

Université de Montréal

Caractérisation du système des endocannabinoïdes au niveau de
la rétine adulte et en développement

par

Nawal Zabouri

École d'optométrie,
Faculté de médecine

Thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat en sciences
neurologiques

Avril 2011

© Nawal Zabouri, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Caractérisation du système des endocannabinoïdes au niveau de
la rétine adulte et en développement.

Présentée par :
Nawal Zabouri

A été évaluée par un jury composé les professeurs ci-dessous :

Alan Smith

Président-rapporteur

Christian Casanova

Directeur de recherche

Jean-François Bouchard

Co-directeur de recherche

Michel Cayouette

Membre du jury

Ken Mackie

Examineur externe

Graciela Pineyro Filpo

Représentant du doyen de la FES

Résumé

Le système endocannaboïde (eCB) est constitué des ligands, des récepteurs – les plus étudiés étant les récepteurs CB1 et CB2 – et les enzymes de synthèse et de dégradation. Les ligands étant lipophiles, ils ne sont pas encapsulés dans des vésicules, ce qui place les enzymes de synthèse et de dégradation dans une position de régulateurs clés. Plusieurs études démontrent une participation du système eCB à des processus de développement dans le système nerveux central (SNC). La rétine est un modèle important pour l'étude de ces processus car elle contient plusieurs types cellulaires bien connus, dont le patron de développement est clairement établi. Pour l'instant très peu est connu sur l'expression du système eCB durant le développement rétinien. C'est dans ce cadre que les patrons d'expression du récepteur CB1 et de l'enzyme de dégradation FAAH ont été étudiés pendant le développement rétinien postnatal chez le rat. Pour identifier les types cellulaires exprimant ces protéines, des co-marquages ont été accomplis pour le récepteur CB1 ou FAAH et des marqueurs des types cellulaires rétiniens. À P1, les cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales et mitotiques expriment le récepteur CB1. Les cellules ganglionnaires et amacrines cholinergiques sont FAAH-positives. Au cours du développement, certains types cellulaires démontrent une expression transitoire de ces deux protéines, suggérant une implication du système eCB dans les processus de développement.

Nos données démontrent également une importante expression du système eCB dans la rétine adulte, ce qui soutient l'hypothèse de son implication dans la réponse rétinienne. En bref, des études fonctionnelles *in vitro* sur des rétines de non-mammifères ont révélées que le récepteur CB1 modulait la réponse des cônes et des cellules bipolaires. Malgré la récente démonstration de sa présence dans la rétine, il n'existe pas de d'étude sur le rôle du récepteur CB2 dans la rétine. Dans cette thèse, les conséquences fonctionnelles de l'élimination des récepteurs CB1 ou CB2 ont été évaluées chez des souris transgéniques. Les réponses rétiniennes ont été enregistrées par électrorétinographie chez des souris *cnr1^{-/-}* (CB1R-KO) et *cnr2^{-/-}* (CB2R-KO). Nos données suggèrent une implication différente pour chaque récepteur dans la formation de la réponse rétinienne.

Mots clés: Récepteur aux cannabinoïdes, rétine, développement postnatal, FAAH, ERG, marqueurs des cellules rétiniennes, souris *cnr1^{-/-}*, souris *cnr2^{-/-}*, immunohistochimie, microscopie confocale.

Summary

The endocannabinoid (eCBs) system is composed of the ligands, the receptors - the most studied are CB1R and CB2R – and the synthesizing and degradative enzymes. The lipophilic ligands are not stored in vesicles, thereby placing the synthesizing and degradative enzymes as key regulators of the receptor function. The eCB system is thought to participate to developmental processes in the central nervous system (CNS). The rodent retina is a valuable model to study CNS development, as it contains well identified cell types with established developmental timelines. Very little is known about the distribution of this neuromodulation system in the developing retina. In this thesis, the expression patterns of CB1R and eCB degradative enzyme FAAH were investigated in the rat retina during postnatal development. To identify the cells expressing these proteins, co-stainings were carried out for CB1R or FAAH and retinal cell type markers. At P1, CB1R was expressed in ganglion, amacrine, horizontal and mitotic cells, whereas FAAH was present in ganglion and cholinergic amacrine cells. In the course of development, both CB1R and FAAH were transiently expressed in some cell type, suggesting a role of the eCB system in developmental processes.

Furthermore, our data demonstrated an important expression of both proteins in adult animals, supporting the hypothesis that the eCB system is involved in retinal functions. Briefly, functional *in vitro* studies on non-mammalian retinæ have revealed an effect of CB1R on cone photoreceptors and bipolar cells response. Despite the recent demonstration of CB2R mRNA and protein presence in the retina, there are no data on CB2R functional role in retina have been published. In this thesis, the consequences of removing either CB1R or CB2R from the retina of transgenic mice were evaluated. Retinal response was recorded by electroretinogram in *cnr1*^{-/-} (CB1R-KO) and *cnr2*^{-/-} (CB2R-KO) mice. This data suggests that both receptors are involved in shaping the retinal response to light and they have different roles in this process.

Keywords: Cannabinoid receptors, retina, postnatal development, FAAH, ERG, retinal cell markers, *cnr1*^{-/-} mice, *cnr2*^{-/-} mice, immunohistochemistry, confocal microscopy

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xii
Liste des tableaux	xiii
Remerciements	xv
<hr style="border: 1px solid black;"/>	
INTRODUCTION	1
1- Le système des endocannabinoïdes	3
1.1- Les voies de synthèse des endocannabinoïdes majeurs	4
1.1.1- L'AEA	5
1.1.2- Le 2-AG	8
1.2- Les récepteurs	8
1.2.1- La distribution des récepteurs	9
1.2.1.1- Le récepteur CB1	9
1.2.1.1- Le récepteur CB2	12
1.2.2. Les voies de signalisation	13
1.2.2.1- Régulation des kinases activées par des agents mitogènes	13
1.2.2.2- Régulation de l'adénylase cyclase	14
1.2.2.3- Modulation des canaux ioniques	15
1.3- Dégradation des endocannabinoïdes	16
1.4- Les fonctions physiologiques des récepteurs dans le SN	18
2- Le système des endocannabinoïdes et le développement	19
2.1- Prolifération et spécification des cellules progénitrices neurales	20
2.2- La migration neuronales	22
2.3- Guidage axonal et synaptogenèse	23
2.3.1- Le guidage axonal	23
2.3.2- La synaptogenèse	24
2.4- Les endocannabinoïdes et le système visuel	24
3- La rétine	27
3.1- La rétine adulte	28
3.1.1- Les photorécepteurs	30
3.1.2- Cellules bipolaires	33
3.1.3- Cellules ganglionnaires	34
3.1.4- Les neurones modulateurs	35
3.1.4.1- Cellules horizontales	35
3.1.4.2- Cellules amacrines	36
3.1.5- Cellules gliales de la rétine	37
3.2- La circuiterie de la rétine du rongeur	38
3.2.1- Transmission du signal des bâtonnets	39
3.2.2- Transmission du signal des cônes	41
4- Développement et maturation de la rétine du rat	41

4.1- L'organisation temporelle de rétino-genèse	44
4.1.1- Phase 1 : une rétine à deux couches	48
4.1.2- Phase 2 : une rétine à 4 couches	49
4.1.3- Phase 3 : une rétine complète	50
5- Système des endocannabinoïdes dans la rétine	55
5.1- Distribution anatomique des éléments du système des eCBs	55
5.1.2- Les récepteurs	56
5.1.2.1- <i>Le récepteur CB1</i>	56
5.1.2.2- <i>Le récepteur CB2</i>	59
5.1.3- Les enzymes de dégradation	60
5.2- Données fonctionnelles	63
5.2.1- Photorécepteurs	63
5.2.2- Cellules bipolaires	64
5.2.3- Cellules inhibitrices	65
5.2.4- Cellules ganglionnaires	65
6- Objectifs	66
<hr/>	
ARTICLE 1	69
ABSTRACT	70
INTRODUCTION	71
MATERIALS AND METHODS	73
Animals	73
Tissue preparation	73
Subcellular fractionation and Western Blot	74
<i>Subcellular fractionation</i>	74
<i>Evolution of CB1R overall expression in time</i>	75
Immunohistochemistry	76
<i>Double-label immunohistochemistry</i>	76
<i>Sequential co-labeling immunohistochemistry</i>	79
<i>Antibody characterization</i>	79
<i>Validity of the sequential labelling</i>	85
Confocal microscopy	85
RESULTS	86
Temporal and spatial patterns of expression of CB1R and associated enzymes	86
<i>Western blot analysis</i>	86
<i>Immunohistochemistry</i>	89
Subcellular Fractionation	92
Cell types expressing CB1R	94
<i>Early-born neuron</i>	94
<i>Late-born neurons</i>	102
DISCUSSION	111
Temporal expression of the endocannabinoid system	111
CB1R expression during retinal development	113
<i>RGCs and amacrine cells</i>	113
<i>Cones and horizontal cells</i>	114

<i>CB1R expression in late-born cells</i> -----	115
Functional consideration -----	116
REFERENCES-----	119
<hr/>	
ARTICLE 2 -----	134
ABSTRACT -----	135
INTRODUCTION-----	136
MATERIALS AND METHODS -----	139
Animals -----	139
Tissue preparation-----	139
Immunohistochemistry-----	140
<i>Double and triple-label immunohistochemistry</i> -----	140
<i>Sequential co-labeling immunohistochemistry</i> -----	140
<i>Antibody characterization</i> -----	141
Validity of the sequential labelings -----	146
Confocal microscopy-----	149
RESULTS-----	150
Spatial and temporal patterns of expression of FAAH in the retina -----	150
Identification of cell types expressing FAAH-----	154
<i>Expression of FAAH in early born neurons</i> -----	154
<i>Expression of FAAH in late-born neurons</i> -----	164
<i>Comparison of the temporal profiles of FAAH and CB1R expression</i> -----	173
DISCUSSION-----	175
FAAH expression during retinal development-----	176
<i>RGCs and amacrine cells</i> -----	176
<i>Cones and horizontal cells</i> -----	177
<i>FAAH expression in late-born cells</i> -----	179
Functional considerations-----	180
REFERENCES -----	183
<hr/>	
ARTICLE 3 -----	193
ABSTRACT -----	194
INTRODUCTION-----	195
MATERIALS AND METHODS -----	196
Animals -----	196
Electroretinography-----	196
Analysis-----	197
Tissue preparation-----	198
Western Blot-----	198
RESULTS-----	198
The dark adapted retinal function-----	198
The light adapted retinal function -----	208
Total amounts of eCB system protein in WT, <i>cnr1</i> ^{-/-} and <i>cnr2</i> ^{-/-} mice-----	212

DISCUSSION -----	212
Effect of CB1R removal -----	212
Effect of CB2R removal -----	214
REFERENCES -----	218

DISCUSSION -----	221
6- Résumé des résultats -----	221
6.1- Aspects du développement de la rétine -----	221
6.1.1- L'expression du récepteur CB1 durant le développemen -----	221
6.1.2- L'expression de l'enzyme FAAH durant le développement -----	221
6.1.3- Conclusions tirées de ces deux études -----	222
6.2- Aspects fonctionnels -----	222
6.2.1- Rôle fonctionnel de CB1 et CB2 en condition scotopique -----	222
6.2.2- Rôle fonctionnel de CB1 et CB2 en condition photopique -----	223
6.3- Expression du récepteur CB2 dans la rétine de la souris adulte -----	223
7- Le système des endocannabinoïdes et le développement -----	224
7.1- Justification du modèle -----	224
7.2- Considérations techniques -----	224
7.2.1- Spécificité des anticorps -----	225
7.2.2- Le protocole de marquage séquentiel avec un fragment Fab -----	227
7.2.3- Les artefacts de redistribution -----	230
8- Rôles potentiels des sCBs dans le développement rétinien -----	230
8.1- Variation de l'expression des eCBs selon l'âge -----	230
8.2- Distribution de CB1 et FAAH dans les cellules précoces de la rétine --	230
8.2.1- Les cellules ganglionnaires et amacrines -----	232
8.2.2- Les cellules horizontales et les cônes -----	232
8.3- Distribution de CB1 et FAAH dans les cellules tardives de la rétine ---	236
8.3.1- Les cellules neuroblastes et mitotiques -----	236
8.3.2- Les cellules bipolaires -----	237
8.3.3- Les bâtonnets -----	240
8.3.4- Les cellules de Müller -----	240
8.4- Les endocannabinoïdes et le développement du système visuel -----	241
8.4.1. Activité spontanée -----	241
8.4.2. L'activité spontanée et la synaptogenèse dans la rétine interne -----	243
8.4.3. Les endocannabinoïdes modulent les projections rétino-fuges -----	245
9- Rôles des éléments du système des eCBs dans la rétine adulte -----	248
9.1- Distribution du récepteur CB2 -----	249
9.2- Condition scotopique -----	249
9.2.1- Le rôle du récepteur CB2 -----	249
9.2.2- Le rôle du récepteur CB1 -----	252
9.3- Condition photopique -----	253
9.3.1- Le rôle du récepteur CB2 -----	253
9.3.2- Le rôle du récepteur CB1 -----	255
10- Perspectives -----	258
10.1- Études futures relatives au développement -----	258
10.2- Études futures chez l'adulte -----	259

CONCLUSION	260
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE	261
<hr/>	
ANNEXE : ARTICLE 4	vixx
ABSTRACT	VIII
INTRODUCTION	XIX
MATERIALS AND METHODS	XX
Reagents	XI
Retinal explant culture	XII
Purified retinal ganglion cell culture	XII
Primary neuron culture	XXIII
Growth cone turning assay	XXIV
Immunocytochemistry	XXIV
Surface biotinylation	XV
Western blot analysis	XV
Intraocular injections	XXVI
Perfusion	XXVI
Immunohistochemistry	XXVI
Retinogeniculate projection patterns analysis	XXVIII
Quantification method	XXVIII
RESULTS	XXIX
The developing visual system expresses the CB1R and the eCB synthesizing and degrading enzymes	
Pharmacological modulation of CB1R activity affects	XXXIV
RGC GC morphology and turning <i>in vitro</i>	
The CB1R modulates GC morphology via the cAMP/PKA pathway	XXXVIII
The DCC receptor is required for CB1R induced reorganization of the GC	XLIII
The CB1R plays an important role during retinal projection growth and target selection <i>in vivo</i>	XLVII
DISCUSSION	LII
REFERENCES	LVI
<hr/>	

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Voies de synthèse et dégradation des principaux endocannabinoïdes	7
Figure 2 : Marquage histochimique nucléaire de la rétine de souris-----	29
Figure 3 : Différents compartiments cellulaires des photorécepteurs -----	32
Figure 4 : Représentation des voies de transmission OFF et ON des bâtonnets	40
Figure 5 : Représentation de la migration intercinétique du noyau -----	43
Figure 6 : Patron temporel du développement de la rétine chez le rat-----	45
Figure 7 : Ordre de développement des cellules rétinienne chez le rat -----	47
Figure 8 : Différentes phases de développement de la rétine-----	54

ARTICLE 1

Figure 1 -----	82
Figure 2 :-----	88
Figure 3 -----	91
Figure 4 -----	93
Figure 5 -----	95
Figure 6 -----	97
Figure 7 -----	99
Figure 8 -----	101
Figure 9 -----	103
Figure 10 -----	106
Figure 11-----	108
Figure 12-----	110

ARTICLE 2

Figure 1 -----	148
Figure 2 -----	153
Figure 3 -----	155
Figure 4 -----	157
Figure 5 -----	159

Figure 6 -----	161
Figure 7 -----	163
Figure 8 -----	165
Figure 9 -----	167
Figure 10 -----	170
Figure 11 -----	172
Figure 12 -----	174

ARTICLE 3

Figure 1 -----	200
Figure 2 -----	204
Figure 3 -----	207
Figure 4 -----	209
Figure 5 -----	211

DISCUSSION

Figure 9-----	229
---------------	-----

ANNEXE : ARTICLE 4

Figure 1: Expression of the eCB system in retinal projections -----	XXXI
Supplementary figure 1: Expression of the eCB system-----	XXII
Figure 2: Pharmacological activation and blockade of the CB1R reorganizes the morphology of the GC and modulates axonal growth and navigation -----	XXXVI
Figure 3: The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway-----	XL
Supplementary figure 2: CB1R activity and second-messenger cascades. -----	XLII
Figure 4: DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC-----	XLV
Supplementary figure 3: DCC regulates CB1R induced reorganization of the GC-----	XLVI
Figure 5: Pharmacological modulation of CB1R activity modulates retinal projection development in vivo -----	XLIX
Supplementary figure 4: Intraocular injections and mechanism by which cannabinoids modulate GC steering -----	L

