

Université de Montréal

Implication du récepteur aux cannabinoïdes CB₂ dans le développement de la voie
rétinothalamique

Par

Gabriel Duff

École d'optométrie

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en sciences pharmaceutiques

option pharmacologie

août 2009

© Gabriel Duff, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Implication du récepteur aux cannabinoïdes CB₂ dans le développement de la voie
rétinothalamique

Présenté par :
Gabriel Duff

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Lévesque
président-rapporteur
Jean-François Bouchard
directeur de recherche
Christian Casanova
membre du jury

Résumé

Durant le développement du système visuel, les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) envoient des axones qui seront influencés par divers signaux guidant leur cône de croissance, permettant ainsi la navigation des axones vers leurs cibles terminales. Les endocannabinoïdes, des dérivés lipidiques activant les récepteurs aux cannabinoïdes (CB₁ et CB₂), sont présents de manière importante au cours du développement. Nous avons démontré que le récepteur CB₂ est exprimé à différents points du tractus visuel durant le développement du hamster. L'injection d'agonistes et d'agonistes inverses pour le récepteur CB₂ a modifié l'aire du cône de croissance et le nombre de filopodes présents à sa surface. De plus, l'injection d'un gradient d'agoniste du récepteur CB₂ produit la répulsion du cône de croissance tandis qu'un analogue de l'AMPC (db-AMPC) produit son attraction. Les effets du récepteur CB₂ sur le cône de croissance sont produits en modulant l'activité de la protéine kinase A (PKA), influençant la présence à la membrane cellulaire d'un récepteur à la nétrine-1 nommé Deleted in Colorectal Cancer (DCC). Notamment, pour que le récepteur CB₂ puisse moduler le guidage du cône de croissance, la présence fonctionnelle du récepteur DCC est essentielle. Suite à une injection intra-oculaire d'un agoniste inverse du récepteur CB₂, nous avons remarqué une augmentation de la longueur des branches collatérales des axones rétiniens au niveau du LTN (noyau lateral terminal). Nous avons également remarqué une diminution de la ségrégation des projections ganglionnaires au niveau du dLGN, le noyau genouillé lateral dorsal, chez les animaux transgéniques *cnr2*^{-/-}, ayant le gène codant pour le récepteur CB₂ inactif. Nos données suggèrent l'implication des endocannabinoïdes et de leur récepteur CB₂ dans la

modulation des processus de navigation axonale et de ségrégation lors du développement du système visuel.

Mots clés:

Cône de croissance, guidage axonal, DCC, AMPc, ségrégation, endocannabinoïde, système visuel

Abstract

Retinal projection navigation towards their visual targets is regulated by guidance molecules and growth cone transduction mechanisms. Here, we show that cannabinoid receptor 2 (CB₂R) is widely expressed throughout the visual pathway during development and in cultured retinal ganglion cells (RGCs) and cortical neurons. Both the number of filopodia and the surface area of the growth cone (GC) are modulated by CB₂R activity in a PKA-dependant manner. Furthermore, DCC is required for CB₂R induced morphological changes of the GC. CB₂R agonists induce GC chemorepulsion. Treatments altering CB₂R activity change retinal explants projections length. These effects are specific to CB₂R as no changes were observed in *cnr2* knockout mouse. A single intraocular injection of AM630 increases retinal projection branch length and aberrant projections were also observed. Moreover, we report defect in eye-specific segregation of retinal projections in the dLGN in *cnr2*^{-/-} mice. These findings highlight the modulatory role of endocannabinoids and their CB₂R during axon guidance.

Key words: Growth cone, CB₂R, axonal guidance, DCC, AMPc, development, segregation, endocannabinoid, visual system

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et des abréviations.....	viii
1.Introduction	1
1.1 Le cône de croissance	2
1.2 Mécanismes impliqués dans le guidage axonal.....	5
1.2.1 Molécules régulant la polymérisation de l'actine du cône de croissance	5
1.2.2 GTPases.....	9
1.2.3 Synthèse protéique locale	10
1.2.4 Autres mécanismes.....	11
1.3 Molécules participant à la formation de la voie rétinothalamique.....	12
1.4 Le système des cannabinoïdes	22
1.4.1 Les voies de signalisation stimulées par les récepteurs aux	
cannabinoïdes.....	24
1.4.2 Les ligands des récepteurs aux cannabinoïdes.....	27
1.4.3 Distribution des endocannabinoïdes et de leurs récepteurs au cours du	
développement et chez l'adulte.....	33
1.4.4 Rôles joués par le système des endocannabinoïdes durant le	
développement.....	36
1.5 Objectifs de la recherche menée dans le cadre du présent mémoire	40
Contribution des auteurs.....	42
2. Article scientifique	43
2.1 Cannabinoid receptor CB ₂ influences axon guidance via Deleted in Colorectal	
Cancer (DCC) (en préparation)	43
2.2 Summary	43

2.3 Introduction	44
2.4 Materials and Methods	47
2.5 Results.....	54
2.5.1 Spatio-temporal Localization of the CB ₂ R in the Developing Visual System	54
2.5.2 CB ₂ R Reorganizes GC Morphology.....	56
2.5.3 CB ₂ R Modulates RGC Projection Length	56
2.5.4 CB ₂ R Agonists Can Act as Chemotropic Factors.....	57
2.5.5 CB ₂ R Induced GC Morphological Changes Require PKA Activity	58
2.5.6 Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Receptor is required for CB ₂ R Action on GC.....	59
2.5.7 CB ₂ R modulates Retinal Projection Growth <i>in vivo</i>	60
2.5.8 CB ₂ R Knockout Mice Possess Deficits in dLGN Segregation	61
2.6 Discussion	62
2.6.1 CB ₂ R Localization in the Developing CNS.....	62
2.6.2 Signaling Pathway by which CB ₂ R modulates axon guidance.....	63
2.6.3 How Does CB ₂ R Act on Axon Pathfinding?	66
2.6.4 Effect on Segregation.....	67
2.6.5 Differences between CB ₁ R and CB ₂ R	67
2.7 References	69
3. Discussion générale	90
3.1 Le récepteur CB ₂ et les endocannabinoïdes forment-ils un système de guidage classique?.....	94
3.2 Importance de la recherche effectuée	96
3.3 Ce qui n'a pas bien fonctionné	97
3.4 Avenues futures	97
Remerciements.....	106
Sources documentaires	107

Liste des tableaux

Tableau I: Valeur des constantes d'inhibition de ligands pour CB ₁ R et CB ₂ R.....	28
---	----

Liste des figures

Figure 1 : Le cône de croissance neuronal.....	3
Figure 2 : Mécanisme de mouvement de l'actine	4
Figure 3 : Mécanisme d'action probable des protéines régulant la polymérisation de l'actine	8
Figure 4 : Visualisation des projections des CGRs	16
Figure 5: Voie de signalisation de la nétrine-1 via son récepteur DCC.....	19
Figure 6: Structure du récepteur CB ₂ humain	23
Figure 7: Voies de synthèse de l'anandamide	30
Figure 8: Voies de synthèse du 2-Arachidonoyl-glycerol.....	31
Article Figure 1 : Spatio-temporal Expression of the CB ₂ R and eCB Metabolizing Enzyme During postnatal Retinal Projection Development	74
Article Figure 2 : CB ₂ R Reorganizes the growth cone Morphology	76
Article Figure 3 : CB ₂ R Modulates Axon Length.....	78
Article Figure 4 : CB ₂ R agonists influence growth cone behavior	80
Article Figure 5 : CB ₂ R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector... 82	
Article Figure 6 : The DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB ₂ R Induced Reorganization of the GC.....	84
Article Figure 7 : CB ₂ R Modulates RGC Projection Development <i>In vivo</i>	86
Article Figure 8 : CB ₂ R Modulates Eye-specific Segregation in the dLGN.....	88
Article Figure 9 : Figure S-1 Expression of CB ₂ R in primary cortical neuron cultures... 89	

Liste des sigles et des abréviations

Δ^9 -THC: delta9-tétrahydrocannabinol

2-AG : 2-arachidonoglycérol

2-AGE: 2-arachidonoyl-glyceryl ester (noladin)

Abh4: alpha/beta-hydrolase 4

AEA : Anandamide N-arachidonoyl-dopamine (NADA)

Akt : protéine kinase B

AMPC: Adénosine monophosphate cyclique

ARNm: ARN messenger

Arp2/3: Actin-related proteins 2 et 3

BMP: Bone Morphogenetic Proteins

BrdU: Bromodeoxyuridine

BSA: Bovine Serum Albumine

CB₁R: Récepteur aux cannabinoïdes type 1

CB₂R: Récepteur aux cannabinoïdes type 2

Cdc42 : cell division cycle 42

cnr1: gène codant pour le récepteur CB₁

cnr2: gène codant pour le récepteur CB₂

CO : Chiasma optique

CGL : Corps genouillé latéral

CGR: Cellule ganglionnaire rétinienne

CTb: Sous-unité b de la toxine du choléra

CS: Collicules supérieurs

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

DAG: Diacylglycérol

DAGL: Diacylglycérol lipase

DCC: Deleted in colorectal cancer

DIG: Digoxigénine

DIV: Days *in vitro*

dLGN: dorsal lateral geniculate nucleus

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

DTN: Dorsal terminal nucleus

E4: Jour embryonnaire 4

Ena/VASP: Famille de protéines reliées à la motilité cellulaire

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FAAH: Fatty acid amide hydrolase

FBS: Foetal bovine serum

FITC: Fluoresceine Iso Thio Cyanate

FGF: Fibroblast growth factor

FSK: Forskolin

GAPs: GTPase activating proteins

GAP43: Growth associated protein 43

GC: Growth cone

GDP: Guanosine diphosphate

GAP : GTPase activating protein

GD: Jour de gestation

GDI: Guanine nucleotide-dissociation inhibitor

GDE1: Glycerophosphodiesterase 1

GEF: Guanine nucleotide-exchange factor

GMPc: Guanosine monophosphate cyclique

GPCR: Récepteur à protéine G

GPR55: G protein-coupled receptor 55

GP-NAPE: Glycerophospho-NAPE

GS: Goat serum

GTP: Guanosine triphosphate

GTPase: Famille d'enzymes hydrolysant le guanosine triphosphate

HRP: Horseradish peroxydase

KCl: Chlorure de potassium

Ki: Constante d'inhibiteur

LTN: Lateral terminus nucleus

MAPK : Mitogen-activated proteins kinase

mDIR/formin: mammalian homologue of formin homology protein family

MGL: Monoacylglycérol lipase

mTOR: mammalian Target of Rapamycin

NADA : N-arachidonoyl-dopamine

NAPE : N-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine

NAPE-PLD : NAPE-Phospholipase D

NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule

NDS: Normal donkey serum

NFL: Neurofilament L

N-WASP: Protéine neuronal du syndrome de Wiskott-Aldrich

OAE : O-arachidonoyl-ethanolamine (virodhamine)

Opa1: Optic atrophy protein 1

P5: 5 jours suivant la naissance

PA: 2-arachidonate-containing phosphatidic acid

PBS: Phosphate buffered saline

PI : 2-arachidonate-containing phosphoinositides

PI3K: Phosphoinositol-3 kinase

PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA: Protéine kinase A

PLA₂ : Phospholipase A₂

PND : Jour post-natal

PSBT: Phosphate buffered saline tween-20

Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate

RhoA: Ras homolog gene family member A

S6 : protéine ribosomale S6

SEM: Standard error of the mean

SNC: Système nerveux central

TBST: Tris buffered saline tween-20

WAVE : Protéine de la famille WASP Verprolin-homologue

Wnt: wingless integration site

À Cynthia et Judge Judy,
les deux femmes de ma vie

1.Introduction

Durant le développement du système visuel, les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) nouvellement formées envoient leurs axones hors de la rétine via le disque optique. À partir de ce point, ils convergent ensemble et forment les nerfs optiques. Ils vont par la suite se diriger vers le centre de l'hypothalamus au niveau du chiasma optique puis s'étendre dorsalement pour former les tractus optiques. Une fois qu'ils ont atteints leur destination principale, les collicules supérieurs chez les rongeurs, les axones des CGRs arrêtent leur navigation et forment des connections synaptiques (Mann, Harris et al. 2004). Ce processus complexe nécessite de nombreux médiateurs tels des facteurs de transcription, des molécules de guidage attractives ou répulsives ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire qui vont influencer le cône de croissance des axones. Malgré le fait que certains processus soient mieux compris à ce jour, l'identification des mécanismes de guidage demeure encore une question fondamentale en neurosciences.

La présence des endocannabinoïdes et de leurs récepteurs au cours du développement foetal et lors de la période post-natale suggère leur implication dans des phénomènes développementaux comme la prolifération, la migration des neurones, la survie cellulaire, le guidage axonal et la synaptogenèse (Fernandez-Ruiz, Berrendero et al. 2000). Ils pourraient donc avoir un rôle important à jouer dans le développement du système visuel.

1.1 Le cône de croissance

L'élément cellulaire principalement impliqué dans le phénomène de locomotion et de guidage des projections est le cône de croissance. Il est situé à l'extrémité des axones de neurones naviguant et sert de site à la formation de neurites. C'est une structure capable de détecter les molécules de guidage présentes dans son environnement immédiat et d'y réagir rapidement (Kalil and Dent 2005). La région centrale du cône de croissance est composée d'agglomérats de microtubules (Pollard and Borisy 2003). La forme particulière des filopodes et des lamellipodes, retrouvés aux extrémités du cône de croissance, est déterminée par le cytosquelette d'actine. Les lamellipodes sont composés de réseaux enchevêtrés de filaments d'actine (Svitkina, Verkhovsky et al. 1997; Svitkina and Borisy 1999) tandis que l'actine des filopodes est organisée en filaments longs et parallèles fortement agglomérés (Small 1988; Lewis and Bridgman 1992). C'est une protéine, la fascine, qui permet la formation de fascicules de F-actine de 8 à 9 nm de diamètre caractéristiques aux filopodes (Ishikawa, Sakamoto et al. 2003). Les filopodes, en forme de doigt, et les lamellipodes, en forme de toile voilée, sont importants pour l'adhésion et la mobilité du cône de croissance (Figure 1) (Tanaka and Sabry 1995). L'actine globulaire (G-actin) est polymérisée selon un mécanisme de débit rétrograde, c'est-à-dire qu'elle est incorporée à la terminaison du filopode, déplacée vers l'arrière et désassemblée au niveau de la région basale. La polymérisation de l'actine se fait donc uniquement aux extrémités du filament d'actine (Mallavarapu and Mitchison 1999). C'est par l'entremise de la myosine de type II qui lie les filaments d'actine que le phénomène de mouvement rétrograde est possible. Il est également régulé en grande partie par

les niveaux de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine. En effet, lorsque l'on inactive la myosine de type II, le mouvement rétrograde s'arrête et on observe une élongation du filopode (Lin, Espreafico et al. 1996). La balance entre les niveaux de polymérisation de l'actine à la terminaison et la perte au niveau de la région basale a été suggérée comme le mécanisme principal gouvernant le mouvement attractif ou répulsif du cône de croissance (Figure 2).

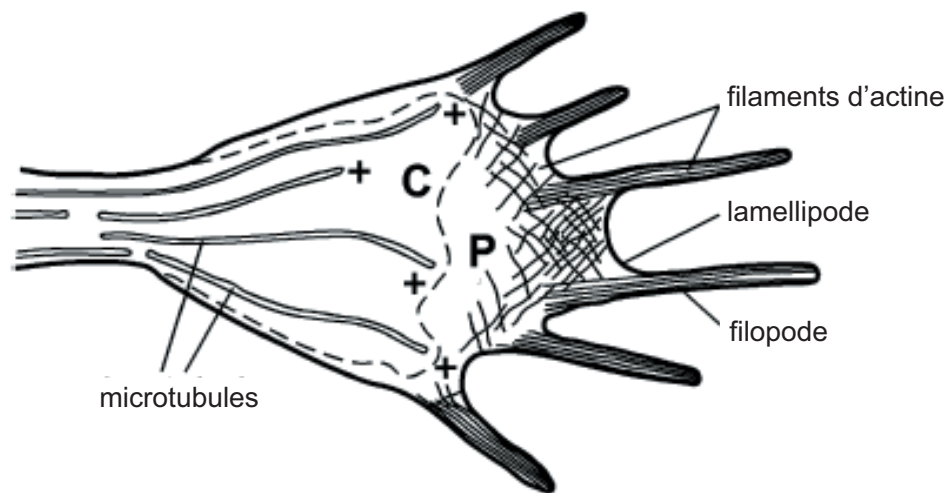


Figure 1 : Le cône de croissance neuronal.

Deux éléments du cytosquelette prédominent dans le cône de croissance. Les microtubules, localisés dans la région centrale (C) avec quelques prolongements qui s'étendent à la base des filopodes. Néanmoins, le domaine périphérique (P) contient majoritairement des filaments d'actine qui sont liés en faisceaux dans les filopodes et forment une toile entremêlée au niveau des lamellipodes.

Mueller, B. K. (1999). "Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding." *Annu Rev Neurosci* **22**: 351-88.

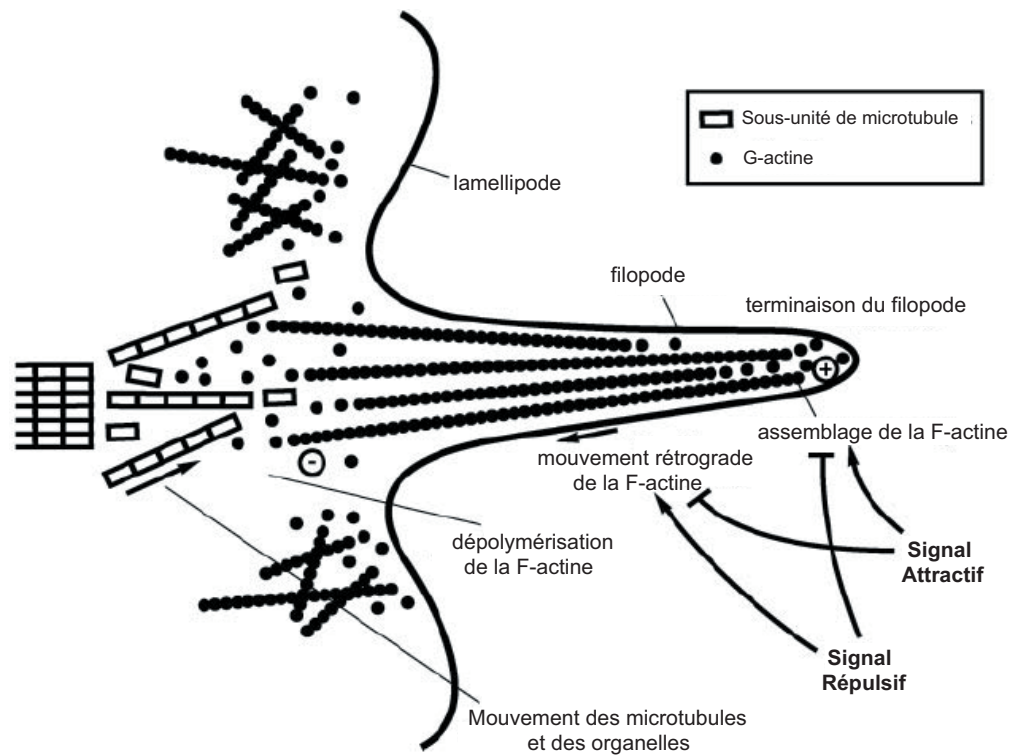


Figure 2 : Mécanisme de mouvement de l'actine

Les signaux répulsifs ou attractifs au cône de croissance vont moduler les niveaux de polymérisation de l'actine à la terminaison du filopode(+) ou de dépolymérisation à la base du filopode (-) ainsi que le mouvement rétrograde de l'actine. Le mouvement de l'actine peut se comparer à un tapis roulant.

Huber, A. B., A. L. Kolodkin, et al. (2003). "Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance." *Annu Rev Neurosci* **26**: 509-63.

Les cônes de croissance deviennent désorientés sans filopode (Bentley and Toroian-Raymond 1986; Chien, Rosenthal et al. 1993; Zheng, Wan et al. 1996). Leur rôle dans le changement directionnel du cône de croissance, n'est pas encore totalement élucidé, mais leur effet sur ce phénomène pourrait être lié à différentes

caractéristiques qui leur sont propres. Ces caractéristiques sont leur adhésion différentielle aux différents substrats (Letourneau 1975), la force mécanique qu'ils génèrent (Heidemann, Lamoureux et al. 1990) ou encore leur habileté à transmettre des signaux au cône de croissance (Davenport, Dou et al. 1993). Il est également connu que la polymérisation de l'actine permet l'extension de la bordure du cône de croissance (Pollard and Borisy 2003). D'un autre côté, les microtubules possèdent aussi une instabilité dynamique leur permettant d'explorer les filopodes et les lamellipodes (Dent, Callaway et al. 1999). L'inhibition de leur état dynamique permet d'abolir les changements de directions du cône de croissance. De plus, la stabilisation ou déstabilisation localisée des microtubules est suffisante pour induire l'attraction ou la répulsion du cône de croissance (Buck and Zheng 2002). Il semblerait donc que ce soit l'interaction de l'actine et des microtubules qui permette la fonction de motilité de la cellule et du cône de croissance (Rodriguez, Schaefer et al. 2003).

1.2 Mécanismes impliqués dans le guidage axonal

1.2.1 Molécules régulant la polymérisation de l'actine du cône de croissance

Il existe de nombreuses molécules présentement répertoriées permettant de réguler la polymérisation de l'actine de certaines régions particulières du cône de croissance (Figure 2).

L'Arp2/3 ("actin-related protein" 2 et 3) est un complexe macromoléculaire responsable de la formation des réseaux d'actine (Millard, Sharp et al. 2004). Il est le premier facteur nucléateur, i.e. facilitant la formation de filament d'actine, qui a été

identifié. Sa structure copie un intermédiaire de la polymérisation de l'actine (Pollard 2007). Lorsque le complexe est incorporé à l'actine, il possède deux sites de liaison, Arp2 et Arp3, où l'actine globulaire peut se polymériser avec un angle de 70° entre les deux sites, permettant la formation de réseaux d'actine (Mullins, Heuser et al. 1998).

N-WASP est une autre protéine possédant deux sites de liaison à l'actine globulaire et un site de liaison à Arp2/3. La liaison de PIP2 et de Cdc42, des seconds messagers intracellulaires, à N-WASP libère les sites de liaisons de l'actine et d'Arp2/3, qui sont normalement protégés par un domaine inhibiteur, ce qui résulte en une augmentation de la polymérisation de l'actine.

La protéine WAVE possède également un site de liaison à l'actine et un site de liaison à Arp2/3 et son activation augmente la polymérisation de l'actine (Takenawa and Miki 2001; Millard, Sharp et al. 2004). Elle est un facteur facilitant la formation de filaments d'actine ayant deux rôles principaux dans la nucléation. Premièrement, elle déclenche le changement conformationnel du complexe Arp2/3 permettant de rapprocher les deux sous-unités (Arp2 et Arp3). Ceci pourrait ainsi permettre de copier la conformation d'un dimère d'actine. De plus, elle permet le recrutement de monomères d'actine, une étape cruciale dans la nucléation puisque le complexe Arp2/3 se lie faiblement aux monomères d'actine (Goley and Welch 2006; Pollard 2007).

Il existe également mDIR/formin (mammalian homologue of formin homology protein family), elle aussi localisée à l'extrémité du cône de croissance, qui permet l'accélération de l'assemblage de l'actine (Kovar 2006). Cette famille de protéine agit

également comme facteur de nucléation. Les formines permettent de catalyser la formation de filament d'actine sans branche *in vitro* et l'assemblage de plusieurs structures d'actine *in vivo* (Faix and Grosse 2006; Goode and Eck 2007). Le mécanisme d'action de cette famille vient d'une haute affinité aux domaines FH2 des terminaisons des filaments d'actine. Il a été suggéré que les formines catalysent la polymérisation en stabilisant les dimères ou trimères d'actine formés spontanément au niveau du domaine FH2 (Pring, Evangelista et al. 2003). Les formines servent également de couronne aux terminaisons des filaments et se déplacent avec le filament en croissance (Goode and Eck 2007). Le mécanisme exact de ce processus n'est pas encore élucidé. Néanmoins, sa présence au niveau de la terminaison du filament d'actine permet d'augmenter la vitesse d'élongation jusqu'à 5 fois comparativement à une extrémité sans formine (Kovar, Harris et al. 2006). Aussi, différents types de formines provoquent des augmentations de vitesse d'élongation distinctes (1,25 à 5 fois d'augmentation).

Ena/VASP ("Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein") est une autre protéine localisée au bout des filopodes et aux extrémités des lamellipodes jouant un rôle important au niveau de la polymérisation de l'actine (Kwiatkowski, Gertler et al. 2003). Ena/VASP est l'autre type de facteur connu, permettant l'élongation de l'actine. Cette famille de protéine est exprimée chez les mammifères, localisée principalement dans les zones enrichies d'actine et contribue, entre autre, à la motilité cellulaire, le guidage axonal, l'adhésion cellulaire (Krause, Dent et al. 2003; Trichet, Sykes et al. 2008). Les protéines de cette famille forment des tétramères

contrairement aux formines (Haffner, Jarchau et al. 1995). Elles peuvent également protéger les terminaisons des filaments en croissance (Bear, Svitkina et al. 2002).

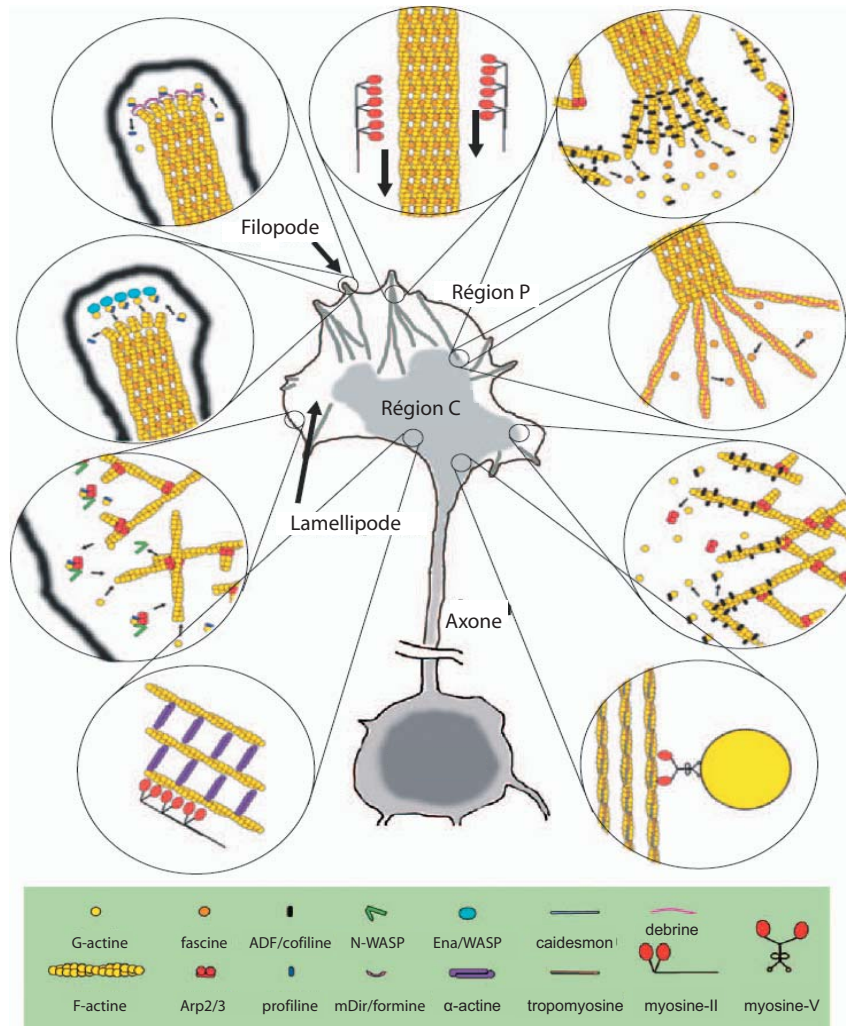


Figure 3 : Mécanisme d'action probable des protéines régulant la polymérisation de l'actine

Ishikawa, R. and K. Kohama (2007). "Actin-binding proteins in nerve cell growth cones." *J Pharmacol Sci* **105**(1): 6-11.

1.2.2 GTPases

L'observation des projections neuronales *in vivo* a révélé que les axones naviguent jusqu'à leurs principales cibles de manière coordonnée et stéréotypique, en ne faisant que très peu d'erreur de navigation. Ceci serait possible grâce à des signaux moléculaires retrouvés dans leur environnement (Goodman and Shatz 1993). Ce sont en fait les cônes de croissances des neurones qui vont être dirigés par une panoplie de signaux de guidage présents au niveau de leur microenvironnement, influençant leur progression et leur direction de croissance. Ces signaux peuvent être solubles ou liés à un substrat, ils vont également produire une réponse chimiotrophique (diminution ou augmentation de la croissance), une réponse chimiotropique positive (déplacement vers une source chimioattractrice) ou chimiotropique négative (éloignement d'une source chimiorépulsive) (Tessier-Lavigne and Goodman 1996).

