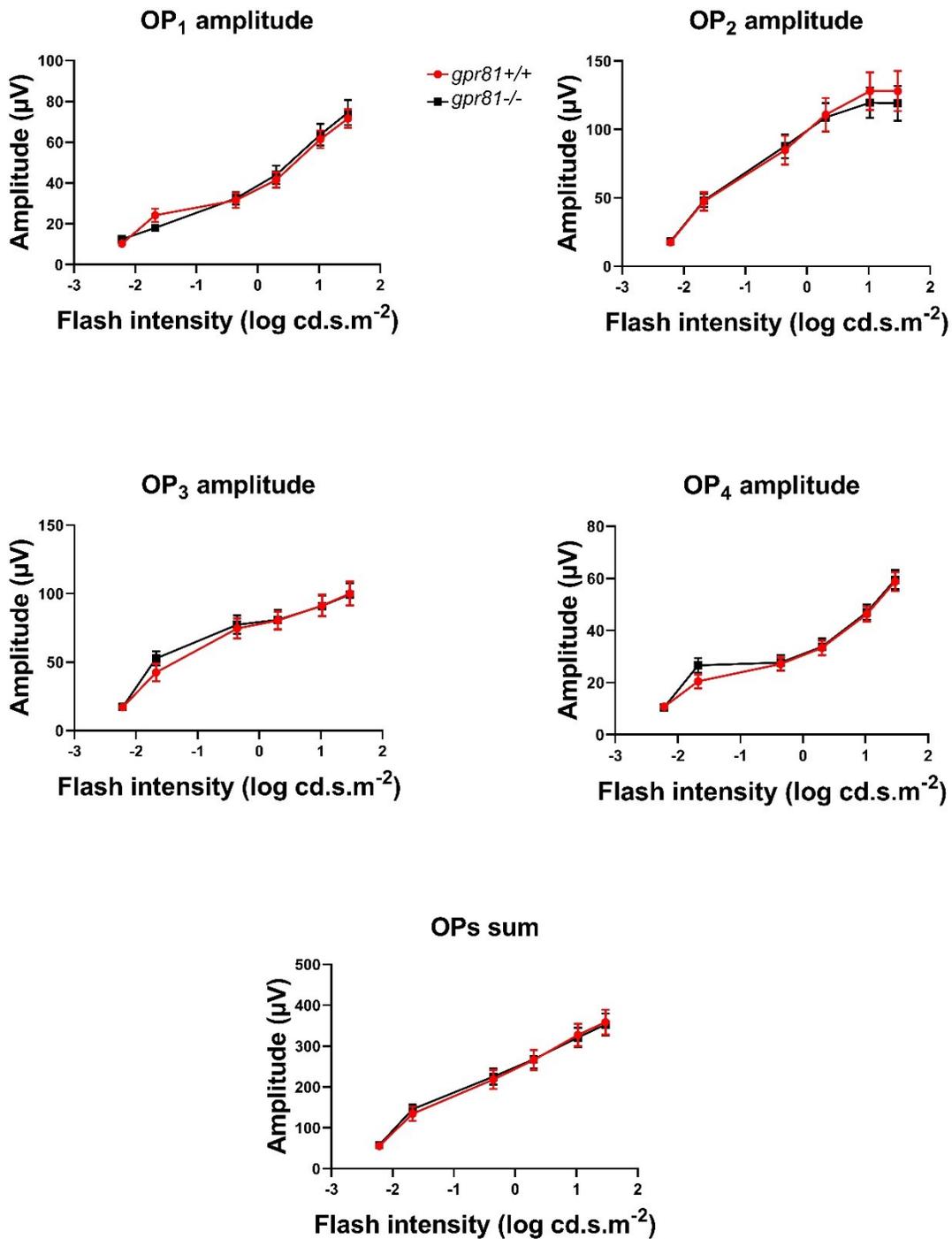


**Figure S4. Deletion of *gpr81* does not affect retinal function in scotopic conditions.** Representative example of ERG traces of *gpr81*<sup>+/+</sup> and *gpr81*<sup>-/-</sup> adult mice. The luminance-response function was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). The amplitude and latency of a- and b-waves respectively plotted as a function of flash luminance. The values are the mean ± SEM from all animals' eyes in both groups. (*gpr81*<sup>+/+</sup> = 18 eyes; *gpr81*<sup>-/-</sup> = 36 eyes).





**Figure S5. Deletion of *gpr81* does not affect retinal function in photopic conditions.** Representative example of ERG traces of *gpr81*<sup>+/+</sup> and *gpr81*<sup>-/-</sup> adult mice. The luminance-response function was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). The amplitude and latency of a-wave and b-wave respectively plotted as a function of flash's luminance. The values are the mean  $\pm$  SEM from all animals' eyes in each group. (*gpr81*<sup>+/+</sup> = 18 eyes; *gpr81*<sup>-/-</sup> = 36 eyes).



**Figure S6. Deletion of *gpr81* does not affect the amplitude of the oscillatory potentials in scotopic conditions.** Amplitude of each OP and the sum of all OPs plotted in function of the flash luminance intensity. The values are the mean  $\pm$  SEM from all animals' eyes in each group. (*gpr81*<sup>+/+</sup> = 18 eyes; *gpr81*<sup>-/-</sup> = 36 eyes).