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION	1
Tableau 1 : Distribution des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2	11
Tableau 2 : Distribution du récepteur CB1 dans la rétine	58
Tableau 3 : Distribution des protéines de système eCB dans la rétine	62

ARTICLE 1	
Table 1 : Antibodies	78

ARTICLE 2	
Table 1 : Antibodies	146

DISCUSSION	
Tableau 4 : Anticorps sélectionnés	226
Tableau 5 : Valeurs des constantes d'inhibition des ligands de CB1 et CB2	257

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

SΔ ⁹ -THC	Δ ⁹ -tétrahydrocannabinol
2-AG	2-arachidonylglycerol
AAs	acides aminés
Abhd4	α,β-hydrolase 4
ABHD6	hydrolase α-β-hydrolase domain 6
ABHD12	serine hydrolase α-β-hydrolase domain 12
AC	adénylate cyclase
Ac	Anticorps
AEA	arachidonoyléthanolamide
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
BDNF	facteur de croissance
CB1R	récepteur aux cannabinoïdes CB1
CB2R	récepteur aux cannabinoïdes CB2
CGL	corps genouillé latéral
CS	collicule supérieur
eCB	endocannabinoïde, cannabinoïdes endogènes
DAG	diacylglycérol,
DAGL	diacylglycérol lipase
DA	dopamine
E	jour embryonnaire
eCB	endocannabinoïde
ERG	électrorétinogramme
FAAH	fatty acid amide hydrolase
Fab	fragment Fab
GAD65	glutamic acid decarboxylase
GPCR G	protein coupled receptor
INL	couche nucléaire interne
IPL	couche plexiforme interne
LTD	mécanismes de dépression à long terme
MAGL	monoacylglycerol lipase
MAPK	MAP kinases
mGluR6 r	écepteurs métabotropiques
NAPE-PLD	<i>N</i> -acylphosphatidylethanolamine phospholipase D
NAT	<i>N</i> -acyltransférase
ONL	couche nucléaire externe
OP	potentiels oscillatoires
OPL	couche plexiforme externe
P	jour postnatal
PKA	protéine kinase A
RGC	cellules ganglionnaires de la rétine
SNC	système nerveux central
V1	l'aire visuelle primaire

*La science restera toujours la satisfaction du
plus haut désir de notre nature la curiosité*
Ernest Renan

REMERCIEMENTS

Cette longue aventure aurait été impossible, et certainement moins agréable, sans le soutien actif de mes professeurs et de bien du monde. C'est ce qui m'a permis de mieux vivre cette expérience pleine de rebondissements. Je tiens à leur témoigner ici ma profonde reconnaissance.

Merci, Christian, de m'avoir acceptée dans votre labo, il y a maintenant 9 ans de cela. De m'avoir initiée à la magie l'électrophysiologie... ça restera la technique la plus exigeante et la plus le *fun* que j'ai jamais eu à faire. Merci aussi de m'avoir permis d'aller au bout de mes idées et d'élargir mes horizons en explorant de nouvelles avenues. Merci de votre soutien et de votre écoute, surtout durant ces derniers mois.

Jean-François, merci de m'avoir familiarisé avec l'univers des endocannabinoïdes et de m'avoir permis de découvrir que ce sera peut-être ma voie. Merci aussi de votre patience et de votre disponibilité. et de m'avoir appris à faire des westerns Blots (cette fois, je crois que c'est vraiment fini). À tous deux, merci votre générosité, on connaît tous le prix exorbitant de mes 5 millions d'anticorps.

Merci à Florence, Geneviève, Karine et Sophie pour les conditions remarquables dans lesquelles j'ai pu effectuer mes expériences ainsi que pour leur soutien moral et quotidien. Merci Florence pour ton écoute, ton aide et le café sur les six derniers mois. Merci Geneviève de faire les commandes plus vite que ton ombre! Karine, par où commencer? Merci pour ton écoute et ton soutien, pour le nombre d'heures que tu as passées, avec moi ou pour mes expériences, sur le confocal, merci pour ta bonne humeur et ton calme contagieux. Merci, Sophie, pour ton soutien et ton écoute.

Merci Denis Latendresse pour le temps que tu m'as consacré, mais également pour ton perfectionnisme qui m'a coûté de longues heures passées à peaufiner des figures afin qu'elles correspondent à tes critères d'esthétisme.

Merci Denis Boire d'avoir pris le temps de lire mon article et de m'avoir amené à réaliser l'importance des statistiques, même si la loi du quantitatif est parfois bien éprouvante.

Merci à mes collègues des deux laboratoires, pour l'ambiance et la créativité m'ont permis de surmonter de nombreuses difficultés. Aux anciens, Brian et Martin merci d'avoir partagé avec moi un peu votre sagesse, même si votre pessimisme (réalisme! Me direz-vous) ne s'accordait pas toujours à mon optimisme résolu. Merci également à Anteneh pour les nombreuses discussions fructueuses, à Gabriel pour la bonne humeur et l'enthousiasme.

Matthieu, le roi de l'absurde, merci de m'avoir fait découvrir l'absurde n'est pas toujours déprimant. Merci aussi de tes critiques et d'être toujours prêt à discuter de science. Marianne, merci pour tous petits matins où nous nous sommes retrouvées toutes deux seules à l'école ou presque. Laurent l'énergique, merci tout d'abord pour ton aide dans l'élaboration des figures. Merci également de tes jockes, bien bizarres. Reza, merci de ton humour et de ta bonne humeur. Un jour, tu me montreras 'la carte de la mort qui tue'. Hosni l'imperturbable, merci de ton calme à toute épreuve ou presque. Merci Joseph pour ton aide et tes superbes dissections. Bruno... Merci pour tout. Tu as accepté sans sourciller de partager durant ces derniers mois, non seulement un espace de travail (un projet et tout ce qui va avec) mais également une part de mes soucis, et ce, avec un calme et une confiance, qui m'ont été très précieux.

Merci à mes amis et ma famille qui ont su me soutenir aux moments les plus critiques et me communiquer leur confiance inébranlable quand la mienne fléchissait. Merci Cécile et Alex pour tous les brunchs –c'était une bouée de sauvetage- pour votre patience, votre confiance et de ne m'avoir jamais demandé "alors tu finis quand?" Merci à Isabelle, pour toutes ces heures hivers, printemps, été, automne, que nous avons passées à travailler dans un café. Merci aussi pour ton écoute et ta joie de vivre. Merci à mes parents pour tout. Pour leur soutien, leur confiance, leur aide et pour les choix de vie qu'ils ont fait afin de me permettre d'être ici aujourd'hui. Merci Cécile et maman pour votre souci du détail lors des séances de révision.

Introduction

Le cannabis, une des premières plantes domestiquées, a une histoire très ancienne et très riche. Les grands explorateurs du XIX^{ème} siècle situent son origine géographique en Asie Centrale. Cette plante aurait ensuite accompagné les migrations et les conquêtes pour se répandre sur tous les continents. Des analyses modernes de biodiversité démontrent aussi que l'épicentre de la pluralité du cannabis est en Asie centrale, probablement dans la République de Tajikistan (voir pour revue Russo, 2007). L'espèce *Cannabis sativa* L est subdivisée en plusieurs sous-espèces, dont les effets psychotropes et les usages varient. Sa reproduction a favorisé l'expansion des sous-espèces aux effets psychotropes plus prononcés. On rapporte aussi une augmentation généralisée de la teneur en Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC – le principe psychotrope) des plants de cannabis durant les quarante dernières années (voir pour revue Russo, 2007).

L'usage médicinal de cette plante remonte à plus de 5000 ans avant notre ère. Elle est mentionnée dans le "Pen-ts'ao ching", une pharmacopée chinoise datant du XXVII^e siècle av. J.-C (Touw, 1981; Mailleux *et al.*, 1992) et dans le Papyrus Ebers, un traité médical rédigé en Égypte au XVI^e siècle av. J.-C. (Tsou *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000; Hanus, 2009). Ces deux ouvrages sont parmi les plus anciens écrits du genre. Le cannabis était prescrit pour soigner une vaste gamme de problèmes médicaux allant de la douleur, à la malaria en passant par les infections et les inflammations (Zuardi, 2006; Lopez *et al.*, 2010).

La plante du cannabis a été introduite dans la médecine occidentale au milieu du XIX^e siècle par le médecin William B. O'Shaughnessy et le psychiatre Jacques-Joseph Moreau. L'usage médicinal du cannabis a atteint son apogée durant la deuxième moitié du XIX^e siècle et s'est répandu à toute l'Europe ainsi qu'en Amérique du Nord. Avec l'apparition de médicaments spécifiques et efficaces, cet usage a grandement diminué au début du XX^e siècle.

Malgré le retrait du cannabis du marché légal américain, sa consommation à des fins récréatives a connu dans les années soixante une hausse fulgurante, passant de 5 à 68% de jeunes consommateurs en quinze ans (Zuardi, 2006). Ce fait a certainement contribué à augmenter l'intérêt des chercheurs pour cette plante. En 1964, notamment, le Δ^9 -THC a été isolé par Gaoni et Mechoulam (Gaoni and Mechoulam, 1964). Cette molécule lipidique est un ligand pour les récepteurs aux endocannabinoïdes. Dans les années 90, les récepteurs aux cannabinoïdes ont été identifiés et l'un des principaux cannabinoïdes endogènes (eCBs), l'anandamide, a été isolé. Depuis, le Δ^9 -THC et le système endogène qu'il active n'ont cessé de susciter l'intérêt de la communauté scientifique.

Les pages qui suivent vont traiter du système endocannabinoïde (eCB) et des rôles fonctionnels qui lui sont attribués dans le développement et le fonctionnement de la rétine. Nous allons, dans un premier temps, détailler le système eCB et ses fonctions dans le système nerveux central (SNC) en général, puis plus particulièrement dans le système visuel. Dans une seconde partie, nous présenterons le modèle d'intérêt ici, soit la rétine, son développement et son organisation fonctionnelle, avant de décrire le rôle et la distribution du système eCB dans cette structure.

1- Le système endocannabinoïde

Le système eCB joue un rôle primordial dans la régulation de divers processus physiologiques fondamentaux tels que l'inflammation, la cognition, le contrôle de l'alimentation et de la nociception (Mackie, 2006; Mackie and Stella, 2006; Cabral and Griffin-Thomas, 2009; Pertwee, 2009). Les récepteurs aux eCBs sont parmi les plus abondamment présents dans le corps. Notamment, CB1R est un des récepteurs les plus exprimés dans le SNC alors que le récepteur CB2 est très abondant dans le système nerveux périphérique et le système immunitaire.

Le système eCB inclut les ligands endogènes lipidiques, les enzymes qui les synthétisent, les récepteurs activés par ces ligands et les enzymes de dégradation des ligands. Deux des ligands endogènes lipidiques les plus connus sont l'arachidonoyléthanolamide (AEA ou anandamide) et le 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). En ce qui concerne les récepteurs, les deux plus étudiés sont les récepteurs CB1 et CB2.

Contrairement aux systèmes "classiques" de neurotransmission les ligands endogènes des récepteurs CB1 et CB2 ne sont pas stockés dans des vésicules avant usage. Ils sont synthétisés sur demande et l'action des récepteurs cesse lorsque les ligands sont dégradés. Cela place les enzymes de synthèse et de dégradation en position de régulateurs clés du système eCB.

Dans les sections qui suivent nous allons décrire chaque élément de ce système, notamment, les voies de synthèse des ligands endogènes majeurs (AEA et 2-AG), la distribution et les voies de signalisation des récepteurs CB1 et CB2 ainsi que les voies de dégradation des eCBs majeurs.

1.1- Les voies de synthèse des endocannabinoïdes majeurs

Au cours de la dernière décennie, les ligands lipidiques tels que l'AEA et le 2-AG ont attiré beaucoup l'attention par rapport à leur rôle dans la neurotransmission chez l'adulte, mais aussi dans le développement. Due à leur nature lipophile, les eCBs ne sont pas stockés dans des vésicules avant utilisation, mais bien produits sur demande. Le processus de synthèse peut être initié par deux mécanismes : la dépolarisation de la cellule et l'entrée de calcium ou l'activation de récepteurs métabotropiques liés à $G_{q/11}$ tels que les récepteurs muscariniques ou les récepteurs métabotropiques glutamatergiques du groupe I (Hashimoto *et al.*, 2007).

1.1.1- L'AEA

Le premier mécanisme de synthèse de l'AEA a été rapporté par Di Marzo et al. (1994). En effet, les auteurs de cette étude ont démontré que les neurones exposés à un fort taux de calcium ou à une dépolarisation synthétisaient et sécrétaient de l'AEA par un mécanisme qui inclut deux étapes. Tout d'abord, le N-arachidonyl phosphatidylethanolamine (NAPE) est synthétisé à partir de phospholipide de la membrane cellulaire par l'enzyme N-acyltransférase (NAT). Par la suite, Le NAPE est hydrolysé par l'enzyme N-Acylphosphatidylethanolamine- hydrolyzing phospholipase D (NAPE-PLD) pour former l'AEA et l'acide phosphatidique. Bien que l'activité de l'enzyme NAPE-PLD soit élevée dans le cerveau et semble influencée par le calcium (Okamoto *et al.*, 2007; Kano *et al.*, 2009), le développement d'une souris transgénique chez qui le gène codant pour cette enzyme a été inactivé ne démontre que très peu de changement dans la concentration de l'AEA (Leung *et al.*, 2006). Cette étude et d'autres soutiennent l'idée que la synthèse de l'AEA peut être accomplie par plusieurs voies. En effet, trois autres voies ont été découvertes. Deux de ces voies incluent les enzymes phospholipases A1/A2 et l' α,β -hydrolase 4 (Abhd4), respectivement. L'action de ces enzymes relâche Lyso-NAPE par hydrolyse du NAPE, après quoi l'AEA est libéré par l'enzyme lysophospholipase D (Sun *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008b). Enfin, un troisième chemin possible implique l'hydrolyse du NAPE par l'enzyme phospholipase C, puis une déphosphorylation pour relâcher l'AEA (Liu *et al.*, 2008b; Wang and Ueda, 2009). Une récente étude a montré que l'élimination de l'enzyme Abhd4 seule ne causait que peu de changement dans les concentrations d'AEA. Par contre, l'élimination simultanée des enzymes NAPE-PLD et Abhd4 causait une grande diminution dans la concentration du ligand endogène du récepteur CB1 (Simon and Cravatt, 2010). Les auteurs de cette étude en ont conclu que ces deux enzymes sont responsables de la synthèse d'une grande partie de l'AEA chez la souris. Cependant, l'importance et les distributions relatives de ces

différentes voies restent encore à découvrir chez la souris de souche sauvage. Tous ces mécanismes sont représentés dans la figure 1A.