Les cônes de croissance vont donc répondre aux familles de molécules de guidage tel que les nétrines, les sémaphorines, les slits et les éphrines, via des récepteurs spécifiques présents à leur membrane cellulaire suivant une signalisation impliquant entre autre la polymérisation de l'actine via la famille de GTPase Rho (Huber, Kolodkin et al. 2003). Ces petites molécules liant le GTP jouent un rôle important dans le phénomène de formation des filopodes et lamellipodes (Nobes and Hall 1995). Ces molécules sont activées en remplaçant un GDP par un GTP, via les protéines de la famille des GEFs (guanine nucleotide-exchange factors), et inactivées via une activité GTPase qui hydrolyse le GTP en GDP. La famille des protéines GAPs

(GTPase activating proteins) accélèrent l'hydrolyse de ce dernier. (Hall 1994; Cerione and Zheng 1996). Les protéines de la famille des GDIs (guanine nucleotide-dissociation inhibitors) séquestrent les GTPase Rho inactives, elles servent de réservoir cytosolique de GTPases Rho inactives (Olofsson 1999). Chez le fibroblaste, Cdc42, Rac et RhoA, 3 membres de la famille Rho GTPases ont été caractérisées et jouent un rôle essentiel lors de la formation de filopodes, de lamellipodes, des fibres de stress et de l'adhésion focale (Nobes and Hall 1995). RhoA est normalement séquestrée par les GDIs, qui sont exprimées à un niveau élevé dans la cellule. De nombreux modulateurs, incluant la protéine kinase A (PKA), stabilisent le complexe en phosphorylant un résidu C-terminal de RhoA (Lang, Gesbert et al. 1996). Un niveau élevé d'AMPc stimule la PKA qui à son tour inactive RhoA, ce qui se traduit par une prédominance de la voie de signalisation via Rac et Cdc42, entraînant une extension du filopode. Une diminution des niveaux d'AMPc mène à une baisse d'activation de la PKA ce qui entraîne l'affaissement du cône de croissance par l'activation de RhoA (Kozma, Sarner et al. 1997; Jaffe and Hall 2005).

1.2.3 Synthèse protéique locale

La synthèse protéique locale au niveau du cône de croissance pourrait aussi être un mécanisme de réponse important de plusieurs signaux de guidage (Campbell and Holt 2001; Brittis, Lu et al. 2002). Une des protéines ayant une modulation importante de sa synthèse locale est la β -actine. Un gradient d'information de guidage influençant le cône de croissance au niveau de son environnement immédiat mène à la translocation asymétrique des ARNm de cette protéine. Ce phénomène a entre autre

été étudié pour la nétrine-1, où l'on a observé des variations des taux d'ARNm codant pour la β -actine proportionnelles à celles de la nétrine-1 présente au niveau du cône de croissance. Il en résulte une synthèse locale asymétrique de la β -actine au niveau du cône de croissance ce qui permet, du moins partiellement, la réponse attractive à la nétrine-1, puisque celle-ci est abolie si on bloque la synthèse de la β -actine. Ce phénomène semble donc important pour la régulation de la motilité du cône de croissance en favorisant la décision directionnelle face aux potentiels signaux de guidage (Leung, van Horck et al. 2006; Yao, Sasaki et al. 2006).

1.2.4 Autres mécanismes

La trajectoire des axones navigant est normalement divisée en plusieurs segments. La plupart du temps, ces segments se terminent par des cellules spécialisées qui sont des cibles intermédiaires pouvant présenter des informations de guidage aux axones, leur permettant de procéder vers le prochain segment de leur trajectoire. Il est donc plus simple pour les axones de naviguer dans un petit segment, puis d'avoir un choix à faire pour le prochain segment. De plus, le processus de navigation se déroule en plusieurs étapes. Le premier axone qui entame sa navigation le fait dans un environnement sans axone chez un embryon assez petit. Néanmoins, la plupart des projections rencontrent un environnement en expansion avec une toile d'axones pionniers. D'autres axones, étant produits encore plus tard dans le développement, vont suivre les fascicules laissés par les autres axones, et ce pour au moins une partie de leur trajectoire (Raper, Bastiani et al. 1983; Goodman, Bastiani et al. 1984). C'est cette fasciculation sélective qui permet l'assemblage de systèmes

nerveux complexes, où les axones se rendent à leur cible en vagues successives sur une longue période de temps.

1.3 Molécules participant à la formation de la voie rétinothalamique

La navigation axonale des CGRs vers leurs noyaux terminaux au cours du développement du système visuel se déroule en suivant les caractéristiques présentées précédemment (Section 1.2.4).

Pour sortir de l'œil, les axones des CGRs doivent initialement naviguer le long de la surface vitréale rétinienne pour se diriger vers le centre de la rétine. Pour ce faire, ceux-ci croissent en contact étroit avec les cellules gliales de Müller et la lame basale vitréale qui expriment toutes deux des molécules d'adhésion et des molécules de la matrice extracellulaire telles les NCAM et L1. Ces molécules possèdent la capacité d'activer la cascade de signalisation du récepteur FGF qui est requise pour leur effet positif sur la mobilité du cône de croissance (Williams, Furness et al. 1994). Elles vont également permettre de stimuler la croissance axonale et elles servent comme signaux pour le guidage des axones (Stuermer and Bastmeyer 2000). Sonic Hedgehog est un autre signal localisé en faible concentration en périphérie et en concentration élevée au centre de la rétine qui promeut la croissance axonale des CGRs vers le disque optique (Kolpak, Zhang et al. 2005). Les axones sont aussi maintenus dans la couche des fibres optiques par des signaux répulsifs localisés sur d'autres couches de la rétine (Brittis and Silver 1995). Le système Slit-Robo semble jouer un rôle dans ce phénomène de contention des axones dans la couche des fibres optiques de la rétine puisque la délétion du gène codant pour Slit, un agoniste du

récepteur Robo, provoque l'apparition de projections axonales aberrantes hors de cette couche (Thompson, Camand et al. 2006). Des études *in vitro* ont de plus démontré le potentiel inhibiteur de ce système sur la croissance des CGRs (Niclou, Jia et al. 2000; Ringstedt, Braisted et al. 2000). Ces différents signaux attractifs et inhibiteurs agissent de concert pour permettre aux axones de se diriger vers le disque optique.

Lorsque ce dernier est atteint, les axones doivent effectuer leur premier changement majeur de direction, c'est-à-dire un virage à 90° pour aller profondément dans la rétine et sortir de l'œil pour former le nerf optique. Au disque optique, la nétrine-1 est exprimée sur les cellules gliales entourant le disque optique et semble agir sur une courte distance en attirant les axones des CGRs exprimant le récepteur DCC vers le nerf optique via la modulation de leur cône de croissance. De fait, la délétion du gène codant pour la nétrine-1 ou pour DCC permet le guidage normal des axones jusqu'au disque optique, cependant, les fibres ne peuvent pas sortir via le nerf optique, provoquant une hypoplasie de ce dernier (de la Torre, Hopker et al. 1997; Deiner, Kennedy et al. 1997). Plusieurs autres facteurs semblent affecter la trajectoire des axones au disque optique et leur sortie de l'œil notamment la signalisation des récepteurs BMP et les NCAM (Birgbauer, Oster et al. 2001; Liu, Wilson et al. 2003; Zelina, Avci et al. 2005).

En quittant l'œil, les axones sont confinés dans la zone du nerf optique en développement par les signaux de Sema5A, formant un feuillet inhibiteur entourant la région du nerf optique (Oster, Bodeker et al. 2003). Les axones provenant de

chaque œil naviguent vers la zone centrale du diencephale où ils se croisent formant le X caractéristique du chiasma optique (Figure 4). Les molécules Slits sont exprimées au niveau de la zone centrale du diencephale et entourent de manière inhibitrice la zone où le chiasma optique se développe (Erskine, Williams et al. 2000; Bagri, Marin et al. 2002; Hutson and Chien 2002). Pour sa part, Sonic Hedgehog aurait un rôle inhibiteur dans cette partie du tractus optique et son absence est essentielle pour que les axones puissent traverser la zone centrale du chiasma optique (Trousse, Marti et al. 2001). Chez les espèces binoculaires, lorsque les axones des CGRs approchent la zone centrale du chiasma optique, ils doivent décider s'ils traversent (projection controlatérale) ou non (projection ipsilatérale) cette zone médiane. Les éphrines-B joue un rôle important dans cette divergence des projections ipsilatérales au niveau de la zone centrale, ce qui a été démontré chez le Xénopus (Nakagawa, Brennan et al. 2000). Chez la souris, l'éphrineB2 est exprimée au niveau du chiasma au moment où les axones ipsilatéraux se retrouvent dans la zone centrale et cette molécule est essentielle dans la formation des projections ipsilatérales. EphB1, son récepteur, est exprimé par les cônes de croissance des axones ipsilatéraux des CGRs et une délétion de celui-ci mène à une diminution marquée projections ipsilatérales (Williams, Mann et al. 2003). Les mécanismes permettant aux axones controlatéraux de traverser la zone médiane sont encore peu connus. Pour l'instant, NCAM, qui est exprimé au niveau des cônes de croissances des axones des CGRs envoyant des projections controlatérales, est important pour ce processus, puisque son inactivation augmente les projections ipsilatérales *in vivo* et diminue la croissance des projections controlatérales *in vitro* (Williams, Grumet et al. 2006). Sema3D semble aussi être

impliqué dans la navigation des axones vers le tractus visuel controlatéral (Sakai and Halloran 2006). La nécessité des signaux permettant le passage de la zone centrale du chiasma démontre que les axones ne projettent pas controlatéralement par défaut, mais sont plutôt guidées par un processus actif leur permettant de prendre une décision directionnelle.

L'activité de GAP-43 est nécessaire pour la progression des axones du chiasma vers le tractus optique pour pouvoir outrepasser les signaux inhibiteurs de cette zone du diencephale (Kruger, Tam et al. 1998; Zhang, Lu et al. 2000). La signalisation de Slit-Robo sert d'inhibiteur prévenant l'éloignement des axones hors du tractus optique et la formation de projections aberrantes (Ringstedt, Braisted et al. 2000; Thompson, Barker et al. 2006). Similairement, le protéoglycane chondroïtine sulfate exprimé au niveau des cellules telencéphaliques sert aussi de barrière inhibitrice délimitant la partie antérieure du telencéphale (Ichijo and Kawabata 2001). De plus, la N-cadhérine et l'intégrine β -1 maintiennent les axones des CRGs dans le tractus optique (Stone and Sakaguchi 1996). Ces deux dernières protéines semblent aussi avoir la capacité d'interagir avec les Slits dans le développement du système visuel (Rhee, Mahfooz et al. 2002; Stevens and Jacobs 2002). La signalisation médiée par le récepteur du FGF est aussi nécessaire pour permettre l'entrée des projections au niveau du tectum chez le Xénope (McFarlane, McNeill et al. 1995; McFarlane, Cornel et al. 1996).

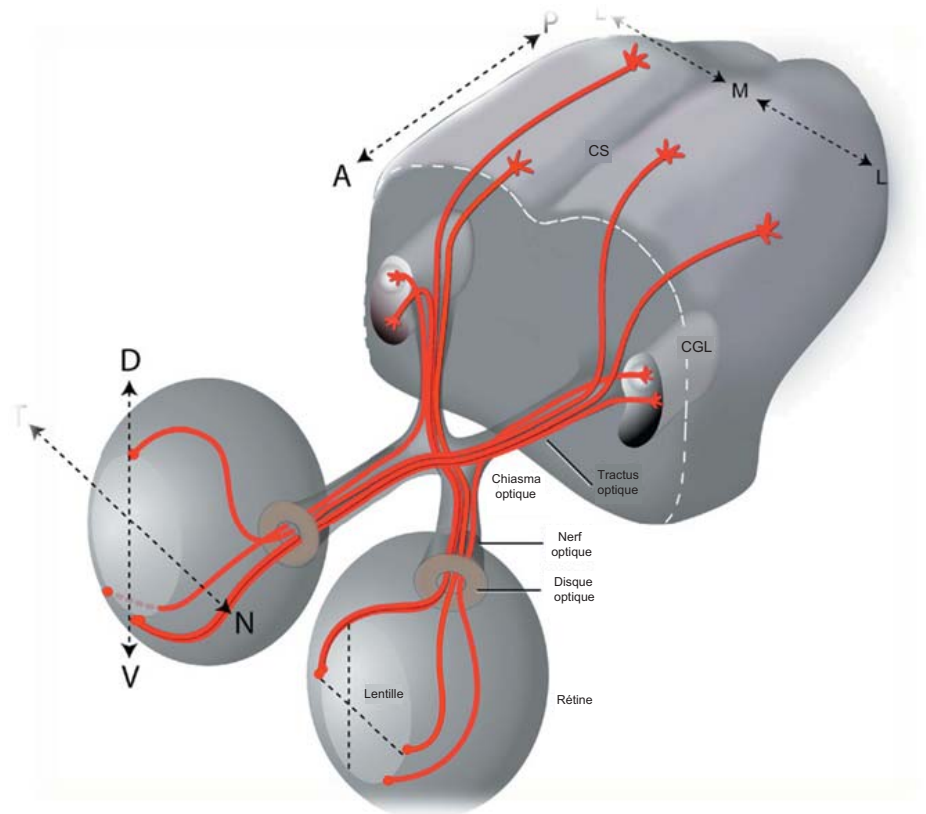


Figure 4 : Visualisation des projections des CGRs

Les CGRs localisés au niveau de la rétine envoient des projections qui vont naviguer à travers le nerf optique pour atteindre le chiasma optique où il se produit une décussation d'une partie des fibres, résultant en des projections controlatérales et ipsilatérales provenant de chacun des yeux. Par la suite, les projections vont naviguer à travers le thalamus pour atteindre leurs noyaux terminaux, le CGL et les CS.

Erskine, L. and E. Herrera (2007). "The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance." *Dev Biol* **308**(1): 1-14.

La topographie des projections aux principaux noyaux visuels, les collicules supérieurs (CS) et le corps genouillé latéral (CGL), est aussi médiée par des molécules

exprimées en gradients. Au niveau du tectum et des CS, la famille de l'éphrine-A et son récepteur EphA sont nécessaires pour la formation d'une carte de projections dans l'axe antéropostérieur et pour la topographie de l'axe dorsoventral (Frisen, Yates et al. 1998; Feldheim, Kim et al. 2000). Pour la formation de la carte de l'axe medio-latéral du tectum et des CS, c'est la famille des éphrines-B et les récepteurs EphB, disposés en gradient dans cet axe, qui influencent le phénomène en jouant comme signaux attracteurs (Hindges, McLaughlin et al. 2002). Un membre de la famille Wnt, le Wnt3, est également exprimé selon un gradient identique aux éphrines-B au niveau du tectum et des CS, mais il agit plutôt comme signal répulsif (Schmitt, Shi et al. 2006). Ces deux gradients attractifs et répulsifs agiraient donc de manière coordonnée pour établir avec précision la carte topographique du tectum et des CS. Au niveau du CGL, la famille de l'éphrine-A est exprimée en gradient médio-latéral. Si le signal médié par l'éphrine-A5 est absent, il en résulte une perte de précision de la carte topographique du CGL (Feldheim, Vanderhaeghen et al. 1998).

Chez les espèces binoculaires, les projections des deux yeux s'entremêlent au niveau du CGL. Un processus de ségrégation des projections permet la formation de couches spécifiques à chacun des yeux chez l'adulte (Shatz 1983). L'activité de la rétine est essentielle pour ce phénomène (Penn, Riquelme et al. 1998; Chapman 2000; Stellwagen and Shatz 2002), néanmoins, la distribution des projections ne peut être seulement expliquée par un mécanisme d'activité spontanée de la rétine. De fait, si on perturbe l'expression du système de l'éphrine-A, il se produit des erreurs de cible au niveau du CGL (Huberman, Murray et al. 2005; Pfeiffenberger, Cutforth et al. 2005). Ce serait donc une combinaison de l'activité de la rétine et de la présence de

signaux moléculaires spécifiques qui dicterait la forme, la taille et la position des territoires des projections respectives à chacun des yeux.

Les diverses molécules de guidage vont provoquer une réponse au niveau du cône de croissance via leurs récepteurs respectifs. DCC est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de la superfamille des immunoglobulines exprimé par les axones des neurones commissuraux lorsqu'ils sont attirés vers la plaque de plancher, une source de nétrine-1 (Keino-Masu, Masu et al. 1996). Le récepteur est également exprimé par les projections des CGRs et participe à la navigation du système visuel en développement, comme expliqué précédemment. DCC, lorsque lié à la nétrine-1, recrute des signaux intracellulaires dirigeant l'organisation de l'actine en modifiant directement le cytosquelette (Figure 5). Son activation permet une augmentation de l'aire du cône de croissance via l'activité de Cdc42 et de Rac1 (Shekarabi, Moore et al. 2005). Selon des études effectuées sur des fibroblastes, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) a été impliquée dans la formation de lamellipodes et cell division cycle 42 (Cdc42), dans celle de filopodes (Ridley 2001). La nétrine-1 augmente légèrement la quantité de DCC à la membrane cellulaire, l'activation de la PKA augmente la mobilisation de DCC présent dans les vésicules intracellulaires vers la surface de la membrane plasmique neuronale, ce qui accroît la croissance axonale. L'action de la PKA serait possiblement indirecte puisque son activité permettrait d'augmenter la translocation du récepteur à la membrane, mais ce serait la présence de la nétrine-1 qui stabiliserait le récepteur à la surface membranaire (Bouchard, Moore et al. 2004). Lorsque l'activité de l'adénylate cyclase ou de la PKA est inhibée ou lorsque l'exocytose est bloquée, le mécanisme de

translocation de DCC est bloqué. Ceci nous porte à penser que les taux d'AMPc intracellulaires déterminent l'interaction entre la nétrine-1 et son récepteur DCC et, du même coup, modifie le guidage axonal.

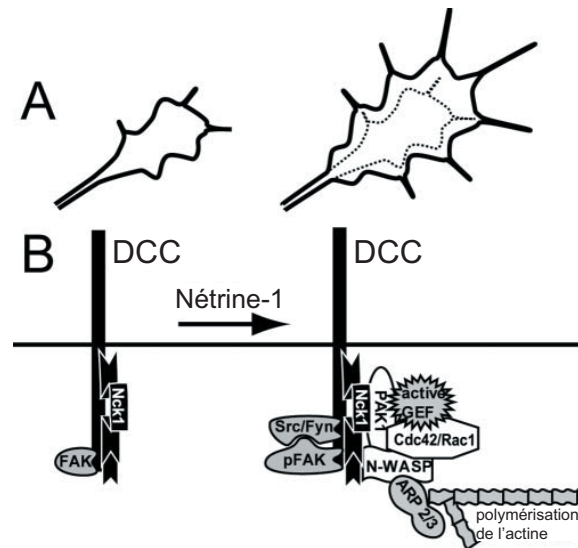


Figure 5: Voie de signalisation de la nétrine-1 via son récepteur DCC

L'activation du récepteur DCC par la nétrine-1 passe par la voie des Rho GTPases Cdc42 et Rac1, ce qui mène à la polymérisation de l'actine au niveau du cône de croissance et, ainsi, à son extension.

Shekarabi, M., S. W. Moore, et al. (2005). "Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion." *J Neurosci* **25**(12): 3132-41.

En effet, les niveaux intracellulaires de certains seconds messagers influencent l'effet de certains signaux de guidage, notamment le ratio d'AMPc : GMPc, peut varier et convertir un effet attractif en un effet répulsif (Song, Ming et al.

1997; Song, Ming et al. 1998). En conséquence, la réponse à la nétrine-1 peut être modulée suite à une variation des niveaux d'AMPC cytosolique (Ming, Song et al. 1997). Celle-ci semble donc être dépendante d'autres signaux concomitants qui vont modifier les niveaux d'AMPC intracellulaire. Notamment, la laminine-1, une protéine de la matrice extracellulaire, semble être capable d'empêcher l'augmentation des niveaux d'AMPC induits par la nétrine-1 chez des cultures de CGRs. De fait, la combinaison de la laminine-1 et de la nétrine-1 au niveau de la surface de la rétine permettrait la répulsion des projections ganglionnaires, les dirigeant ainsi vers le nerf optique (Hopker, Shewan et al. 1999). Il en est de même pour la réponse de Slit2, un membre de la famille des slits, lors d'une combinaison avec la laminine-1 puisque celle-ci modifie l'attraction, normalement observée, des axones naviguant vers leurs tissus cibles en une répulsion. (Nguyen-Ba-Charvet, Brose et al. 2001). Par ailleurs, la nétrine-1 agit comme une molécule répulsive plus loin au niveau du système visuel en formation. En effet, la réponse *in vitro* des axones de CGRs à un gradient de nétrine-1 dépend du stade de développement cellulaire. Les axones de CGRs n'ayant pas quitté l'œil démontrent une attraction à la nétrine-1, ceux ayant poussé à travers le disque optique sont insensibles à la nétrine-1 et ceux ayant dépassé le chiasma optique sont fortement repoussés par cette molécule (Shewan, Dwivedy et al. 2002). Des CGRs ayant été cultivés *in vitro* sans avoir navigué dans les aires visuelles démontrent aussi de la répulsion à la nétrine-1. D'autres seconds messagers comme le calcium intracellulaire posséderaient les mêmes propriétés de modulation de la réponse du cône de croissance (Nishiyama, Hoshino et al. 2003). Il semble donc probable que le cône de croissance ne soit pas directement attiré ou repoussé par des facteurs

intrinsèques aux molécules de guidage, mais ce serait plutôt l'état du cône de croissance répondant à ces facteurs, notamment le niveau de seconds messagers intracellulaires, qui déterminerait la réponse du cône aux signaux environnementaux.

L'AMPC est un second messenger important pour plusieurs phénomènes développementaux dont la croissance axonale (Meyer-Franke, Kaplan et al. 1995; Meyer-Franke, Wilkinson et al. 1998; Bouchard, Moore et al. 2004). Les niveaux endogènes d'AMPC rétinien diminuent au cours du développement durant la première semaine suivant la naissance chez le hamster (Argaw, Duff et al. 2008). Ceci est similaire à la diminution des niveaux d'AMPC observée pour des cellules ganglionnaires de la base dorsale et CGRs purifiées de rat *in vivo*. Le développement de neurones dissociés de ces deux types cellulaires dépend donc des niveaux endogènes de ce second messenger (Cai, Qiu et al. 2001). *In vivo*, l'injection intraoculaire d'un analogue de l'AMPC a permis d'accélérer la croissance des projections ganglionnaires de la rétine vers leurs noyaux terminaux sans toutefois provoquer des projections aberrantes (Argaw, Duff et al. 2008). De plus, les niveaux d'AMPC semblent être importants au cours du processus de régénération des axones. En effet, l'addition d'analogues de l'AMPC à un mélange de facteurs de croissance a augmenté le nombre d'axones se régénérant dans l'environnement inhibiteur du cerveau en développement (Cui, Yip et al. 2003; Lu, Li et al. 2004; Rodger, Goto et al. 2005; Hu, Cui et al. 2007). L'AMPC est également un second messenger important dans le phénomène de la ségrégation des projections rétino-fuges spécifiques à chaque œil (Stellwagen, Shatz et al. 1999; Ravary, Muzerelle et al. 2003; Nicol, Bennis et al. 2006). Les niveaux d'AMPC intracellulaires doivent être dynamiques pour que ce phénomène

soit possible. C'est via l'activité spontanée de la rétine, régulant les niveaux d'AMPC, qu'il peut y avoir une rétraction axonale des projections rétiniennes via l'éphrine-A (Nicol, Voyatzis et al. 2007).

1.4 Le système des cannabinoïdes

La famille des récepteurs activant un mécanisme de signalisation intracellulaire impliquant une protéine hétérotrimérique liant le GTP, la protéine G, ont des caractéristiques structurales similaires, mais peuvent lier une grande quantité de ligands tels des acides aminés, des petits peptides, des protéines et des glycoprotéines (Strader, Fong et al. 1994). Les protéines G hétérotrimériques sont composées de trois sous-unités distinctes, α , β et γ et l'activation du récepteur résulte en l'échange d'un GDP pour un GTP au niveau de la sous-unité α de la protéine G. Il s'ensuit une dissociation de la protéine G du récepteur et la séparation de la sous-unité α de la sous-unité $\beta\gamma$. Les deux sous-unités sont chacune capables de réguler une grande variété de signaux intracellulaires différents (Gudermann, Schoneberg et al. 1997). Tous les récepteurs de cette famille, les récepteurs à protéine-G (GPCRs), possèdent 7 domaines transmembranaires caractéristiques à cette famille de récepteurs. Les récepteurs cannabinoïdes sont des membres à part entière de la famille des récepteurs à protéine G. Deux récepteurs sont présentement répertoriés : CB₁, retrouvé majoritairement au niveau des cellules neuronales et du cerveau et CB₂ (Figure 6), retrouvé principalement au niveau des cellules et tissus immunitaires chez l'adulte (Howlett, Barth et al. 2002). De plus, le récepteur couplé aux protéines G orphelin GPR55 vient maintenant s'ajouter aux récepteurs CB₁ et CB₂, de par son

affinité pour les endocannabinoïdes (Mackie 2006; Mackie and Stella 2006; Petitet, Donlan et al. 2006; Harkany, Guzman et al. 2007).

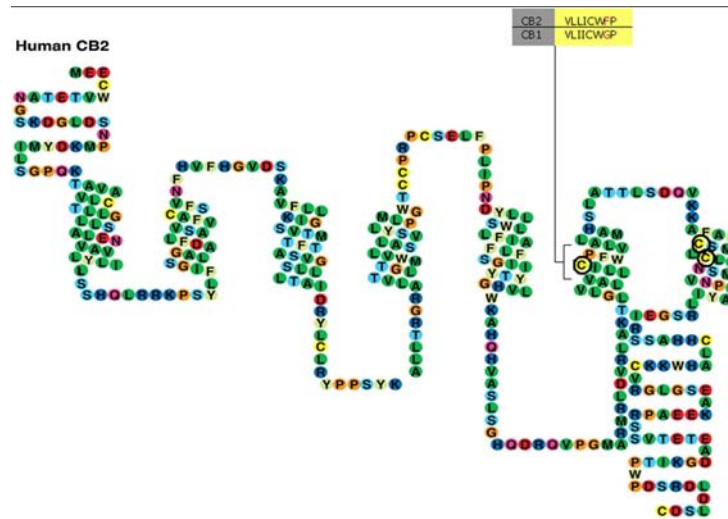


Figure 6: Structure du récepteur CB₂ humain

Le récepteur CB₂ est un récepteur de la famille des protéines G possédant 7 domaines transmembranaires. Le récepteur CB₂ possède une homologie de structure de 44% avec le récepteur CB₁ quand on le compare dans son ensemble. Les 7 segments transmembranaires ont une homologie plus élevée avec 68% de ressemblance. Pour sa part, le nouveau récepteur aux cannabinoïdes GPR55 ne possède que 14,4% d'homologie de structure avec le récepteur CB₂.

Pei, Y., R. W. Mercier, et al. (2008). "Ligand-binding architecture of human CB2 cannabinoid receptor: evidence for receptor subtype-specific binding motif and modeling GPCR activation." *Chem Biol* **15**(11): 1207-19.

Plusieurs études récentes ont démontré que les récepteurs aux cannabinoïdes ainsi que leurs ligands endogènes, les endocannabinoïdes, forment un système modulateur qui est impliqué dans fonctions spécifiques du cerveau telles la

nociception, le contrôle du mouvement, la mémoire et la régulation neuroendocrine (Fernandez-Ruiz, Berrendero et al. 2000). C'est via une régulation au niveau des synapses que ce système pourrait agir sur ces différents processus (Di Marzo, Melck et al. 1998). Le rôle des endocannabinoïdes au niveau de la régulation synaptique est très bien documenté via les effets de la marijuana sur les fonctions cérébrales. Ces effets ont d'ailleurs mené à la découverte de son principal composé psychoactif, le delta9-tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), ainsi que la découverte du récepteur impliqué, le récepteur CB₁ (Martin 1986; Matsuda, Lolait et al. 1990; Mackie and Hille 1992). Les endocannabinoïdes affectent les processus synaptiques par un mécanisme de régulation rétrograde. Ils sont synthétisés de manière activité-dépendante au niveau post-synaptique, sont libérés au niveau de la fente synaptique où ils vont se lier aux récepteurs CB₁ pré-synaptiques des neurones afférents excitateurs ou inhibiteurs, diminuant de fait même la relâche de neurotransmetteurs de ces neurones (Wilson and Nicoll 2001; Chevaleyre, Takahashi et al. 2006). Au niveau de la synapse, les cannabinoïdes produisent leurs effets grâce à une modulation de l'activité des canaux ioniques (Vaughan and Christie 2005).

1.4.1 Les voies de signalisation stimulées par les récepteurs aux cannabinoïdes

Les récepteurs CB₁ et CB₂ peuvent agir selon plusieurs mécanismes d'actions qui dépendent du type cellulaire stimulé. Leur voie de signalisation principale se fait via l'inhibition de la production d'AMPC par l'adénylate cyclase, par l'activité de la sous-unité α de la protéine G. En effet, cette inhibition peut être empêchée par la toxine pertussique pour les deux types de récepteurs ce qui indique l'activation d'une

protéine Gi/o (Howlett, Qualy et al. 1986; Felder, Joyce et al. 1995; Howlett 1995). La régulation des activités cellulaires par protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) est une voie importante pour la modulation de la réponse neuronale (Childers and Deadwyler 1996). Les deux récepteurs semblent aussi pouvoir réguler la famille des mitogen-activated proteins kinases (MAPK) (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995). De plus, l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂ provoque une élévation rapide des niveaux intracellulaires de Ca²⁺ libre dans les tissus neuronaux (Sugiura, Kodaka et al. 1997; Sugiura, Kondo et al. 2000). Les récepteurs aux cannabinoïdes influencent également la voie de signalisation du phosphoinositol-3 kinase (PI3K/Akt) (Molina-Holgado, Vela et al. 2002). Le récepteur CB₁ possède une activité qui lui est propre puisqu'il peut se coupler avec des canaux ioniques. En effet, son activité permet l'inhibition de canaux calciques voltage-dépendant (Mackie and Hille 1992), ainsi que l'activation de canaux potassiques (Mackie, Lai et al. 1995). Dû à sa récente entrée dans l'univers des récepteurs aux endocannabinoïdes, la signalisation du récepteur GPR55 est présentement au moins partiellement connue. En fait, son activité impliquerait la voie de la PI3K, entraînant par le fait même une augmentation du calcium intracellulaire (Lauckner, Jensen et al. 2008). Le récepteur GPR55 peut également se coupler avec une protéine de la famille G α , menant à l'activation de RhoA, ce qui pourrait potentiellement en faire un acteur intéressant dans le guidage axonal (Lauckner, Jensen et al. 2008; Waldeck-Weiermair, Zoratti et al. 2008; Henstridge, Balenga et al. 2009).