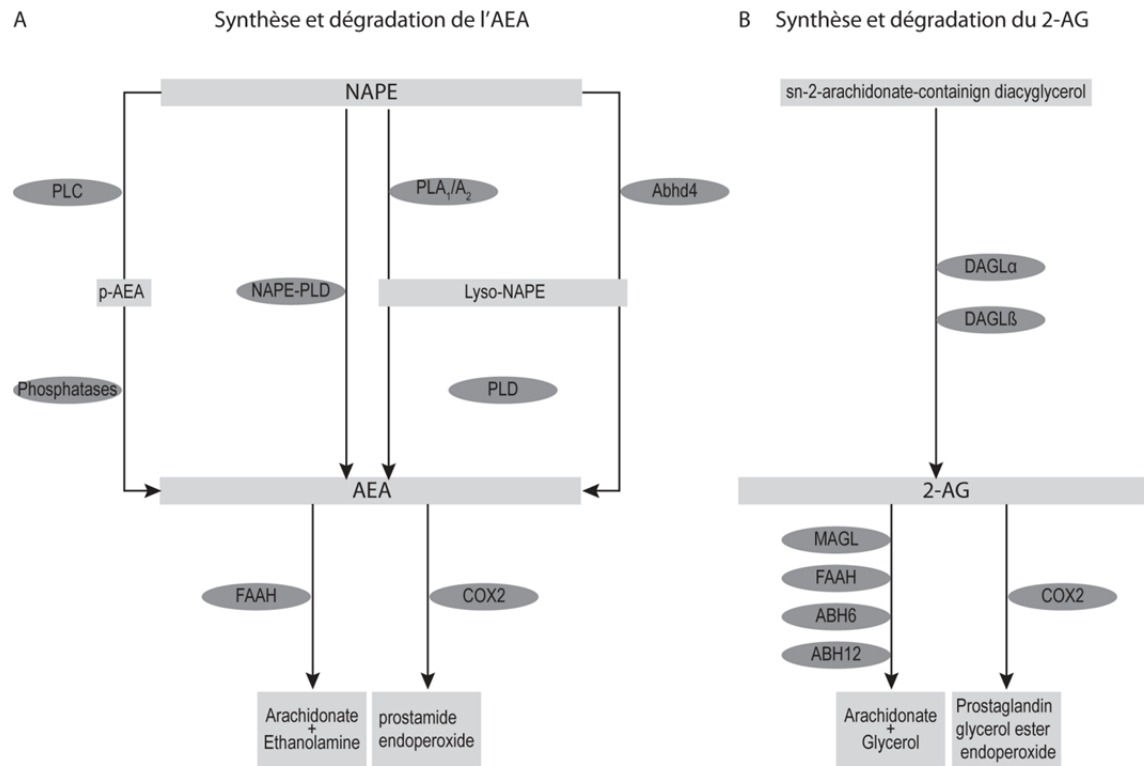


Figure 1 : Voies de synthèse et dégradation des deux principaux endocannabinoïdes

1.1.2- Le 2-AG

Au même titre que l'AEA, plusieurs voies de synthèses existent pour le 2-AG. Néanmoins, les chercheurs s'accordent pour dire que la voie décrite dans le paragraphe qui suit est la voie principale. Ainsi, le 2-AG peut être formé à partir de phospholipides membranaires contenant l'acide arachidonique par le biais de la phospholipase C. La molécule obtenue- le diacylglycérol, DAG - est ensuite hydrolysée par la diacylglycérol lipase (DAGL) pour former le 2-AG (Bisogno *et al.*, 1997a; Bisogno *et al.*, 1997b; Bisogno *et al.*, 2003 et voir figure 1B). L'enzyme DAGL existe en plusieurs isoformes. Récemment, deux souris transgéniques ayant le gène *DAGL α* ou *DAGL β* inactif ont été développées. Gao *et al.* (2010) démontrent une baisse substantielle de la concentration du 2-AG chez ces deux lignées de souris. Les auteurs soulignent aussi une distribution hétérogène des deux isoformes, suggérant ainsi que l'un ou l'autre des isoformes serait responsable de la production de 2-AG selon la région d'intérêt.

1.2- Les récepteurs

Parmi les récepteurs aux cannabinoïdes, le récepteur CB1 est probablement le plus exprimé et certainement le plus étudié dans le SNC, alors que le récepteur CB2 est davantage exprimé dans le système immunitaire (voir pour revue Howlett, 2002). Il est néanmoins à noter que de plus en plus de chercheurs s'accordent sur le fait que le récepteur CB2 joue également un rôle dans le SNC (voir pour revue Svizenska *et al.*, 2008). Les deux récepteurs à 7 passages transmembranaires, faisant partie de la grande famille des récepteurs liés à une protéine G (GPCR), sont généralement couplés à une protéine G_i ou G_o . Le récepteur CB1, cloné en 1990 à partir du cerveau de rat, compte plus de 473 acides aminés (AAs) (Matsuda *et al.*, 1990). Le récepteur CB2 a été cloné à partir de cellules humaines en 1993, (Munro *et al.*, 1993) et il comporte 360 AAs. L'homologie entre les séquences d'AAs des récepteurs CB2 et CB1 humains est de 44%. Dans les parties qui

suivent, nous allons décrire la distribution des deux récepteurs dans le SNC puis leurs voies de signalisation.

1.2.1- La distribution des récepteurs

1.2.1.1- Le récepteur CB1

Le patron d'expression de ce récepteur a été établi à l'aide de diverses méthodes telles que l'autoradiographie quantitative, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie ainsi que, tout récemment, l'imagerie *in vivo* par tomographie (voir Horti and Van Laere, 2008 pour revue). Ainsi, dans les structures sous-corticales, les premières études par autoradiographie rapportent une forte expression dans l'hippocampe, les couches profondes du bulbe olfactif, la partie latérale du striatum, le globus pallidus, la substance noire, et la couche moléculaire du cervelet (Herkenham *et al.*, 1990; Herkenham, 1991; Mailleux *et al.*, 1992; Westlake *et al.*, 1994).

Par hybridation *in situ*, on retrouve deux patrons d'expression du récepteur CB1 selon les régions du cerveau. Le premier patron, un marquage uniforme, est particulièrement observable dans le striatum, le thalamus, l'hypothalamus, le cervelet et la partie inférieure du tronc cérébral. Le deuxième patron, un marquage non-uniforme indiquant une présence préférentielle du récepteur CB1 dans une population donnée, est présent dans l'hippocampe et l'amygdale, où le récepteur CB1 est concentré dans les interneurons positifs à la cholécystokinine (Matsuda *et al.*, 1993; Westlake *et al.*, 1994; Marsicano and Lutz, 1999; Tsou *et al.*, 1999; Hohmann and Herkenham, 2000; McDonald and Mascagni, 2001; Kawamura *et al.*, 2006).

Le récepteur CB1 est également exprimé dans le cortex cérébral, notamment dans les aires somatosensorielle, motrice et visuelle primaires. Dans ces régions, l'ARNm du récepteur est exprimé uniquement dans certaines populations d'interneurones (Marsicano and Lutz, 1999), alors que la protéine est située dans les terminaisons inhibitrices et les axones entourant les neurones pyramidaux. Récemment, il a été démontré que le

récepteur CB1 et son ARNm sont également exprimés par les neurones pyramidaux (Egertová and Elphick, 2000; Lafourcade et al., 2007). On retrouve aussi ce récepteur dans la rétine de plusieurs mammifères, allant du poisson à l'humain. La distribution ce récepteur dans la rétine fera l'objet d'une partie subséquente de cette introduction et ne sera donc pas traitée ici. Le résumé détaillé des structures qui expriment ce récepteur et l'intensité de son expression sont présentés dans le tableau 1.

CB2	CB1	Localisation	Références	
---	+++/++/+	Cortex somatosensoriel primaire et secondaire	Référence pour l'expression de la protéine et de l'ARNm du récepteur CB1: Herkenham et al., 1990; Herkenham, 1991; Herkenham et al., 1991; Westlake et al., 1994; Glass et al., 1997; Tsou et al., 1998; Farquhar-Smith et al., 2000	
---	+++	Cortex cingulaire,		
---	+++	Cortex entorhinale,		
+++	+++	Cortex piriforme		
---	+++	Régions corticales associatives du lobe frontal		
---	++	Aires associatives temporales		
+++	++/	Cortex moteur		
+++	++/+	Cortex visuel		
+++	++/+	Cortex auditif		
+++	---	Cortex orbital		
+++	+++/++/+	Gyrus dentelé et hippocampe		
---	+++	Bulbe olfactif		
+++	+++	Noyaux olfactif antérieur		
---	+++	Partie olfactive de la commissure antérieure		
---	+	Tubercules olfactifs		
+++	+++	Amygdale		
+++	+++/++/+	Noyaux gris centraux		Référence pour l'expression de la protéine et de l'ARNm du récepteur CB2: Lu et al., 2000; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Lopez et al., 2010
---	+++	Connexions striato-nigrales		
+++/++	+++/+	Tronc cérébral		
---	++	Claustrume		
---	++	Strie terminale		
+++/++	+++/++	Cervelet		
---	++	Cerveau antéro-basal		
+++/++	++/+	Noyaux thalamiques		
---	++	Noyau habénulaire		
+	++	Hypothalamus		
---	+++/++	Moelle épinière		
+++	+++	Rétine		

Dans chaque structure mentionnée ci-dessus un ou plusieurs noyaux (ou couches dans le cas du cortex) expriment les récepteurs.

+++ = Marquage dense; ++ = Marquage modéré; + = Marquage faible,

--- = pas de marquage; tableau adapté de Svizenska et al., 2008.

Tableau 1 : Distribution des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2

1.2.1.2- Le récepteur CB2

Le récepteur CB2 est principalement exprimé par les cellules du système immunitaire. Ainsi, l'ARNm du récepteur CB2 a été localisé dans la rate, le thymus, les amygdales, la moelle osseuse, le pancréas, les leucocytes sanguins, les macrophages spléniques ainsi que dans plusieurs modèles de cultures de cellules immunitaires (voir pour revue Howlett, 2002). En particulier, des cellules immunitaires telles les macrophages, les cellules T CD4 et CD8 de même que les cellules B, entre autres, expriment ce récepteur de façon importante (Patel *et al.*, 2010). En outre, ce récepteur se retrouve également dans la microglie active (Stella, 2010), une population de cellules gliales du SNC, qui devient active lors d'une menace immunitaire dans le SNC.

L'expression du récepteur CB2 dans le SNC a été étudiée à l'aide de techniques telles que le RT-PCR, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie. La concentration de ce récepteur dans le SNC est beaucoup plus faible que dans le système immunitaire. L'une des premières études à avoir décrit son existence dans des neurones a été réalisée en 1996 par Skaper *et al.*. Cette étude révélait la présence de l'ARNm du récepteur CB2 dans les cellules granulaires en culture, ainsi que les cellules granulaires et de Purkinje du cervelet de la souris. Depuis, plusieurs études rapportent l'expression du récepteur CB2 par les neurones peuplant différentes régions du cerveau. Ainsi, les études immunohistochimiques ont révélé que le récepteur est présent en forte concentration dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, les tubercules olfactifs, le cortex cérébral, le striatum, les noyaux thalamiques, l'amygdale, la substance noire, les colliculi inférieurs ainsi que dans la rétine, élément qui sera discuté de façon détaillée ultérieurement (Lu *et al.*, 2000; Van Sickle *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006; Onaivi *et al.*, 2006; Atwood and Mackie, 2010; Lopez *et al.*, 2010). Le résumé détaillé des structures qui expriment ce récepteur et son intensité est présenté dans le tableau 1.

Il faut néanmoins mentionner que la présence du récepteur CB2 dans les neurones demeure un sujet controversé. Une récente étude a démontré la présence de plusieurs isoformes du récepteur CB2 avec des distributions différentes selon le tissu chez plusieurs espèces, notamment l'humain et la souris (Liu *et al.*, 2009). Les auteurs de cette étude soulignent que cela pourrait être en partie la source des résultats contradictoires quant à l'expression du récepteur CB2 dans les neurones.

1.2.2- Les voies de signalisation

Les deux récepteurs aux cannabinoïdes de types 1 et 2 sont tous deux des GPCRs et les protéines G auxquelles ils sont couplés peuvent moduler plusieurs voies intracellulaires. Le mécanisme général, commun à toutes les protéines G, inclut l'activation des sous-unités α , β et γ des protéines G. Cela cause l'hydrolyse d'une molécule de GTP, déclenchant ainsi la séparation de la sous-unité α GTP des sous-unités β et γ . Chacune de ces sous-unités va par la suite activer différentes voies de signalisation (voir Maudsley *et al.*, 2007 pour revue). Dans le cas des récepteurs CB1 et CB2, les voies modulées sont celles des MAP kinases (MAPK) dont nous ne parlerons que brièvement, de l'adénylate cyclase (AC) et de la modulation des canaux ioniques calciques et potassiques.

1.2.2.1- Régulation des kinases activées par des agents mitogènes

Les récepteurs aux cannabinoïdes de types 1 et 2 ont la capacité de réguler l'activité de la famille des 'mitogen-activated proteins kinases' (MAPKs) (Bouaboula *et al.*, 1995b; Poinot-Chazel *et al.*, 1996; Howlett, 2005; Daigle *et al.*, 2008; Grimaldi *et al.*, 2009). La voie des MAPKs est souvent activée après une stimulation des GPCRs. Par cette voie, les GPCRs peuvent moduler la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire. Cette voie de signalisation se caractérise par une organisation hiérarchique qui aboutit à une activation d'une ou plusieurs protéines (Erk1/2, JNK, p38 MAPK ou Erk5) qui peuvent alors moduler l'expression des gènes immédiats

("immediate early genes"). Ainsi, il a été démontré que le THC provoque, dans l'hippocampe de souris, l'expression des produits de gènes immédiats comme le krox-24 et le c-Fos ainsi que le facteur de croissance BDNF. Certains de ces éléments jouent un rôle important lors de la plasticité synaptique (Bouaboula *et al.*, 1995a). Par conséquent, la régulation de l'expression génique par l'activation des MAPKs est un mécanisme physiologique par lequel les cannabinoïdes peuvent influencer entre autre la plasticité synaptique.

1.2.2.2- Régulation de l'adénylate cyclase

La régulation de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) par le récepteur CB1 a été la première voie de signalisation décrite. Plusieurs années plus tard, il a été observé que le récepteur CB2 pouvait aussi moduler cette voie de signalisation. Ainsi, il a été démontré, dans un premier temps, que les agonistes de récepteurs aux cannabinoïdes causaient l'inhibition de l'AC (**CB1R** :Howlett and Fleming, 1984; Howlett, 1985; **CB2R** : Felder *et al.*, 1995; Slipetz *et al.*, 1995; Bouaboula *et al.*, 1999a; 1999b). Cela a pour conséquence de diminuer la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire, ce qui occasionne une diminution de la phosphorylation de l'enzyme protéine kinase A (PKA) et donc d'inhiber son activité (Howlett, 1985; Howlett, 1987; Yasuda *et al.*, 2008). Toutefois, l'interaction entre les récepteurs aux cannabinoïdes et l'AC dépend de l'isoenzyme exprimée par le tissu (Rhee *et al.*, 1998). En effet, neuf variantes de l'enzyme ont été répertoriées (AC-I à AC-IX, Sunahara *et al.*, 1996). La distribution dans le SNC de ces isoformes de l'AC est hétérogène et influence grandement la réponse cellulaire aux cannabinoïdes. Ainsi, les isoformes I, V, VI et VIII sont inhibés tandis que les isoenzymes II, IV et VII sont activés par les cannabinoïdes (Rhee *et al.*, 1998).

Dans le cas du récepteur CB1, un niveau de modulation supplémentaire s'ajoute. En effet, sa capacité de se lier à une Gi/o ainsi qu'à une Gs dans certaines conditions (Howlett, 2002), permet un contrôle plus fin

des effets des eCBs sur le niveau d'AMPc, ce qui influence profondément l'activité cellulaire. La voie de signalisation AMPc/PKA est responsable de la régulation de plusieurs processus physiologiques tels que l'expression de gènes, la croissance cellulaire, la plasticité synaptique, l'activité de canaux ioniques dans presque tous les tissus (voir pour revue Sadana and Dessauer, 2009).

Les conséquences à court terme de l'activation du récepteur CB1 incluent une diminution de la relâche synaptique dans les neurones GABAergiques et glutamatergiques due à une modulation des canaux voltage-dépendants calciques et potassiques (voir Demuth and Molleman, 2006 pour revue). Plusieurs éléments indiquent une implication du récepteur CB1 dans plusieurs formes de plasticité, notamment à court terme, telles que la suppression de l'inhibition ou l'activation liée à la dépolarisation (Voir pour revue Kano *et al.*, 2009).

1.2.2.3- Modulation des canaux ioniques

Les cannabinoïdes modulent l'activité de plusieurs canaux ioniques, notamment des canaux calciques et potassiques. Les canaux calciques voltage-dépendants sont classés en cinq catégories : L, N, P/Q, T et R. Tous ces types s'expriment dans le SNC (Catterall *et al.*, 2005). Les endocannabinoïdes inhibent l'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L, N, P/Q. Par exemple, l'inhibition de canaux calciques de type L a été observée dans plusieurs types cellulaires, y compris dans les cellules bipolaires de la rétine (Straiker *et al.*, 1999a). Il a été démontré, dans des cultures neuronales, que le mécanisme qui sous-tend cet effet emprunte la voie de l'AMPc/PKA (Hoddah *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'AEA bloque les canaux calciques voltage-dépendants de type N et P/Q, causant ainsi une baisse de l'influx calcique dans la synapse (Mackie and Hille, 1992). Cet effet s'effectue par l'intermédiaire d'une protéine Gi/o, mais n'est pas AMPc-dépendant (Mackie *et al.*, 1993; 1995; Hampson *et al.*, 1998). La régulation des canaux calciques voltage-dépendants de type N et P/Q fait partie du

mécanisme par lequel les cannabinoïdes diminuent la relâche synaptique (Mackie *et al.*, 1995; Sullivan, 1999).

D'autre part, les endocannabinoïdes activent les canaux potassiques de type A (Mu *et al.*, 1999) et à courant entrant liés à une protéine G (GIRK) (Mackie *et al.*, 1995; McAllister *et al.*, 1999). Ces derniers sont capables d'interagir avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G. L'activation des GIRKs semble également être un mécanisme par lequel les cannabinoïdes inhibent la libération de neurotransmetteurs et ce, par une voie de signalisation indépendante de l'AMPc (Robbe *et al.*, 2001).

Une des différences clés entre les récepteurs CB1 et CB2 est que ce dernier ne semble pas moduler les canaux calciques ou les GIRKs au niveau du SNC (Felder *et al.*, 1995; Sanchez-Pastor *et al.*, 2007). Il faut, néanmoins, mentionner que de récentes études ont démontré que le récepteur CB2 était capable de moduler la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses centrales et périphériques (Mule *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2009), mais les auteurs de ces études ne présentent pas de mécanismes possibles.

Tel que démontré dans les paragraphes précédents, les récepteurs CB1 et CB2 possèdent une grande quantité de signaux intracellulaires distincts. La diversité de seconds messagers activés suite à la stimulation des récepteurs aux cannabinoïdes est augmentée par la capacité d'homohétérodimérisation du récepteur CB1. En outre, le fait que les récepteurs CB2 de différentes espèces aient souvent des réponses pharmacologiques différentes (Bingham *et al.*, 2007) accroît cette diversité. Il s'en suit que la résultante de la signalisation des récepteurs CB1 et CB2 peut être très différente malgré un couplage de ces derniers à la même famille de protéines G.

1.3- Dégradation des endocannabinoïdes

Comme la majorité des neurotransmetteurs, les eCBs sont transférés de l'espace extracellulaire vers l'intérieur la cellule pour arrêter leur

interaction avec les récepteurs aux cannabinoïdes. Les mécanismes et les protéines impliqués dans le transport de l'AEA et du 2-AG demeurent largement méconnus et controversés. Notamment, certains chercheurs proposent que ces lipides traversent les membranes par simple diffusion (Glaser *et al.*, 2003; Kaczocha *et al.*, 2006). D'autres soutiennent que le processus de récupération se fait par endocytose (Yates and Barker, 2009). Bien que l'on ne sache pas encore comment les eCBs reviennent dans la cellule, les mécanismes de dégradation sont bien connus. Ces molécules sont généralement dégradées par hydrolyse ou oxydation et les mécanismes qui régissent ces réactions sont décrits dans la section qui suit.

Une des enzymes responsables de la dégradation de l'AEA est l'enzyme Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH – Deutsch and Chin, 1993; Ueda *et al.*, 1995; Cravatt *et al.*, 1996; Ueda *et al.*, 1998; Cravatt *et al.*, 2001; Deutsch *et al.*, 2002; McKinney and Cravatt, 2005). Il existe deux isoformes de cette protéine FAAH1 et FAAH2 (Cravatt *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2006). Ces enzymes sont des protéines intégrales des membranes cytoplasmiques et endoplasmiques (Tsou *et al.*, 1998b; Gulyas *et al.*, 2004) et elles font partie de la famille d'enzymes appelée "amidase signature" (Chebrou *et al.*, 1996). Les deux isoformes de FAAH ont une distribution hétérogène. Il a été démontré que FAAH1 s'exprimait préférentiellement dans le cerveau, les testicules et l'intestin grêle alors que FAAH2 était davantage exprimée dans les tissus cardiaques (Wei *et al.*, 2006). Par ailleurs, FAAH2 ne se retrouve pas chez les rongeurs, contrairement à l'isoforme 1 (Wei *et al.*, 2006). L'enzyme FAAH est capable de dégrader les deux eCBs majeurs (Di Marzo, 2008) avec une préférence marquée pour l'AEA (Deutsch and Chin, 1993; Cravatt *et al.*, 1996; Goparaju *et al.*, 1998; Ueda *et al.*, 1998), notamment pour l'isoforme 1 (Wei *et al.*, 2006). La réaction chimique catalysée par cette enzyme est l'hydrolyse de l'AEA et les produits obtenus sont l'acide arachidonique et l'éthanolamine (Figure 1A - Deutsch and Chin, 1993; Desarnaud *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1995; Cravatt *et al.*, 1996).

Le 2-AG, pour sa part, est essentiellement hydrolysé par l'enzyme monoacylglycérol lipase (MAGL) (Dinh *et al.*, 2002a; Dinh *et al.*, 2002b). La réaction catalysée par cette enzyme engendre de l'acide arachidonique et du glycérol (Figure 1B - Karlsson *et al.*, 1997). L'enzyme MAGL est exprimée dans plusieurs organes, en particulier le système nerveux et l'inhibition de cette enzyme cause une augmentation de la concentration de 2-AG (Long *et al.*, 2009a; Long *et al.*, 2009b).

La seconde catégorie d'enzymes capables d'hydrolyser le 2-AG sont les enzymes appelées "serine hydrolase α - β -hydrolase domain 6" et "serine hydrolase α - β -hydrolase domain 12" (ABHD6 et ABHD12, respectivement). Ces enzymes sont également exprimées dans les neurones en culture (Marrs *et al.*, 2010) et dans le SNC (Schuett *et al.*, 2002; Blankman *et al.*, 2007), notamment dans la rétine pour l'enzyme ABHD6 (Hu *et al.*, 2010). La réaction catalysée par ces enzymes engendre les mêmes produits que celle provoquée par l'enzyme MAGL, soit de l'acide arachidonique et du glycérol (Figure 1B).

Bien que les réactions décrites ci-dessus soient les principales voies de dégradation des eCBs, ces derniers ne sont pas uniquement sujets à l'hydrolyse. Ils peuvent également être métabolisés par oxydation, notamment par les enzymes cyclooxygénase 2 (Hu *et al.*, 2008) et la lipooxygénase 12 et 15 (Veldhuis *et al.*, 2003).

1.4- Les fonctions physiologiques des récepteurs dans le SNC

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression des récepteurs CB1 et CB2 est très largement distribuée. Leur activation dans le SNC affecte un grand nombre de fonctions physiologiques. Une des propriétés fondamentales de ces récepteurs est la modulation de la transmission synaptique (voir pour revue détaillée Kano *et al.*, 2009). Cela a d'abord été établi pour le récepteur CB1. Aujourd'hui, plusieurs études rapportent une

fonction de modulation synaptique pour le récepteur CB2 (Onaivi *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2009).

La présence des récepteurs au niveau des éléments présynaptiques des neurones (excitateurs et inhibiteurs) leur permet de détecter les endocannabinoïdes libérés par les neurones post-synaptiques. L'activation rétrograde de récepteurs leur permet de moduler l'activité des canaux calciques et potassiques synaptiques et donc la relâche synaptique. Une des conséquences à court terme de l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes est une diminution de la relâche synaptique au niveau des neurones inhibiteurs et excitateurs qui les expriment (voir pour revue détaillée Demuth et Molleman, 2006 et Kano *et al.*, 2009). Cette fonction a été rapportée dans plusieurs régions du SNC notamment le néocortex, l'hippocampe, le cervelet, les ganglions de la base et la rétine.

L'administration expérimentale d'eCBs produit des effets à la fois pharmacologiques et comportementaux également associés à d'autres produits cannabimimétiques. Elle inclut notamment une action analgésique, hypothermique, une diminution de la mobilité. Au niveau neuronal, l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes module les fonctions cognitives, mnémoniques, anxiolytiques, motrices et perceptuelles ainsi que la division cellulaire. On rapporte également des effets au niveau gastrique, cardiaque, endocrinien, immunitaire/inflammatoire et métabolique (voir pour revue Svizenska *et al.*, 2008).

2- Le système endocannabinoïde et le développement

Le rôle des eCBs comme modulateurs de la transmission synaptique et de la plasticité neuronale est maintenant bien établi. Ce système de neurotransmission semble également affecter plusieurs processus développementaux. Ainsi, plusieurs éléments tels que l'expression et l'activité précoces du système eCB durant le développement ont poussé les

chercheurs à étudier le rôle de ce système dans le développement du SNC. Bien que certains aspects de ce rôle soient encore méconnus, plusieurs fonctions développementales semblent déjà émerger. Les parties qui suivent seront consacrées à la description du rôle des eCBs dans la prolifération, la migration, la spécification de l'identité et la différenciation cellulaire ainsi que l'établissement de connexions synaptiques.

Les eCBs sont présents durant le développement du système nerveux. Durant la période fœtale, l'AEA est exprimé, mais sa concentration est 1000 fois inférieure à celle du 2-AG (Fernandez-Ruiz *et al.*, 2000). De plus, le patron temporel de variations des deux eCBs est différent. Ainsi, alors que la concentration de l'AEA augmente progressivement jusqu'à l'âge adulte, le niveau de 2-AG observé durant la période fœtale est équivalent à celui observé chez l'adulte (Berrendero *et al.*, 1999). Bien que plusieurs études soient en accord sur la différence entre l'AEA et le 2-AG, les valeurs de concentration sont très variables, il est donc de rigueur de prendre ces données avec précaution (Buczynski and Parsons, 2010). Néanmoins, les données actuelles suggèrent que les deux eCBs (AEA et 2-AG) auraient tous deux un rôle à jouer dans les processus du développement.

2.1- Prolifération et spécification des cellules progénitrices neurales

La présence des ARNm du des récepteurs CB1 et CB2 commence à être détectée vers le 11^e jour de gestation (Buckley *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'expression du récepteur CB1 augmente progressivement dans tout le cerveau durant la période postnatale (McLaughlin and Abood, 1993; Rodriguez de Fonseca *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 2007). En outre, l'existence d'une signalisation eCB fonctionnelle, impliquant les deux récepteurs, dans les zones de prolifération neuronale du cerveau en développement et chez l'adulte a été démontrée par plusieurs auteurs (Galve-Roperh *et al.*, 2006; Harkany *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Harkany *et al.*, 2008a). En effet, les cellules progénitrices neurales sont aptes à synthétiser les ligands, les récepteurs CB1s ainsi que l'enzyme FAAH (Aguado *et al.*, 2005). De plus,

l'activation des récepteurs CB1 ou CB2 dans ces cellules favorise la division cellulaire et la génération de neurosphères (Aguado *et al.*, 2006; Molina-Holgado *et al.*, 2007; Trazzi *et al.*, 2010). Cet effet est aboli dans les cultures de cellules dont les gènes codant pour les protéines des récepteurs CB1 ou CB2 ont été mutés (*cnr1*^{-/-} ou *cnr2*^{-/-} - Aguado *et al.*, 2005; Palazuelos *et al.*, 2006). Par ailleurs, la division des cellules progénitrices est augmentée dans les cultures de cellules comportant une forte concentration d'AEA, notamment lorsque le gène codant pour FAAH a été supprimé (*faah*^{-/-} - Aguado *et al.*, 2005).

Les eCBs régulent également la première étape de la spécification des cellules progénitrices neurales. Ainsi, l'activation du récepteur CB1 au niveau des cellules progénitrices neurales les force à se différencier en une lignée de cellules gliales (Aguado *et al.*, 2006; Soltys *et al.*, 2010). Il a également été récemment démontré que le 2-AG pouvait promouvoir la différenciation des cellules progénitrices en oligodendrocytes, mais le récepteur responsable de cette action n'est pas encore déterminé (Gomez *et al.*, 2010).

Les effets de l'activation du récepteur CB1 sur la neurogenèse demeurent sujets à controverse. Ainsi, certains auteurs rapportent une diminution de la neurogenèse suite à l'activation ce récepteur (Rueda *et al.*, 2002) alors que d'autres rapportent l'effet contraire (Jiang *et al.*, 2005). Ces données et d'autres ont mené Harkany *et al.*, (2007) à conclure que les caractéristiques chimiques de l'agoniste du récepteur CB1 ainsi que le contexte physiologique dans lequel celui-ci intervient peuvent en quelque sorte déterminer l'ampleur de la genèse des neurones. Une toute récente étude semble soutenir cette idée. En effet, Soltys *et al.* (2010) ont démontré qu'un court traitement à l'AEA cause la différenciation des cellules progénitrices en cellules gliales mais si l'on maintient le traitement des cellules progénitrices à l'AEA durant une période prolongée (4-7 jours), celles-ci continuent à se différencier pour devenir des neurones.

Collectivement, ces données soutiennent l'idée qu'un système eCB fonctionnel module de manière active la division et la différenciation des cellules progénitrices neurales, voire même l'équilibre entre les populations neuronale et gliale.

2.2- La migration neuronale

Le rôle des eCBs dans la différenciation des cellules progénitrices neurales soulève la question de l'implication de ces ligands lipidiques dans d'autres aspects développementaux tels que la migration dont nous allons traiter dans les paragraphes qui suivent.

Les eCBs et leurs récepteurs jouent un rôle dans la migration neuronale, surtout dans le cas de neurones immatures. Ainsi Berghuis et al. (2005) ont démontré que les agonistes du récepteur CB1 provoquent la migration d'interneurones GABAergiques *in vitro*. Ces interneurones sont connus pour voyager sur des distances relativement longues pour peupler des couches spécifiques du cortex et de l'hippocampe, par exemple. Les eCBs contrôlent la migration en coopération avec le facteur neurotrophique BDNF (Berghuis *et al.*, 2005; Maison *et al.*, 2009), un élément important dans la régulation de la migration neuronale (Fukumitsu *et al.*, 2006). Une étude de Mulder et al (2008) rapporte aussi une implication du récepteur CB1 dans la migration et la fasciculation des neurones pyramidaux durant le développement.

Par ailleurs, cette fonction est en accord avec la localisation du récepteur CB1 dans la matière blanche, localisation rapportée uniquement pendant la période développementale (Romero *et al.*, 1997; Berrendero *et al.*, 1998; Berrendero *et al.*, 1999). De récentes données démontrent aussi une interaction entre le récepteur CB1 et la protéine d'adhésion L1, qui est impliquée dans plusieurs processus développementaux, notamment la migration cellulaire (Schmid and Maness, 2008). En effet, non seulement ces deux protéines s'expriment dans les mêmes structures au cours du

développement (Gomez *et al.*, 2003), mais il a été démontré que l'activation du récepteur CB1 peut moduler à la baisse la synthèse de la protéine L1 (Gomez *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008b), donc la migration cellulaire.

Le rôle du récepteur CB2 dans les processus de migration de cellules neuronales n'a pas encore été étudié. Néanmoins, il est clair que ce récepteur est capable de moduler la migration des cellules immunitaires telles que les microglies (Miller and Stella, 2008). Il reste donc à découvrir si ce récepteur est capable de moduler également la migration neuronale.

2.3- Guidage axonal et synaptogenèse

2.3.1- Le guidage axonal

L'une des caractéristiques premières d'un système nerveux est la capacité de ses éléments - les neurones - à communiquer entre eux. Cette communication se fait à travers une structure spécialisée, appelée synapse. Bien que de nombreux mécanismes permettant l'établissement de ces synapses soient connus, ils en restent encore beaucoup à découvrir. Pour établir leurs synapses, les axones voyagent sur des distances plus ou moins longues pour parvenir à leur(s) cible(s). Plusieurs éléments récemment découverts permettent de penser que les endocannabinoïdes sont impliqués dans les mécanismes de guidage axonal et de synaptogenèse.

Il a été démontré que les agonistes du récepteur CB1 abolissent la croissance des neurites dans les cultures d'interneurones GABAergiques embryonnaires (Berghuis *et al.*, 2005) alors qu'ils favorisent la croissance axonale des neurones pyramidaux embryonnaires (Mulder *et al.*, 2008). Les résultats de ces études démontrent que les endocannabinoïdes modulent la croissance des axones des neurones différemment selon le type neuronal. De plus, la présence atypique du récepteur CB1 dans la matière blanche du cerveau antérieur durant le développement et la superposition de cette présence avec un marqueur de cônes de croissance – la structure

spécialisée qui permet le guidage axonal – confirme l'idée d'une implication des eCBs dans le guidage axonal (Gomez *et al.*, 2008b).

Enfin, d'importants déficits de fasciculation sont retrouvés lorsque l'activité du récepteur CB1 est bloquée (Mulder *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010). En particulier, Wu *et al.*, (2010) démontrent des anomalies de fasciculation dans les connexions corticothalamiques et thalamocorticales qui arrivent ou émergent de l'aire somatosensorielle primaire de la souris *cnr1*^{-/-}, mais également chez des souris dont le gène *cnr1* est muté uniquement dans les neurones glutamatergiques. Ces travaux permettent de conclure que le récepteur CB1 joue un rôle important dans la fasciculation axonale et dans le guidage axonal. Là encore, le rôle du récepteur CB1 est maintenant assez bien décrit, mais aucune donnée n'a encore été publiée sur le récepteur CB2.