Les récepteurs CB₁ et CB₂ possèdent une grande quantité de signaux intracellulaires distincts. La variété de seconds messagers activés suite à la stimulation

des récepteurs aux cannabinoïdes pourrait être attribuable à la capacité d'homodimérisation/hétérodimérisation des récepteurs. Cet état d'hétérodimérisation du récepteur CB₁ a déjà été observée avec le récepteur μ opioïde *in vitro* et l'homodimérisation du récepteur CB₁ *in vivo* (Devi 2000; Wager-Miller, Westenbroek et al. 2002; Rios, Gomes et al. 2006). La variété de réponse aux récepteurs aux cannabinoïdes pourrait également être due à la présence de récepteurs provenant d'un épissage des ARNm. En effet, deux variantes du récepteur CB₁ humain ont été identifiées et sont exprimées à de faible niveau dans divers tissus (Ryberg, Vu et al. 2005). Une autre hypothèse qui pourrait expliquer la variété de signaux des récepteurs vient des évidences démontrant que les récepteurs à protéine G possèdent différentes conformations actives et qu'un agoniste spécifique aurait la capacité d'activer une conformation particulière, stimulant par le fait même une voie de signalisation spécifique (Kenakin 2002). Cette activation dépendante du ligand de la réponse intracellulaire a d'ailleurs déjà été démontrée pour le récepteur CB₁ (Bonhaus, Chang et al. 1998).

Il est aussi important de prendre en considération que les récepteurs sont plus que des interrupteurs qui ne peuvent avoir qu'un état actif et un état inactif. De fait, il a été démontré que plusieurs récepteurs à protéine G sont constitutivement actifs, c'est-à-dire qu'il peuvent réguler leurs seconds messagers intracellulaires, et ce même en absence d'un agoniste (Kenakin 2001). Le récepteur CB₁ et le récepteur CB₂ sont deux récepteurs constitutivement actifs, étant phosphorylés et internalisés même lors de leur activité basale (Bouaboula, Perrachon et al. 1997; Bouaboula, Dussossoy et al. 1999). Les ligands ayant la capacité d'inhiber les récepteurs autoactivés sont appelés agonistes inverses (Strange 2002; Prather 2004). Le JTE907

et l'AM630 qui seront utilisés dans mon projet de recherche sont tous les deux des agonistes inverses pour le récepteur CB₂ (Ross, Brockie et al. 1999; Iwamura, Suzuki et al. 2001).

1.4.2 Les ligands des récepteurs aux cannabinoïdes

Puisque les récepteurs CB₁ et CB₂ possèdent une certaine homologie, la plupart des ligands pouvant moduler l'activité d'un des récepteurs peuvent également agir sur l'autre récepteur. De plus, le fait que les deux récepteurs peuvent se retrouver sur le même type cellulaire durant le développement nous incite à bien comprendre cette spécificité intrinsèque de chacun des ligands. La constante d'inhibition (K_i), qui représente la concentration pour laquelle la moitié des sites d'un type de récepteur sont occupés, nous permet de déterminer la spécificité des différents ligands. On peut donc clairement dire que l'agoniste JWH133 possède une meilleure sélectivité que le JWH015 pour le récepteur CB₂, les concentrations requises pour observer la K_i pour ce récepteur étant 200 fois plus élevées pour le JWH133 et 27 fois pour le JWH015 que les concentrations pour le récepteur CB₁. Pour leur part, les deux agonistes inverses, AM630 et JTE907, possèdent respectivement une sélectivité 165 fois et 441 fois plus élevée pour le récepteur CB₂ que pour le récepteur CB₁.

Tableau I : Valeur des constantes d'inhibition de ligands pour les récepteurs CB₁ et CB₂

Ligand	Valeur Ki CB ₁ (nM)	Valeur Ki CB ₂ (nM)
Agoniste sélectifs pour CB ₂		
JWH133	677	3.4
JWH015	383	13.8
Agoniste inverse sélectif pour CB ₁		
Rimonabant (SR141716A)	1,8	514
Agonistes inverses sélectifs pour CB ₂		
AM630	5152	31.2
JTE907	684	1.55

Cannabinoids and the Brain, Köfalvi 2008

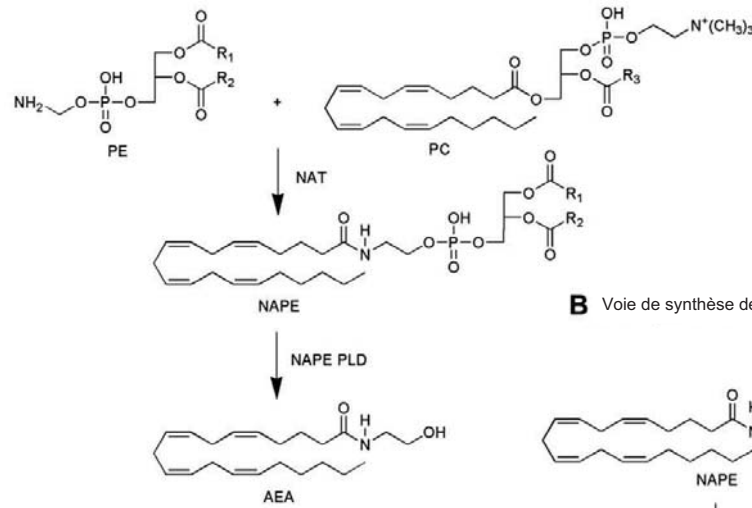
Plusieurs substances produites par le corps ayant une action sur les récepteurs cannabinoïdes, couramment nommé les endocannabinoïdes, ont déjà été répertoriées. L'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoglycérol (2-AG) sont les deux principaux médiateurs lipidiques agissant sur les deux récepteurs cannabinoïdes. Néanmoins, d'autres endocannabinoïdes dérivés de l'acide arachidonique ont été découverts : le 2-arachidonyl-glyceryl ester (noladin, 2-AGE), le O-arachidonoyl-ethanolamine (virodhamine, OAE) et le N-arachidonoyl-dopamine (NADA) (Bisogno, Melck et al. 2000; Hanus, Abu-Lafi et al. 2001; Huang, Bisogno et al. 2002; Porter, Sauer et al. 2002). Ce sont les récepteurs aux cannabinoïdes, les endocannabinoïdes et les enzymes de synthèse et de dégradation des ligands aux récepteurs qui constituent le système endocannabinoïde. Les deux endocannabinoïdes les plus étudiés proviennent de précurseurs dérivés de phospholipides membranaires. La

synthèse de l'AEA se produit suite au transfert d'un groupement acyl de la position sn-1 d'un phospholipide à la position-N d'un phosphatidylethanolamine, le tout catalysé par une trans-acyclase Ca^{2+} dépendante. Le N-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine (NAPE) résultant est hydrolysé par une phospholipase D sélective pour les NAPEs, la NAPE-PLD, produisant le AEA (Figure 7) (Schmid, Schmid et al. 1990; Hansen, Lauritzen et al. 1998). Une autre voie de formation de l'AEA passerait aussi par l'action séquentielle d'un groupe de phospholipase A_2 (PLA_2) sur les NAPEs formant le N-acyl-lyso-PE. La lyso-PLD termine la formation de l'AEA via son action enzymatique (Sun, Tsuboi et al. 2004). Il existe une troisième voie par laquelle la synthèse de l'AEA est possible. Celle-ci est impliquée une double désacylation de NAPE, catalysée par une sérine hydrolase nommée Abh4, pour produire le glycerophospho-NAPE (GP-NAPE) (Simon and Cravatt 2006). Par la suite, une glycerophosphodiesterase, la GDE1, va transformer le GP-NAPE en AEA (Simon and Cravatt 2008).

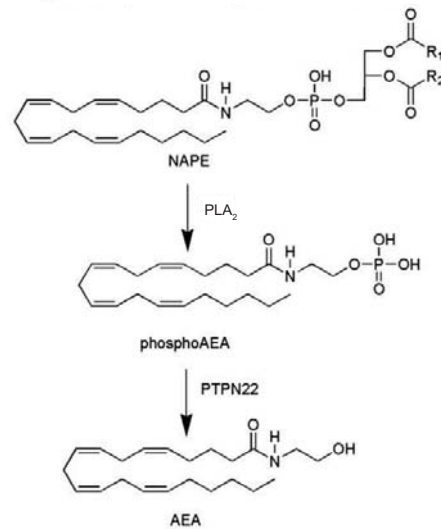
Pour sa part, la synthèse du 2-AG n'est pas exclusivement calcium dépendante. Les précurseurs les plus importants de sa synthèse sont les diacylglycérols (DAGs), provenant principalement de l'hydrolyse du 2-arachidonate-containing phosphoinositides (PIs), catalysé par une phospholipase C sélective pour les PIs (Figure 8) (Di Marzo, De Petrocellis et al. 1996; Stella, Schweitzer et al. 1997; Kondo, Kondo et al. 1998; Liu, Batkai et al. 2003). Une autre voie de synthèse des DAGs provient de l'hydrolyse du 2-arachidonate-containing phosphatidic acid (PA), catalysée par une phosphohydrolase des PAs (Bisogno, Melck et al. 1999; Carrier, Kearn et al. 2004). La conversion des DAGs en 2-AG se fait via une DAG lipase sn-1

sélective, ayant 2 isoformes présentement répertoriés (DAGL α et DAGL β) (Bisogno, Sepe et al. 1997; Stella, Schweitzer et al. 1997; Bisogno, Howell et al. 2003).

A Voie de synthèse de l'AEA impliquant la NAPE-PLD



B Voie de synthèse de l'AEA impliquant la PLA₂



C Voie de synthèse de l'AEA impliquant Abh4

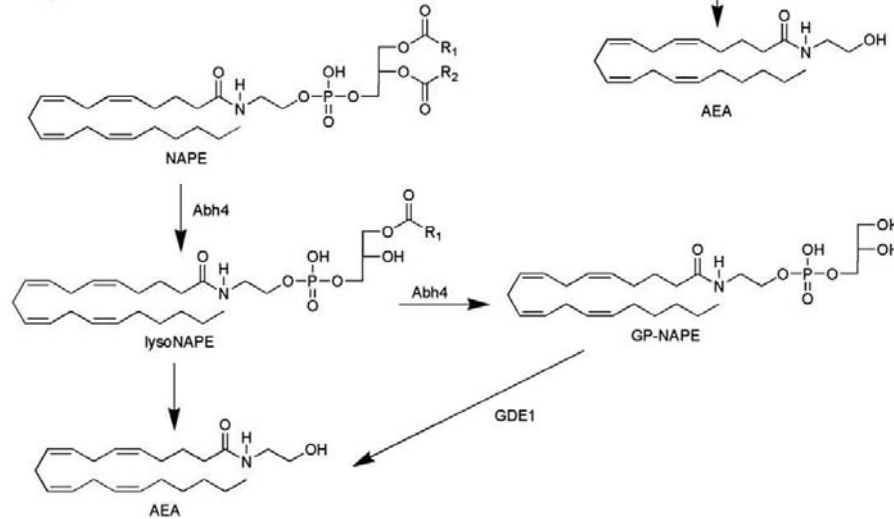


Figure 7: Voies de synthèse de l'anandamide

Il existe 3 voies de synthèse principales de l'AEA. La première se produit suite au transfert d'un groupement acyl à un phosphatidylethanolamine catalysé par une trans-acyclase Ca^{2+} dépendante. Le NAPE résultant est hydrolysé par la NAPE-PLD. La deuxième passerait par l'action de la PLA_2 sur les N-acyl-lyso-PE, suivie par l'action de la lyso-PLD. La troisième voie implique une double désacylation du NAPE, catalysée par Abh4 , pour produire le GP-NAPE. Par la suite, la GDE1 va transformer le GP-NAPE en AEA.

Placzek, E. A., Y. Okamoto, et al. (2008). "Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonoyl glycerol biosynthesis and breakdown." *Neuropharmacology* 55(7): 1095-104.

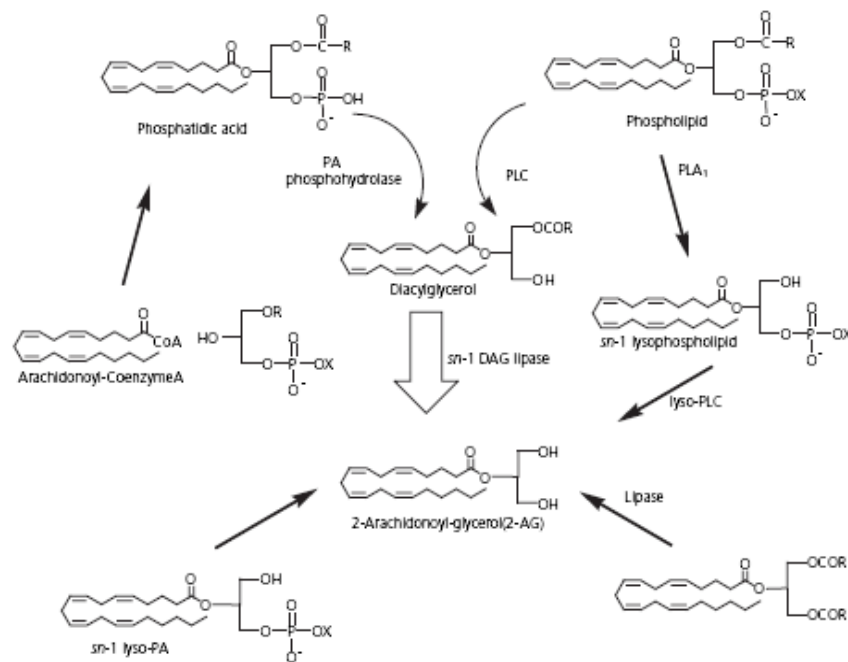


Figure 8: Voies de synthèse du 2-Arachidonoyl-glycerol

Les DAGs, les principaux précurseurs du 2-AG, proviennent principalement de l'hydrolyse des PIs effectuée par une phospholipase C sélective. Les DAGs peuvent

aussi être synthétisés suite à l'hydrolyse du PA par une phosphohydrolase. La conversion des DAGs en 2-AG se fait via une DAG lipase sn-1 sélective, possédant 2 isoformes (DAGL α et DAGL β).

Bisogno, T. (2008). "Endogenous cannabinoids: structure and metabolism." J Neuroendocrinol **20 Suppl 1**: 1-9.

Les endocannabinoïdes sont libérés par la cellule via la diffusion passive à travers la membrane cytoplasmique, mais le processus semble aussi être régulé par une protéine transporteur au niveau de la membrane cellulaire (Dinh, Carpenter et al. 2002). Cette dernière hypothèse a été proposée à cause de la faible demi-vie (moins de 5 minutes) des endocannabinoïdes lorsqu'ils sont incubés avec des cellules *in vitro* (Ben-Shabat, Fride et al. 1998; Beltramo and Piomelli 2000; Bisogno, MacCarrone et al. 2001). L'hypothèse d'un transporteur est également mise en évidence par la saturation du transport, la sensibilité à la température, la sélectivité pour les acides gras à longue chaîne et la sensibilité à des inhibiteurs synthétiques (Beltramo, Stella et al. 1997; Bisogno, Sepe et al. 1997; Hillard, Edgemon et al. 1997). Par contre, puisque le transporteur n'as pas encore été isolé et cloné, il se pourrait que se soit seulement le processus de diffusion passive qui régule le processus, puisque la dégradation des endocannabinoïdes par des enzymes spécialisées provoquerait un gradient favorisant cette diffusion dans la cellule. Une fois à l'intérieur de la cellule, l'activité des endocannabinoïdes est terminée, comme mentionné précédemment, suite à une hydrolyse par la FAAH, une enzyme dégradant préférentiellement l'anandamide (Cravatt, Giang et al. 1996) ou la monoacylglycérol lipase (MGL), qui

dégrade plus spécifiquement le 2-arachidonoglycérol (Ben-Shabat, Fride et al. 1998; Di Marzo, Bisogno et al. 1998).

En terme de spécificité pour les récepteurs aux endocannabinoïdes, l'AEA a une plus grande affinité pour le récepteur CB₁ (Showalter, Compton et al. 1996). Pour sa part, le 2-AG est un ligand endogène possédant une affinité similaire pour les deux récepteurs (Sugiura, Kodaka et al. 1996; Stella, Schweitzer et al. 1997).

1.4.3 Distribution des endocannabinoïdes et de leurs récepteurs au cours du développement et chez l'adulte

Les niveaux des endocannabinoïdes varient grandement au cours du développement. Le 2-AG a pu être mesurés au 21^e jour de gestation (GD21), il a également atteint des concentrations maximales au 1^{er} jour après la naissance (PND1) et il a diminué pour des âges plus avancés chez le rat. Pour sa part, l'AEA augmente durant la période postnatale pour atteindre son pic à l'âge adulte (Berrendero, Sepe et al. 1999).

Parallèlement, l'expression des récepteurs cannabinoïdes peut être vérifiée avec des tests de liaison et en vérifiant l'expression de leur ARNm. Le récepteur CB₁ est distribué de manière atypique dans le cerveau dans la période tardive foetale par rapport au cerveau adulte. De plus, le récepteur est plus abondant dans ces zones que dans le cerveau de rat adulte. Le récepteur CB₁ a pu être observé à partir de GD21 chez le rat. Le cerveau du rat exprime donc le récepteur CB₁ durant la période foetale et l'activation des mécanismes de signalisation du récepteur a aussi été observée (Romero, Garcia-Palomero et al. 1997). L'expression du récepteur CB₁ a

aussi été observée au niveau du tectum chez le poulet avec une augmentation marquée de l'immunoréactivité du récepteur du 4^e jour embryonnaire (E4) et à E10, suivi d'une diminution continue du récepteur jusqu'à E18 (Leonelli, Britto et al. 2005). Pour sa part, l'expression du récepteur CB₂ a été démontrée chez des neurones ganglionnaires de la base dorsale en culture et des progéniteurs neuronaux *in vitro* et *in vivo* pendant le développement (Ross, Coutts et al. 2001; Palazuelos, Aguado et al. 2006).

Les récepteurs aux cannabinoïdes possèdent également une expression caractéristique chez l'adulte. Pour sa part, le récepteur CB₁ a une forte expression au niveau des noyaux gris centraux, du cervelet, de l'hippocampe, certaines parties du cortex olfactif ainsi qu'une expression un peu moins importante au niveau du cortex cérébral, du bulbe olfactif, du septum, de l'amygdale et de noyaux du tronc cérébral (Herkenham, Lynn et al. 1990; Tsou, Brown et al. 1998; Freund, Katona et al. 2003). La présence du récepteur CB₂ a été démontrée dans plusieurs modèles. À l'aide de la technique d'hybridation *in situ*, l'expression des ARNm du récepteur a été démontrée chez des cellules granulaires du cervelet en culture et sur des tranches de cervelet (Skaper, Buriani et al. 1996). La présence du récepteur CB₂ dans le système nerveux central a aussi été reportée chez le rat, la souris et le furet (Van Sickle, Duncan et al. 2005; Gong, Onaivi et al. 2006; Onaivi, Ishiguro et al. 2006). Par contre, le récepteur est exprimé plus fortement au niveau des cellules immunitaires (Herkenham, Lynn et al. 1990; Ishac, Jiang et al. 1996). Pour sa part, l'ARNm du récepteur GRP55 a été découvert dans le cerveau humain, plus abondamment au niveau du noyau caudé, du putamen et de façon moins importante au niveau de l'hippocampe, du thalamus, de

la protubérance annulaire, du cervelet et du cortex frontal. De plus, l'ARNm a été détecté dans l'hippocampe et le thalamus chez le rat et la souris (Sawzdargo, Nguyen et al. 1999; Ryberg, Larsson et al. 2007). Finalement, sa présence a été démontrée par immunohistochimie chez des neurones ganglionnaires de la base dorsale chez la souris (Lauckner, Jensen et al. 2008).

Il semble de plus en plus évident que le système endocannabinoïde est présent au niveau de la rétine. Les principaux endocannabinoïdes, le 2-AG et l'AEA, ont été détectés dans la rétine du rat, du bœuf et de l'humain par des techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse (Bisogno, Delton-Vandenbroucke et al. 1999; Straiker, Maguire et al. 1999; Stamer, Golightly et al. 2001; Chen, Matias et al. 2005; Matias, Wang et al. 2006). De plus, l'hydrolyse de l'AEA a été mesurée dans des extraits de rétines du porc, du bœuf et du poisson rouge (Matsuda, Kanemitsu et al. 1997; Bisogno, Delton-Vandenbroucke et al. 1999; Glaser, Deutsch et al. 2005). L'immunoréactivité de l'enzyme de synthèse FAAH montre une expression importante de l'enzyme au niveau de la rétine du rat, du danio zébré et du poisson rouge (Yazulla, Studholme et al. 1999; Yazulla and Studholme 2001; Glaser, Deutsch et al. 2005). C'est Buckley et al. (1998) qui a démontré pour la première fois la présence du récepteur CB₁ au niveau de la rétine chez l'embryon de rat (E15-20) à l'aide de la technique d'hybridation *in situ*. La présence du récepteur a aussi été démontrée dans l'oeil du rat en utilisant le RT-PCR (Porcella, Casellas et al. 1998). La couche des CGRs de l'embryon de poulet (E18) exprime le récepteur CB₁, ceci ayant été démontré par hybridation *in situ* (Begbie, Doherty et al. 2004). L'immunoréactivité du récepteur CB₁ a été localisée au niveau de la rétine de l'humain, du singe, de la souris, du rat, du

poulet, de la salamandre et du poisson rouge (Straiker, Maguire et al. 1999; Yazulla, Studholme et al. 1999; Yazulla, Studholme et al. 2000; Leonelli, Britto et al. 2005). Par contre, la distribution exacte du récepteur au niveau des différents types cellulaires qui composent la rétine reste encore mitigée. Des différences de spécificité des anticorps utilisés pourraient expliquer en partie ces distinctions. Pour sa part, le récepteur CB₂ n'a pas été détecté chez l'embryon de rat (Buckley, Hansson et al. 1998). Par contre, à l'aide de la technique de la RT-PCR, la présence de l'ARNm du récepteur CB₂ a été rapportée dans la rétine de souris adulte. De plus, une hybridation *in situ* a démontré sa présence dans toutes les couches de la rétine du rat adulte (Lu, Straiker et al. 2000).

1.4.4 Rôles joués par le système des endocannabinoïdes durant le développement

Le système endocannabinoïde est de plus en plus étudié au cours du développement du cerveau, car il semble y jouer un rôle. En effet, trois observations principales indiquent son implication dans ce phénomène. Lorsqu'on administre des cannabinoïdes synthétiques ou dérivés de plantes à des rates gestantes, il y a un changement marqué de la maturation de plusieurs neurotransmetteurs pouvant être observé par une modification des comportements associés à ces neurotransmetteurs chez la progéniture. Également, la présence d'éléments du système des endocannabinoïdes durant le développement du cerveau, en particulier la localisation atypique et les niveaux élevés d'expression des endocannabinoïdes et de leurs récepteurs concordent avec cette hypothèse. De plus, les récepteurs aux cannabinoïdes sont présents sur les cellules neuronales en développement et ils

produisent des effets cellulaires correspondant avec leurs rôles probables sur le développement neuronal, en régulant l'expression de gènes clés, le métabolisme énergétique et des mécanismes signalétiques cellulaires (Fernandez-Ruiz, Berrendero et al. 2000).

Le système endocannabinoïde a récemment été proposé comme acteur dans plusieurs phénomènes développementaux du SNC (Fernandez-Ruiz, Berrendero et al. 2000). Plusieurs de ces rôles ont été confirmés au cours des dernières années. L'activité du récepteur CB₁ influence la neurogenèse, puisque des souris chez qui le gène codant pour ce récepteur a été délété ainsi que l'injection d'antagonistes modifient ce processus (Jin, Xie et al. 2004). Les endocannabinoïdes peuvent également moduler la prolifération des précurseurs des cellules pyramidales, des cellules progénitrices neuronales ainsi que la différenciation de ces dernières en cellules gliales. L'activité du récepteur CB₁ affecte également la migration des neurones pyramidaux immatures, en plus de la fasciculation des neurones pyramidaux différenciés (Aguado, Palazuelos et al. 2006; Mulder, Aguado et al. 2008). L'effet du récepteur sur la fasciculation ainsi que certains déficits du développement axonal ont été démontrés chez le poulet et suite au "knockdown" du gène codant pour le récepteur CB₁ (*cnr1*) chez le danio zébré (Watson, Chambers et al. 2008). Le rôle du récepteur dans le guidage axonal a été démontré au niveau des interneurons GABAergiques, où l'activation du récepteur a induit un effondrement du cône de croissance résultant en une chimiorépulsion (Berghuis, Rajnicsek et al. 2007). Par ailleurs, un agoniste du récepteur CB₁ a induit la rétraction de neurites dans un modèle de neuroblastes (Zhou and Song 2001) ainsi que chez des neurones corticaux

glutamatergiques (Vitalis, Laine et al. 2008). De plus, un effet de l'activité du récepteur CB₁ sur le guidage axonal des CGRs a été récemment observé chez les mammifères (Argaw, soumis à Science). Également, les niveaux du récepteur CB₁ augmentent drastiquement chez les neurones immatures lorsqu'ils doivent se différencier (Begbie, Doherty et al. 2004).

Par contre, le mécanisme d'action par lequel le récepteur CB₁ reste encore à être déterminé. Il a été démontré que la cascade de signalisation du récepteur tyrosine kinase pour le FGF impliquait l'activation de la phospholipase C γ qui génère le diacylglycérol (DAG) (Hall, Williams et al. 1996). Celui-ci est ensuite hydrolysé par une DAG lipase pour former le 2-AG, pouvant activer les récepteurs endocannabinoïdes au cerveau. Cette action aurait pour effet de stimuler la croissance axonale en favorisant les influx de calcium au niveau cône de croissance via des canaux calciques de type N et L (Doherty, Ashton et al. 1991). Les changements calciques impliqués sont localisés très près de la région de la membrane du cône de croissance (Archer, Doherty et al. 1999). Ce type de changement localisé serait suffisant pour induire la formation de filopodes *in vivo* (Lau, Zucker et al. 1999), et même pour faire tourner un cône de croissance *in vitro* (Zheng 2000). Un antagoniste du récepteur CB₁ chez des neurones granulaires du cervelet aurait également permis d'inhiber la croissance axonale stimulée par N-cadhérine et FGF-2. De plus, un agoniste du récepteur CB₁ aurait permis la croissance par un mécanisme en aval de l'activation du récepteur FGF (Williams, Walsh et al. 2003). On a aussi pu noter le couplage de canaux calciques avec des récepteurs aux cannabinoïdes en certaines occasions (Sugiura, Kodaka et al. 1996; Rubovitch, Gafni et al. 2002). Par

contre, un article récemment publié suggère que l'activation du récepteur CB₁ dans une culture de CGRs inhibe les canaux calciques à haut voltage. Cette dernière information démontrerait que les cannabinoïdes peuvent modifier l'excitabilité de CGRs et avoir un effet sur la réponse de la rétine et suggère que ceux-ci ont un effet inhibiteurs sur ces neurones (Lalonde, Jollimore et al. 2006). Il semble donc évident que les effets des endocannabinoïdes, en particulier sur l'activité du récepteur CB₁ sont mitigés. Peut-être que l'addition du récepteur GPR55, qui a lui aussi une localisation au niveau du SNC chez l'adulte, ou la présence de récepteurs encore inconnus pour l'instant pourront expliquer ces différences observées. Il est également probable que les récepteurs aux cannabinoïdes aient des effets à court terme et à long terme des cannabinoïdes différents. De plus, il faut tenir compte de la force de chaque signal puisqu'un mécanisme pourrait être très faible par rapport à un autre et n'avoir que peu d'influence physiologiquement.

Quelques rôles ont également été précisés pour le récepteur CB₂. Il est notamment impliqué dans le phénomène de la prolifération des cellules progénitrices neuronales et des cellules de la microglie, puisqu'un agoniste de ce récepteur ou le 2-AG augmente et un antagoniste diminue respectivement le processus de neurogenèse (Carrier, Kearns et al. 2004; Molina-Holgado, Rubio-Araiz et al. 2007; Goncalves, Suetterlin et al. 2008). L'activation du récepteur semble favoriser l'état de prolifération, en contribuant par le fait même à l'état non-différencié de la cellule (Carayon, Marchand et al. 1998; Palazuelos, Aguado et al. 2006). Malgré le fait que l'implication du récepteur CB₂ dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules neuronales a été observée (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007; Goncalves,

Suetterlin et al. 2008), peu d'emphasis a été portée sur son rôle dans d'autres processus développementaux.

Le mécanisme d'action par lequel les récepteurs aux cannabinoïdes influencent le développement neuronal et le guidage axonal est encore très peu documenté, en particulier pour le récepteur CB₂. Selon la littérature, l'effet probable des endocannabinoïdes suite à leur liaison et à l'activation du récepteur CB₂ se ferait via l'inhibition de l'adénylate cyclase entraînant ainsi une baisse des concentrations cellulaires d'AMPc. Ceci pourrait possiblement diminuer l'activité de la PKA et mènerait à l'activation de RhoA, une molécule impliquée dans la rétraction du cône de croissance. De plus, la diminution de l'activité de la PKA semble avoir une influence directe sur la mobilisation de DCC à la membrane cellulaire. Il a aussi été démontré qu'une activation par la nétrine-1 via DCC avec un faible niveau d'AMPc cellulaire pouvait entraîner une répulsion au niveau de la rétine chez les CGRs. La concentration d'AMPc pourrait donc modifier le comportement des neurones face aux différentes molécules de guidage.