2.3.2- La synaptogenèse

Pour l'instant, une seule étude a directement évalué le rôle du récepteur CB1 dans la synaptogenèse. Kim et Thayer (2001) ont avancé que les agonistes du récepteur CB1 inhibent la formation de synapses dans les cultures de neurones de l'hippocampe. Par ailleurs, de récentes études démontrent une organisation synaptique anormale dans l'aire somatosensorielle primaire lorsqu'il y a interférence avec l'activation du récepteur CB1 pendant la période critique de développement de la couche corticale 2/3 (Li *et al.*, 2009).

2.4- Les endocannabinoïdes et le système visuel

Le rôle des eCBs dans la fonction visuelle est assez peu étudié. La majorité des études fonctionnelles qui existent portent sur la rétine. Il existe néanmoins quelques éléments dans la littérature qui permettent de penser que ce système de neuromodulation peut avoir un rôle dans la fonction visuelle. Nous allons donc brièvement présenter le système visuel puis les fonctions connues des endocannabinoïdes dans ce système.

La rétine est le point d'entrée de l'information visuelle. C'est une structure laminaire à l'anatomie complexe qui sera discutée en détails dans la section 3 de la présente introduction. Les cellules ganglionnaires forment la seule classe de neurones rétiniens projetant vers le reste du système nerveux central. Les axones des cellules ganglionnaires quittent la rétine par le nerf optique, décussent – dans une proportion qui varie selon les espèces – au niveau du chiasme optique, avant d'atteindre leurs cibles primaires : le corps genouillé latéral (CGL) et le collicule supérieur (CS). Le CGL est un noyau thalamique de premier ordre qui effectue une analyse de bas niveau de l'information visuelle avant de la transférer au cortex visuel primaire. Le CS quant à lui, est une structure multimodale qui se caractérise par une très grande sensibilité au mouvement qui est impliqué dans le contrôle visuo-moteur.

L'aire visuelle primaire est la première aire corticale à recevoir l'information visuelle; elle reçoit les afférences du CGL. Cette aire se caractérise par une organisation rétinopique extrêmement précise. Chez les rongeurs, cette organisation a d'abord été démontrée par électrophysiologie dans les années 70-80 (Drager, 1975; Wagor *et al.*, 1980; Espinoza, 1983; Espinoza and Thomas, 1983), puis confirmée par des méthodes complémentaires comme l'imagerie optique (Schuett *et al.*, 2002; Gias *et al.*, 2005). Cette aire contient donc une représentation spatiale du champ visuel contralatéral, avec une petite portion du cortex qui reçoit des projections des deux yeux. Cette portion binoculaire correspond à une région de 30-40 degrés de champ visuel central (Wagor *et al.*, 1980).

Fonctionnellement, dans le cortex visuel primaire des rongeurs, une importante proportion de neurones répondent à des stimuli orientés et en mouvement (Drager, 1975; Mangini and Pearlman, 1980; Girman *et al.*, 1999). Dans cette structure, il existe également des neurones avec des champs récepteurs non-orientés caractérisés par un centre ON (qui

lorsqu'éclairés causent la dépolarisation de la cellule), OFF (qui lorsqu'éclairés causent l'hyperpolarisation de la cellule) ou ON-OFF, qui peuvent répondre ou pas à des stimuli en mouvement.

Il existe assez peu de données sur l'effet du cannabis sur la perception visuelle. Les premières études effectuées chez l'humain (datant de la fin des années 1960) combinaient le cannabis et l'alcool, ce qui rend difficile l'évaluation des conséquences provenant de l'alcool de celles dues au cannabis. Néanmoins, plusieurs études rapportent les effets de la consommation de cannabis sur la vision. Notamment, il a été rapporté que le temps de rétablissement après un éblouissement pouvait être prolongé par la prise de THC (Adams *et al.*, 1978). La consommation aiguë de marijuana peut également causer une réduction de l'acuité visuelle, altérer la vision des couleurs et augmenter la photosensibilité (Kiplinger *et al.*, 1971; Dawson *et al.*, 1977; Russo *et al.*, 2004). Certains auteurs ont aussi démontré des effets à court et long termes sur certains paramètres centraux de la vision comme la perception de la profondeur (Emrich *et al.*, 1991; Leweke *et al.*, 1999; Semple *et al.*, 2003 et voir pour revue détaillée Yazulla, 2008).

De très récentes études démontrent un effet de l'activation ou de l'inhibition du récepteur CB1 sur la plasticité durant le développement dans l'aire visuelle primaire (V1) chez la souris et le rat (Sjostrom *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008a) (Jiang *et al.*, 2010a; Jiang *et al.*, 2010b). Durant la période critique, des mécanismes de dépression à long terme (LTD) sont responsables de modeler les arbres dendritiques des neurones de l'aire V1. Le récepteur CB1 semble jouer un rôle dans ces mécanismes dans les couches 2/3, mais pas 4 du cortex visuel primaire de la souris (Sjostrom *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008a). Il a également été démontré que le récepteur CB1 modulait la maturation des réseaux GABAergiques des couches 2/3 par un mécanisme de LTD

dans l'aire visuelle primaire de la souris (Jiang *et al.*, 2010a; Jiang *et al.*, 2010b).

Bien que le rôle du récepteur CB1 dans le fonctionnement de V1 ou de la perception chez l'adulte n'a pas encore été étudié directement, ces données démontrent que ce récepteur est impliqué dans le développement normal de cette région. Par ailleurs, plusieurs études démontrent la présence de ce récepteur dans une autre structure du système visuel, la rétine. Avant de présenter la distribution et le rôle des endocannabinoides dans la rétine, nous allons brièvement présenter la rétine et son développement.

3- La rétine

La rétine est un modèle intéressant et accessible pour l'étude de la neurotransmission adulte, mais également du développement neuronal. Cette structure présente l'avantage de contenir six types de cellules neuronales et un type de cellule gliale majeur, organisés en trois couches cellulaires et deux couches synaptiques. Bien que la microcircuiterie de la rétine soit assez complexe, il existe une littérature abondante et très détaillée qui permette d'avoir une très bonne compréhension de la dite circuiterie. Pour ce qui est du développement, la genèse des différents types cellulaires suit un patron bien connu qui semble être commun à plusieurs espèces. Chez le rongeur, le développement de la rétine a lieu en partie durant la période postnatale. Jusqu'à très récemment, peu d'études existaient sur la synaptogenèse de la rétine du fait de la difficulté à obtenir des marquages à la fois spécifiques et précoces.

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps, la rétine, notamment les types cellulaires qui la composent et leur rôle dans la fonction rétinienne. Dans un second temps, nous détaillerons le

développement de la rétine et les mécanismes qui le régissent. Enfin, nous examinerons le rôle du système endocannabinoïde dans la rétine.

3.1- La rétine adulte

La rétine est une structure constituée de trois couches cellulaires et deux couches synaptiques. Il s'agit d'une part, des couches nucléaires interne et externe (INL, ONL) et de la couche des cellules ganglionnaires (GCL) et d'autre part, des couches plexiformes interne et externe (IPL et OPL). Les sept principaux types cellulaires se répartissent dans ces couches selon le même schéma chez différentes espèces animales. Un exemple de rétine dont les noyaux sont marqués est présenté dans la figure 2.

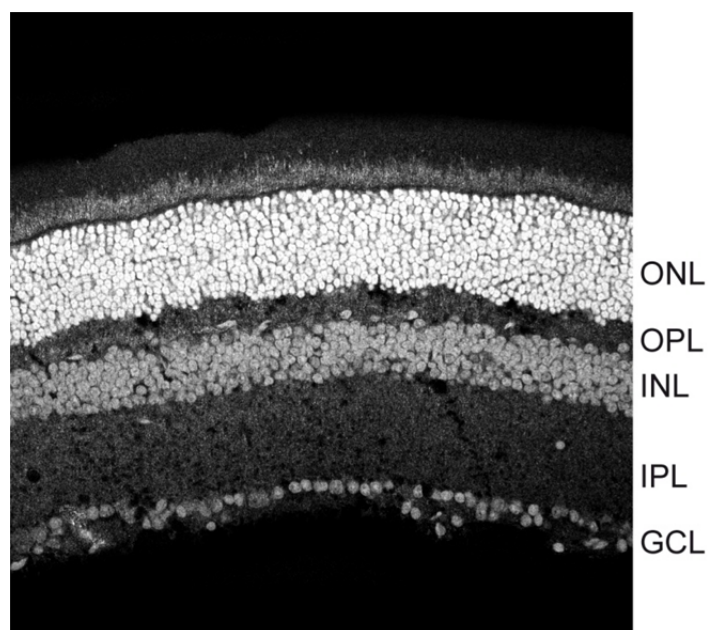


Figure 2 : Marquage histochimique nucléaire de la rétine de souris.

Marquage histochimique nucléaire au Sytox Green d'une rétine. ONL = couche nucléaire externe, OPL = couche plexiforme externe, INL = couche nucléaire interne, IPL = couche plexiforme interne, GCL = couche des cellules ganglionnaires. Barre d'échelle = 100 μ m.

3.1.1- Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont le point d'entrée de l'information visuelle. Ils sont constitués de deux classes de cellules spécialisées, les bâtonnets et les cônes, dont le rôle est de transformer l'influx lumineux en influx électrique. Les bâtonnets sont dédiés à la vision dans des conditions de faible luminosité. Ils sont extrêmement sensibles et peuvent réagir à une activation aussi faible qu'un seul photon. Les cônes, quant à eux, sont dédiés à la vision de jour. Ils sont beaucoup moins sensibles que les bâtonnets mais présentent une meilleure résolution spatiale et temporelle.

Les espèces animales nocturnes, telles le rat et la souris, ont entre 0.5 et 3% de cônes dans leur rétine, les espèces crépusculaires et arythmiques en ont entre 2 et 10%. Enfin, chez les espèces diurnes, telles que les primates, la proportion de cônes est extrêmement variable, allant de 8 à 95%, cependant les cas présentant un pourcentage de cônes supérieur à celui des bâtonnets soient rares.

Les longueurs d'ondes détectées (intervalle spectral de détection) par un animal dépendent du type de pigments visuels présents dans les segments externes des photorécepteurs, lesquels peuvent avoir des propriétés d'absorption spectrale différentes. Le seuil et l'amplitude de la réponse à la lumière sont également influencés par la concentration du pigment visuel dans la cellule photoréceptrice. Par ailleurs, la distribution spatiale, appelée mosaïque rétinienne des photorécepteurs peut contribuer à la vision des couleurs et à la résolution spatiale (Rodieck, 1998). Ces attributs varient considérablement d'une espèce à l'autre. Des facteurs comme le type et le niveau d'expression des pigments, le nombre de photorécepteurs, et leur organisation spatiale semblent avoir évolué différemment selon les espèces, de façon à permettre à celles-ci une meilleure adaptation à leur environnement visuel (Jacobs, 1993). Par exemple, dans la rétine de la souris, l'un des modèles utilisés dans la présente thèse, on trouve 3% de cônes (Jeon *et al.*, 1998). Chez le rat, qui est notre modèle principal, on

trouve 1% de cônes (La Vail, 1976). Chez ces deux espèces, les cônes sont distribués sur toute la surface de rétine de façon homogène. Szél et son équipe de recherche ont établi l'existence de deux types de pigments dans les cônes des souris (Szel *et al.*, 1992) et des rats (Szel and Rohlich, 1992). Il s'agit de l'opsine M qui absorbe les longueurs d'ondes moyennes (autour de 508nm) et l'opsine S qui absorbe les longueurs d'ondes courtes (autour de 360nm). Les cônes contiennent les deux pigments avec une concentration d'opsine M qui augmente progressivement: les cônes dans la rétine supérieure expriment davantage d'opsine M que ceux qui sont situés dans la rétine ventrale (Applebury *et al.*, 2000).

Les deux types de photorécepteurs ont des structures morphologiques relativement similaires. Tous deux sont formés de quatre compartiments fonctionnels : le segment externe, le segment interne, le corps cellulaire et la terminaison synaptique. Chacun de ces compartiments est schématisé dans la figure 3.

Le segment externe est composé d'un empilement de disques qui contiennent une très grande concentration de pigments visuels. Chez les rongeurs, ces pigments sont la rhodopsine pour les bâtonnets, les opsines M et S pour les cônes. Dans les bâtonnets, les disques sont indépendants de la membrane cellulaire, alors qu'ils y sont enchâssés dans les cônes. Le segment interne contient le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. De nombreuses mitochondries sont aussi présentes tout près du segment externe, afin de répondre au besoin métabolique de cette structure. Le corps cellulaire contient essentiellement le noyau de la cellule. La terminaison synaptique est la structure en charge de la transmission de l'information lumineuse aux neurones de second ordre, à savoir les cellules bipolaires et horizontales. (Fu and Yau, 2007).

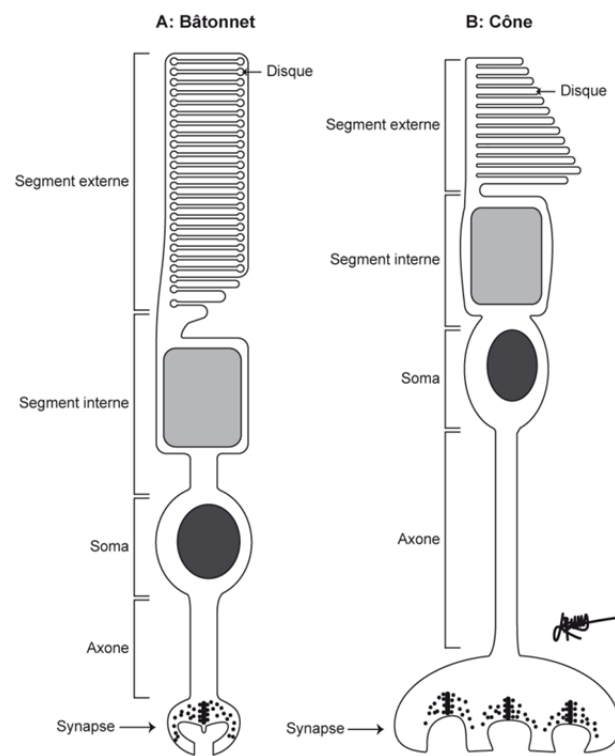


Figure 3 : Différents compartiments cellulaires des photorécepteurs.

Dans l'obscurité, il y a un courant entrant continu appelé courant d'obscurité ("the dark current") qui dépolarise la cellule photoréceptrice et qui maintient une relâche constante de glutamate au niveau de la synapse. La lumière cause la fermeture du canal qui permet ce courant, menant à une hyperpolarisation de la cellule et à l'arrêt de la relâche synaptique.

3.1.2- Cellules bipolaires

Les cellules bipolaires sont des cellules de second ordre qui recueillent l'information des photorécepteurs dans l'OPL et la transmettent aux cellules ganglionnaires dans l'IPL. Cette population de cellules est hétérogène et, selon les critères choisis, le nombre de types de cellules bipolaires varie. En effet, si l'on se base sur des critères fonctionnels, on retrouve deux groupes de cellules bipolaires ON et OFF (Famiglietti and Kolb, 1976). Ces deux groupes de cellules répondent différemment à la lumière : les cellules bipolaires ON en se dépolarisant et les OFF en s'hyperpolarisant, créant ainsi des canaux parallèles de transfert d'information. Cette dichotomie existe grâce à la présence de deux types de récepteurs glutamatergiques dans les dendrites des cellules bipolaires. Les ON expriment des récepteurs métabotropiques mGluR6 dans leur dendrites. Ce récepteur permet d'inverser le signe de la réponse causée par le glutamate, qui devient alors une hyperpolarisation (Slaughter and Miller, 1985; Nomura *et al.*, 1994; Koyasu *et al.*, 2008). Les OFF, quant à elles, expriment des récepteurs ionotropiques AMPA/kainate GluR, qui conservent le signe de la réponse causée par le glutamate (DeVries, 2000). Les synapses de ces cellules se stratifient à des niveaux différents dans l'IPL. Les OFF dans la strate a (la moitié supérieure de l'IPL) et les ON dans la strate b (la moitié inférieure de l'IPL).

Selon le critère du type de cellule pré-synaptique, il existe deux autres groupes de cellules bipolaires : les cellules bipolaires liées aux bâtonnets et celles associées aux cônes (voir pour revue Tom Dieck and Brandstatter, 2006). Selon les critères morphologiques, les chercheurs ont

dénombré entre dix et douze types de cellules bipolaires selon les espèces animales (Haverkamp *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2004; Wassle *et al.*, 2009 et voir pour revue récente Strettoi *et al.*, 2010). Il est à noter que bien que les cônes soient nettement moins nombreux que les bâtonnets, la vaste majorité des sous-types des cellules bipolaires leur sont associées (neuf types sur dix chez le rat et la souris). Dans la voie des bâtonnets, la sensibilité à la lumière est la caractéristique la plus importante. Il existe donc une convergence de plusieurs bâtonnets sur une seule cellule bipolaire liée aux bâtonnets. Par ce mécanisme, la sensibilité d'une cellule bipolaire liée aux bâtonnets peut être jusqu'à vingt fois supérieure à celle d'un bâtonnet. À contrario, chaque cône fait synapse avec une cellule bipolaire liée aux cônes de chaque sous-type formant ainsi des canaux parallèles de transmission et d'intégration de l'information (Wassle *et al.*, 2009).

3.1.3- Cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires sont situées dans la monocouche nucléaire la plus superficielle de la rétine (voir figure 2). Elles reçoivent l'information de deux partenaires synaptiques : les cellules bipolaires et certaines cellules amacrines. Les cellules ganglionnaires sont responsables de la transmission de l'information visuelle aux structures sous-corticales, notamment le CGL et CS. Ces cellules transfèrent l'information mais elles effectuent également une certaine analyse de cette information qu'elles envoient le long de parallèles

Ces cellules varient considérablement en termes de taille, de connectivité et de réponses à une stimulation visuelle. Fonctionnellement, le champ récepteur des cellules ganglionnaires est divisé en deux régions : le centre et la périphérie. La réponse à la lumière de ces deux régions est opposée. Par exemple, l'illumination du centre cause la dépolarisation de la cellule (appelée centre ON), alors que l'illumination de la périphérie de cette même cellule cause son hypolarisation (appelée périphérie OFF). Cette organisation signifie que la réponse optimale de cette cellule est causée par

une illumination focale du centre du champ récepteur, qui laisse sa périphérie dans le noir. Les cellules ganglionnaires peuvent avoir une organisation opposée c'est-à-dire un centre OFF et une périphérie ON. Les cellules ganglionnaires à centre ON reçoivent leurs afférences des cellules bipolaires ON, alors que les cellules ganglionnaires OFF reçoivent les leurs des cellules bipolaires OFF (Werblin and Dowling, 1969). La périphérie est généralement attribuée aux afférences inhibitrices des cellules horizontales et amacrines (Werblin and Dowling, 1969; Davenport *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2008).

Selon des critères morphologiques, il existe entre 15 et 20 types de cellules ganglionnaires. Chez les rongeurs, cette classification est la plus élaborée. Les études les plus récentes rapportent jusqu'à 22 sous-types de cellules ganglionnaires (Sun *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2005; Coombs *et al.*, 2006; Volgyi *et al.*, 2009).

Outre la voie excitatrice verticale dont nous avons décrit les trois acteurs (photorécepteurs, cellules bipolaires, cellules ganglionnaires), il existe dans la rétine deux étapes d'inhibition latérale.

3.1.4- Les neurones modulateurs

Dans la rétine, il existe deux classes de neurones inhibiteurs : les cellules horizontales et amacrines. Les cellules horizontales modulent le transfert de l'information entre les cônes et cellules bipolaires en agissant au niveau du pédicule du premier et des dendrites des secondes. Les cellules amacrines, quant à elles, modulent le transfert de l'information entre les cellules bipolaires et ganglionnaires en agissant sur les terminaisons synaptiques des premières et les dendrites des secondes.

3.1.4.1- Cellules horizontales

Un élément important de la première synapse excitatrice de la rétine est la présence d'une voie de rétroaction inhibitrice provenant des cellules horizontales. Ces dernières sont situées juste en dessous de la couche plexiforme externe, avec des dendrites qui s'étendent latéralement dans la

couche synaptique, de sorte que chaque cellule horizontale reçoit des afférences de plusieurs photorécepteurs. Chez la majorité des vertébrés, il existe au moins deux types de cellules horizontales, l'exception étant les rongeurs (Peichl and Gonzalez-Soriano, 1994; Oguni *et al.*, 1998). Chez les rongeurs, le type B de cellule horizontale est celui que l'on retrouve, avec les dendrites se connectant aux cônes, alors que l'axone est connecté aux bâtonnets (Suzuki and Pinto, 1986; Peichl and Gonzalez-Soriano, 1994; Oguni *et al.*, 1998)

Il est également important de mentionner que ces cellules sont couplées entre elles par des jonctions électriques ("gap junctions"), de sorte que chaque cellule horizontale reçoit des afférences qui s'étendent au-delà de son propre arbre dendritique (Bloomfield *et al.*, 1995). Ces cellules deviennent alors responsables de faire la moyenne du signal, avant de le renvoyer aux cônes et aux cellules bipolaires.

Chez les mammifères, l'augmentation de la luminosité de l'environnement cause une relâche accrue de dopamine (Godley and Wurtman, 1988), qui par un mécanisme dépendant de l'AMPc diminue le couplage des cellules horizontales (Xin and Bloomfield, 1999; He *et al.*, 2000). Par ce mécanisme, les cellules horizontales jouent un rôle important dans l'adaptation rétinienne à la lumière, car grâce à leur rétroaction ces cellules modulent la sensibilité des cônes et forment les champs récepteurs des cellules bipolaires et ganglionnaires.

3.1.4.2- Cellules amacrines

Le deuxième type de cellules modulatrices dans la rétine sont les cellules amacrines. Elles forment une population extrêmement hétérogène qui joue un rôle important dans l'analyse de l'information visuelle dans la rétine interne en modulant les paramètres spatiaux et temporels du transfert de l'information visuelle (pour revues détaillées voir MacNeil and Masland, 1998 et Lukasiewicz, 2005). Certaines cellules amacrines ont des fonctions bien connues notamment les amacrines All qui forment le lien permettant le

passage de l'information visuelle aux cellules ganglionnaires en condition de faible luminosité.

Les cellules amacrines sont également très hétérogènes en termes de morphologie (voir pour revues détaillées Masland, 1988 et Wassle and Boycott, 1991). Chez la souris, par exemple, les cellules amacrines constituent 39% du nombre total de cellules (Jeon *et al.*, 1998). Les somas des cellules amacrines occupent la moitié la plus profonde de l'INL, mais peuvent également se retrouver dans la couche des cellules ganglionnaires, elles sont alors appelées "cellules amacrines déplacées" (Perry and Walker, 1980). Toutes les cellules amacrines reçoivent et forment leurs synapses dans la couche plexiforme interne. Ces cellules ont également une composition neurochimique complexe. En effet, en plus d'un neurotransmetteur inhibiteur (glycine ou GABA), elles sont souvent également capables de sécréter un neuropeptide comme l'acétylcholine ou la dopamine (voir pour revue détaillée Wassle and Boycott, 1991).

3.1.5- Cellules gliales de la rétine

La rétine contient en plus de la microglie, deux types de macroglies : les astrocytes et les cellules de Müller. Les astrocytes sont produits dans le cerveau et migrent à travers le nerf optique dans la couche des fibres de cellules ganglionnaires (Watanabe and Raff, 1988 et voir pour revue Huxlin *et al.*, 1992). Chez l'adulte, ces cellules sont confinées autour des vaisseaux sanguins dans les rétines vascularisées et dans la couche des fibres de cellules ganglionnaires (Watanabe and Raff, 1988; Hollander *et al.*, 1991). Les cellules de Müller quant à elles, sont produites dans à partir des cellules progénitrices de la rétine. Elles s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine et forment le type le plus important de cellules gliales dans la rétine. Ces macroglies sont dérivés du système immunitaire et forment des éléments très importants pour la défense immunitaire de la rétine (voir pour revue Bringmann *et al.*, 2006). Les cellules de Müller sont particulièrement importantes car en plus d'être en contact avec la quasi-totalité, voire la

totalité, des neurones rétiniens, il existe des échanges permanents entre ces cellules et les neurones de la rétine. Notamment, ces cellules fournissent un soutien trophique aux neurones rétiniens (de Melo Reis *et al.*, 2008), elles sont également en charge de l'élimination des déchets métaboliques de la rétine. Par ailleurs, ces cellules jouent un rôle crucial dans le maintien de la barrière hématorétinienne et la régulation du flot sanguin (voir pour revue Bringmann *et al.*, 2006 et 2009). Un autre rôle important des cellules de Müller est le maintien de l'homéostasie de la rétine, ces cellules sont particulièrement bien équipées pour contrôler de la concentration des ions potassiques qui sont relâchés massivement dans le milieu extracellulaire par les neurones (Bringmann *et al.*, 2000).

Les cellules Müller sont capables de moduler l'excitabilité des neurones rétiniens en contrôlant le recyclage des neurotransmetteurs et la disponibilité de leurs précurseurs (pour revue voir Newman, 2004; de Melo Reis *et al.*, 2008 et Bringmann *et al.*, 2009).

3.2- La circuiterie de la rétine du rongeur

Bien que les grands groupes cellulaires de la rétine soient relativement simples, les types et surtout le nombre d'interactions qui les unissent font de la rétine une structure excessivement complexe. Étant donné la complexité de la question, nous allons nous concentrer sur les grandes voies connues.

Chez les mammifères, les bâtonnets et les cônes sont le point de départ de deux voies d'analyse. Les bâtonnets sont responsables de la vision en condition de faible luminosité (vision scotopique) alors que les cônes répondent à des conditions de luminosité plus intenses (vision photopique). Les cônes sont également responsables de la perception de couleur. Les bâtonnets et les cônes font synapse avec les cellules bipolaires au niveau de l'OPL. Ces dernières sont alors responsables de transférer l'information directement ou indirectement aux cellules ganglionnaires. La transmission du

signal a été décrite par plusieurs auteurs, notamment par Wässle (2004) et chez la souris par Chalupa and Williams (2008). Les concepts présentés dans ces textes seront donc résumés dans les paragraphes qui suivent.

3.2.1- Transmission du signal des bâtonnets

Dans le noir, les bâtonnets relâchent du glutamate, et cette action est diminuée par la lumière. L'élément présynaptique, formé par la sphérule du bâtonnet, est généralement en apposition avec deux dendrites de cellules horizontales et une à trois dendrites de cellules bipolaires chez presque tous les mammifères. Chez les rongeurs, les dendrites des cellules horizontales sont en contact uniquement avec les cônes (Suzuki and Pinto, 1986; Peichl and Gonzalez-Soriano, 1994; Oguni et al., 1998). Chaque cellule bipolaire liée aux bâtonnets est en contact avec 20 à 80 sphérules. Les terminaisons synaptiques des cellules bipolaires liées aux bâtonnets sont dans l'IPL, mais pas directement en contact avec les cellules ganglionnaires. En effet, ces cellules bipolaires forment des synapses avec les cellules amacrines de type All, qui sont alors dépolarisées à la lumière. Celles-ci intègrent l'information de plusieurs CBbs, et la transfèrent aux terminaux des cellules bipolaires ON et OFF associées aux cônes grâce à des synapses électriques. Enfin, les cellules bipolaires liées aux cônes transfèrent l'information aux cellules ganglionnaires ON et OFF. Ces voies sont représentées dans la figure 4 sous les appellations ON1 et OFF1.

Un second chemin de signalisation a été établi fonctionnellement chez les primates et anatomiquement chez le rongeur. Il semblerait que le signal des bâtonnets emprunte la voie des cônes par le biais des jonctions électriques présentes entre les deux types de photorécepteurs (voir voies ON2 et OFF2 dans figure 4).

Un troisième chemin de signalisation implique le passage par un type de cellule bipolaire OFF associée aux cônes (type 4) qui fait synapse à la fois avec les cônes et les bâtonnets (voir voie OFF3 dans figure 4).

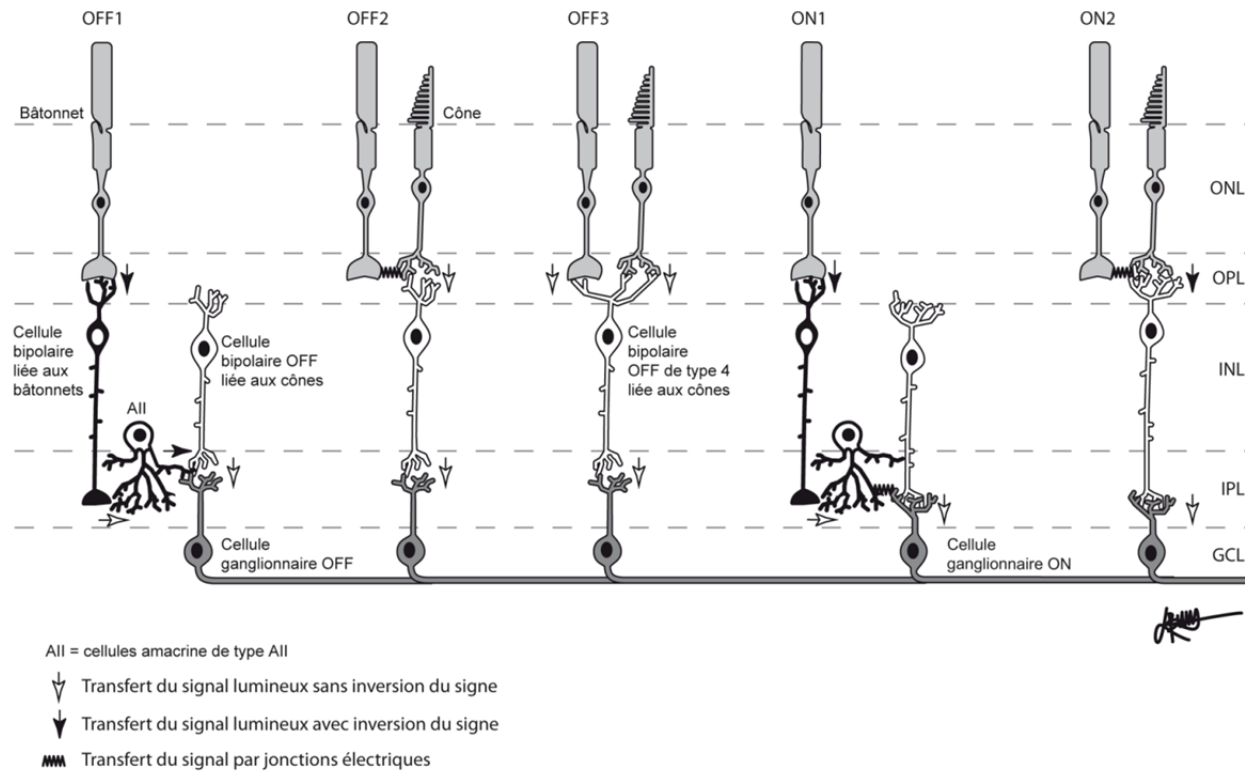


Figure 4 : Représentation des voies de transmission OFF et ON des bâtonnets.

Figure adaptée de Wassle et al., (2004)

3.2.2- Transmission du signal des cônes

Comme les bâtonnets, les cônes répondent à la lumière par une hyperpolarisation gradée et une diminution de la relâche glutamatergique au niveau de leur pédicule. Celui-ci peut être considéré comme une des structures synaptiques les plus complexes du SNC, car il peut interagir avec un maximum de 500 éléments postsynaptiques. En effet, un pédicule est en contact avec huit types de cellules bipolaires, en plus d'un ou de plusieurs types de cellules horizontales, selon les animaux. Les cellules horizontales et les cellules bipolaires OFF sont hyperpolarisées par la lumière, alors que les cellules bipolaires ON sont dépolarisées. Les chemins de signalisation constitués par les cellules bipolaires peuvent donc être regroupés en deux grandes catégories : ON et OFF. Les cellules ON répondent à une augmentation de la lumière et font synapse avec les cellules ganglionnaires ON dans la partie inférieure de l'IPL. Les cellules bipolaires OFF réagissent à une diminution lumineuse et font synapse avec les cellules ganglionnaires OFF dans la partie supérieure de l'IPL.

4- Développement et maturation de la rétine du rat

L'œil se développe à partir d'une excroissance du tube neural, qui forme d'abord une vésicule optique. Cette vésicule est constituée de deux monocouches cellulaires au départ, l'épithélium pigmenté à l'extérieur et le neuroépithélium rétinien à l'intérieur. Dans une première phase, les deux couches prolifèrent, ce qui entraîne une croissance rapide de la vésicule optique. Le neuroépithélium rétinien est constitué, à cette étape, de cellules progénitrices, des cellules ovales, ancrées aux membranes basale (la membrane limitante interne) et apicale (le réticulum pigmenté) par des filaments le long desquels le corps cellulaire peut migrer.