1.5 Objectifs de la recherche menée dans le cadre du présent mémoire

L'objectif principal de mon projet de recherche était d'identifier la contribution fonctionnelle des cannabinoïdes endogènes, via leur activité au niveau du récepteur CB₂, au niveau de la croissance et du guidage axonal lors du développement. Je voulais également déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus développementaux. Mon hypothèse de recherche était que l'activité de récepteur CB₂, en influençant les niveaux d'AMPc intracellulaires,

pourrait moduler le cône de croissance et, ainsi, produire des effets sur le guidage axonal. Pour ce faire, je voulais confirmer la présence du récepteur CB₂ dans nos modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*. De plus, je désirais confirmer l'implication des endocannabinoïdes *in vitro* en déterminant l'effet du récepteur CB₂ sur le cône de croissance directement et au niveau des projections ganglionnaires, et identifier les mécanismes moléculaires influençant ces processus. Le but final de mon projet consistait à établir l'implication *in vivo* du récepteur CB₂ sur les CGRs lors du processus de navigation axonale et de la formation de la voie rétinothalamique.

Contribution des auteurs

G.D. a fait le design du projet, fait l'expérimentation sur les explants et les cultures de cellules neuronales, les expériences de stimulation du cône de croissance, les injections intraoculaires, les techniques d'immunohistochimie et d'immunocytochimie, la technique de Western blot et l'analyse d'image et a rédigé le manuscrit. A.A. a fait l'expérimentation sur les explants et les cultures de cellules neuronales, les expériences de stimulation du cône de croissance, les injections intraoculaires, les techniques d'immunohistochimie et d'immunocytochimie, l'analyse d'image et a fait les tests statistiques. J.F.B a fait le design et supervisé le projet en plus de faire l'expérimentation de biotinylation tout en contribuant à la préparation du manuscrit.

2. Article scientifique

2.1 Cannabinoid receptor CB₂ influences axon guidance via Deleted in Colorectal Cancer (DCC) (en préparation)

Gabriel Duff^{1,2}, Anteneh Argaw^{1,3}, Jean-François Bouchard^{1,2}

¹School of Optometry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3T 1P1

²Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

³Department of Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3T 1J4

2.2 Summary

Navigation of retinal projections towards their visual targets is regulated by guidance molecules and growth cone transduction mechanisms. Here, we show that cannabinoid receptor 2 (CB₂R) is widely expressed throughout the optical pathway during the development of the retinothalamic system. Both the number of filopodia and the surface area of the growth cone (GC) are modulated by CB₂R activity in a PKA-dependant manner. Furthermore, Deleted in Colorectal Cancer (DCC), a receptor for the guidance molecule netrin-1, is required for CB₂R induced morphological changes of the GC. CB₂R agonists induce GC chemorepulsion and conversely, treatments with CB₂R inverse agonists increase retinal explants projections length. These effects are specific to CB₂R as all the effects observed in wild type mice were abolished or were not observed in the CB₂^{-/-} mouse where the gene coding for the CB₂R was altered. In vivo, a single intraocular injection of CB₂R inverse agonist, AM630, increases retinal projection branch length and aberrant projections were also observed in some

animals. Moreover, in $CB_2R^{-/-}$ mice, we report defects in eye-specific segregation of retinal projections in the dLGN in $CB_2R^{-/-}$ mice. These findings highlight the modulatory role of endocannabinoids and their CB_2Rs during the formation of the retinothalamic system.

Author Keywords: CB_2R , DCC, growth cone, axon guidance

2.3 Introduction

The endogenous cannabinoid system consist of endocannabinoids (eCBs), their synthetic and degrading enzymes, and the cannabinoid receptors (Salzet 2000). These receptors are 7 transmembrane domain proteins coupled to a heterotrimeric G protein. The type 1 (CB_1R) and type 2 (CB_2R) are the principal receptors that have been characterized (Howlett, Barth et al. 2002). The CB_2R was first cloned in mammals by Shire et al. (1996). It is pertussis toxin sensitive, indicating the coupling to a $G_{i/o}$ protein (Howlett 1995). Its principal signaling pathway is through inhibition of adenylate cyclase (AC), which leads to a reduction of cAMP production (Felder, Joyce et al. 1995). cAMP is a second messenger known to causes various changes in proteins activity including PKA and MAPK (Walsh, Perkins et al. 1968; Frodin, Peraldi et al. 1994). CB_2R presence has been reported during development using different *in vivo* and *in vitro* techniques, in several neuronal cells types from various species. In particular, CB_2Rs are expressed in cultured mouse cerebellar granule cells and cerebellum sections (Skaper, Buriani et al. 1996) as well as in rat cultured dorsal root ganglia neurons and neuronal progenitors (Ross, Coutts et al. 2001; Palazuelos, Aguado et al. 2006). Moreover, the presence of CB_2R in adult mammalian central

nervous system (CNS) has been reported in brainstem, cerebella and hippocampal pyramidal neurons (Van Sickle, Duncan et al. 2005; Gong, Onaivi et al. 2006; Onaivi, Ishiguro et al. 2006). CB₂R is also extensively expressed in peripheral and immune tissues (Klein, Newton et al. 2003). However, currently, there is no evidence of its expression in developing visual system.

The implication of the eCB system in numerous developmental processes of the CNS has recently been proposed by Fernandez-Ruiz et al. (2000). Hence, pharmacological modulation of the CB₂R activity has been reported to influence neuronal progenitor cell and microglia proliferation and neurogenesis (Carrier, Kearns et al. 2004; Molina-Holgado, Rubio-Araiz et al. 2007; Goncalves, Suetterlin et al. 2008). In addition, CB₂R seems to favor a nondifferentiated, proliferative state (Palazuelos, Aguado et al. 2006). eCBs, through CB₁R, modulate pyramidal cell progenitor proliferation and immature pyramidal cells migration.

CB₁R, the other cannabinoid receptor, also plays a major role in the development of the central nervous system (CNS). It has been reported that CB₁R deletion causes deficits in pyramidal cell fasciculation (Mulder, Aguado et al. 2008). Fasciculation and axonal growth deficits have also been reported following pharmacological activation of the CB₁R, in chick, and gene knockdown in zebrafish (Watson, Chambers et al. 2008). Its role in axonal guidance was shown in GABAergic interneurons, where its activation induced GC collapse resulting in chemorepulsion (Berghuis, Rajnicek et al. 2007). Recently, CB₁R effect on RGCs axonal guidance was observed (Argaw, submitted to Science). Although CB₂R implication in control of proliferation,

differentiation and survival of neuronal cells has been documented (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007; Goncalves, Suetterlin et al. 2008), no emphasis has been put on the role played by the CB₂R on axon guidance during CNS development.

GC cytoskeleton reorganization, due to surface receptor responses to guidance cues, is the mechanism by which axons navigate toward their target cells (Bovolenta 2005). Numerous guidance cues have been identified, these include the slits, semaphorins and ephrins (Dickson 2002). Netrin is another family of chemotropic factors implicated in axonal guidance (Kennedy, Serafini et al. 1994) and Deleted in colorectal cancer (DCC), a transmembrane immunoglobulin superfamily receptor, is one of the receptors of netrin-1 (Keino-Masu, Masu et al. 1996). GC morphology can be modified by DCC activation via substrate adhesion to netrin-1 and the recruitment of actin organization complex (Shekarabi, Moore et al. 2005). DCC is contained in an intracellular pool and its mobilization to plasma membrane is PKA-dependant (Bouchard, Moore et al. 2004; Bouchard, Horn et al. 2008). Given their activity on intracellular cAMP levels, eCBs, via their action on CB₂R could influence the GC's response to other guidance cues such as netrin-1.

During the development of the visual system, RGCs axons navigate from the retina to their thalamic and midbrain targets. RGC axons steer towards the optic chiasm (OC) where the majority of axons decussate to reach the contralateral side while a small percentage remain ipsilaterally. When axons reach their main visual targets, namely the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and superior colliculus (SC), they stop their navigation to form synaptic connections (Erskine and Herrera 2007). As eCBs

levels greatly vary in the brain during the development (Berrendero, Sepe et al. 1999) and that we report CB₂R presence in developing CNS, it is plausible to speculate that eCBs, via their CB₂R, could affect axonal navigation. We decided to investigate the role of CB₂R in the axonal guidance phase of the developing visual system.

2.4 Materials and Methods

Protocols for animal experimentation were all approved by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of Université de Montréal and handled in accordance to Canadian Council on Animal Care recommendations.

Products

Anti-GAPDH antibody, Bovine serum albumin (BSA), ciliary neurotrophic factor (CNTF), dibutyl cAMP (db-cAMP), DNase, dextran-FITC, forskolin (FSK), hoechst 33258, insulin, KT5720, laminin, monoclonal anti- β -actin, monoclonal anti-MAP Kinase (Diphosphorylated Erk-1&2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, selenium, apotransferrin, triiodo-thyronine, and trypsin were all purchased from Sigma (Oakville, ON). B27, dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), foetal bovine serum (FBS), glutamine, N2, neurobasal media, penicillin-streptomycin, S-MEM and sodium pyruvate were bought from Invitrogen Canada (Burlington, ON). Anti-NCAM, anti-neurofilament-L, anti-pPKA C and anti-PKA C- α antibodies were from Cell Signaling Tech (Beverly, MA). Normal donkey serum (NDS) and normal goat serum (NGS) were from Jackson Immuno (West Grove, PA). Shandon immu-mount was bought from Thermo Scientific (Pittsburgh, PA). AM630, JTE907, JWH015, JWH133

were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MI). Primary antibodies GAP-43 and cAMP were from Chemicon International (Temecula, CA). Anti-DCC_{FB} AF5, H89, LNAC, LY294002, rapamycin and wortmannin were purchased from EMD (La Jolla, CA). Primary antibody against L1 and alexa fluor conjugated secondary antibodies (Alexa-350, Alexa-488 and Alexa-546) were obtained from Invitrogen. Avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit and donkey anti-goat biotinylated secondary antibody were from Vector Labs (Burlingame, CA). The B fragment of the cholera toxin (CTb) and goat anti-CTb were from List Biological Laboratories (Campbell, CA). Anti-CB₂R and anti-MGL were purchased from Cayman (Ann Arbor, Michigan). Another anti-CB₂R was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Primary Cortical Neuron Culture

Staged pregnant CD1 mice were obtained from Charles Rivers (St-Constant, Qc). E14-15 mouse embryo cortices were isolated surgically and transferred in a vial containing 2ml S-MEM at 37°C supplemented with 2.5% trypsin and 2mg/ml DNase for 15 minutes. The pellet was then transferred into 10ml S-MEM with cold 10% FBS and briefly centrifuged. The pellet was again transferred in 2ml S-MEM with 10% FBS and triturated 3 or 4 times. The supernatant was removed and inserted into 10 ml Neurobasal medium. Dissociated cells were counted and cultured in 24 well plates on 12mm poly-D-lysine treated glass coverslips (20µg/ml; 50 000 cells/well). Cells were cultured for 2 days *in vitro* (DIV2) in neurobasal medium containing 1% B-27, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 0.25% N2 and 0.5mM glutamine for GC analysis. Wells were treated with either CB₂R agonists (300nM JWH133 or JWH015), CB₂R inverse agonists (300nM AM630 or JTE907), adenylate cyclase activator (10µM FSK),

PKA inhibitors (200nM KT5720 or 2 μ M H89) or DCC function blocking (3.5 μ g/ml anti-DCC_{FB} AF5) for 1 hour for GC morphology experiments or for 15 minutes for cAMP immunocytochemistry.

Retinal Explant Culture

E14-15 mouse embryos retinas were isolated and dissected in small segments in ice cold DPBS and cultivated in 24 well plates on 12mm poly-D-Lysine (20 μ g/ml) and laminin (5 μ g/ml) treated glass coverslips. Explants were cultured in Neurobasal supplemented with 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 5 μ g/ml LNAC, 1% B27, 40ng/ml selenium, 16 μ g/ml putrescine, 0.04ng/ml triiodo-thyronine, 100 μ g/ml transferrin, 60ng/ml progesterone, 100 μ g/ml BSA, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 10 ng/ml ciliary neurotrophic factor (CNTF), 5 μ g/ml insulin, and 10 μ M FSK. Explants were treated for 15 hours at DIV0 (1 hour following plating) for projection analysis or for 1 hour at DIV1 for GC analysis assay. Photomicrographs for projection analysis were taken using an Olympus BX51WI microscope (Olympus Canada, Markham, ON) with a 10X objective lens and analyzed using Image Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD). The total length of axon bundles was quantified and expressed as mean \pm SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

Immunocytochemistry

Plates were put on ice, washed with ice cold PBS (pH 7.4) and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes. Primary neuron and retinal explants cultures were blocked in 2% NGS and 2% BSA in PBS during 30 minutes at room

temperature. Antibodies were added overnight in a blocking solution at the following concentrations : anti-GAP-43 1 :1000, anti-CB₂Rsc 1:100, anti-CB₂Rcayman 1:500, anti-MGL 1:500, anti-L1 1:500, anti-cAMP 1:1000, anti- β -actin 1:1000 et anti-NFL 1:500. Wells were washed with PBST, incubated with secondary antibodies Alexa-350, 488 or 546 for 2 hours at room temperature. Nuclei were labeled with Hoechst 33258 and coverslips were mounted with Immu-mount (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

Quantification of cAMP Immunoreactivity

All photomicrographs used for quantification were taken using an inverted Olympus IX71 microscope (Olympus Canada, Markham, ON) with a 60X objective lens and identical exposure time to allow for comparison of measurements. Fluorescence intensity at the GC was corrected for background noise and quantified using Image Pro Plus 5.1 software. For GCs analysis, both differential interference contrast (DIC) and fluorescent images were taken. Fluorescence intensity per squared micrometer is expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

Western Blots

Dissociated primary cortical neurons were cultured for 2 DIV at a density of approximately 250 000 cells/dish in 35mm poly-D-lysine coated dish. After 10 minutes treatment with CB₂R agonists (300nM JWH133 or JWH015), CB₂R inverse agonists (300nM AM630 or JTE907), adenylylate cyclase activator (10 μ M FSK), neurons were washed once with ice-cold PBS and lysed with Laemmli sample buffer (Barker and Shooter 1994). Samples were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis on 8% gels. After electrophoresis, proteins were transferred to

nitrocellulose membrane (BioTrace NT, Pall Corporation, Pensacola, FL) and blocked for 2 h by incubation in 5% non-fat dry milk in TBST (TBS containing 0.1% Tween 20) or in 2% bovine serum albumin (BSA) in TBST. Western blot analysis was performed using anti-CB₂Rcayman 1:1000, anti- β -actin 1:5000, anti-GAPDH 1:20000, anti-pPKA 1:1000, anti-PKA_{TOTAL} 1:1000 overnight at 4°C. After 2 h of incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), bands were visualized using the Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus kit (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Immunoreactivity was imaged with a ScanJet 5300C (Hewlett Packard Canada, Mississauga, ON, Canada).

Surface biotinylation.

E14-15 commissural neurons were plated and cultured for 2 d at a density of 2,000,000 cells per 100 mm PDL-coated tissue culture dish. On day 2, cells were treated with CB₂R inverse agonists (300nM AM630 or JTE907), AM630 and PKA inhibitors (200nM KT5720 or 2 μ M H89), adenylate cyclase activator (10 μ M FSK), or vehicle for 15 min. Cells were then washed with ice-cold PBS containing 0.1 mM calcium chloride and 1 mM magnesium chloride, pH 7.4, to halt protein trafficking (Meyer-Franke, Wilkinson et al. 1998). Surface biotinylation was performed by adding EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin, 5 ml per plate at 0.5 mg/ml in PBS at 4°C for 30 min, removed, and the reaction was quenched by the addition of 5ml of 10mM ice-cold glycine in PBS at 4°C for two 10 min periods. Subsequently, cells were washed twice with 5 ml of ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer. Biotinylated proteins were precipitated with streptavidin–agarose and analyzed by Western blot.

Time-lapse Microinjections

Retinal explants were cultured in borosilicate chambered coverglass (Lab-Tek; Rochester, NY). At DIV1, chambers were installed in a Live Cell chamber (5% CO₂, 37⁰C) (Neue Bioscience, Camp Hill, PA) attached to an inverted Olympus IX71 microscope. Glass micropipettes with an orifice of less than 3µm diameter were mounted on Burleigh PCS 5000 Series micromanipulator (Life Sciences, Mississauga, ON), and positioned at ≈ 45° and ≈ 100µm away from the growth cone of interest. Drugs were injected with a Pico Plus injector (Havard Apparatus - Model 702213) at 0.05 µl/min for 30 minutes for dbcAMP group and 60 minutes for other groups. The injection caused a concentration gradient which was visualized with immunofluorescent dextran-FITC (Figure 4E), indicating that the drugs reached the GC.

Intraocular Injections

Syrian golden hamsters (Charles River, St-Constant, QC) were used for intraocular injections. These mammals are born with a premature nervous system (Clancy, Darlington et al. 2001). At birth (postnatal day 0, P0), RGC axons have not all reached their thalamic and midbrain targets. By P3, virtually all RGC axons have reached their targets (Bhide and Frost 1991). To take advantage of this opportunity, twenty four hours following birth, at postnatal day 1 (P1), hamsters received a 2µl unilateral injection of a 1% solution of the beta subunit of the cholera toxin coupled to FITC (CTb-FITC), a highly sensitive anterograde tracer, in either 0.9% saline solution, 300µM JWH133 or 300µM AM630, a CB₂R inverse agonist. Briefly, a small incision was made in the eyelids to access the right eye, the injections were administered using a

glass micropipette attached to a 10 μ l Hamilton syringe. The micropipette was carefully inserted into the vitreous at an angle to avoid damaging the lens. Following the injection, the eyelids were closed with surgical glue (Vetbond; 3 M, St-Paul, MN). The same surgical procedures were performed using adult mice where the gene coding for the CB₂R was genetically modified to produce non functional CB₂R (*cnr2*^{-/-}). In these series of experiments, adult mice (*cnr2*^{-/-} and their wildtypes (*cnr*^{+/+})) were injected in the right eye with the CTb-Alexa-546 and the left one received an injection of CTb-Alexa-488. Four days following the injections, animals were perfused transcardially with 0.1M phosphate-buffered saline followed by 4% paraformaldehyde in PBS. The brains were removed, postfixed overnight at 4 °C, cryoprotected by infiltration of buffered sucrose, flash frozen and kept at -80 °C until further processing.

Immunohistochemistry

CTb was visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described (Argaw, Duff et al. 2008). Briefly, 40 μ m thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3% H₂O₂ in PBS for 20 min. After several washes, they were incubated in 0.1 M glycine solution for 30 min, and then blocked overnight at 4 °C. Sections were subsequently rinsed and immersed for 48 h at room temperature in a solution containing goat 1:4000 anti-CTb diluted in blocking solution. Afterwards, sections were rinsed and incubated 1 h in a biotinylated donkey secondary antibody directed against goat diluted in blocking solution (1:200). Tissue was rinsed and subsequently processed using an avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit (1:100) for 1 h, in the dark and at room temperature. Sections were then

rinsed and preincubated in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in PBS for 5 min. The peroxidase was visualized by adding 0.004% H₂O₂ to the DAB solution for 5-10 min. Sections were finally washed five times with PBS, mounted on gelatine-chrome alum-subbed slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA).

Photomicrographs were taken with an Olympus BX51WI microscope (Olympus Canada, Markham, ON) using a 10X objective lens. Images were analyzed with Image Pro Plus 5.1 software. Axon branch growth was quantified on consecutive photomicrographs of coronal slices of brain tissue, as described previously in (Argaw, Duff et al. 2008), comprising the LTN. Briefly, the distance between the lateral border of the nucleus of interest and the tips of the longest axon branches were measured and normalized for interthalamic distance. Axon collateral density was also quantified for the LTN using an adaptation of the Sholl technique (Sholl 1953). Values are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Sheffe's post hoc test (Systat).

2.5 Results

2.5.1 Spatio-temporal Localization of the CB₂R in the Developing Visual System

Despite emerging evidence of the eCB system presence in the developing CNS, the expression of the CB₂R is not well characterized in the growing neurovisual system. In order to determine *in vivo* spatio-temporal expression of CB₂R, hamsters received a single intra-ocular injection of CTb, within 24 hours following birth, to label retinal axons (Argaw, Duff et al. 2008). Subsequently, cryoprotected brains harvested at P5,

P7, or P9 were sliced and immunostained for CB₂R. The primary CB₂R antibody from Cayman Chemical that we used has previously been utilized to observe the *in vivo* distribution of the receptor in adult rat brain (Gong, Onaivi et al. 2006). In the developing visual system, CB₂R was present at the OC, the dLGN and the SC at all ages investigated (Figure 1A-G). The antibody appears to be specific to CB₂R, as *cnr2*^{-/-} mouse retina tissues, in contrast to *cnr2*^{+/+}, lacked its presence as indicated by a greatly decreased signal (Figure 1H-I).

As a first step in investigating the function of the CB₂R in the developing retinohthalamic pathway, we established retinal explant cultures obtained from E14-15 mouse embryos. We next analyzed by immunofluorescence microscopy the localization of CB₂R following fixation. At 1 days *in vitro* (DIV), its expression was observed with either Cayman Chemical or Santa-Cruz antibodies in RGC projections, GCs, and filopodia (Figure 1J-R). The receptor immunoreactivity was also observed in DIV2 primary cortical neuron cultures (Figure S-1A). Western blot analysis of primary cortical culture lysates harvested after 1 to 23 days *in vitro* (DIV) revealed that these cultures express CB₂R (Figure S-1B). CB₂R immunoreactivity is low at DIV1 but increased at DIV3 and remained relatively constant at all the other developmental stages.

Monoacylglycerol lipase (MGL), an enzyme implicated in the degradation of the CB₂R agonist, 2-arachidonoylglycerol (2-AG), is ubiquitously expressed in the GCs, filopodia and projections of RGCs (Figure 1S-U). These results demonstrate the presence of a CB₂R system in developing retinal projections and their thalamic and midbrain targets.

The spatio-temporal expression of the CB₂R suggests its implication during GC navigation.

2.5.2 CB₂R Reorganizes GC Morphology

To investigate the implication of the CB₂R during axon navigation, the morphological and biochemical responses of the neuronal GC was evaluated with mouse E14-15 retinal explants and primary cortical neurons cultured for DIV1 and DIV2, respectively, and treated for 1 hour with agonists or inverse agonists of the CB₂R (Figure 2A and D). These neurons were then fixed and stained with anti-GAP43, a membrane protein associated with the cytoplasmic surface of growth cones and filopodia to assess GC morphology. The GC surface area was greatly reduced when CB₂R agonists (JWH015 or JWH133) were added to the culture. Conversely, surface area was increased following CB₂R inverse agonist (AM630 or JTE907) stimulation (Figure 2B and E). In addition, the use of agonists caused a decrease in the number of filopodia present on the GC, while inverse agonists increased it (Figure 2C and F). These results demonstrate that the CB₂R influences GC morphology.

2.5.3 CB₂R Modulates RGC Projection Length

To assess whether CB₂R could affect axonal growth, E14-15 mouse retinal explant cultures were exposed to CB₂R agonists or inverse agonists for 15 hours at DIV0 (Figure 3A). To quantify bundles length, explants were fixed and stained with a primary antibody directed against GAP43. Retinal projection growth was evaluated as the total bundle length normalized with explant surface area. Treatment with CB₂R

agonists (JWH015 or JWH133) reduced total projection length of the explants whereas addition of CB₂R inverse agonists (AM630 or JTE907) increased it (Figure 3B). Retinal fibers emerging from the explants were labeled with L1 antibody to ensure that all the projections quantified were RGC axons since they are the only neurons that express this protein in the mouse retina (Demyanenko and Maness 2003). These results demonstrate that CB₂R has the ability to influence RGCs fibers extension. To ascertain that these effects were CB₂R specific, we performed the same experiments using *cnr2*^{-/-} mice. In contrary to retinal explant cultures obtained from *cnr2*^{+/+} mice, cultures from *cnr2*^{-/-} mice did not demonstrate significant changes in projection length following CB₂R agonist and inverse agonist treatment (Figure 3C). This indicates that these pharmacological agents were selective for the CB₂R and that this receptor modulates retinal projection growth *in vitro*.

2.5.4 CB₂R Agonists Can Act as Chemotropic Factors

In vitro, it has been shown that CB₁R can mediate GABAergic interneurons GC repulsion (Berghuis, Rajnicek et al. 2007). Recently, we demonstrated that CB₁R also modulates GC turning in RGCs (Argaw et al. submitted). Therefore we were interested to evaluate whether CB₂R agonists could produce a similar effect and could act as chemotropic signaling molecule guiding mammalian RGCs axons. Time-lapse differential interference contrast (DIC) images of GC were acquired every 30 seconds for a 60 minute period (Figure 4A). The vehicle (EtOH) was tested and did not affect the GC behaviour. The injection created a drug gradient which was visualized with immunofluorescent dextran-FITC (Figure 4E), in order to ensure that the drugs

reached the GC. Neurite projections length and angle responses to each drug are presented in Figure 4B-D. GC collapse was followed by neurite retraction after injection of CB₂R agonists (JWH015 or JWH133) (Figure 4C). Angle was also negatively changed after agonist treatment (Figure 4D). To determine if increasing cAMP levels could produce an attractive response, the GCs were subjected to a gradient of db-cAMP. Under this condition, GCs turned and elongated towards the source of db-cAMP (Figure 4B-D). These results show that CB₂R activation can modify axons growth and steering, and that its endogenous ligands can act as chemorepulsive modulators for RGC GCs.

2.5.5 CB₂R Induced GC Morphological Changes Require PKA Activity

The principal signaling pathway by which CB₂R is known to act is through inhibition of adenylyl cyclase (AC) (Felder, Joyce et al. 1995). We therefore examined if CB₂R could modulate the cAMP/PKA pathway during axon development. Consequently, using an antibody raised against cAMP, we evaluated changes in GC intracellular cAMP levels following CB₂R modulation (Figure 5A). We noticed a decrease in cAMP levels at the GC following treatment with CB₂R agonists (JWH015 or JWH133) as indicated by relatively low fluorescence intensities (Figure 5A-B). Conversely, CB₂R inverse agonists (AM630 or JTE907) as well as AC activator (forskolin) increased cAMP levels (Figure 5A, B). Accordingly, PKA phosphorylation levels were modulated following stimulation of CB₂R (Figure 5C). Furthermore, we verified if these CB₂R effects were dependant on PKA activity. Inhibition of PKA with KT5720 or H89 blocked AM630 induced GC expansion and filopodia number increase (Figure 5D-F). Forskolin effects on GC area

and filopodia number were abolished when JWH133 was added to the cultures. Taken together, these results demonstrate that the GC morphology reorganization induced by the CB₂R is dependant of the cAMP/PKA pathway.

2.5.6 Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Receptor is required for CB₂R Action on GC

The cAMP/PKA pathway has been suggested to influence the GC's sensitivity to netrin-1 (Ming, Song et al. 1997). Several studies have reported that activation of PKA increases netrin-dependent recruitment of DCC to the plasma membrane (Bouchard, Moore et al. 2004; Moore and Kennedy 2006; Bouchard, Horn et al. 2008). DCC is widely expressed in RGCs (Deiner, Kennedy et al. 1997) and cortical neurons (Bouchard, Horn et al. 2008) during development. Here, we report its presence in cultured retinal explant projections (Figure 1A-C). Since CB₂R and DCC are expressed in developing neurons, using pharmacological and genetic approaches, we investigated the potential interaction between these two receptors. First, we examined the effect of perturbing DCC function on CB₂R evoked GC remodeling. Adding DCC function blocking antibody (α DCC_{fb}) 15 minutes prior to pharmacological treatment blocked the CB₂R inverse agonists AM630 and JTE907 induced increases in GC surface area and filopodia number (Figure 6D, E and F). Secondly, CB₂R agonists or inverse agonists did not provoke any significant changes in GC area and filopodia number in neurons obtained from *dcc*^{-/-} mice which is contrary to their effects observed in neuron culture derived from *dcc*^{+/+} mice (Figure 6G-K). Furthermore, we report that DCC plasma membrane levels were also modified after CB₂R activation. Biotinylation results show that DCC fraction to membrane decreased following

agonist stimulation and contrarily, it increased subsequent to inverse agonist stimulation (Figure 6L). Taken together, these results demonstrate that the presence of functional receptors DCC is required for CB₂R induced reorganization of the GC.

2.5.7 CB₂R modulates Retinal Projection Growth *in vivo*

Recent studies on chick embryos have shown that inhibiting CB₁R affects axonal growth (Watson, Chambers et al. 2008). Recently, we observed that the CB₁R can modulate retinal projections *in vivo* (Argaw et al, submitted to Science). In addition, retinal cAMP elevation was shown to increase retinal collaterals length in the LTN (Argaw, Duff et al. 2008). To assess the contribution of the CB₂R pathway during retinal projection development *in vivo*, hamsters received intraocular injections of CB₂R modulators. Compared with rats and mice, hamsters have shorter gestation period. Consequently, they are born with a relatively premature nervous system (Clancy, Darlington et al. 2001). At birth (postnatal day 0, P0), RGC axons have not all reached their thalamic and midbrain targets. By P3, virtually all RGC axons have reached their targets (Bhide and Frost 1991). To take advantage of this opportunity, within 24 hours following birth, hamsters received a unilateral intraocular injection of AM630 or JWH133. Our data show that collateral projection length at the LTN was significantly higher in the group treated with a CB₂R inverse agonist when compared with the untreated group (Figure 7A-C). JWH133 group projection length did not differ significantly from control group. However, axon density analysis showed a decrease in branch length. Axon collateral density was also evaluated and branch density was increased in the AM630-treated group (Figure 7D). In addition, interfering

with the intrinsic ocular cannabinoid signaling with AM630 induced aberrant projections in the ipsilateral side of the SC as indicated by a robust labeling of retinal axons (Figure 7E).

2.5.8 CB₂R Knockout Mice Possess Deficits in dLGN Segregation

During perinatal development, RGCs from both eyes send axons which connect to multiple target cells in the dLGN. These projections spread throughout the dLGN sharing common terminal space. During postnatal development, an eye-specific segregation occurs (Godement, Salaun et al. 1984). In the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. The implication of the CB₂R during retinogeniculate development was further investigated in the dLGN in adult CB₂R-deficient mice (*cnr2*^{-/-}) and their wild-type (*cnr2*^{+/+}) littermates. Adult *cnr2*^{+/+} and *cnr2*^{-/-} mice received a bilateral intra-ocular injection of CTb-Alexa488 in left and of CTb-Alexa546 in right eyes, respectively. The area occupied by contralateral projections is larger in *cnr2*^{-/-} mice compared with *cnr2*^{+/+} mice (Fig. 8A-F). The contra- and ipsilateral retinal projection images were quantified using a multi-threshold method of analysis with MatLab software (Torborg and Feller 2004; Stevens, Allen et al. 2007). These data indicate a significant overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of *cnr2*^{-/-} mice (Fig. 8G-I). These observations confirm the essential role played by the CB₂R during the retinogeniculate development.

2.6 Discussion

In the present study, we showed that the CB₂R is present throughout the visual pathway during development as well as *in vitro* in primary retinal ganglion cell and cortical neuron cultures. CB₂R activation modulates cAMP levels resulting in a modification of GC surface area and filopodia number. This effect is PKA-dependant. In addition, we noticed that retinal projection length decreased following CB₂R agonist treatment while it increased with inverse agonist stimulation. Moreover, collapse and chemorepulsion of GC was also induced following a CB₂R agonist microgradient application. Most importantly, DCC, an axon guidance molecule receptor, is required for CB₂R mediated morphological changes of the GC. *In vivo*, we observed that a single intraocular injection of AM630, an inverse agonist of CB₂R, resulted in an increased of collateral projections length in the LTN and increased ipsilateral projections were found. Finally, eye-specific segregation in the dLGN was also altered in *cnr2*^{-/-} mice. Taken together, these observations demonstrate that CB₂R exert an important effect during the development of the retinothalamic pathway.

2.6.1 CB₂R Localization in the Developing CNS

CB₂R expression has been detected by immunoreactivity in adult mammal brain (Van Sickle, Duncan et al. 2005; Gong, Onaivi et al. 2006; Onaivi, Ishiguro et al. 2006). Although the receptor was also localized in developing neural progenitors and dorsal root ganglia (Ross, Coutts et al. 2001; Palazuelos, Aguado et al. 2006), its expression in RGCs and along the visual tract remained unknown until now. Here, we show that

primary RGC and cortical neuron cultures express CB₂R and endocannabinoids degrading enzyme MGL. In fact, the receptor is present on axonal projections, GCs and GC filopodia *in vitro*. Moreover, CB₂R was localized at several important points in the visual system: the OC, dLGN and SC. CB₂Rs are present both in a spatial and timely manner where they could influence extensive axonal navigation.

2.6.2 Signaling Pathway by which CB₂R modulates axon guidance

CB₂R effects on GC morphology were demonstrated in retinal projections and primary cortical neurons. Both bath application and microgradient stimulation studies showed its action on the GC. CB₁R agonists, like CB₂R agonists, provoked chemorepulsive effect and collapse of the axonal growth cone (Berghuis et al., 2007; Argaw, submitted to Science). Moreover, CB₂R is able to modulate length of retinal axons for both short and longer stimulation periods showing its capacity to influence axonal growth rate. These results are in conformity with the ones that with observed recently for CB₁R (Argaw et al, submitted to Science) and with those already published in the literature for the CB₁R (Berghuis, Rajnicek et al. 2007; Vitalis, Laine et al. 2008; Watson, Chambers et al. 2008).

In a search for the mechanism underlying CB₂R effect on GC morphology and axonal growth, we examined CB₂R known signaling pathway through AC modulation (Felder, Joyce et al. 1995). Our study shows that CB₂R acts by modulating intracellular cAMP concentrations, which directly influence PKA activity. These results are in contradiction with a recent study reporting that an anandamide stimulation of CB₁R induced MAPK activation in GABAergic neurons (Berghuis, Rajnicek et al. 2007). This

could in part be explained by the fact that as opposed to Berguis et al. (2007), we performed our experiments on RGC using CB₂R agonists and inverse agonists, and that different receptors can activate different signaling pathways. Cell developmental stage can also determine the activation pathway for a given phenomenon (Vogt Weisenhorn, Roback et al. 2001).

Increased cAMP levels in GC led to surface area and filopodia number increase in RGCs (Argaw, Duff et al. 2008). Addition of CB₂R inverse agonists to the neurons produced the same effect and increased GC cAMP levels. This effect correlates with previous studies reporting CB₂R-dependent modulation of AC activity (Bayewitch, Avidor-Reiss et al. 1995; Slipetz, O'Neill et al. 1995). Furthermore, we showed that the CB₂R modulates the cAMP/PKA pathway and this signaling pathway is essential to the GC remodeling. This sets PKA as an important downstream determinant for CB₂R-induced GC reorganization.

DCC is also required for CB₂R-induced GC morphology alterations. In fact, in the presence of an antibody which blocks DCC function, CB₂R agonists or inverse agonists induced no changes in GC morphology. Furthermore, in DCC knockout mice, absence of a functional DCC blocks CB₂R effects on the GC. Earlier reports showed that PKA potentiated the mobilization of DCC to the cell surface (Bouchard, Moore et al. 2004; Bouchard, Horn et al. 2008). We have confirmed that elevation of PKA activity induces DCC receptor translocation to the plasma membrane through biotinylation analysis. Our results indicate that CB₂R, which modulates cAMP levels, regulates growth cone expansion via a PKA-dependant mechanism. Variation of PKA activity will modulate

the presence of DCC receptors at the GC surface and will induce GC morphological changes (Bouchard, Moore et al. 2004; Bouchard, Horn et al. 2008). Similar mechanism was observed with CB₁R (Argaw et al, submitted to Science).

The principal study that elucidated CB₁R mechanism in axon guidance proposes that CB₁R stimulation activates RhoA in GABAergic interneurons (Berghuis, Rajnicek et al. 2007). Spatially restricted activation of RhoA in the collapsing growth cone is associated with filopodial retraction and growth cone repulsion in response to chemical and electrical extracellular cues (Wahl, Barth et al. 2000; Hu, Marton et al. 2001; Yuan, Jin et al. 2003; Rajnicek, Foubister et al. 2006) through the activation of the serine-threonine kinase Rho kinase (ROCK) and subsequent phosphorylation of myosin light chains (Amano, Ito et al. 1996; Rajnicek, Foubister et al. 2006). Recently, Moore et al (Moore, Correia et al. 2008) demonstrate that RhoA inhibition recruits DCC to the plasma membrane. Therefore, CB₁R agonists increasing RhoA activity may decrease the presence of DCC at the membrane and induce GC collapse. Conversely, CB₁R inverse agonists or antagonists will decrease the activity of RhoA pathway and promote axon growth via the translocation of DCC to the membrane.

Evidences from the literature suggest that there is an interaction between the RhoA and PKA pathway. In fact, PKA can directly inhibit RhoA (Lang, Gesbert et al. 1996; Forget, Desrosiers et al. 2002; Ellerbroek, Wennerberg et al. 2003; Qiao, Huang et al. 2003), the PKA induced recruitment of DCC to the plasma membrane must engage several mechanisms and inhibition of RhoA signaling could be one of them. We are currently investigating this possible interaction.

2.6.3 How Does CB₂R Act on Axon Pathfinding?

CB₁R agonist induces neurite retraction in neuroblast cells (Zhou and Song 2001) and chemorepulsive effect in GABAergic (Berghuis, Rajnicek et al. 2007) and glutamatergic neurons (Argaw et al., submitted to Science). Because CB₂R can modulate GC morphology and its agonists have chemorepulsive effect on retinal projections, it acts as a modulator in axon guidance. In a complex system such as the brain, CB₂R modulation of cAMP levels by eCBs could determine the guidance response to netrin-1 (Ming, Song et al. 1997) or other guidance cues. During the retinothalamic development, eCBs could act as inhibitory modulators. In fact, integration of multiple signals by RGC axons may increase the specificity of their navigation and allow a better target recognition.

We showed that a single intraocular injection of AM630, a CB₂R inverse agonist, could increase the length of projections in the LTN. Similar effects on growth rate were reported using cAMP analog (Argaw, Duff et al. 2008). We also observed the presence of aberrant ipsilateral RGC projections following a single intraocular injection of AM630. CB₂R activity could affect axonal arborization and branching, similarly to CB₁R (Mulder, Aguado et al. 2008). It seems possible that, by acting on intracellular signaling pathways, the injection increased the branching or stabilized ipsilateral projections that would have normally retracted.

These insights are relevant to our understanding of guidance phenomenon, because endocannabinoid cues seem to affect retinal ganglion cell projections via interactions with both the retina and the axonal GC.

2.6.4 Effect on Segregation

We have noticed that *cnr2*^{-/-} mice have increased overlapping regions in the dLGN compared to *cnr2*^{+/+} mice, which we interpret as a deficit in eye-specific segregation of retinal projections. This process could be influenced in the wildtype animal by eCB actions at the retina or directly at the axonal GC. It is possible that non functional CB₂R influence retinal spontaneous activity, which is necessary for segregation and maintenance of specific inputs to the dLGN (Penn, Riquelme et al. 1998; Chapman 2000), modifying the segregation outcome. Deficiency in eye-specific segregation may also occur as a result of the absence of functional CB₂R directly in the dLGN. In *cnr2*^{-/-} mouse, eCBs would not be able to act as local modulators, inducing retraction of exuberant ectopic branches that have less activity. In fact, eCBs, via their action on CB₂Rs may contribute to the normal inhibitory environment present in the CNS (Cui, Yip et al. 2003; Monsul, Geisendorfer et al. 2004). It is also plausible to hypothesize that CB₂R knockout effect in mouse may not be as important as predicted because CB₁R might in part surrogate CB₂R activity, especially since main eCBs, like 2-AG, have affinity for both receptors types (Sugiura, Kodaka et al. 1996; Stella, Schweitzer et al. 1997).

2.6.5 Differences between CB₁R and CB₂R

CB₁R and CB₂R both seem to be expressed in a similar pattern throughout the visual pathway with mostly analog actions and appear to be overlapping during the guidance process (Argaw et al., submitted). Even though both cannabinoid receptors produce a chemorepulsive response *in vitro*, we noticed some different effects during

in vivo studies. There was an increased number of abnormal ipsilateral labeling occurrences after a unilateral injection of inverse agonist for CB₁R. Although we cannot put aside the animal maturations level as a possible cause of this difference, it seem possible that CB₁R agonist could influence more selectively some specific RGC subtype and suggest that both receptors may not be expressed homogeneously across RGCs (Volgyi, Chheda et al. 2008). Another observation that reinforces this hypothesis is the fact that intraocular injection of agonist for CB₁R or CB₂R did not produce the same effect on the DTN and LTN collateral projections, each receptor having a bigger effect in one nucleus in particular. This hypothesis is further supported by the fact that db-cAMP, a cAMP analog, could increase projection length in both thalamic nuclei (Argaw, Duff et al. 2008).

This study is the first to identify CB₂R potential implication in guidance phenomenon, and the signaling pathway that mediates the effect of this receptor effects. Altogether, the present study identifies the mechanism by which the eCB system via the CB₂R modulates retinothalamic development and nervous system wiring.

2.7 References

- Amano, M., M. Ito, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *J Biol Chem* **271**(34): 20246-9.
- Argaw, A., G. Duff, et al. (2008). "Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development." *Exp Neurol* **211**(2): 494-502.
- Barker, P. A. and E. M. Shooter (1994). "Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells." *Neuron* **13**(1): 203-15.
- Bayewitch, M., T. Avidor-Reiss, et al. (1995). "The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling." *FEBS Lett* **375**(1-2): 143-7.
- Berghuis, P., A. M. Rajnec, et al. (2007). "Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity." *Science* **316**(5828): 1212-6.
- Berrendero, F., N. Sepe, et al. (1999). "Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period." *Synapse* **33**(3): 181-91.
- Bhide, P. G. and D. O. Frost (1991). "Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets." *J Neurosci* **11**(2): 485-504.
- Bouchard, J.-F., K. E. Horn, et al. (2008). "Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1." *Journal of Neurochemistry* **107**(2): 398-417.
- Bouchard, J. F., S. W. Moore, et al. (2004). "Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension." *J Neurosci* **24**(12): 3040-50.
- Bovolenta, P. (2005). "Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy?" *J Neurobiol* **64**(4): 405-16.
- Carrier, E. J., C. S. Kearn, et al. (2004). "Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism." *Mol Pharmacol* **65**(4): 999-1007.
- Chapman, B. (2000). "Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus." *Science* **287**(5462): 2479-82.
- Clancy, B., R. B. Darlington, et al. (2001). "Translating developmental time across mammalian species." *Neuroscience* **105**(1): 7-17.
- Cui, Q., H. K. Yip, et al. (2003). "Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons." *Mol Cell Neurosci* **22**(1): 49-61.
- Deiner, M. S., T. E. Kennedy, et al. (1997). "Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia." *Neuron* **19**(3): 575-89.
- Demyanenko, G. P. and P. F. Maness (2003). "The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons." *J Neurosci* **23**(2): 530-8.

- Dickson, B. J. (2002). "Molecular mechanisms of axon guidance." Science **298**(5600): 1959-64.
- Ellerbroek, S. M., K. Wennerberg, et al. (2003). "Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo." J Biol Chem **278**(21): 19023-31.
- Erskine, L. and E. Herrera (2007). "The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance." Dev Biol **308**(1): 1-14.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Mol Pharmacol **48**(3): 443-50.
- Fernandez-Ruiz, J., J. Romero, et al. (2007). "Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?" Trends Pharmacol Sci **28**(1): 39-45.
- Forget, M. A., R. R. Desrosiers, et al. (2002). "Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes." Biochem J **361**(Pt 2): 243-54.
- Frodin, M., P. Peraldi, et al. (1994). "Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells." J Biol Chem **269**(8): 6207-14.
- Godement, P., J. Salaun, et al. (1984). "Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse." J Comp Neurol **230**(4): 552-75.
- Goncalves, M. B., P. Suetterlin, et al. (2008). "A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner." Mol Cell Neurosci **38**(4): 526-36.
- Gong, J. P., E. S. Onaivi, et al. (2006). "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain." Brain Res **1071**(1): 10-23.
- Howlett, A. C. (1995). "Pharmacology of cannabinoid receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 607-34.
- Howlett, A. C., F. Barth, et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.
- Hu, H., T. F. Marton, et al. (2001). "Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling." Neuron **32**(1): 39-51.
- Keino-Masu, K., M. Masu, et al. (1996). "Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor." Cell **87**(2): 175-185.
- Kennedy, T. E., T. Serafini, et al. (1994). "Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord." Cell **78**(3): 425-35.
- Klein, T. W., C. Newton, et al. (2003). "The cannabinoid system and immune modulation." J Leukoc Biol **74**(4): 486-96.
- Lang, P., F. Gesbert, et al. (1996). "Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes." EMBO J **15**(3): 510-9.
- Meyer-Franke, A., G. A. Wilkinson, et al. (1998). "Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons." Neuron **21**(4): 681-93.
- Ming, G.-l., H.-j. Song, et al. (1997). "cAMP-Dependent Growth Cone Guidance by Netrin-1." Neuron **19**(6): 1225-1235.

- Molina-Holgado, F., A. Rubio-Araiz, et al. (2007). "CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation." Eur J Neurosci **25**(3): 629-34.
- Monsul, N. T., A. R. Geisendorfer, et al. (2004). "Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve." Exp Neurol **186**(2): 124-33.
- Moore, S. W., J. P. Correia, et al. (2008). "Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1." Development **135**(17): 2855-64.
- Moore, S. W. and T. E. Kennedy (2006). "Protein Kinase A Regulates the Sensitivity of Spinal Commissural Axon Turning to Netrin-1 But Does Not Switch between Chemoattraction and Chemorepulsion." J. Neurosci. **26**(9): 2419-2423.
- Mulder, J., T. Aguado, et al. (2008). "Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(25): 8760-5.
- Onaivi, E. S., H. Ishiguro, et al. (2006). "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." Ann N Y Acad Sci **1074**: 514-36.
- Palazuelos, J., T. Aguado, et al. (2006). "Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation." Faseb J **20**(13): 2405-7.
- Penn, A. A., P. A. Riquelme, et al. (1998). "Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity." Science **279**(5359): 2108-12.
- Qiao, J., F. Huang, et al. (2003). "PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L972-80.
- Rajnicek, A. M., L. E. Foubister, et al. (2006). "Temporally and spatially coordinated roles for Rho, Rac, Cdc42 and their effectors in growth cone guidance by a physiological electric field." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1723-35.
- Ross, R. A., A. A. Coutts, et al. (2001). "Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception." Neuropharmacology **40**(2): 221-32.
- Salzet, M. (2000). "Invertebrate molecular neuroimmune processes." Brain Res Brain Res Rev **34**(1-2): 69-79.
- Shekarabi, M., S. W. Moore, et al. (2005). "Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion." J Neurosci **25**(12): 3132-41.
- Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." J Anat **87**(4): 387-406.
- Skaper, S. D., A. Buriani, et al. (1996). "The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3984-9.
- Slipetz, D. M., G. P. O'Neill, et al. (1995). "Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase." Mol Pharmacol **48**(2): 352-61.

- Stella, N., P. Schweitzer, et al. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." Nature **388**(6644): 773-8.
- Stevens, B., N. J. Allen, et al. (2007). "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." Cell **131**(6): 1164-78.
- Sugiura, T., T. Kodaka, et al. (1996). "2-Arachidonoylglycerol, a Putative Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, Induces Rapid, Transient Elevation of Intracellular Free Ca²⁺ in Neuroblastoma × Glioma Hybrid NG108-15 Cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **229**(1): 58-64.
- Torborg, C. L. and M. B. Feller (2004). "Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns." J Neurosci Methods **135**(1-2): 17-26.
- Van Sickle, M. D., M. Duncan, et al. (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." Science **310**(5746): 329-32.
- Vitalis, T., J. Laine, et al. (2008). "The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro." Eur J Neurosci **28**(9): 1705-18.
- Vogt Weisenhorn, D. M., L. J. Roback, et al. (2001). "Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage." Exp Neurol **169**(1): 44-55.
- Volgyi, B., S. Chheda, et al. (2008). "Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina." J Comp Neurol **512**(5): 664-687.
- Wahl, S., H. Barth, et al. (2000). "Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase." J Cell Biol **149**(2): 263-70.
- Walsh, D. A., J. P. Perkins, et al. (1968). "An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle." J Biol Chem **243**(13): 3763-5.
- Watson, S., D. Chambers, et al. (2008). "The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation." Molecular and Cellular Neuroscience **38**(1): 89-97.
- Yuan, X. B., M. Jin, et al. (2003). "Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance." Nat Cell Biol **5**(1): 38-45.
- Zhou, D. and Z. H. Song (2001). "CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells." J Neurosci Res **65**(4): 346-53.

**Figure 1. Spatio-temporal Expression of the CB₂R and eCB Metabolizing Enzyme
During postnatal Retinal Projection Development**

At postnatal day 1 (P1), golden hamsters were injected in the eye with CTb-FITC, an anterograde tracer, to label RGC projections. Hamsters were perfused at P5, P7 or P9, and their brains were fixed and frozen. Coronal sections were immunostained for CB₂R (Secondary alexa-546) **(A-G)**. *cnr2*^{+/+} and *cnr2*^{-/-} adult mouse retinas are shown **(H-I)**. DIV1 retinal explants GCs labeled with primary antibodies directed against CB₂R **(J,M and P)** and MGL **(S)**. GCs were also labeled for β-actin **(K)**, L1 **(Q)** or Neurofilament-L **(N and T)**. Merged images are presented in L, O, R and U. Scale bars : 50 μm **(A-G)**; 5μm **(J-U)**.

Article Figure 1 : Spatio-temporal Expression of the CB₂R and eCB Metabolizing Enzyme During postnatal Retinal Projection Development

Figure 1

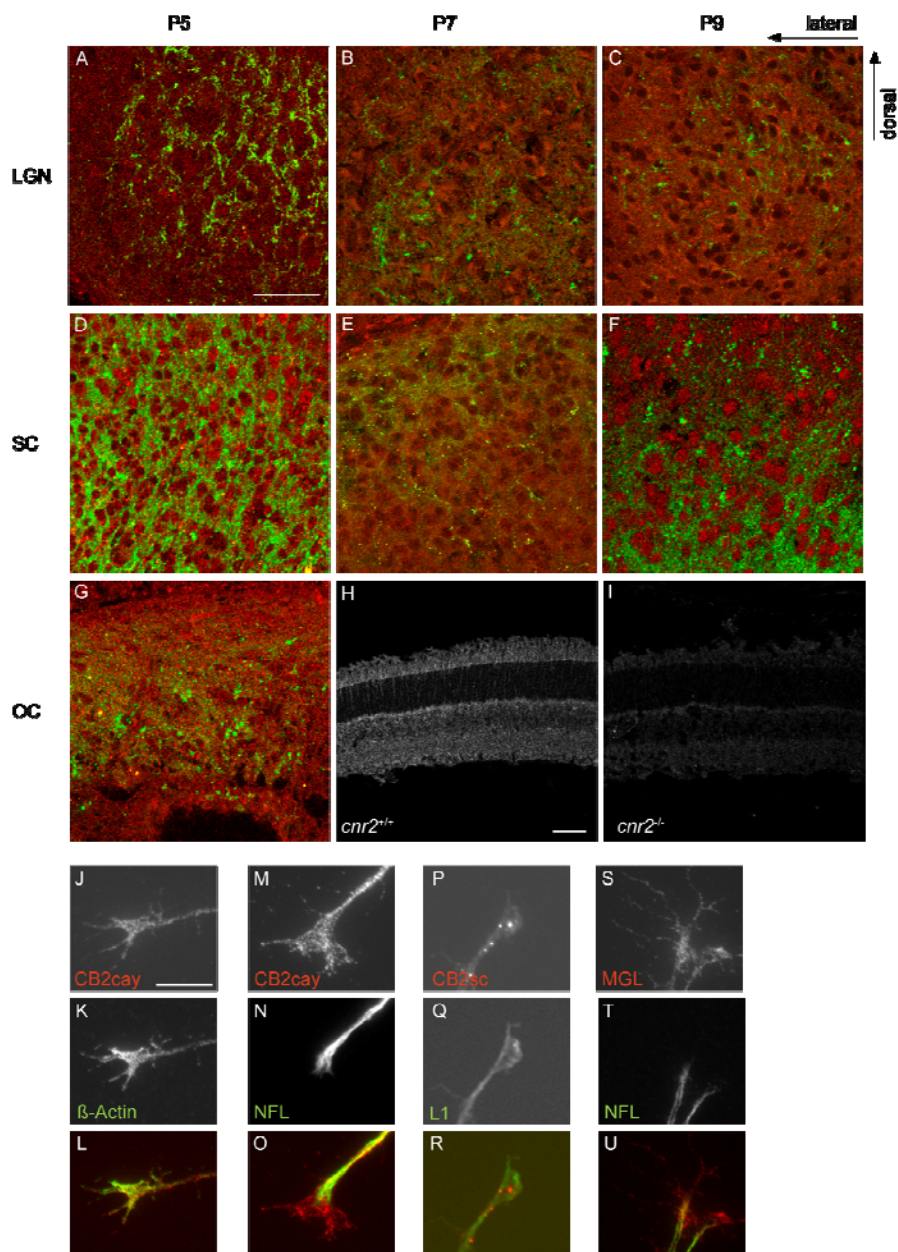


Figure 2. CB₂R Reorganizes the growth cone Morphology

Retinal explants **(A)** and dissociated cortical neurons **(D)** were grown 1 and 2 days *in vitro*, respectively. GCs were exposed for 1 hour to 300 nM JWH015, 300 nM JWH133, 300 nM AM630, 300 nM JTE907 or 10 μ M FSK. Following treatment, neurons were fixed and immunolabeled for GAP-43. Addition of FSK and CB₂R inverse agonists (AM630, JTE907) increased GC surface area **(B and E)** and filopodia number **(C and F)** while the opposite effects was observed following CB₂R agonists (JWH015 and JWH133) (mean \pm SEM; n = 374 to 714 per condition). Scale bar, 5 μ m (A); 20 μ m (D).

*P<0.05

Article Figure 2 : CB₂R Reorganizes the growth cone Morphology

Figure 2

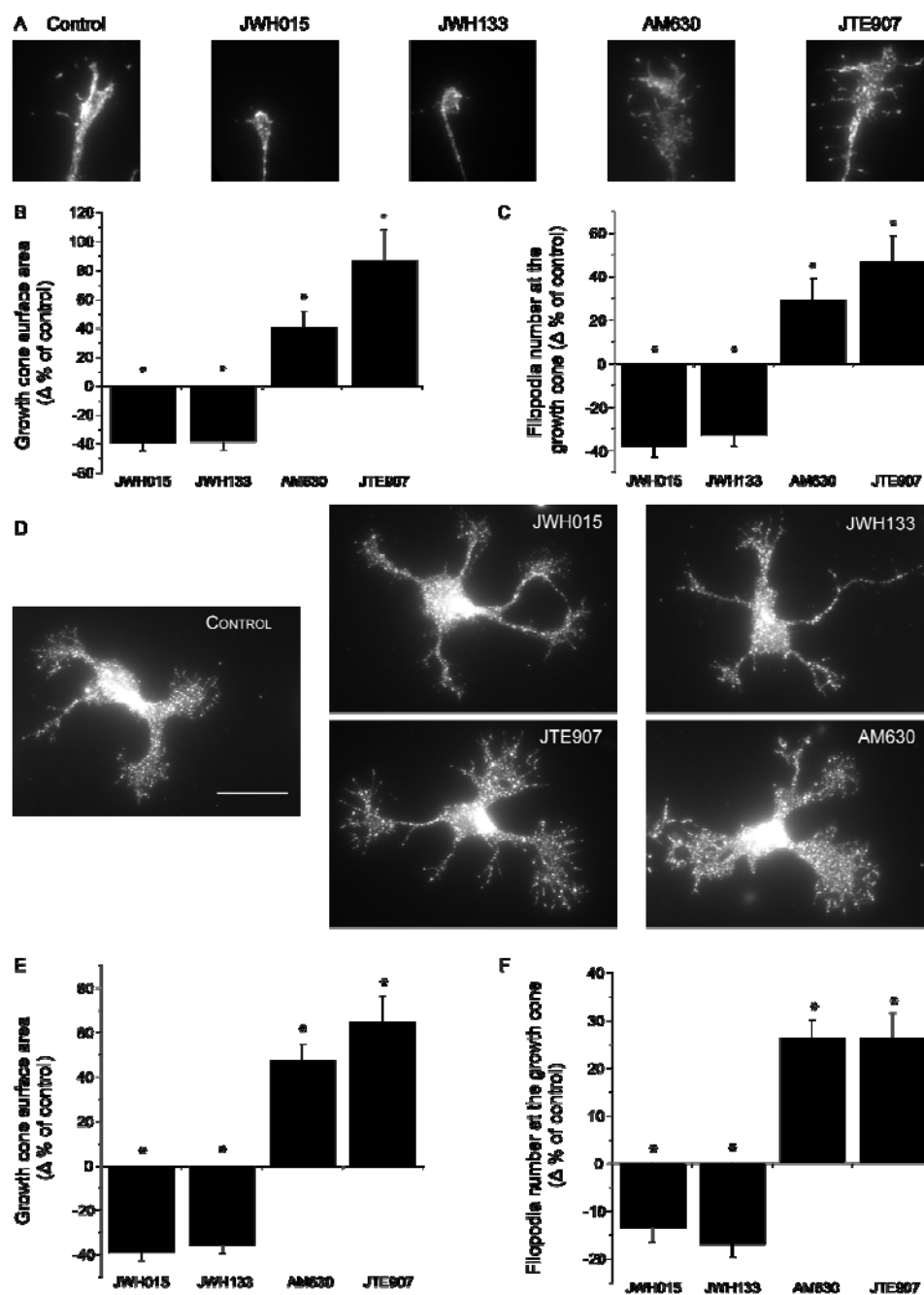


Figure 3. CB₂R Modulates Axon Length

Retinal explants obtained from CD1, C57Bl/6-*cnr2*^{+/+} or C57Bl/6-*cnr2*^{-/-} mice were treated for 15 hours with 300 nM JWH015, 300 nM JWH133, 300 nM AM630 or 300 nM JTE907 **(A)**. Explants were labeled using anti-GAP43. Quantification of total projections length was normalized for explants area and expressed as percentage of the control group (B-C) (mean ± SEM; n = 20 to 82 explants per condition). Addition of CB₂R agonists (JWH015 and JWH133) decreased axon growth, while treatment with CB₂R inverse agonists (AM630 and JTE907) increased it **(B)**. Pharmacological modulation of the CB₂R did not induce any significant changes in projection length explants obtained from *cnr2*^{-/-} mouse embryos whereas JWH133 induced a significant decrease in projection length while AM630 augmented it in *cnr2*^{+/+} explants **(C)**. Scale bar, 200µm. *P<0.05

Article Figure 3 : CB₂R Modulates Axon Length

Figure 3

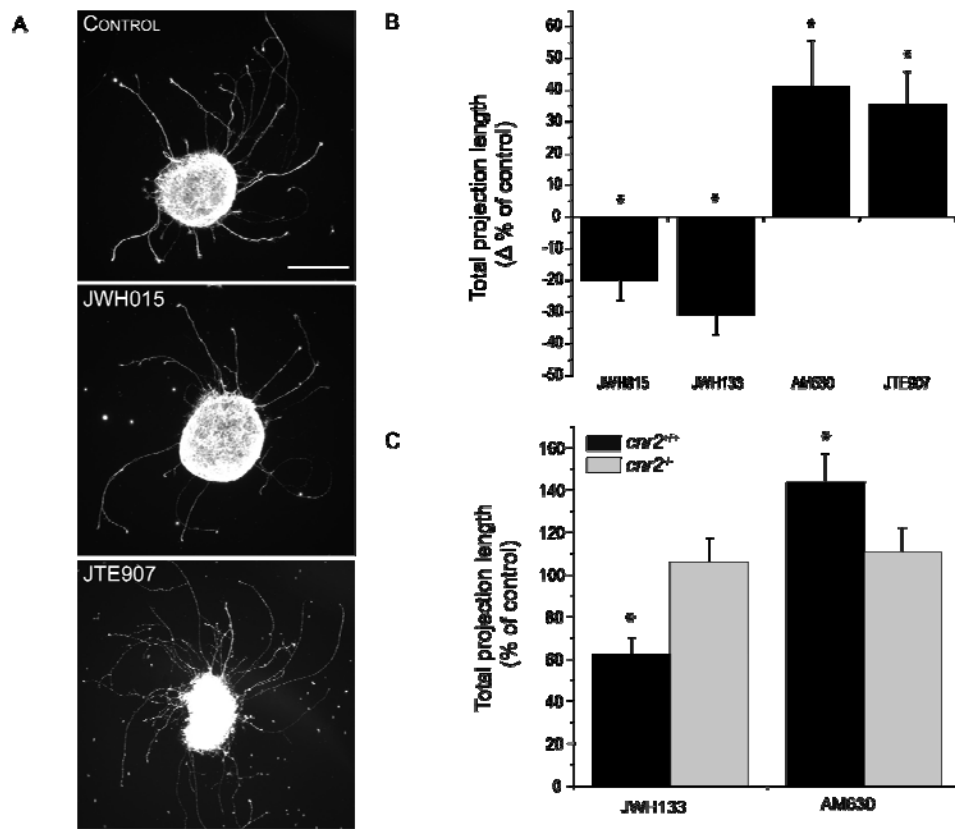


Figure 4. CB₂R agonists influence growth cone behavior

Time-lapse microscopy of GC of DIV1 mouse retinal explants exposed to dbcAMP, JWH015 or JWH133 gradients **(A)**. Arrows and arrow heads show micropipette angle and GC position, respectively. The micropipette tip diameter was 3 μ m wide and positioned at 45° angle and 100 μ m from the GC of interest. Scatter plot analysis of the GC behavior upon stimulation **(B)**. Histograms illustrate neurite length **(C)** and turning angle of GC following treatment **(D)** (mean \pm SEM; n = 3 to 7 per condition). Stable analog of cAMP (db-cAMP) increased axon growth and turning toward the pipette tip while CB₂R agonists (JWH133 and JWH015) induced GC collapse, axon retraction and repulsion. Photomicrograph represents a microgradient created during drug application **(E)**. Scale bars: 20 μ m **(A)**; 50 μ m **(E)**.