Durant le développement rétinien, les changements dans les phases du cycle cellulaire des cellules progénitrices et des nouvelles cellules post-mitotiques

coïncident avec une oscillation de l'emplacement du noyau entre les membranes apicale et basale. Ceci constitue la migration intercinétique du noyau ("interkinetic nuclear migration").

Dans la phase M du cycle, le noyau est positionné au niveau de la surface apicale. Au cours de cette phase, les cellules progénitrices peuvent se diviser de façon symétrique ou asymétrique. La division symétrique donne naissance à deux cellules filles de mêmes types, soit deux cellules mitotiques ou deux neurones identique. Par la suite, dans les phases G1 et S, le noyau de ces cellules mitotiques se déplacent vers des localisations davantage basales avant de remonter durant la phase G2 vers la surface apicale pour une nouvelle division (figure 5). La division asymétrique génère deux cellules filles de types différent.

Lorsque les cellules générées qui quittent le cycle cellulaire pour se différencier, elles migrent par translocation nucléaire vers leur positions finales (voir pour revue Baye and Link 2008).

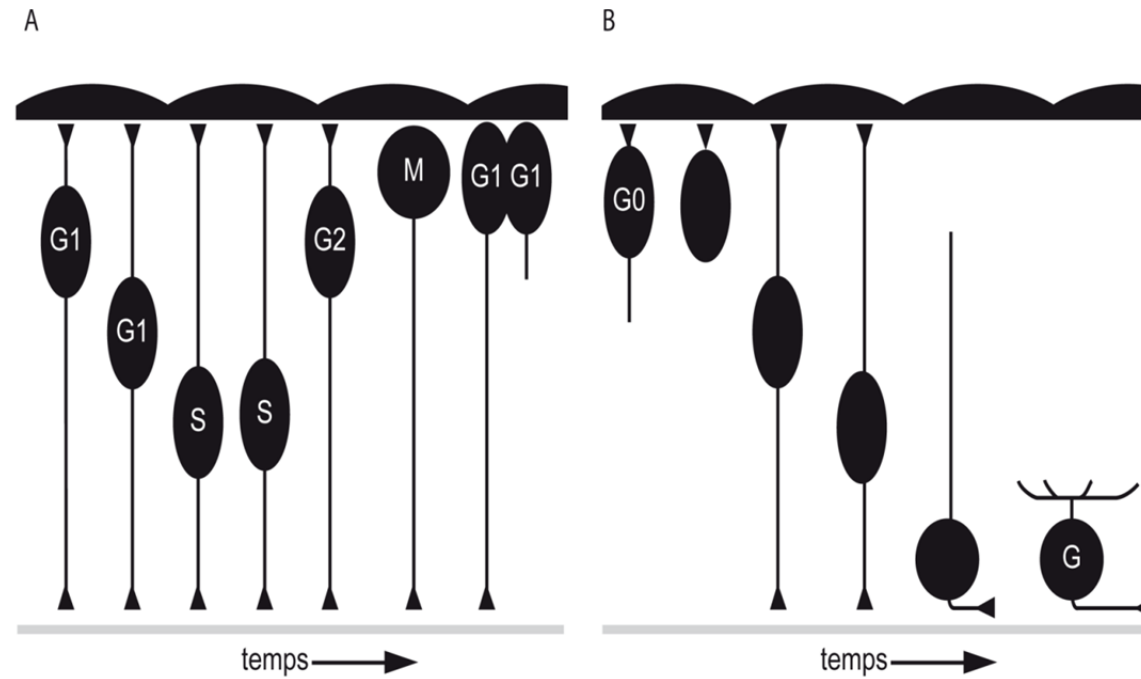


Figure 5 : Représentation de la migration intercinétique du noyau.

A : Migration intercinétique du noyau des cellules progénitrice , B : Migration intercinétique du noyau suite à une division en neurogénique qui donne une cellule progénitrice et une cellule ganglionnaire (G). Figure adaptée de revue de Baye and Link (2008).

4.1- L'organisation temporelle de la rétino-genèse

Le patron temporel selon lequel les cellules sont générées se divise en trois étapes. La première étape, "ramp-up", commence chez le rat au jour embryonnaire 10 (jour du début des naissances cellulaires) pour durer environ cinq jours. Au cours de cette étape, les premiers 5% de la population cellulaire à une excentricité donnée (centrale ou périphérique) sont créés en deux jours environ (Rapaport *et al.*, 2004). Il existe un décalage d'environ deux à trois jours entre le développement des rétines centrale et périphérique. Il faut cinq jours pour atteindre 5% de la population cellulaire totale de la rétine (Rapaport *et al.*, 2004). La majorité de la population cellulaire (90% des cellules) est produite pendant la deuxième étape. Chez le rat, cette étape commence généralement au jour embryonnaire (E) 15 et se termine au jour postnatal (P) 6 (Rapaport *et al.*, 2004). Durant cette phase, la vitesse de production cellulaire augmente exponentiellement : 50% des cellules sont générées entre P0 et P2. La dernière portion de cellules (5%) est produite durant la troisième étape, qui commence chez le rat à P6 et se termine à P13 (Rapaport *et al.*, 2004). Bien que l'échelle de temps varie d'une espèce à l'autre, le patron temporel adopté par ce processus est le même chez le primate (La Vail *et al.*, 1991; Rapaport *et al.*, 1996) et le rat (voir figure 6 - Rapaport *et al.*, 2004).

La rétino-genèse s'effectue dans un sens centrifuge puisque la rétine centrale présente une avance de deux à trois jours sur la rétine périphérique des rongeurs (voir figure 6 - Young, 1985b; Young, 1985a; Rapaport *et al.*, 2004; Young, 1985b; Young, 1985a).

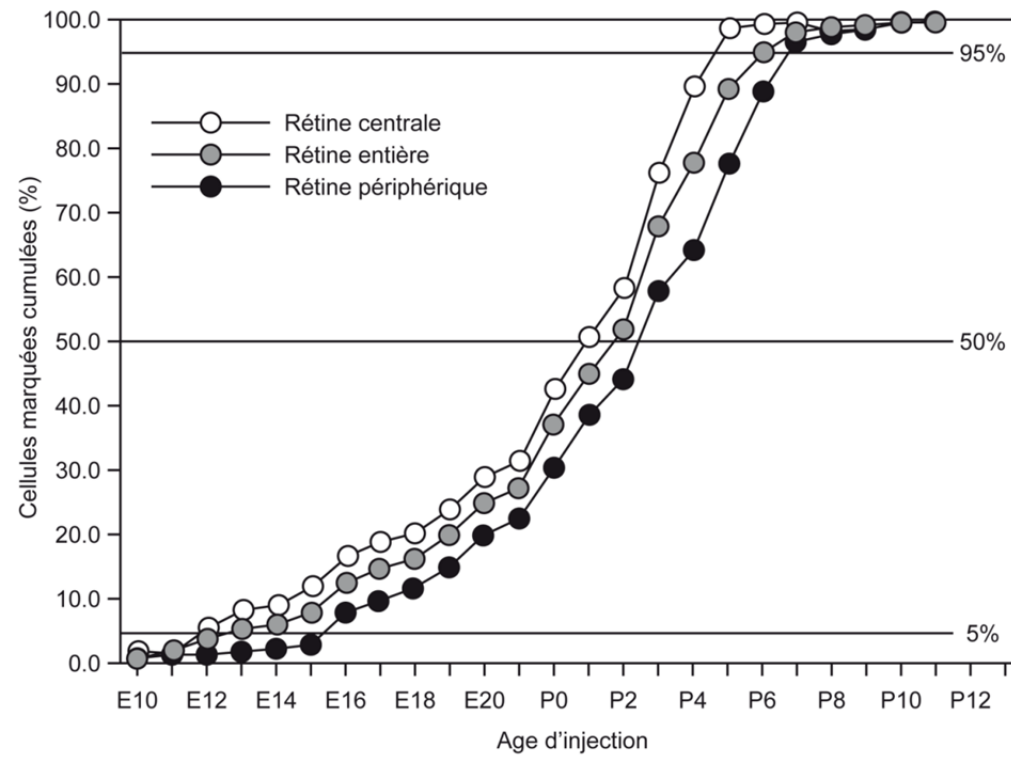


Figure 6 : Le patron temporel du développement de la rétine chez le rat.

Le développement de la rétine centrale est deux à trois jours en avance sur celui de la rétine périphérique.

Figure adaptée de Rapaport, et al., (2004).

Rapaport *et al*, (2004) décrivent de façon détaillée l'ordre de production des différents types de cellules rétiniennes chez le rat (figure 7). Ils distinguent deux groupes, contenant chacun plusieurs types de cellules rétiniennes. Le premier groupe inclut les cellules ganglionnaires, les cellules horizontales et les cônes. Ces cellules sont générées dans cet ordre. Le développement de ce groupe survient essentiellement entre E9 et E16. Il est suivi par une période de quatre à sept jours durant laquelle le nombre de "naissances" cellulaires est grandement diminué. Entre E12 et E20, la majorité des cellules amacrines sont générées. Les auteurs de cette étude soulignent qu'ils ne leur a pas été possible de déterminer si les cellules amacrines constituent un groupe à part entière ou si elles s'intègrent à l'un des autres groupes mentionné ci-dessus. Le dernier groupe inclut les cellules bipolaires, les cellules de Müller ainsi que des bâtonnets, dont la production se concentre entre E18 et P2. Ces cellules sont générées dans cet ordre.

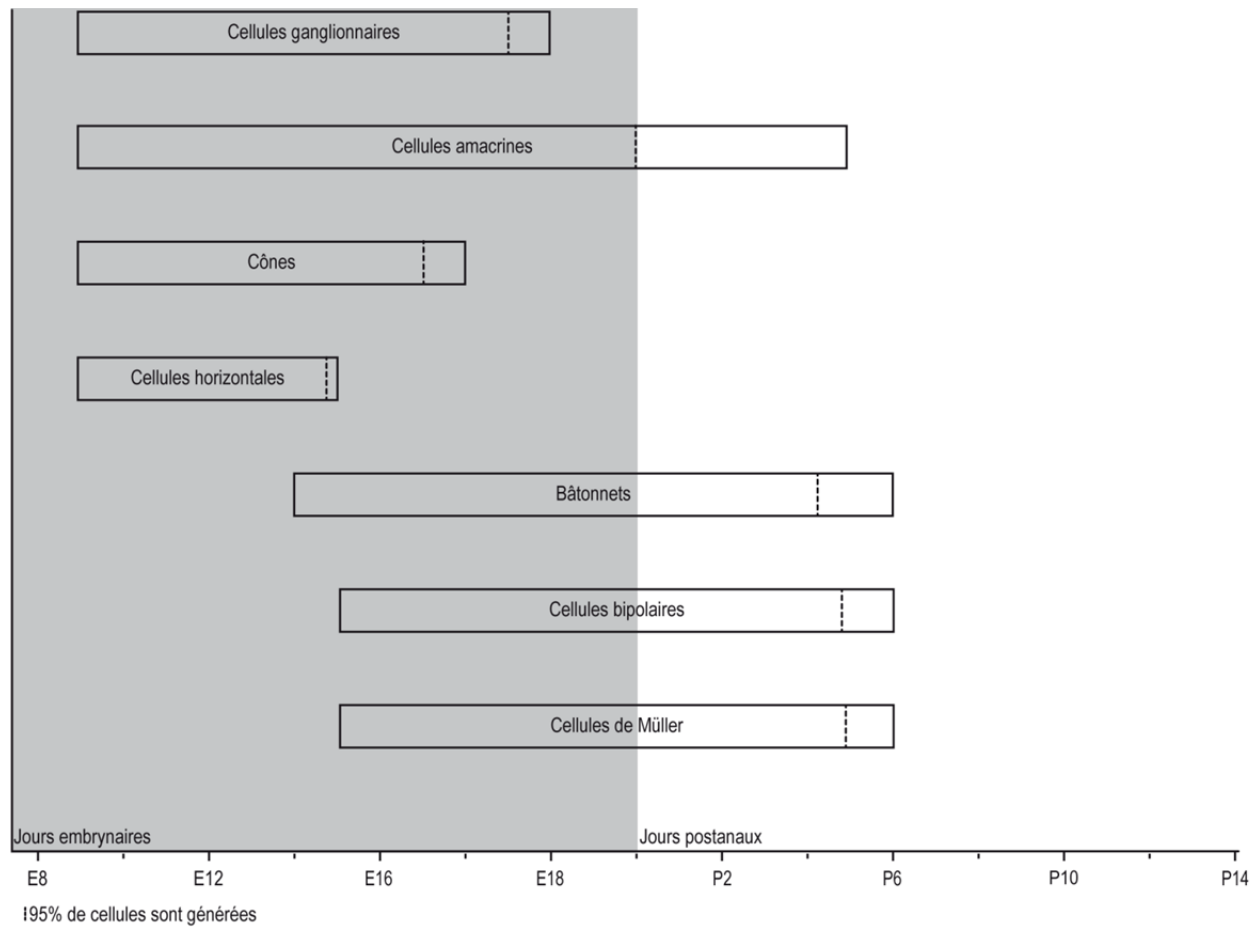


Figure 7 : Ordre de développement des cellules rétinienne chez le rat.

Adaptée de Rapaport, et al., (2004).

Tel qu'indiqué précédemment, les six types neuronaux peuvent être déclinés en soixante sous-types morphologiques. Les mécanismes à l'origine de cette diversité sont encore méconnus. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle les cellules progénitrices passeraient par des "stades de compétence" apparaît pour l'instant la plus plausible. Selon cette hypothèse, à chaque stade de compétence, les cellules "multipotentes" peuvent générer un nombre limité de types et/ou de sous-types cellulaires (Alexiades and Cepko, 1996; Cayouette *et al.*, 2006; Fujitani *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2008).

La formation de la rétine passe par plusieurs étapes. Dans une première phase, la rétine est constituée de deux couches cellulaires et d'une fine couche synaptique, l'IPL en formation. Dans la deuxième phase, la rétine est constituée de trois couches cellulaires : GCL, INL et NBL. La couche GCL et INL sont séparées par l'IPL, mais les couches INL et NBL sont encore continues. Dans la troisième phase, la rétine adopte sa structure finale.

4.1.1- Phase 1 : une rétine à deux couches

Les cellules ganglionnaires sont les premières à quitter le cycle cellulaire pour former des cellules ganglionnaires immatures. Celles-ci développent un cône de croissance qui est une structure spécialisée permettant aux cellules de diriger leur axone vers une cible adéquate à partir du filament basal qui les relie à la membrane limitante interne. Le filament apical, quant à lui, se rétracte alors que le corps cellulaire des cellules ganglionnaires immatures redescend vers la partie basale de la rétine, créant ainsi la couche des cellules ganglionnaires (Figure 8, I). Le cône de croissance des cellules ganglionnaires immatures longe la membrane limitante interne vers la tête du nerf optique pour se diriger ensuite vers sa ou ses cible(s) sous-corticale(s). Des données accumulées chez le rat (Rapaport *et al.*, 2004), le chat (Walsh *et al.*, 1983) et le singe (Rapaport *et al.*, 1992) suggèrent une séquence dans l'émergence des divers sous-types. Ainsi, les cellules ganglionnaires qui projettent au CGL et au CS ipsilatéraux semblent

avoir tendance à être générées avant celles qui projettent du côté controlatéral (Drager, 1985; Reese *et al.*, 1992).

4.1.2- Phase 2 : une rétine à 4 couches

Peu après les cellules ganglionnaires immatures, les cellules horizontales immatures, les cônes immatures et les cellules amacrines immatures commencent à être générées. Les cellules horizontales et les cônes immatures restent dans la couche des neuroblastes. Une fois différenciées, les cellules horizontales immatures se déplacent radialement dans la NBL avec des neurites dirigés vers la partie apicale de la rétine (figure 8, II). Les cônes immatures, quant à eux, restent proches de la surface apicale, le segment externe devenant clairement visible vers P2 chez la souris (Fei, 2003). Vers P4, quelques axones démontrent un début d'éléments pré-synaptiques, les pédicules synaptiques devenant systématiques et visibles vers P7 (Fei, 2003). Ces cellules atteignent la morphologie adulte vers P10 et deviennent complètement matures vers P20 (Fei, 2003). Il est à noter que le premier photopigment à être exprimé dans la rétine n'est pas l'une des opsines des cônes, mais bien la rhodopsine, suivie par l'opsine S qui apparaît à la naissance chez le rat Brown Norway, puis l'opsine M vers P4 (Arango-Gonzalez *et al.*, 2010 et voir pour revue Lukats *et al.*, 2005). Bien que l'ordre d'apparition des différents pigments soit maintenu, le moment auquel ils apparaissent semblent dépendre de l'espèce et/ou de la souche (Szel *et al.*, 1994).