Article Figure 4 : CB₂R agonists influence growth cone behavior

Figure 4

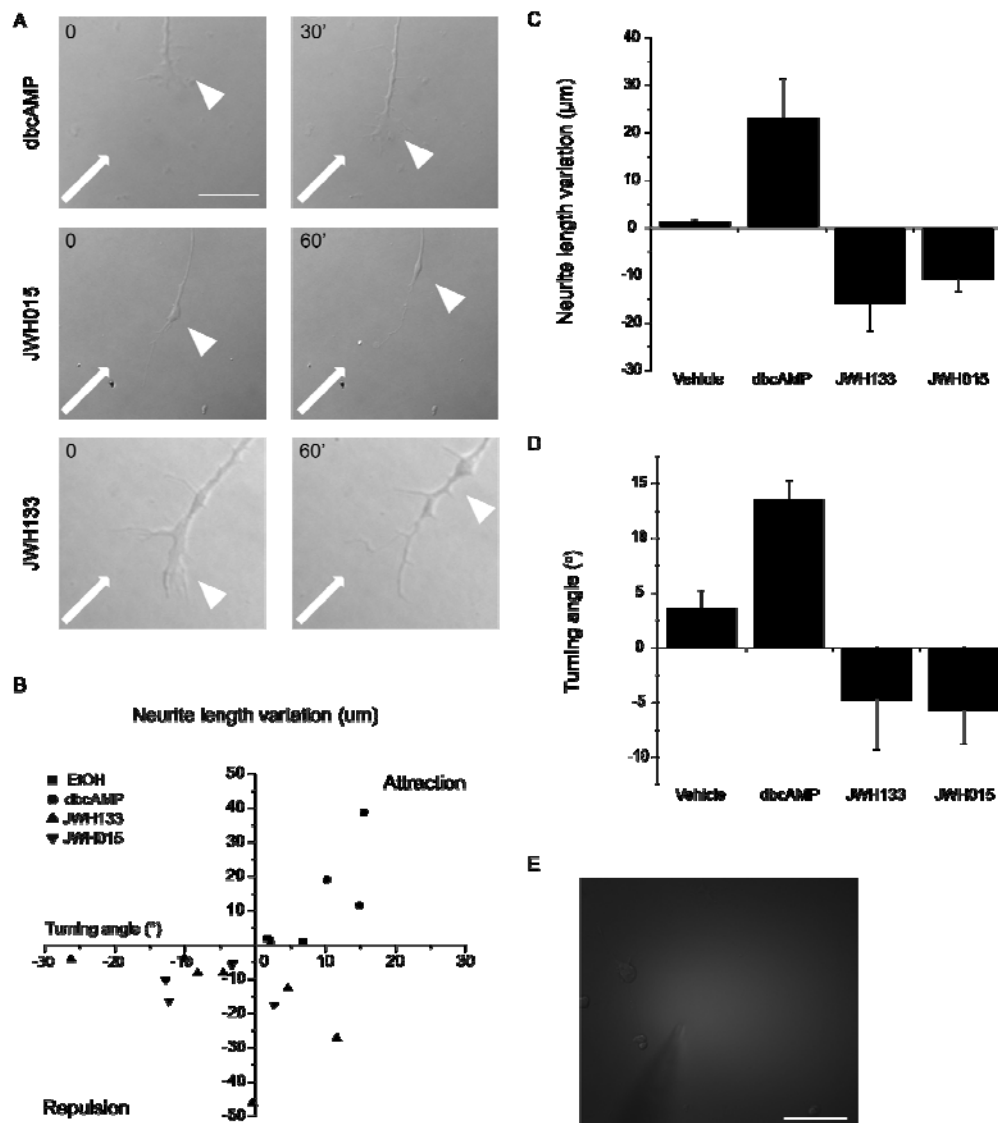


Figure 5. CB₂R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector

GCs were immunolabeled for intracellular cAMP following FSK, CB₂R agonist (JWH015, JWH133), or CB₂R inverse agonist (AM630, JTE907) application. Representative photomicrographs **(A)**. Quantification of cAMP fluorescence intensity at the GC **(B)** indicates a significant decrease in cAMP levels following treatment with JWH133 and JWH015 while the opposite was observed following stimulation with AM630, JTE907 or FSK (mean \pm SEM; n = 161 to 212 per condition). Scale bar, 5 μ m. *P<0.05. Western analysis indicates important changes in PKA phosphorylation levels following stimulation with CB₂R agonists or inverse agonists **(C)**. For GC morphology analysis, neurons were exposed for 1 hour to FSK, FSK and JWH133, AM630, AM630 and H89 (an inhibitor of PKA), or AM630 and KT5720 (another inhibitor of PKA) **(D)**. Neurons were fixed and immunolabeled for GAP-43. Histograms represent quantification of GC surface area **(E)** and filopodia number **(F)**. JWH133 abolished FSK induced increases in GC surface area and filopodia number and PKA inhibition abolished GC morphology modifications induced by AM630 (mean \pm SEM; n = from 160 to 360 per condition). Scale bar, 5 μ m. # P<0.05 versus FSK group *P<0.05 versus AM630 group.

Article Figure 5 : CB₂R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector

Figure 5

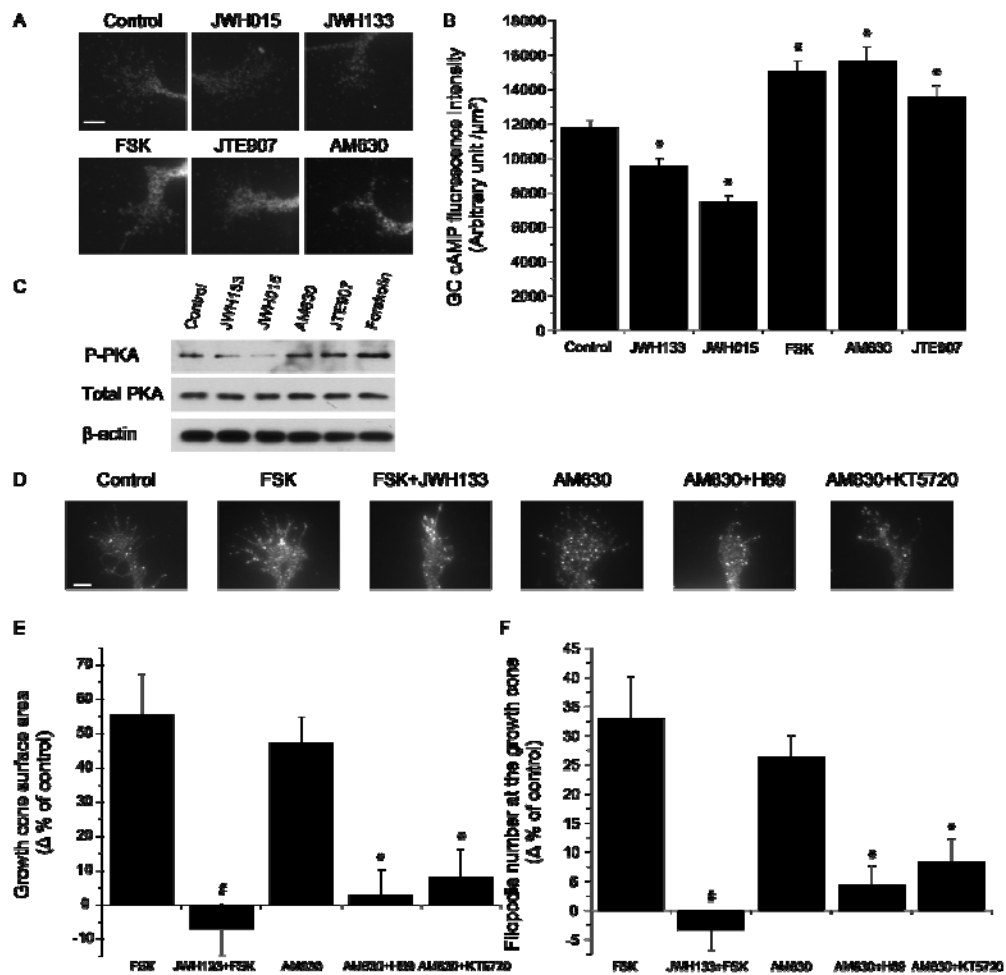


Figure 6. The DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB₂R Induced

Reorganization of the GC

Retinal explants were grown 1 day *in vitro* and GCs were immunolabeled for DCC receptor **(A)** and L1 **(B)**. Merged images are presented in **C**. Dissociated neurons were cultured for 2 days *in vitro* and treated with pharmacological agents for 1 hour. DCC function blocking (α DCC_{fb}) antibody 3.5 μ g/ml was added 15 minutes prior to AM630 or JTE907 stimulation. α DCC_{fb} abolished AM630 and JTE907 induced increases in GC surface area **(D)** and filopodia number **(E)** (mean \pm SEM; n = from 134 to 159 per conditions). Photomicrographs of GC for *dcc*^{+/+} or *dcc*^{-/-} mice **(G)**. GC area and filopodia number of *dcc*^{+/+} and *dcc*^{-/-} **(H-K)** Pharmacological modulation of the CB₂R did not induce any significant changes in GC surface area nor filopodia number in primary neuron cultures obtained from *dcc*^{-/-} mice embryos **(H and J)** whereas JWH133 and JWH015 induced a decrease in GC surface and filopodia number while AM630 and JTE907 augmented these endpoints in *dcc*^{+/+} neuron cultures **(I and K)**. Mean \pm SEM; 125 to 219 per conditions). DIV2 neurons were treated with AM630, JTE907, AM630 and KT5720 or AM630 and KT5720 for 15 minutes. Following biotinylation and western blot, expression of surface protein was assessed for DCC receptor, CB₂R and NACM **(L)**. Scale bar, 5 μ m (A-E).

Article Figure 6 : The DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB₂R Induced Reorganization of the GC

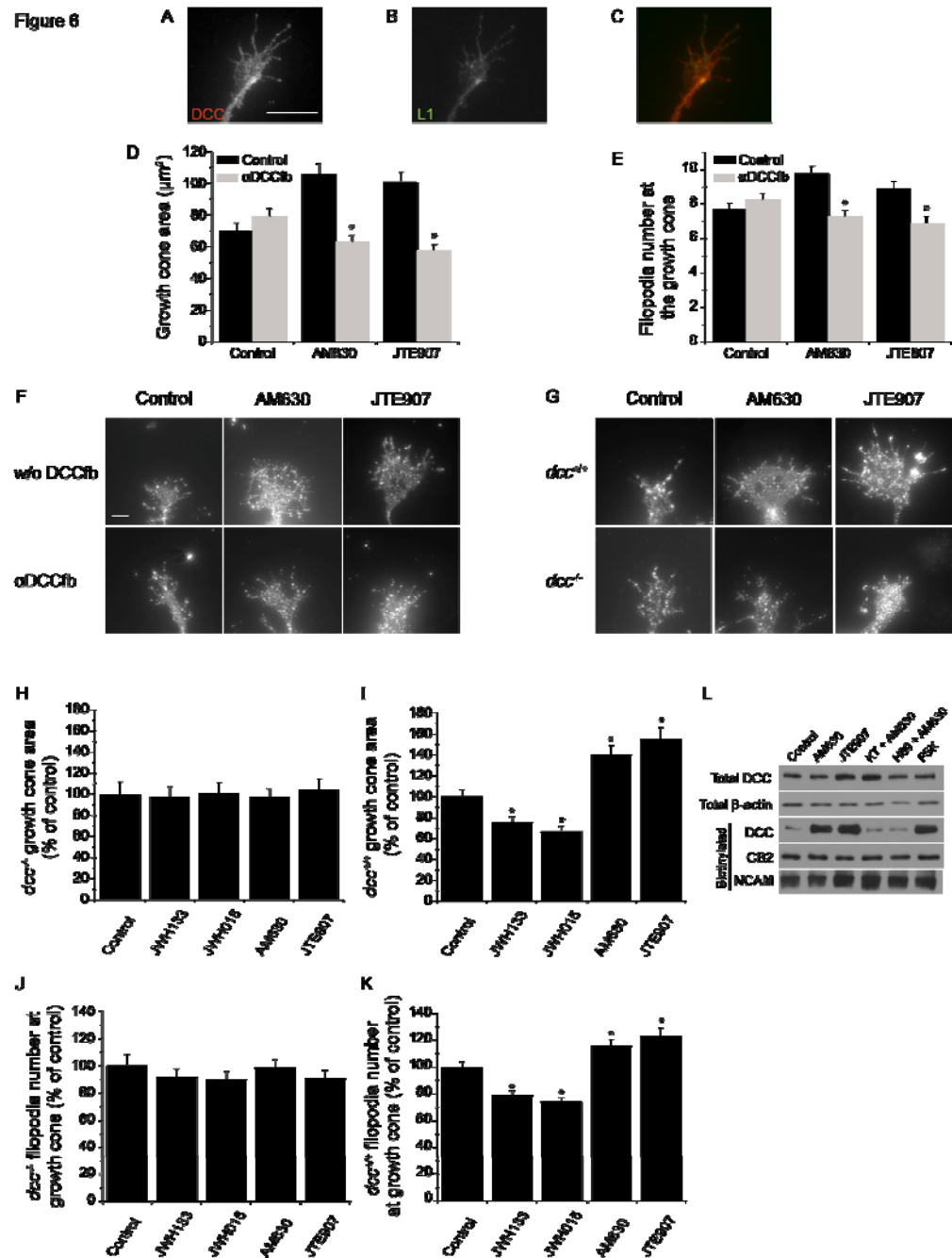


Figure 7. CB₂R Modulates RGC Projection Development *In vivo*

Hamsters at P1 were injected in the eye with CTb-FITC and 300 μ M AM630, 300 μ M JWH133 or vehicle control. Perfusion and brain fixation were done at P5. CTb revelation was performed with anti-CTb, enhanced with ABC Kit and revealed with DAB. Photomicrograph of the LTN for the control and the AM630 groups **(A)** and terminal magnifications are shown **(B)**. Quantification for collateral projection length is expressed as mean \pm SEM percentage versus the control group **(C)**. Quantification for axon branch density was also performed. AM630 increased axon growth **(C)** and collateral branch number **(D)** (n = 4 to 5 brains per condition). Photomicrographs showing SC for the control and the treated groups **(E)**. In the treated (AM630) group, the presence of aberrant projections is illustrated by labeling in both hemispheres **(E)**. Scale bars, 200 μ m **(A)**; 50 μ m **(B)**; 600 μ m **(E)** *P<0.05 versus control group

Article Figure 7 : CB₂R Modulates RGC Projection Development *In vivo*

Figure 7

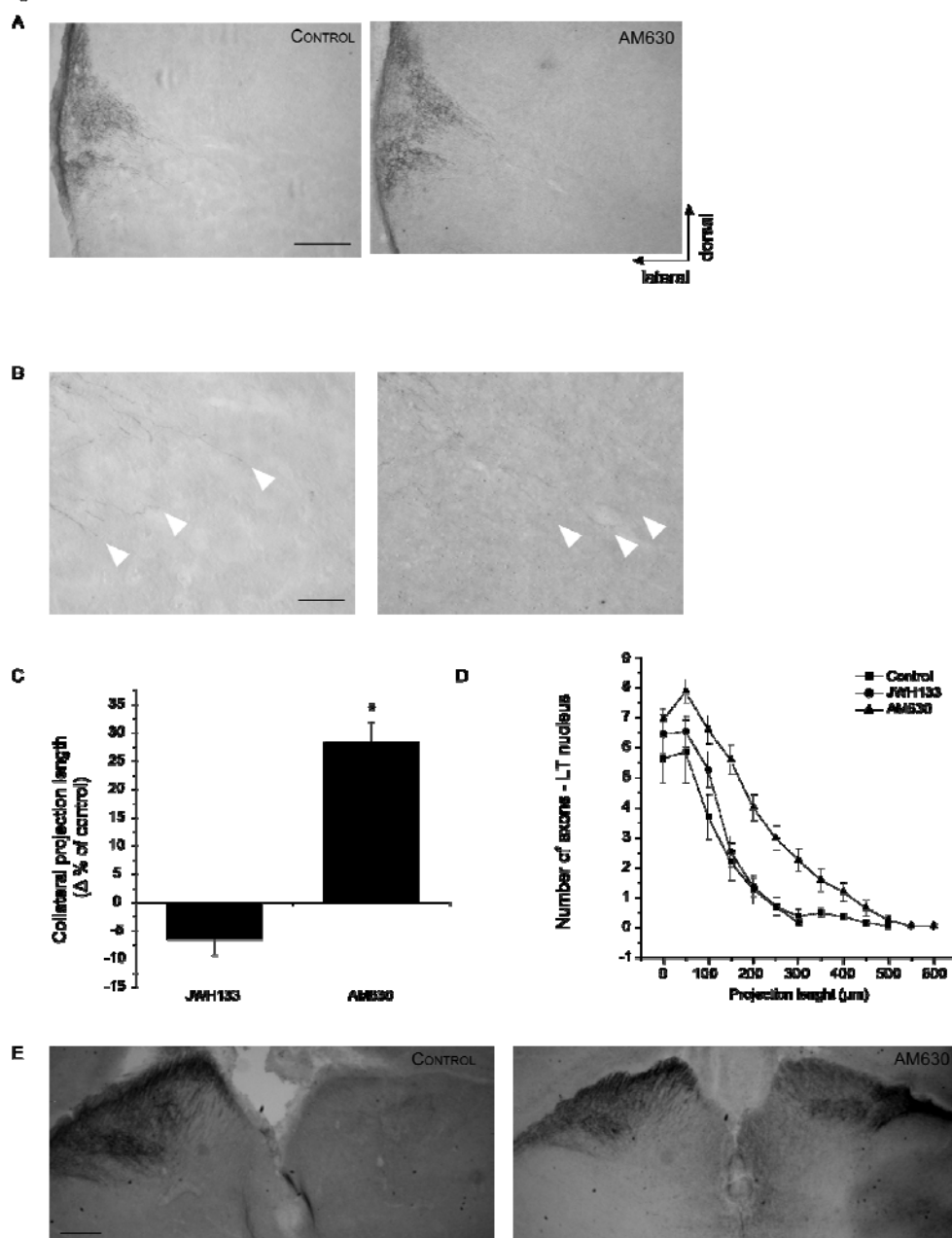


Figure 8. CB₂R Modulates Eye-specific Segregation in the dLGN

Fluorescence images of the dLGN for C57Bl/6-*cnr2*^{+/+} and C57Bl/6-*cnr2*^{-/-} mouse showing contralateral projections from right eye injected with CTb-Alexa-546 **(A-B)** and ipsilateral projections from left eye injected with CTb-Alexa-488 **(C-D)**. Merged images show all projections from both eyes to the dLGN **(E-F)**. Images were also merged in regard to signal intensity, overlaying projections are shown in yellow **(G-H)**. Graphic shows percentage of the dLGN receiving overlapping inputs as mean ± SEM (n = 4 to 5 brains per condition) **(I)**. Quantification of the percentage of overlapping inputs in *cnr2*^{-/-} and *cnr2*^{+/+} adult mice indicating a significant overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of *cnr2*^{-/-} mice. Scale bar, 200µm (A-F) *P<0.05

Article Figure 8 : CB₂R Modulates Eye-specific Segregation in the dLGN

Figure 8

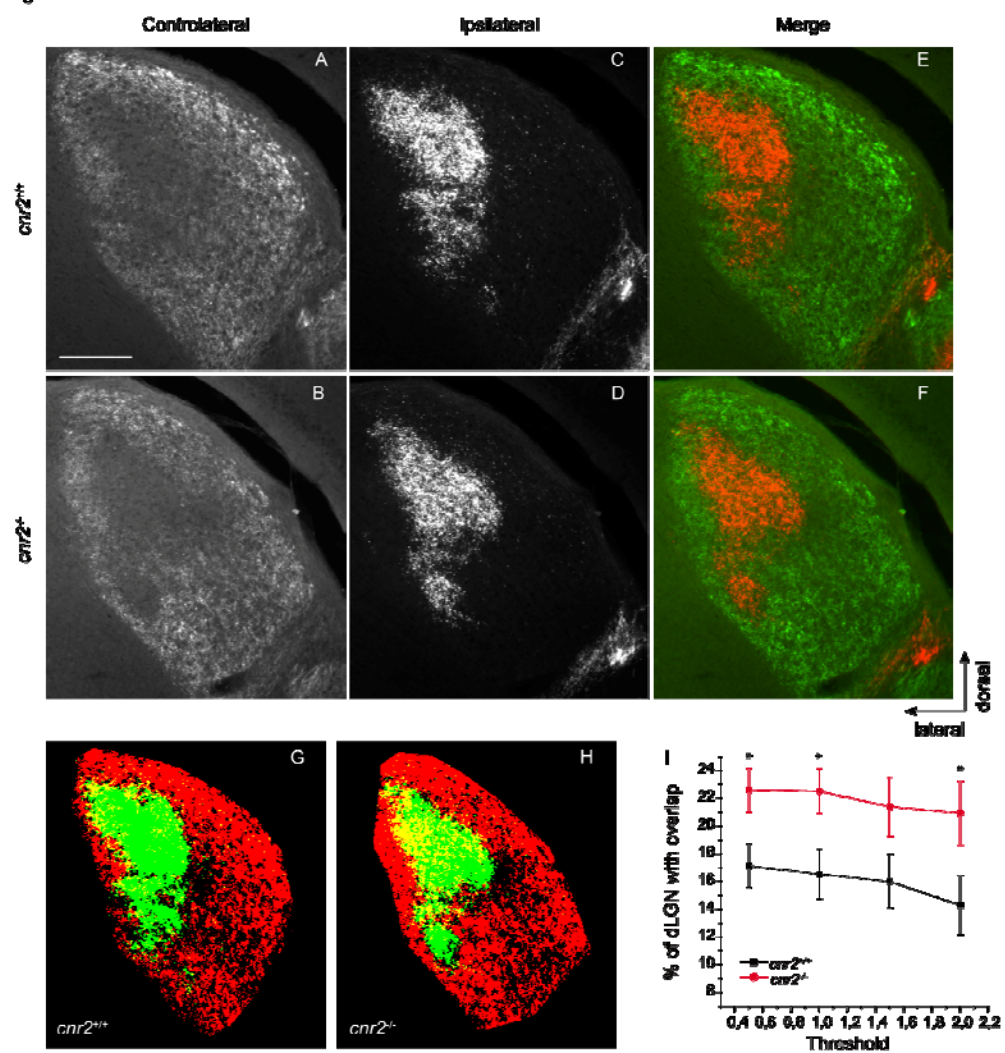
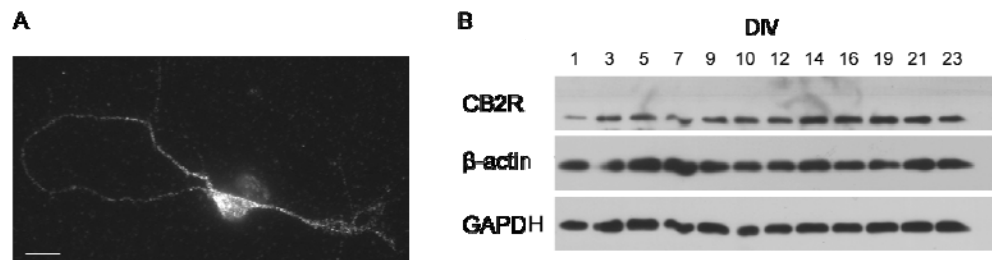


Figure S-1 Expression of CB₂R in primary cortical neuron cultures

Photomicrograph of DIV2 primary cortical neuron immunolabeled for CB₂R **(A)**.

Primary cortical neurons were cultured for various numbers of days *in vitro* and cell extracts were equalized for total protein content. Western blot shows temporal protein expression of CB₂R, β -actin and GAPDH **(B)**. Scale bar: 10 μ m (A)

Article Figure 9 : Figure S-1 Expression of CB₂R in primary cortical neuron cultures**Figure S-1**

3. Discussion générale

Le récepteur CB₂ est exprimé au cours du développement du SNC du hamster à différents âges (P5, P7, P9) au niveau de plusieurs régions importantes de la voie rétinothalamique soit le chiasma optique, le corps genouillé latéral et les collicules supérieurs. Nous avons également observé sa présence au niveau de la rétine chez la souris adulte, et son absence chez l'animal *cnr2*^{-/-}. Ceci confirme les résultats de la littérature qui démontraient la présence de l'ARNm du récepteur CB₂ au niveau de la rétine du rat adulte (Lu, Straiker et al. 2000). Le récepteur CB₂ ainsi que l'enzyme de dégradation des endocannabinoïdes MGL sont tous deux présents au niveau des projections, des cônes de croissance et des filopodes des neurones corticaux primaires et des CGRs en culture. La présence spatio-temporelle du récepteur CB₂, ainsi que celle du système endocannabinoïde en général lors du développement, laisse supposer l'implication de ce dernier dans le guidage axonal et la maturation du système visuel.

Suite à son activation, le récepteur CB₂ peut moduler la morphologie du cône de croissance de neurones corticaux et de cellules ganglionnaires de la rétine. Le cône de croissance subit une modification de son aire et du nombre de filopodes présents à sa surface. Ces deux paramètres sont diminués suite à une stimulation avec un agoniste du récepteur CB₂ et augmentés avec un agoniste inverse de celui-ci. Dans le but de s'assurer que l'effet du récepteur résultait bien d'une modulation locale du cône de croissance plutôt que d'un effet au niveau du corps cellulaire, nous avons utilisé une technique d'injection à l'aide d'une micropipette pour former un gradient

de la substance injectée directement dirigé vers le cône de croissance. À l'aide de cette méthode, nous avons démontré un effet marqué sur ce senseur de l'environnement présent à l'extrémité de l'axone, qui a subi un effondrement et une rétraction lorsque soumis à deux agonistes différents du récepteur CB₂ et une attraction vers la micropipette lorsqu'exposé à un gradient d'un analogue de l'AMPC. Nous avons également stimulé longuement des explants de rétine cultivés, et avons remarqué que la longueur des projections de ces explants pouvait être diminuée ou augmentée suite à une modulation de l'activité du récepteur CB₂ avec un agoniste ou un agoniste inverse respectivement. Par contre, il reste difficile de distinguer exactement l'effet du récepteur CB₂ sur les projections rétiniennes, puisque son action pourrait être directement reliée à son activité au cône de croissance, au niveau du corps cellulaire des CGRs ou encore à un effet sur différents types cellulaires qui pourraient influencer les CRGs.

Nous avons également vérifié si la présence du récepteur CB₂ était essentielle pour obtenir cet effet sur les projections rétiniennes. Ceci a pu être démontré en stimulant des explants de rétine de souris possédant ou non un récepteur CB₂ fonctionnel. Nous avons remarqué que l'effet du traitement disparaissait lorsque le récepteur CB₂ était non fonctionnel, et ce, pour un traitement d'agoniste ou d'agoniste inverse. Nous pouvons donc tirer quelques conclusions de cette dernière expérience. Il semble clair que les drogues sont spécifiques pour le récepteur, puisque nous savons que le récepteur CB₁ est présent au niveau de la rétine et qu'il peut avoir le même effet que le récepteur CB₂ (Argaw et al., soumis). De plus, le récepteur CB₂

est requis pour observer un effet de modulation de la longueur des projections ganglionnaires lors de nos stimulations.

Suite à des injections intraoculaires d'AM630 réalisées chez le hamster, nous avons regardé les projections ganglionnaires collatérales au niveau du LTN, noyau secondaire du système visuel. Nous avons remarqué un effet de cet agoniste inverse puisque la longueur des projections ganglionnaires a augmenté après l'injection. Cette expérience semble également démontrer l'effet des cannabinoïdes au niveau de la rétine, soit au niveau des CGR ou d'autres types cellulaires qui vont avoir la capacité de moduler ces dernières. De plus, chez 15% des cerveaux, nous avons également noté que les projections ganglionnaires des deux hémisphères du thalamus étaient marquées suite à une injection unilatérale. Il semble probable que la cause principale de ce dérèglement survienne au niveau de l'arborisation et du maintien ou de la formation de branches comme pour le récepteur CB₁ (Mulder, Aguado et al. 2008). Puisque qu'un faible pourcentage seulement des animaux injectés possédaient un marquage des deux hémisphères, nous pensons que cet effet dépendrait en fait du niveau de maturation de l'animal. Ceci voudrait dire que si la majorité des branches ont déjà subi une rétraction au moment de l'injection, il pourrait être impossible d'observer cet effet. L'injection pourrait agir sur la signalisation intracellulaire en augmentant le nombre des branches des projections ou en stabilisant des branches qui se seraient normalement rétractées. Nous croyons également que cet effet s'opère par un débalancement des niveaux d'AMPC.

L'ensemble des différentes données expérimentales présentées précédemment nous poussent à penser que les endocannabinoïdes influencent le guidage des projections ganglionnaires tant au niveau de leur cône de croissance, qu'au niveau du corps cellulaire des CGRs ou encore en activant d'autres types cellulaires au niveau de la rétine qui pourront modifier l'état de la cellule.

Nous voulions également déterminer les mécanismes moléculaires responsables des effets du récepteur CB₂. Pour ce faire, nous avons évalué l'activation de plusieurs voies secondaires potentiellement impliquées suite à l'activation du récepteur. Les voies de la PKA, des MAPK et de la PI3K identifiées comme cible probable de l'activation du récepteur CB₂ (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995; Felder, Joyce et al. 1995; Molina-Holgado, Vela et al. 2002) ont été évaluées, en plus de la voie de signalisation de mTOR. Les niveaux de phosphorylation des protéines ERK^{1/2}, AKT et S6 n'ont pas été altérés par une modulation du récepteur CB₂ en conditions basales. Nous avons également observé des niveaux similaires de phosphorylation de ces protéines par rapport au groupe témoin dans un système préstimulé avec du KCl ou de l'insuline. Néanmoins, les niveaux de phosphorylation de la PKA ont diminué suite à une stimulation avec un agoniste et ont augmenté après un traitement avec un agoniste inverse, et ce en condition basale. De plus, les niveaux d'AMPC intracellulaires suivent la phosphorylation de la PKA et sont modulés par l'activité du récepteur CB₂, comme nous l'avons démontré en mesurant les niveaux d'AMPC au niveau du cône de croissance. En bloquant la voie de signalisation de la PKA lors d'une stimulation d'AM630 *in vivo*, en utilisant des inhibiteurs de la PKA, nous avons observé que les caractéristiques du cône de croissance restaient similaires

à celles du groupe témoin. Les modifications du cône de croissance observées lors de la modulation du récepteur CB₂ sont similaires aux effets d'une modification des niveaux d'AMPC intracellulaires et de l'activité de la PKA sur le cône de croissance (Argaw, Duff et al. 2008). L'action du récepteur sur la voie de la PKA est différente de ce qui avait été démontré chez des neurones GABAergiques, c'est-à-dire une activation de la voie des MAPK suite à la modulation du récepteur CB₁ (Berghuis, Rajnicek et al. 2007). Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences. Premièrement le récepteur étudié ici est le CB₂ et non le CB₁. L'activité d'un récepteur peut être différente chez des populations de neurones distinctes. La variété de seconds messagers activés suite à la stimulation des récepteurs aux cannabinoïdes pourrait être attribuable à la capacité d'homo-/hétérodimérisation des GPCRs (Devi 2000). Le stade de développement peut également influencer la signalisation intracellulaire pour un phénomène donné (Vogt Weisenhorn, Roback et al. 2001).

3.1 Le récepteur CB₂ et les endocannabinoïdes forment-ils un système de guidage classique?

Les évidences portent à croire que ce système n'entre pas exactement dans cette catégorie. Une caractéristique qui semble renforcer cette hypothèse est la nécessité de la présence et de l'activité de DCC, un récepteur à la nétrine-1, pour l'action du récepteur CB₂ sur le cône de croissance. Le récepteur DCC est présent chez nos deux types cellulaires étudiés et il possède une localisation au niveau du cône de croissance, des filopodes et des projections des cellules. Sans la présence ou l'activité de DCC, le cône de croissance reste insensible à la seule stimulation du récepteur CB₂. La nétrine semble donc être un déterminant important dans la réponse de ce

récepteur aux endocannabinoïdes. En fait, nous avons noté une variation de la quantité de DCC présent à la membrane cellulaire suite à une stimulation du récepteur CB₂ et que ses niveaux membranaires dépendent du niveau d'activation de la PKA. Ceci est similaire à ce qui avait été observé précédemment chez des neurones commissuraux dorsaux de la moelle épinière et neurones corticaux primaires (Bouchard, Moore et al. 2004; Bouchard, Horn et al. 2008).

Les endocannabinoïdes ne semblent pas non plus être exprimés en gradient sur une longue distance, étant des molécules liposolubles synthétisés au besoin. De plus, la suppression de la fonction du récepteur CB₂ ne semble pas causer d'altérations majeures au niveau du guidage, puisque les projections ganglionnaires se rendent bien à leurs différents noyaux terminaux. Par contre, les effets observés suivant l'inactivation du récepteur CB₂ au niveau des projections ganglionnaires après une injection intra-oculaire d'un agoniste inverse du récepteur CB₂ démontrent un potentiel modulateur au niveau des projections axonales. En tenant compte des effets négatifs et répulsifs de l'activation du récepteur CB₂ sur le cône de croissance *in vitro*, il semble fort probable que l'activité du récepteur permette le confinement des projections dans un milieu plus favorable, ou que la signalisation intracellulaire résultante à son activation provoque un effondrement d'une partie du cône de croissance. Les endocannabinoïdes, via leur action sur le récepteur CB₂, pourraient donc faire partie intégrante de l'environnement inhibiteur du SNC. Compte tenu des autres facteurs présents dans l'environnement du cône de croissance en pleine navigation, il s'en suivrait une meilleure reconnaissance des molécules classiques de guidage suite à cette intégration de signaux distincts.

Nous avons également découvert que le récepteur CB₂ agissait comme modulateur du phénomène de la ségrégation des projections rétiniennes au niveau du CGL. Ce noyau thalamique est innervé par des projections ganglionnaires provenant des rétines de chaque œil. Durant le développement, il se produit une réorganisation des projections de ce noyau, composé en majeure partie des projections de la rétine controlatérale, à l'intérieur duquel on retrouve une aire réservée aux projections de la rétine ipsilatérale. La réorganisation des projections produit deux zones assez bien délimitées l'une de l'autre, les projections de chaque œil étant ségréguées dans leur aire respective (Godement, Salaun et al. 1984). En mesurant le niveau de superposition des terminaux ipsilatéraux et controlatéraux, nous avons noté une différence significative du niveau de superposition des projections des deux yeux. En effet, la délétion de la fonction du récepteur CB₂ chez nos souris vient affecter cette superposition de manière directe, puisqu'elle est augmentée dans ce modèle expérimental. Nous interprétons cette augmentation de l'enchevêtrement des terminaisons rétiniennes comme une diminution de la ségrégation du noyau thalamique. Les endocannabinoïdes sécrétés dans l'environnement immédiat du CGL semblent être les acteurs désignés dans ce phénomène. Par leur effet direct sur le récepteur CB₂, ils pourraient influencer la rétraction de certains terminaux qui est essentielle dans le processus de ségrégation des projections ganglionnaires.

3.2 Importance de la recherche effectuée

Mon projet a permis l'avancement des connaissances sur le système des endocannabinoïdes. En effet, l'étude que j'ai effectuée est une des premières qui démontre la contribution du récepteur CB₂ dans le développement au niveau du système nerveux central. De plus, elle démontre un nouveau rôle de ce récepteur au niveau de la modulation du guidage axonal des projections des CGRs et de leur ségrégation durant le développement.

3.3 Ce qui n'a pas bien fonctionné

Une des expériences qui n'a pas donné tout à fait les résultats escomptés était l'injection intraoculaire des agonistes inverses des récepteurs CB₁ et CB₂. En effet, précédemment, des injections intraoculaires d'un analogue de l'AMPC avaient affecté la croissance de projections ganglionnaires au niveau du LTN et DTN du système visuel (Argaw, Duff et al. 2008). Par contre, l'injection de substances cannabinoïdes affectant l'un ou l'autre des récepteurs ne semble pas être capable de reproduire cet effet pour ces deux noyaux. En effet, nous avons observé une augmentation des projections au niveau du LTN pour le récepteur CB₂, et du DTN pour le récepteur CB₁. Cependant, il est possible que le groupe expérimental ne fût pas assez élevé pour confirmer entièrement cette hypothèse. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet des injections dans un plus grand groupe expérimental.

3.4 Avenues futures

Mon projet de recherche pourrait également être amélioré en ajoutant quelques techniques qui permettraient de compléter certaines de ses parties.

Une étude publiée en 2008 a démontré le manque de spécificité de certains des anticorps pour le récepteur CB₁ (Grimsey, Goodfellow et al. 2008). Puisque l'expression du récepteur CB₂ au niveau du cerveau est encore peu connue, en particulier au niveau du développement, il serait préférable de déterminer l'expression de l'ARNm du récepteur CB₂ en utilisant la technique d'hybridation *in situ* avec une sonde spécifique pour l'ARNm du récepteur marquée avec le DIG sur des coupes coronales (Machon, van den Bout et al. 2002). Ceci serait réalisé afin de contre-vérifier nos résultats immunologiques, dans le but de s'assurer de leur validité.

Nous avons observé un marquage des deux hémisphères des noyaux visuels du thalamus suite à une injection intraoculaire unilatérale d'un agoniste inverse. Ce phénomène est très intéressant en ce qui attrait au rôle des endocannabinoïdes sur le guidage, par contre, il reste certaines interrogations à vérifier pour être certain des conclusions à tirer de cette expérience. Il semble possible que cette anomalie implique une erreur de guidage au niveau du thalamus. Par contre, comme un faible taux de double marquage s'est produit, il apparaît possible que cette anomalie soit plutôt dû au délai entre la naissance de l'hamster et l'injection intraoculaire, donc une différence dans la maturité des animaux. Le récepteur CB₂ au niveau de la rétine pourrait donc affecter le guidage des projections ganglionnaires, en modifiant leur état, ce qui provoquerait une erreur de décision au niveau du chiasma optique. Pour vérifier cette théorie, il faudrait noter l'heure de naissance des hamsters nouveau-nés et, suite à l'injection de l'agoniste inverse, vérifier si ce double marquage apparaît à un moment particulier du développement du hamster. Une autre façon de vérifier cette hypothèse consisterait à bloquer la synthèse des endocannabinoïdes au niveau

du chiasma optique lors du guidage des projections vers leurs cibles terminales. En injectant directement au niveau du chiasma optique la tetrahydrostatine, un inhibiteur des deux isoformes des DAGL α et β (Bisogno, Howell et al. 2003), à différents âges du développement du hamster, nous pourrions vérifier les effets sur les projections ganglionnaires. D'autres inhibiteurs analogues de la tétrahydrostatine plus spécifiques pour une des isoformes de la DAGL sont maintenant également disponibles (Ortar, Bisogno et al. 2008). Cette façon de procéder aurait l'avantage de démontrer directement le rôle des endocannabinoïdes au niveau du cône de croissance plus spécifiquement pour le guidage.

Une autre expérience qui serait intéressante à réaliser serait de stimuler seulement le corps cellulaire ou les axones distaux de CGRs en culture, à l'aide de la chambre Campenot, permettant la compartimentalisation des axones distaux du corps cellulaire et des axones proximaux (Campenot 1994). Puisque nos résultats démontrent l'effet des modulateurs du récepteur CB₂ tant au niveau de la cellule que du cône de croissance, l'addition d'agonistes ou d'agonistes inverses pour le récepteur CB₂ à un niveau du corps cellulaire seulement pourrait nous permettre de confirmer ce que nous avons déjà observé jusqu'à présent, soit un effet sur les axones distaux, avec une stimulation du corps cellulaire ou des axones distaux directement. Nous pourrions également vérifier l'effet de l'activité du récepteur sur la formation de branches de cette manière.

Puisque les endocannabinoïdes semblent avoir un effet sur la ségrégation des projections ganglionnaires au niveau du CGL, il faudrait déterminer leur expression

exacte. Pour ce faire, la technique de l'essai par bandes pourrait être utilisée au niveau du CGL et des CS (Walter, Kern-Veits et al. 1987; Bahr and Wizenmann 1996). En utilisant des co-cultures, c'est-à-dire des bandes provenant de différentes parties d'un noyau en particulier ainsi que des explants rétiniens avec un récepteur CB₂ fonctionnel ou non, il serait possible de voir si les axones vont pousser vers une zone en particulier du noyau ou non. Ceci permettrait de déterminer l'expression particulière des endocannabinoïdes au niveau d'un noyau visuel précis.

Ayant mis au point une technique de stimulation du cône de croissance en temps réel, nous pourrions améliorer le système actuel pour permettre l'ajout d'un deuxième microinjecteur, ce qui nous permettrait de créer deux gradients différents à la fois. Puisque nous pensons que le récepteur CB₂ pourrait agir en tant que modulateur du guidage, il faudrait vérifier l'effet d'un gradient de nétrine et d'un agoniste CB₂ pour voir la réponse du cône de croissance stimulé. Il serait également possible de vérifier l'effet d'une stimulation simultanée d'un agoniste et d'une autre molécule de guidage comme les éphrines ou les sémaphorines. Ceci permettrait de démontrer plus spécifiquement le rôle modulateur du récepteur sur des molécules de guidage classique et de reproduire plus efficacement le système nerveux de l'animal.

Pour améliorer la compréhension du mécanisme d'action du récepteur CB₂, nous pourrions évaluer plus minutieusement la cascade moléculaire impliquée dans son action. Nous savons désormais que le récepteur DCC est impliqué dans son activité et que ce récepteur implique un complexe de Rho GTPase lorsqu'il est activé par la nétrine (Shekarabi, Moore et al. 2005). Par contre, nous n'avons pas encore vérifié si

ces mêmes effecteurs étaient activés suite à la stimulation du récepteur CB₂ au niveau du cône de croissance. En utilisant un ensemble ELISA spécifique pour une Rho GTPase telle la Rho A (RhoA G-LISA™ Activation Assay, Cytoskeleton), il serait facile de vérifier les niveaux d'activité de ces molécules suite à l'activation du récepteur CB₂. Un anticorps dirigé contre la protéine activée pourrait également être utilisé, ce qui nous permettrait de mesurer les niveaux de fluorescence de la protéine au niveau du cône de croissance, comme nous l'avons fait pour l'AMPc.

Puisque l'effet de chacun des récepteurs aux cannabinoïdes sur la ségrégation a été démontré (Argaw et al., soumis), il serait capital de vérifier l'effet de la suppression des deux récepteurs sur ce phénomène. Nous possédons présentement des souches de souris ayant chacun un des récepteurs non-fonctionnel, nous pourrions donc créer une nouvelle colonie de souris ayant les deux récepteurs non-fonctionnels. Ceci est d'autant plus important puisqu'il ne semble pas y avoir d'effet majeur au niveau de la ségrégation lors d'une délétion de l'un ou l'autre des récepteurs chez les souris. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que l'autre récepteur "prend la relève et compense" le récepteur manquant, puisque les endocannabinoïdes peuvent activer les deux récepteurs, même s'ils ont des sélectivités différentes pour chacun des récepteurs (Sugiura, Kodaka et al. 1996; Stella, Schweitzer et al. 1997).

Les niveaux du récepteur CB₂ augmentent drastiquement dans le tissu neuronal lors d'une inflammation chronique (Benito, Nunez et al. 2003; Ramirez, Blazquez et al. 2005; Shoemaker, Seely et al. 2007) et nous savons que le récepteur

est localisé au niveau de l'œil. Nous pourrions donc vérifier s'il possède une implication dans ce phénomène. L'action de l'agoniste inverse JTE907 a démontré des propriétés anti-inflammatoires chez un modèle de souris reproduisant la dermatite atopique, en diminuant de façon marquée le nombre de comportements de démangeaisons et en améliorant la condition de la peau (Maekawa, Nojima et al. 2006). Les effets anti-inflammatoires des agonistes inverses JTE907 et SR144528 pour des réactions allergiques cutanées de type IgE ont également été démontrés. En effet, un traitement oral avec ces modulateurs du récepteur CB₂, de même que la délétion du récepteur, permettent d'abolir la réaction en 3 phases d'inflammation au niveau des oreilles de souris (Ueda, Miyagawa et al. 2007). Ces résultats semblent prometteurs et nous pourrions comparer l'effet des différents traitements conventionnels et du JTE907 pour certaines pathologies causant l'inflammation oculaire.

Puisque dans l'expérimentation effectuée durant ma maîtrise, nous semblons pouvoir moduler la croissance axonale, suite à une injection intra-oculaire d'un agoniste inverse de récepteur CB₂, il serait propice de vérifier si nous pouvons modifier le processus de régénération du nerf optique. De fait, l'effet de l'AMPC sur la régénération commence à être bien établi (Cui, Yip et al. 2003; Lu, Li et al. 2004; Rodger, Goto et al. 2005; Hu, Cui et al. 2007). Par contre, utiliser un analogue de l'AMPC pour permettre la régénération axonale du nerf optique chez l'humain ne semble pas idéal puisque son usage pourrait amener des impacts sur potentiellement n'importe quel type cellulaire. Nous avons démontré dans ce projet de recherche que les niveaux d'AMPC étaient modulés par l'activation du récepteur CB₂. La modulation

de l'activité d'un récepteur en particulier, le récepteur CB₂ dans notre cas, semble une meilleure cible pharmacologique. Selon la distribution du récepteur au niveau de la rétine, un agoniste inverse pourrait avoir une action beaucoup plus spécifique qu'un analogue de l'AMPc c'est-à-dire sur des types cellulaires particuliers. De nos jours, les types de traitements recevant des autorisations gouvernementales doivent avoir un effet de plus en plus marqué tout en causant le moins d'effets indésirables possibles pendant leur utilisation. C'est dans cette optique que la recherche présentée ici pourrait avoir une implication plus immédiate en vue d'une cible thérapeutique potentielle. Pour pouvoir vérifier des effets potentiels d'un agoniste inverse sur la régénération, il faudrait faire une lésion du nerf optique chez la souris. Par la suite, il faudrait appliquer notre agoniste inverse sous forme d'une pommade ou de solution ophtalmique, ce qui me semble plus réaliste que des injections intra-oculaires qui seraient plus invasives. Puis, suivant une application plus ou moins prolongée, nous regarderions le niveau de régénération du nerf optique, en vérifiant le nombre d'axones qui réussissent à repousser malgré l'axotomie. Vu leur caractère très lipophile, les agents pharmacologiques devraient facilement traverser la cornée, diffuser à travers le vitrée et atteindre aisément leur cible au niveau de la rétine. Prochainement, ces expériences seront débutées en collaboration avec l'équipe de recherche du Dr Adriana Di Polo de l'Université de Montréal.

Pour compléter cette dernière expérience, il est nécessaire de déterminer sur quels types cellulaires le récepteur CB₂ peut avoir un effet au niveau de la rétine. Pour obtenir une réponse claire, nous pourrions vérifier l'expression exacte du récepteur CB₂ au niveau des différents types cellulaires de la rétine au cours

du développement et chez l'adulte. Pour ce faire, nous pourrions faire des co-localisations du récepteur CB₂ et des cônes, des bâtonnets, des cellules horizontales, des cellules bipolaires, des cellules amacrines et des cellules ganglionnaires. Puisqu'il existe un nombre important de populations de cellules ganglionnaires différentes, 22 ayant été répertoriées chez la souris adulte (Volgyi, Chheda et al. 2008), il pourrait également être intéressant déterminer si les différentes populations possèdent une distribution différente du récepteur CB₂. Ces expériences sont déjà en cours dans le laboratoire du Dr Bouchard.

Il serait également envisageable de vérifier l'effet d'une modulation du récepteur CB₂ pour la pathologie de l'atrophie du nerf optique. Cette pathologie résulte en une perte des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (Repka and Miller 1988; Hansen, Flage et al. 1992). Les causes de cette maladie incluent en ordre d'importance la prématurité de l'enfant, les tumeurs, des malformations au niveau du cerveau et des prédispositions génétiques à l'atrophie (Mudgil and Repka 2000). Certaines pathologies dégénératives, notamment le glaucome, mènent également à une atrophie du nerf optique (Soto, Oglesby et al. 2008). Celle-ci amène des troubles visuels considérables et est une des causes les plus importantes de cécité (Phillips, Levy et al. 1987; Rudanko, Fellman et al. 2003). Il serait donc intéressant de vérifier l'impact de l'activité du récepteur CB₂ sur cette pathologie. Nous pourrions doter notre laboratoire d'un modèle de souris ayant subi une mutation du gène *Opa1*, résultant en une pathologie similaire à celle de l'atrophie du nerf optique dominante (Alavi, Bette et al. 2007). En traitant les souris avec le JTE907 ou l'AM630 en solution

ophtalmique, nous pourrions vérifier s'il est possible de ralentir la propagation de la pathologie ou même de stabiliser cette dernière.

Finalement, il serait possible d'explorer l'implication du récepteur CB₂ dans d'autres aspects de certains processus cellulaires. Puisque nous avons observé des effets sur les projections des cellules ganglionnaires suite à une injection intraoculaire d'un agoniste inverse pour le récepteur CB₂, il semble que le récepteur soit présent au niveau de la rétine et qu'il peut possiblement réguler certains autres processus. Il serait alors possible de déterminer l'effet de l'activation du récepteur sur le phénomène de neurogenèse, étant le processus développemental régi par le récepteur CB₂ le plus étudié jusqu'à maintenant, principalement chez les cellules progénitrices (Molina-Holgado, Rubio-Araiz et al. 2007; Goncalves, Suetterlin et al. 2008). Pour évaluer son potentiel dans ce phénomène, il serait possible de faire des injections intraoculaires d'agonistes et d'antagonistes du récepteur CB₂ et de donner du BrdU, qui s'incorpore aux cellules en division cellulaire, pour ainsi vérifier le nombre de cellules qui sont dans cette phase du cycle cellulaire. De plus, nous pourrions essayer de déterminer l'impact de son activité sur la différenciation cellulaire. Encore grâce à des injections intraoculaires, nous pourrions déterminer la différence en nombre de chacun des types cellulaires présents dans la rétine. Puisqu'il n'y a pas d'étude ayant déterminé son implication au niveau du système visuel, il semble y avoir un potentiel important. Ces études sont présentement en branle dans le laboratoire du Dr Bouchard.

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. Jean-François Bouchard. Cet homme, grand de cœur et d'esprit, a toujours été présent pour moi. Il a tenu compte de mes idées et m'a aidé à les exploiter. M'incitant à me dépasser pour donner le meilleur de moi-même, il m'a permis de développer tous les outils nécessaires à la poursuite de mes ambitions.

Je tiens également à remercier Anthony Argaw. Mentor, partenaire de débat et ami à ses heures, il était la meilleure moitié du groupe du cône de croissance. S'il y a bien une chose que j'ai apprise avec lui c'est la patience. Minutieux, il m'en a fait baver, moi qui aime que tout se passe rapidement. Je lui souhaite la carrière qu'il désire et mérite.

Nawal, Nawal, Nawal, que dire de Nawal Zabouri? Que du bien, évidemment! Elle est la personne la mieux organisée et méthodique que je connaisse. Elle m'a toujours donné de judicieux conseils et n'a jamais hésité à prendre du temps pour m'aider. Je voulais t'en remercier.

Il serait juste de mentionner l'aide indispensable de Pierre-Camille Gilet et de Sophie Charron dans plusieurs des expériences réalisées. Je tiens à dire que j'ai apprécié les moments passés avec chacun de vous.

Sources documentaires

- Aguado, T., J. Palazuelos, et al. (2006). "The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells." J Neurosci **26**(5): 1551-61.
- Alavi, M. V., S. Bette, et al. (2007). "A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy." Brain **130**(Pt 4): 1029-42.
- Amano, M., M. Ito, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem **271**(34): 20246-9.
- Archer, F. R., P. Doherty, et al. (1999). "CAMs and FGF cause a local submembrane calcium signal promoting axon outgrowth without a rise in bulk calcium concentration." Eur J Neurosci **11**(10): 3565-73.
- Argaw, A., G. Duff, et al. (2008). "Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development." Exp Neurol **211**(2): 494-502.
- Bagri, A., O. Marin, et al. (2002). "Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain." Neuron **33**(2): 233-48.
- Bahr, M. and A. Wizenmann (1996). "Retinal ganglion cell axons recognize specific guidance cues present in the deafferented adult rat superior colliculus." J Neurosci **16**(16): 5106-16.
- Barker, P. A. and E. M. Shooter (1994). "Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells." Neuron **13**(1): 203-15.
- Bayewitch, M., T. Avidor-Reiss, et al. (1995). "The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling." FEBS Lett **375**(1-2): 143-7.
- Bear, J. E., T. M. Svitkina, et al. (2002). "Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility." Cell **109**(4): 509-21.
- Begbie, J., P. Doherty, et al. (2004). "Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo." J Anat **205**(3): 213-8.
- Beltramo, M. and D. Piomelli (2000). "Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol." Neuroreport **11**(6): 1231-5.
- Beltramo, M., N. Stella, et al. (1997). "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition." Science **277**(5329): 1094-7.
- Ben-Shabat, S., E. Frider, et al. (1998). "An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity." Eur J Pharmacol **353**(1): 23-31.
- Benito, C., E. Nunez, et al. (2003). "Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains." J Neurosci **23**(35): 11136-41.

- Bentley, D. and A. Toroian-Raymond (1986). "Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment." Nature **323**(6090): 712-5.
- Berghuis, P., A. M. Rajniecek, et al. (2007). "Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity." Science **316**(5828): 1212-6.
- Berrendero, F., N. Sepe, et al. (1999). "Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period." Synapse **33**(3): 181-91.
- Bhide, P. G. and D. O. Frost (1991). "Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets." J Neurosci **11**(2): 485-504.
- Birgbauer, E., S. F. Oster, et al. (2001). "Retinal axon growth cones respond to EphB extracellular domains as inhibitory axon guidance cues." Development **128**(15): 3041-8.
- Bisogno, T., I. Delton-Vandenbroucke, et al. (1999). "Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina." Arch Biochem Biophys **370**(2): 300-7.
- Bisogno, T., F. Howell, et al. (2003). "Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain." J Cell Biol **163**(3): 463-8.
- Bisogno, T., M. MacCarrone, et al. (2001). "The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors." Eur J Biochem **268**(7): 1982-9.
- Bisogno, T., D. Melck, et al. (2000). "N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo." Biochem J **351 Pt 3**: 817-24.
- Bisogno, T., D. Melck, et al. (1999). "Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin." J Neurochem **72**(5): 2113-9.
- Bisogno, T., N. Sepe, et al. (1997). "Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells." Biochem J **322 (Pt 2)**: 671-7.
- Bonhaus, D. W., L. K. Chang, et al. (1998). "Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses." J Pharmacol Exp Ther **287**(3): 884-8.
- Bouaboula, M., D. Dussosoy, et al. (1999). "Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses." J Biol Chem **274**(29): 20397-405.
- Bouaboula, M., S. Perrachon, et al. (1997). "A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions." J Biol Chem **272**(35): 22330-9.

- Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, et al. (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." Biochem J **312** (Pt 2): 637-41.
- Bouchard, J.-F., K. E. Horn, et al. (2008). "Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1." Journal of Neurochemistry **107**(2): 398-417.
- Bouchard, J. F., K. E. Horn, et al. (2008). "Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1." J Neurochem **107**(2): 398-417.
- Bouchard, J. F., S. W. Moore, et al. (2004). "Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension." J Neurosci **24**(12): 3040-50.
- Bovolenta, P. (2005). "Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy?" J Neurobiol **64**(4): 405-16.
- Brittis, P. A., Q. Lu, et al. (2002). "Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target." Cell **110**(2): 223-35.
- Brittis, P. A. and J. Silver (1995). "Multiple factors govern intraretinal axon guidance: a time-lapse study." Mol Cell Neurosci **6**(5): 413-32.
- Buck, K. B. and J. Q. Zheng (2002). "Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics." J Neurosci **22**(21): 9358-67.
- Buckley, N. E., S. Hansson, et al. (1998). "Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat." Neuroscience **82**(4): 1131-49.
- Cai, D., J. Qiu, et al. (2001). "Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate." J Neurosci **21**(13): 4731-9.
- Campbell, D. S. and C. E. Holt (2001). "Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation." Neuron **32**(6): 1013-26.
- Campenot, R. B. (1994). "NGF and the local control of nerve terminal growth." J Neurobiol **25**(6): 599-611.
- Carayon, P., J. Marchand, et al. (1998). "Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation." Blood **92**(10): 3605-15.
- Carrier, E. J., C. S. Kearns, et al. (2004). "Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism." Mol Pharmacol **65**(4): 999-1007.
- Cerione, R. A. and Y. Zheng (1996). "The Dbl family of oncogenes." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 216-22.
- Chapman, B. (2000). "Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus." Science **287**(5462): 2479-82.
- Chen, J., I. Matias, et al. (2005). "Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma." Biochem Biophys Res Commun **330**(4): 1062-7.
- Chevalyere, V., K. A. Takahashi, et al. (2006). "Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity in the CNS." Annu Rev Neurosci.

- Chien, C. B., D. E. Rosenthal, et al. (1993). "Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain." *Neuron* **11**(2): 237-51.
- Childers, S. R. and S. A. Deadwyler (1996). "Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors." *Biochemical Pharmacology* **52**(6): 819-827.
- Clancy, B., R. B. Darlington, et al. (2001). "Translating developmental time across mammalian species." *Neuroscience* **105**(1): 7-17.
- Cravatt, B. F., D. K. Giang, et al. (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." *Nature* **384**(6604): 83-7.
- Cui, Q., H. K. Yip, et al. (2003). "Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons." *Mol Cell Neurosci* **22**(1): 49-61.
- Davenport, R. W., P. Dou, et al. (1993). "A sensory role for neuronal growth cone filopodia." *Nature* **361**(6414): 721-4.
- de la Torre, J. R., V. H. Hopker, et al. (1997). "Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC." *Neuron* **19**(6): 1211-24.
- Deiner, M. S., T. E. Kennedy, et al. (1997). "Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia." *Neuron* **19**(3): 575-89.
- Demyanenko, G. P. and P. F. Maness (2003). "The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons." *J Neurosci* **23**(2): 530-8.
- Dent, E. W., J. L. Callaway, et al. (1999). "Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches." *J Neurosci* **19**(20): 8894-908.
- Devi, L. A. (2000). "G-protein-coupled receptor dimers in the lime light." *Trends Pharmacol Sci* **21**(9): 324-6.
- Di Marzo, V., T. Bisogno, et al. (1998). "The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide." *Biochem J* **331** (Pt 1): 15-9.
- Di Marzo, V., L. De Petrocellis, et al. (1996). "Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* **227**(1): 281-8.
- Di Marzo, V., D. Melck, et al. (1998). "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action." *Trends Neurosci* **21**(12): 521-8.
- Dickson, B. J. (2002). "Molecular mechanisms of axon guidance." *Science* **298**(5600): 1959-64.
- Dinh, T. P., D. Carpenter, et al. (2002). "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10819-24.
- Doherty, P., S. V. Ashton, et al. (1991). "Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels." *Cell* **67**(1): 21-33.
- Ellerbroek, S. M., K. Wennerberg, et al. (2003). "Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo." *J Biol Chem* **278**(21): 19023-31.

- Erskine, L. and E. Herrera (2007). "The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance." Dev Biol **308**(1): 1-14.
- Erskine, L., S. E. Williams, et al. (2000). "Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robo and slits." J Neurosci **20**(13): 4975-82.
- Faix, J. and R. Grosse (2006). "Staying in shape with formins." Dev Cell **10**(6): 693-706.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Mol Pharmacol **48**(3): 443-50.
- Feldheim, D. A., Y. I. Kim, et al. (2000). "Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping." Neuron **25**(3): 563-74.
- Feldheim, D. A., P. Vanderhaeghen, et al. (1998). "Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain." Neuron **21**(6): 1303-13.
- Fernandez-Ruiz, J., F. Berrendero, et al. (2000). "The endogenous cannabinoid system and brain development." Trends Neurosci **23**(1): 14-20.
- Fernandez-Ruiz, J., J. Romero, et al. (2007). "Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?" Trends Pharmacol Sci **28**(1): 39-45.
- Forget, M. A., R. R. Desrosiers, et al. (2002). "Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes." Biochem J **361**(Pt 2): 243-54.
- Freund, T. F., I. Katona, et al. (2003). "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling." Physiol Rev **83**(3): 1017-66.
- Frisen, J., P. A. Yates, et al. (1998). "Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system." Neuron **20**(2): 235-43.
- Frodin, M., P. Peraldi, et al. (1994). "Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells." J Biol Chem **269**(8): 6207-14.
- Glaser, S. T., D. G. Deutsch, et al. (2005). "Endocannabinoids in the intact retina: 3 H-anandamide uptake, fatty acid amide hydrolase immunoreactivity and hydrolysis of anandamide." Vis Neurosci **22**(6): 693-705.
- Godement, P., J. Salaun, et al. (1984). "Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse." J Comp Neurol **230**(4): 552-75.
- Goley, E. D. and M. D. Welch (2006). "The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 713-26.
- Goncalves, M. B., P. Suetterlin, et al. (2008). "A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner." Mol Cell Neurosci **38**(4): 526-36.
- Gong, J. P., E. S. Onaivi, et al. (2006). "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain." Brain Res **1071**(1): 10-23.
- Goode, B. L. and M. J. Eck (2007). "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." Annu Rev Biochem **76**: 593-627.
- Goodman, C. S., M. J. Bastiani, et al. (1984). "Cell recognition during neuronal development." Science **225**(4668): 1271-9.

- Goodman, C. S. and C. J. Shatz (1993). "Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity." Cell **72 Suppl**: 77-98.
- Grimsey, N. L., C. E. Goodfellow, et al. (2008). "Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal!" J Neurosci Methods **171**(1): 78-86.
- Gudermann, T., T. Schoneberg, et al. (1997). "Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors." Annu Rev Neurosci **20**: 399-427.
- Haffner, C., T. Jarchau, et al. (1995). "Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP." EMBO J **14**(1): 19-27.
- Hall, A. (1994). "Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton." Annu Rev Cell Biol **10**: 31-54.
- Hall, H., E. J. Williams, et al. (1996). "Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neurite outgrowth by a cell-membrane permeable phosphopeptide." Current Biology **6**(5): 580-587.
- Hansen, E., T. Flage, et al. (1992). "Visual impairment in Nordic children. III. Diagnoses." Acta Ophthalmol (Copenh) **70**(5): 597-604.
- Hansen, H. S., L. Lauritzen, et al. (1998). "Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines and N-acetyethanolamines: proposed role in neurotoxicity." Biochem Pharmacol **55**(6): 719-25.
- Hanus, L., S. Abu-Lafi, et al. (2001). "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3662-5.
- Harkany, T., M. Guzman, et al. (2007). "The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development." Trends Pharmacol Sci **28**(2): 83-92.
- Heidemann, S. R., P. Lamoureux, et al. (1990). "Growth cone behavior and production of traction force." J Cell Biol **111**(5 Pt 1): 1949-57.
- Henstridge, C. M., N. A. Balenga, et al. (2009). "The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation." FASEB J **23**(1): 183-93.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1932-6.
- Hillard, C. J., W. S. Edgemond, et al. (1997). "Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion." J Neurochem **69**(2): 631-8.
- Hindges, R., T. McLaughlin, et al. (2002). "EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping." Neuron **35**(3): 475-87.
- Hopker, V. H., D. Shewan, et al. (1999). "Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1." Nature **401**(6748): 69-73.
- Howlett, A. C. (1995). "Pharmacology of cannabinoid receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 607-34.
- Howlett, A. C., F. Barth, et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.

- Howlett, A. C., J. M. Qualy, et al. (1986). "Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs." Mol Pharmacol **29**(3): 307-13.
- Hu, H., T. F. Marton, et al. (2001). "Plexin B mediates axon guidance in Drosophila by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling." Neuron **32**(1): 39-51.
- Hu, Y., Q. Cui, et al. (2007). "Interactive effects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration." Mol Cell Neurosci **34**(1): 88-98.
- Huang, S. M., T. Bisogno, et al. (2002). "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8400-5.
- Huber, A. B., A. L. Kolodkin, et al. (2003). "Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance." Annu Rev Neurosci **26**: 509-63.
- Huberman, A. D., K. D. Murray, et al. (2005). "Ephrin-As mediate targeting of eye-specific projections to the lateral geniculate nucleus." Nat Neurosci **8**(8): 1013-21.
- Hutson, L. D. and C. B. Chien (2002). "Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of astray/robo2." Neuron **33**(2): 205-17.
- Ichijo, H. and I. Kawabata (2001). "Roles of the telencephalic cells and their chondroitin sulfate proteoglycans in delimiting an anterior border of the retinal pathway." J Neurosci **21**(23): 9304-14.
- Ishac, E. J., L. Jiang, et al. (1996). "Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves." Br J Pharmacol **118**(8): 2023-8.
- Ishikawa, R., T. Sakamoto, et al. (2003). "Polarized actin bundles formed by human fascin-1: their sliding and disassembly on myosin II and myosin V in vitro." J Neurochem **87**(3): 676-85.
- Iwamura, H., H. Suzuki, et al. (2001). "In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor." J Pharmacol Exp Ther **296**(2): 420-5.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-69.
- Jin, K., L. Xie, et al. (2004). "Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice." Mol Pharmacol **66**(2): 204-8.
- Kalil, K. and E. W. Dent (2005). "Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton." Curr Opin Neurobiol **15**(5): 521-6.
- Keino-Masu, K., M. Masu, et al. (1996). "Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor." Cell **87**(2): 175-185.
- Kenakin, T. (2001). "Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation." FASEB J **15**(3): 598-611.
- Kenakin, T. (2002). "Drug efficacy at G protein-coupled receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 349-79.
- Kennedy, T. E., T. Serafini, et al. (1994). "Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord." Cell **78**(3): 425-35.

- Klein, T. W., C. Newton, et al. (2003). "The cannabinoid system and immune modulation." J Leukoc Biol **74**(4): 486-96.
- Kolpak, A., J. Zhang, et al. (2005). "Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration." J Neurosci **25**(13): 3432-41.
- Kondo, S., H. Kondo, et al. (1998). "2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA²⁺-dependent and -independent mechanisms." FEBS Lett **429**(2): 152-6.
- Kovar, D. R. (2006). "Molecular details of formin-mediated actin assembly." Curr Opin Cell Biol **18**(1): 11-7.
- Kovar, D. R., E. S. Harris, et al. (2006). "Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin." Cell **124**(2): 423-35.
- Kozma, R., S. Sarner, et al. (1997). "Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid." Mol Cell Biol **17**(3): 1201-11.
- Krause, M., E. W. Dent, et al. (2003). "Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 541-64.
- Kruger, K., A. S. Tam, et al. (1998). "Retinal ganglion cell axon progression from the optic chiasm to initiate optic tract development requires cell autonomous function of GAP-43." J Neurosci **18**(15): 5692-705.
- Kwiatkowski, A. V., F. B. Gertler, et al. (2003). "Function and regulation of Ena/VASP proteins." Trends Cell Biol **13**(7): 386-92.
- Lalonde, M. R., C. A. Jollimore, et al. (2006). "Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells." Mol Vis **12**: 1160-6.
- Lang, P., F. Gesbert, et al. (1996). "Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes." EMBO J **15**(3): 510-9.
- Lau, P. M., R. S. Zucker, et al. (1999). "Induction of filopodia by direct local elevation of intracellular calcium ion concentration." J Cell Biol **145**(6): 1265-75.
- Lauckner, J. E., J. B. Jensen, et al. (2008). "GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2699-704.
- Leonelli, M., L. R. Britto, et al. (2005). "Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system." Brain Res Dev Brain Res **156**(2): 176-82.
- Letourneau, P. C. (1975). "Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation." Dev Biol **44**(1): 92-101.
- Leung, K. M., F. P. van Horck, et al. (2006). "Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1." Nat Neurosci **9**(10): 1247-56.
- Lewis, A. K. and P. C. Bridgman (1992). "Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity." J Cell Biol **119**(5): 1219-43.

- Lin, C. H., E. M. Espreafico, et al. (1996). "Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones." *Neuron* **16**(4): 769-82.
- Liu, J., S. Batkai, et al. (2003). "Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor." *J Biol Chem* **278**(45): 45034-9.
- Liu, J., S. Wilson, et al. (2003). "BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina." *Dev Biol* **256**(1): 34-48.
- Lu, Q., A. Straiker, et al. (2000). "Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina." *Vis Neurosci* **17**(1): 91-5.
- Lu, Y., Y. Li, et al. (2004). "Elevation of intracellular cAMP evokes activity-dependent release of adenosine in cultured rat forebrain neurons." *Eur J Neurosci* **19**(10): 2669-81.
- Machon, O., C. J. van den Bout, et al. (2002). "Forebrain-specific promoter/enhancer D6 derived from the mouse Dach1 gene controls expression in neural stem cells." *Neuroscience* **112**(4): 951-66.
- Mackie, K. (2006). "Cannabinoid receptors as therapeutic targets." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 101-22.
- Mackie, K. and B. Hille (1992). "Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9): 3825-9.
- Mackie, K., Y. Lai, et al. (1995). "Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor." *J Neurosci* **15**(10): 6552-61.
- Mackie, K. and N. Stella (2006). "Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players." *AAPS J* **8**(2): E298-306.
- Maekawa, T., H. Nojima, et al. (2006). "The cannabinoid CB2 receptor inverse agonist JTE-907 suppresses spontaneous itch-associated responses of NC mice, a model of atopic dermatitis." *Eur J Pharmacol* **542**(1-3): 179-83.
- Mallavarapu, A. and T. Mitchison (1999). "Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction." *J Cell Biol* **146**(5): 1097-106.
- Mann, F., W. A. Harris, et al. (2004). "New views on retinal axon development: a navigation guide." *Int J Dev Biol* **48**(8-9): 957-64.
- Martin, B. R. (1986). "Cellular effects of cannabinoids." *Pharmacol Rev* **38**(1): 45-74.
- Matias, I., J. W. Wang, et al. (2006). "Changes in endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in eye tissues of patients with diabetic retinopathy and age-related macular degeneration." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**(6): 413-8.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, et al. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* **346**(6284): 561-4.
- Matsuda, S., N. Kanemitsu, et al. (1997). "Metabolism of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, in porcine ocular tissues." *Exp Eye Res* **64**(5): 707-11.
- McFarlane, S., E. Cornel, et al. (1996). "Inhibition of FGF receptor activity in retinal ganglion cell axons causes errors in target recognition." *Neuron* **17**(2): 245-54.
- McFarlane, S., L. McNeill, et al. (1995). "FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system." *Neuron* **15**(5): 1017-28.

- Meyer-Franke, A., M. R. Kaplan, et al. (1995). "Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture." Neuron **15**(4): 805-19.
- Meyer-Franke, A., G. A. Wilkinson, et al. (1998). "Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons." Neuron **21**(4): 681-93.
- Millard, T. H., S. J. Sharp, et al. (2004). "Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex." Biochem J **380**(Pt 1): 1-17.
- Ming, G.-l., H.-j. Song, et al. (1997). "cAMP-Dependent Growth Cone Guidance by Netrin-1." Neuron **19**(6): 1225-1235.
- Ming, G. L., H. J. Song, et al. (1997). "cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1." Neuron **19**(6): 1225-35.
- Molina-Holgado, E., J. M. Vela, et al. (2002). "Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling." J Neurosci **22**(22): 9742-53.
- Molina-Holgado, F., A. Rubio-Araiz, et al. (2007). "CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation." Eur J Neurosci **25**(3): 629-34.
- Monsul, N. T., A. R. Geisendorfer, et al. (2004). "Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve." Exp Neurol **186**(2): 124-33.
- Moore, S. W., J. P. Correia, et al. (2008). "Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1." Development **135**(17): 2855-64.
- Moore, S. W. and T. E. Kennedy (2006). "Protein Kinase A Regulates the Sensitivity of Spinal Commissural Axon Turning to Netrin-1 But Does Not Switch between Chemoattraction and Chemorepulsion." J. Neurosci. **26**(9): 2419-2423.
- Mudgil, A. V. and M. X. Repka (2000). "Childhood optic atrophy." Clin Experiment Ophthalmol **28**(1): 34-7.
- Mulder, J., T. Aguado, et al. (2008). "Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(25): 8760-5.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser, et al. (1998). "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6181-6.
- Nakagawa, S., C. Brennan, et al. (2000). "Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm." Neuron **25**(3): 599-610.
- Nguyen-Ba-Charvet, K. T., K. Brose, et al. (2001). "Sensory axon response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclic GMP." Mol Cell Neurosci **17**(6): 1048-58.
- Niclou, S. P., L. Jia, et al. (2000). "Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons." J Neurosci **20**(13): 4962-74.
- Nicol, X., M. Bennis, et al. (2006). "Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections." Eur J Neurosci **24**(12): 3401-14.

- Nicol, X., S. Voyatzis, et al. (2007). "cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map." *Nat Neurosci* **10**(3): 340-7.
- Nishiyama, M., A. Hoshino, et al. (2003). "Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning." *Nature* **423**(6943): 990-5.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* **81**(1): 53-62.
- Olofsson, B. (1999). "Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling." *Cell Signal* **11**(8): 545-54.
- Onaivi, E. S., H. Ishiguro, et al. (2006). "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." *Ann N Y Acad Sci* **1074**: 514-36.
- Ortar, G., T. Bisogno, et al. (2008). "Tetrahydrolipstatin analogues as modulators of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol metabolism." *J Med Chem* **51**(21): 6970-9.
- Oster, S. F., M. O. Bodeker, et al. (2003). "Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development." *Development* **130**(4): 775-84.
- Palazuelos, J., T. Aguado, et al. (2006). "Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation." *Faseb J* **20**(13): 2405-7.
- Penn, A. A., P. A. Riquelme, et al. (1998). "Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity." *Science* **279**(5359): 2108-12.
- Petitot, F., M. Donlan, et al. (2006). "GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it." *Chem Biol Drug Des* **67**(3): 252-3.
- Pfeiffenberger, C., T. Cutforth, et al. (2005). "Ephrin-As and neural activity are required for eye-specific patterning during retinogeniculate mapping." *Nat Neurosci* **8**(8): 1022-7.
- Phillips, C. I., A. M. Levy, et al. (1987). "Blindness in schoolchildren: importance of heredity, congenital cataract, and prematurity." *Br J Ophthalmol* **71**(8): 578-84.
- Pollard, T. D. (2007). "Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 451-77.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* **112**(4): 453-65.
- Porcella, A., P. Casellas, et al. (1998). "Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat ciliary body: implications for the antiglaucoma properties of marihuana." *Brain Res Mol Brain Res* **58**(1-2): 240-5.
- Porter, A. C., J. M. Sauer, et al. (2002). "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(3): 1020-4.
- Prather, P. L. (2004). "Inverse agonists: tools to reveal ligand-specific conformations of G protein-coupled receptors." *Sci STKE* **2004**(215): pe1.
- Pring, M., M. Evangelista, et al. (2003). "Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments." *Biochemistry* **42**(2): 486-96.

- Qiao, J., F. Huang, et al. (2003). "PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L972-80.
- Rajnicek, A. M., L. E. Foubister, et al. (2006). "Temporally and spatially coordinated roles for Rho, Rac, Cdc42 and their effectors in growth cone guidance by a physiological electric field." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1723-35.
- Ramirez, B. G., C. Blazquez, et al. (2005). "Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation." J Neurosci **25**(8): 1904-13.
- Raper, J. A., M. J. Bastiani, et al. (1983). "Guidance of neuronal growth cones: selective fasciculation in the grasshopper embryo." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **48 Pt 2**: 587-98.
- Ravary, A., A. Muzerelle, et al. (2003). "Adenylate cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps." J Neurosci **23**(6): 2228-38.
- Repka, M. X. and N. R. Miller (1988). "Optic atrophy in children." Am J Ophthalmol **106**(2): 191-3.
- Rhee, J., N. S. Mahfooz, et al. (2002). "Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion." Nat Cell Biol **4**(10): 798-805.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho family proteins: coordinating cell responses." Trends in Cell Biology **11**(12): 471-477.
- Ringstedt, T., J. E. Braisted, et al. (2000). "Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon." J Neurosci **20**(13): 4983-91.
- Rios, C., I. Gomes, et al. (2006). "mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis." Br J Pharmacol **148**(4): 387-95.
- Rodger, J., H. Goto, et al. (2005). "cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish." Mol Cell Neurosci **30**(3): 452-64.
- Rodriguez, O. C., A. W. Schaefer, et al. (2003). "Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis." Nat Cell Biol **5**(7): 599-609.
- Romero, J., E. Garcia-Palomero, et al. (1997). "Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development." Synapse **26**(3): 317-23.
- Ross, R. A., H. C. Brockie, et al. (1999). "Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630." Br J Pharmacol **126**(3): 665-72.
- Ross, R. A., A. A. Coutts, et al. (2001). "Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception." Neuropharmacology **40**(2): 221-32.
- Rubovitch, V., M. Gafni, et al. (2002). "The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells." Molecular Brain Research **101**(1-2): 93-102.
- Rudanko, S. L., V. Fellman, et al. (2003). "Visual impairment in children born prematurely from 1972 through 1989." Ophthalmology **110**(8): 1639-45.

- Ryberg, E., N. Larsson, et al. (2007). "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor." Br J Pharmacol **152**(7): 1092-101.
- Ryberg, E., H. K. Vu, et al. (2005). "Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor." FEBS Lett **579**(1): 259-64.
- Sakai, J. A. and M. C. Halloran (2006). "Semaphorin 3d guides laterality of retinal ganglion cell projections in zebrafish." Development **133**(6): 1035-44.
- Salzet, M. (2000). "Invertebrate molecular neuroimmune processes." Brain Res Brain Res Rev **34**(1-2): 69-79.
- Sawzdargo, M., T. Nguyen, et al. (1999). "Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain." Brain Res Mol Brain Res **64**(2): 193-8.
- Schmid, H. H., P. C. Schmid, et al. (1990). "N-acylated glycerophospholipids and their derivatives." Prog Lipid Res **29**(1): 1-43.
- Schmitt, A. M., J. Shi, et al. (2006). "Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping." Nature **439**(7072): 31-7.
- Shatz, C. J. (1983). "The prenatal development of the cat's retinogeniculate pathway." J Neurosci **3**(3): 482-99.
- Shekarabi, M., S. W. Moore, et al. (2005). "Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion." J Neurosci **25**(12): 3132-41.
- Shewan, D., A. Dwivedy, et al. (2002). "Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway." Nat Neurosci **5**(10): 955-62.
- Shoemaker, J. L., K. A. Seely, et al. (2007). "The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset." J Neurochem **101**(1): 87-98.
- Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." J Anat **87**(4): 387-406.
- Showalter, V. M., D. R. Compton, et al. (1996). "Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands." J Pharmacol Exp Ther **278**(3): 989-99.
- Simon, G. M. and B. F. Cravatt (2006). "Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway." J Biol Chem **281**(36): 26465-72.
- Simon, G. M. and B. F. Cravatt (2008). "Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain." J Biol Chem **283**(14): 9341-9.
- Skaper, S. D., A. Buriani, et al. (1996). "The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3984-9.

- Slipetz, D. M., G. P. O'Neill, et al. (1995). "Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase." Mol Pharmacol **48**(2): 352-61.
- Small, J. V. (1988). "The actin cytoskeleton." Electron Microsc Rev **1**(1): 155-74.
- Song, H., G. Ming, et al. (1998). "Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides." Science **281**(5382): 1515-8.
- Song, H. J., G. L. Ming, et al. (1997). "cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones." Nature **388**(6639): 275-9.
- Soto, I., E. Oglesby, et al. (2008). "Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model." J Neurosci **28**(2): 548-61.
- Stamer, W. D., S. F. Golightly, et al. (2001). "Cannabinoid CB(1) receptor expression, activation and detection of endogenous ligand in trabecular meshwork and ciliary process tissues." Eur J Pharmacol **431**(3): 277-86.
- Stella, N., P. Schweitzer, et al. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." Nature **388**(6644): 773-8.
- Stellwagen, D. and C. J. Shatz (2002). "An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity." Neuron **33**(3): 357-67.
- Stellwagen, D., C. J. Shatz, et al. (1999). "Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP." Neuron **24**(3): 673-85.
- Stevens, A. and J. R. Jacobs (2002). "Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals." J Neurosci **22**(11): 4448-55.
- Stevens, B., N. J. Allen, et al. (2007). "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." Cell **131**(6): 1164-78.
- Stone, K. E. and D. S. Sakaguchi (1996). "Perturbation of the developing Xenopus retinotectal projection following injections of antibodies against beta1 integrin receptors and N-cadherin." Dev Biol **180**(1): 297-310.
- Strader, C. D., T. M. Fong, et al. (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." Annu Rev Biochem **63**: 101-32.
- Straiker, A. J., G. Maguire, et al. (1999). "Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(10): 2442-8.
- Strange, P. G. (2002). "Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **23**(2): 89-95.
- Stuermer, C. A. O. and M. Bastmeyer (2000). "The retinal axon's pathfinding to the optic disk." Progress in Neurobiology **62**(2): 197-214.
- Sugiura, T., T. Kodaka, et al. (1997). "Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells." J Biochem **122**(4): 890-5.
- Sugiura, T., T. Kodaka, et al. (1996). "2-Arachidonoylglycerol, a Putative Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, Induces Rapid, Transient Elevation of Intracellular Free Ca²⁺ in Neuroblastoma × Glioma Hybrid NG108-15 Cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **229**(1): 58-64.
- Sugiura, T., S. Kondo, et al. (2000). "Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells." J Biol Chem **275**(1): 605-12.

- Sun, Y. X., K. Tsuboi, et al. (2004). "Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D." *Biochem J* **380**(Pt 3): 749-56.
- Svitkina, T. M. and G. G. Borisy (1999). "Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia." *J Cell Biol* **145**(5): 1009-26.
- Svitkina, T. M., A. B. Verkhovsky, et al. (1997). "Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation." *J Cell Biol* **139**(2): 397-415.
- Takenawa, T. and H. Miki (2001). "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." *J Cell Sci* **114**(Pt 10): 1801-9.
- Tanaka, E. and J. Sabry (1995). "Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance." *Cell* **83**(2): 171-176.
- Tessier-Lavigne, M. and C. S. Goodman (1996). "The molecular biology of axon guidance." *Science* **274**(5290): 1123-33.
- Thompson, H., D. Barker, et al. (2006). "Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract." *Dev Biol* **296**(2): 476-84.
- Thompson, H., O. Camand, et al. (2006). "Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina." *J Neurosci* **26**(31): 8082-91.
- Torborg, C. L. and M. B. Feller (2004). "Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns." *J Neurosci Methods* **135**(1-2): 17-26.
- Trichet, L., C. Sykes, et al. (2008). "Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP." *J Cell Biol* **181**(1): 19-25.
- Trousse, F., E. Marti, et al. (2001). "Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog." *Development* **128**(20): 3927-36.
- Tsou, K., S. Brown, et al. (1998). "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system." *Neuroscience* **83**(2): 393-411.
- Ueda, Y., N. Miyagawa, et al. (2007). "Involvement of cannabinoid CB2 receptors in the IgE-mediated triphasic cutaneous reaction in mice." *Life Sci* **80**(5): 414-9.
- Van Sickle, M. D., M. Duncan, et al. (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." *Science* **310**(5746): 329-32.
- Vaughan, C. W. and M. J. Christie (2005). "Retrograde signalling by endocannabinoids." *Handb Exp Pharmacol*(168): 367-83.
- Vitalis, T., J. Laine, et al. (2008). "The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro." *Eur J Neurosci* **28**(9): 1705-18.
- Vogt Weisenhorn, D. M., L. J. Roback, et al. (2001). "Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage." *Exp Neurol* **169**(1): 44-55.
- Volgyi, B., S. Chheda, et al. (2008). "Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina." *J Comp Neurol* **512**(5): 664-687.

- Wager-Miller, J., R. Westenbroek, et al. (2002). "Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example." Chem Phys Lipids **121**(1-2): 83-9.
- Wahl, S., H. Barth, et al. (2000). "Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase." J Cell Biol **149**(2): 263-70.
- Waldeck-Weiermair, M., C. Zoratti, et al. (2008). "Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression." J Cell Sci **121**(Pt 10): 1704-17.
- Walsh, D. A., J. P. Perkins, et al. (1968). "An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle." J Biol Chem **243**(13): 3763-5.
- Walter, J., B. Kern-Veits, et al. (1987). "Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro." Development **101**(4): 685-96.
- Watson, S., D. Chambers, et al. (2008). "The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation." Molecular and Cellular Neuroscience **38**(1): 89-97.
- Williams, E. J., J. Furness, et al. (1994). "Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin." Neuron **13**(3): 583-594.
- Williams, E. J., F. S. Walsh, et al. (2003). "The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response." J Cell Biol **160**(4): 481-6.
- Williams, S. E., M. Grumet, et al. (2006). "A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways." Neuron **50**(4): 535-47.
- Williams, S. E., F. Mann, et al. (2003). "Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm." Neuron **39**(6): 919-35.
- Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses." Nature **410**(6828): 588-92.
- Yao, J., Y. Sasaki, et al. (2006). "An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca²⁺-dependent growth cone guidance." Nat Neurosci **9**(10): 1265-73.
- Yazulla, S. and K. M. Studholme (2001). "Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry." J Neurocytol **30**(7): 551-92.
- Yazulla, S., K. M. Studholme, et al. (1999). "Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina." J Comp Neurol **415**(1): 80-90.
- Yazulla, S., K. M. Studholme, et al. (2000). "Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings." Vis Neurosci **17**(3): 391-401.
- Yuan, X. B., M. Jin, et al. (2003). "Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance." Nat Cell Biol **5**(1): 38-45.
- Zelina, P., H. X. Avci, et al. (2005). "The cell adhesion molecule NrCAM is crucial for growth cone behaviour and pathfinding of retinal ganglion cell axons." Development **132**(16): 3609-18.

- Zhang, F., C. Lu, et al. (2000). "GAP-43 mediates retinal axon interaction with lateral diencephalon cells during optic tract formation." Development **127**(5): 969-80.
- Zheng, J. Q. (2000). "Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions." Nature **403**(6765): 89-93.
- Zheng, J. Q., J. J. Wan, et al. (1996). "Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient." J Neurosci **16**(3): 1140-9.
- Zhou, D. and Z. H. Song (2001). "CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells." J Neurosci Res **65**(4): 346-53.