Dans une étude visant à déterminer l'ordre de naissance des sous-types des cellules amacrines immatures, Voinescu *et al.*, (2009) ont démontré que la longue période de "naissance" des cellules amacrines de E8 à P5, chez la souris, était en fait divisée en plusieurs vagues de production des différents sous-types. Ainsi, les sous-groupes de cellules amacrines GABAergiques sont générés de façon ordonnée et précèdent les sous-groupes glycinergiques qui sont générés plus tardivement. Dans cette étude, les auteurs ont établi qu'il existe une forte relation linéaire entre la position du

soma de la cellule amacrine et sa date de naissance. Les cellules générées plus tôt ont tendance à occuper la couche des cellules ganglionnaires, alors que celles générées plus tardivement se retrouvent dans une partie plus distale de l'INL.

Une fois générées, les cellules amacrines immatures migrent vers la partie la plus profonde de la NBL. Lorsqu'elles arrivent près des cellules ganglionnaires immatures, les neurites qui entrent en contact avec ces dernières sont sélectivement stabilisés alors que les autres se rétractent. Les neurites stabilisés s'allongent et se ramifient pour devenir des arbres dendritiques dans l'IPL naissante. Les arbres dendritiques des cellules amacrines immatures semblent être dirigés vers la partie apicale ou basale de l'IPL, où elles sont la cible des cellules ganglionnaires immatures (Godinho *et al.*, 2005). Chez les rongeurs, des synapses conventionnelles sont développées avec les cellules amacrines à partir de P3 (Olney, 1968; Fisher, 1979).

À cette étape, la rétine est constituée de quatre couches : GCL, IPL, un début d'INL et NBL.

4.1.3- Phase 3 : une rétine complète

L'étape suivante, en terme de stratification, correspond à l'apparition de l'OPL (figure 8, III). Cette couche est initialement composée des neurites des cellules horizontales immatures et des premiers contacts synaptiques qu'elles forment avec les cônes (Dhingra *et al.*, 1997; Rich *et al.*, 1997; Hack *et al.*, 2002) autour P2 chez la souris (Raven *et al.*, 2008).

Dans la dernière phase, les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller sont produites. Les cellules bipolaires se différencient à partir des cellules progénitrices qui quittent le cycle cellulaire. Les filaments de ces cellules forment des collatéraux horizontaux au niveau basal, puis apical. Parmi ces collatéraux, ceux qui aboutissent dans l'IPL et l'OPL sont sélectivement stabilisés et deviennent respectivement l'axone et les dendrites

des cellules bipolaires (Morgan *et al.*, 2006). L'élément postsynaptique des cônes, que sont les cellules bipolaires liées aux cônes, rejoint la synapse formée par le cône et les cellules horizontales tardivement vers P10 chez les rongeurs (Rich *et al.*, 1997; Hack *et al.*, 2002).

À notre connaissance, une seule étude a établi un ordre dans la genèse des cellules bipolaires. Il s'agit de celle de Morrow *et al.* (2008) qui ont démontré que les cellulaires bipolaires liées aux cônes sont générées avant celles liées aux bâtonnets. Cette étude explore l'hypothèse selon laquelle la différenciation précoce des cellules bipolaires liées aux cônes serait due à un élément présynaptique déjà présent (Rapaport *et al.*, 2004) et fonctionnel dans une certaine mesure (Rich *et al.*, 1997; Sherry *et al.*, 2003).

Les bâtonnets sont la dernière classe de cellules rétiniennes à être produites. Leur phénotype semble être déterminé par différents facteurs environnementaux qui vont soit stimuler ce développement ou les pousser à se différencier en un autre type cellulaire tel que les cellules bipolaires, par exemple. Ce phénomène n'intervient que préalablement à l'expression de protéines spécifiques aux bâtonnets telles que la recoverine et la rhodopsine. Il est à noter que les bâtonnets sont identifiables à partir de P5, c'est aussi à cette étape que la rhodopsine commence à être produite.

Par la suite, le développement de la rétine requiert deux étapes supplémentaires. La première est celle de la maturation des photorécepteurs pour qu'ils soient capables de détecter la lumière, notamment par le développement de leurs segments externes et internes. Les segments externes des bâtonnets changent assez peu en diamètre pendant leur développement. Par contre, ils s'allongent rapidement et à une vitesse presque linéaire entre P11 et P17. Ils atteignent la longueur adulte entre P19 et P25. Chez la souris, cet allongement du segment externe est accompagné d'une augmentation presque linéaire de la rhodopsine entre P8 et P23. Fonctionnellement, ces changements s'accompagnent d'une augmentation

proportionnelle du courant d'obscurité ("dark current") entre P12 et P45 (voir pour revue Fu and Yau, 2007).

La seconde étape concerne la maturation et le raffinement des connexions synaptiques entre les différents types neuronaux. Cette dernière est notamment modulée, en premier lieu, par l'activité spontanée des cellules rétinienne, puis par l'activité visuelle évoquée après l'ouverture des yeux. Dans la rétine interne, l'activité spontanée provenant des cellules bipolaires ou amacrines participe à l'établissement de la stratification des cellules ganglionnaires ON et OFF au niveau de l'IPL ((Bodnarenko and Chalupa, 1993; Bodnarenko *et al.*, 1995; Deplano *et al.*, 2004). Les étapes par lesquelles les cellules ganglionnaires atteignent leur stratification finale ne font pas consensus dans la littérature. Certains auteurs affirment que les cellules ganglionnaires étendent d'abord leurs dendrites sur plusieurs sous-couches avant de réorganiser les arbres dendritiques pour atteindre la stratification finale selon un mécanisme dépendant de l'activité neuronale. D'autres estiment plutôt que les cellules ganglionnaires dirigent dès le début leurs dendrites vers les sous-couches appropriées. Dans une récente étude, Kim *et al.*, 2010 réconcilient ces deux écoles en établissant que les cellules ganglionnaires atteignent leur stratification finale dans l'IPL selon une chronologie spécifique à leur sous-type, directement pour certains et indirectement pour d'autres.

Le développement des cellules de Müller a été récemment décrit par Jadhav *et al.*, (2009). Ces cellules émergent des cellules progénitrices de la rétine et en gardent de nombreuses caractéristiques moléculaires et morphologiques. Au cours du développement de la rétine, la position du soma des cellules progénitrices oscille dans la rétine en conjonction avec les phases du cycle cellulaire. Après la dernière division, créant les cellules de Müller, le soma se stabilise au niveau de la couche nucléaire interne. La cellule de Müller immature projette des filaments vers les surfaces apicale et basale de la rétine. Le filament apical se rend jusqu'à la membrane limitante

externe avec des microvilli qui s'étendent dans l'espace sous rétinien. Le filament basal s'étend jusqu'à la membrane limitante interne pour former un pied ("endfoot"). Des filaments additionnels s'étendent latéralement à partir de la structure radiale de la cellule de Müller pour couvrir le corps cellulaire des neurones adjacents et leurs connexions synaptiques. Ces changements morphologiques sont accompagnés de changements fonctionnels tels que l'expression des canaux potassiques à courant entrant rectifiant (Inward rectifying potassium channel – Kir4.1). Pannicke et al. (2002) ont constaté une grande augmentation de l'expression et de l'activité de ce canal, qui est impliqué dans un des rôles cruciaux de la cellule de Müller, soit le contrôle du potassium extra cellulaire (Kofuji *et al.*, 2002).

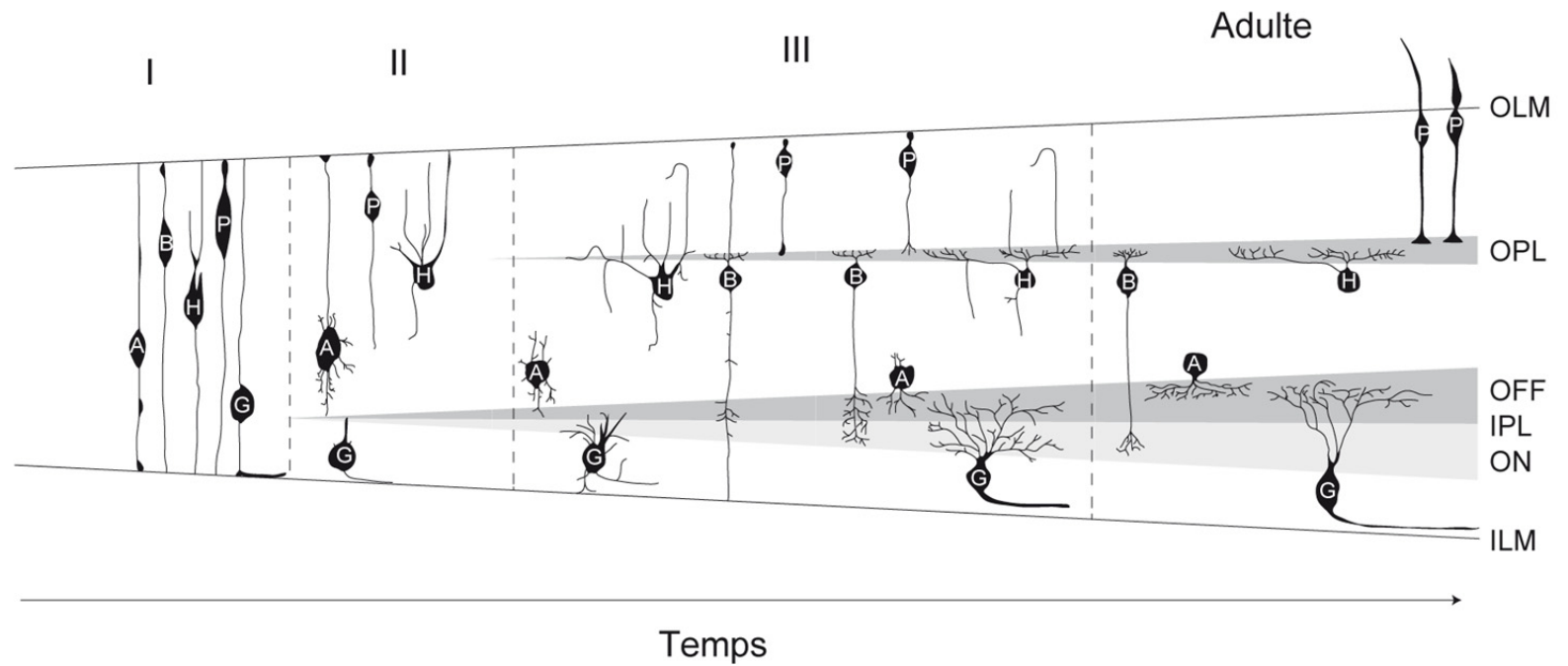


Figure 8 : Différentes phases de développement de la rétine.

P = photorécepteurs; H = cellules horizontales B = cellules bipolaires; A = cellules amacriques; G = cellules ganglionnaires; OLM = membrane limitante externe; ILM = Membrane limitante interne. Figure adaptée de (Sernagor, 2006)

5- Système des endocannabinoïdes dans la rétine

5.1- Distribution anatomique des éléments du système des eCBs

5.1.1- Les enzymes de synthèse et les ligands

La présence des deux principaux endocannabinoïdes a été rapportée par plusieurs études dans la rétine de porcs adultes (Bisogno *et al.*, 1999; Fan and Yazulla, 2007), de rongeurs (Straiker *et al.*, 1999a) et d'humains (Chen *et al.*, 2005; Matias *et al.*, 2006). De même, il a été démontré que la rétine était capable de produire et de dégrader ces deux endocannabinoïdes. Les quantités de 2-AG rapportées varient entre 1400 et 3000 pmol/g (Bisogno *et al.*, 1999; Straiker *et al.*, 1999a; Chen *et al.*, 2005) selon les espèces testées. Dans le cas de l'AEA, Straiker *et al.*, (1999a) rapporte une absence d'AEA, alors que d'autres auteurs démontrent la présence de 4.5 à 100 pmol/g selon les espèces (Bisogno *et al.*, 1999; Stamer *et al.*, 2001; Nucci *et al.*, 2007).

Les auteurs qui ont comparé les concentrations de l'AEA et du 2-AG s'accordent pour dire que la concentration du second est nettement supérieure à celle de l'AEA. Ainsi, chez le bœuf et chez l'humain il y a 25 fois plus de 2-AG que d'AEA (Bisogno *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005). Chez le rat, Straiker *et al.*, (1999a) trouvent une concentration de 2-AG de 3000 pmol/g, mais pas d'AEA. Bien que l'étude de Nucci *et al.* (Nucci *et al.*, 2007) rapporte la présence de 100 pmol/g d'AEA dans la rétine du rat, le rapport demeure largement en faveur de 2-AG.

La capacité de la rétine à produire les endocannabinoïdes (AEA et 2-AG) a été rapportée par Matsuda *et al.*, (1997) et la localisation des enzymes DAGL α et β – responsables de la synthèse du 2-AG – a été décrite par Hu *et al.*, (2010). L'enzyme DAGL α est présente dans les deux couches synaptiques de la rétine de la souris. Au niveau de l'OPL, elle s'exprime intensément dans les dendrites de cellules bipolaires OFF des cônes de type 1. Les auteurs soulignent que cette enzyme est aussi présente, mais de

façon moins importante, dans les dendrites d'autres cellules bipolaires sans en préciser le type. L'enzyme DAGL α est également présente au niveau de la couche plexiforme interne. Bien que le type de neurones qui l'exprime ne soit pas encore déterminé, les auteurs ont démontré que ce n'était pas dans les cellules amacrines GABAergiques, ni dans les neurones qui expriment le récepteur CB1.

Dans la même étude, Hu *et al.*, (2010) ont établi que l'enzyme DAGL β est présente exclusivement dans les vaisseaux sanguins dans la rétine.

La distribution de l'enzyme NAPE-PLD n'a pas encore fait l'objet de d'études.

5.1.2- Les récepteurs

5.1.2.1- Le récepteur CB1

Contrairement à presque toutes les autres protéines du système des eCBs, l'expression du récepteur CB1 a été étudiée chez différents animaux et par diverses équipes (Buckley *et al.*, 1998; Straiker *et al.*, 1999a; Straiker *et al.*, 1999b; Yazulla *et al.*, 1999; Yazulla *et al.*, 2000; Straiker and Sullivan, 2003; Hu *et al.*, 2010). Ainsi, ce récepteur se retrouve dans la rétine de plusieurs espèces, allant du cyprin doré à l'humain. La présence du récepteur CB1 au niveau de la rétine a été étudiée à l'aide de techniques d'hybridation *in situ*, de réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) et d'immunohistochimie. Buckley *et al.*, (1998) sont les premiers à avoir démontré la présence précoce de l'ARNm du récepteur CB1 dans la rétine du rat, notamment dans la GCL et l'INL (à partir respectivement de E15 et E20). Quelques années plus tard, la présence de ce récepteur durant le développement de la rétine est confirmée par Begbie *et al.*, (2004) chez le poulet.

Une étude comparative menée par Straiker *et al.*, (1999a) a démontré la présence de ce récepteur dans la rétine de l'humain, du singe, de la souris, du rat, du poulet, de la salamandre et du cyprin doré. La localisation exacte

de ce récepteur, dans les différents types cellulaires, rapportée par cette étude est décrite dans le tableau ci-dessous. Une deuxième étude menée par Yazulla *et al.*, (1999) décrit également l'expression du récepteur CB1 dans la rétine du rat albinos adulte (voir tableau ci-dessous).

Cellules réiniennes	Données recueillies relatives à la distribution du récepteur CB1
Photorécepteurs	<p>-Présence dans le segment interne chez plusieurs espèces.</p> <p>-Forte expression dans les pédicules des cônes (Straiker <i>et al.</i>, 1999a; Yazulla <i>et al.</i>, 1999; Yazulla <i>et al.</i>, 2000).</p>
Cellules horizontales	<p>-Présence dans toutes les espèces étudiées (Straiker <i>et al.</i>, 1999a).</p> <p>-Présence au niveau de la membrane mais pas les dendrites (Yazulla <i>et al.</i>, 1999).</p>
Cellules bipolaires	<p>-Absence dans les cellules bipolaires associées aux bâtonnets par immunohistochimie, mais validation de la présence du récepteur par électrophysiologie (Straiker <i>et al.</i>, 1999a).</p> <p>-Présence dans les cellules bipolaires associées aux bâtonnets, au niveau des dendrites, des corps cellulaires; des axones chez le rat albinos (Yazulla <i>et al.</i>, 1999).</p>
Cellules amacrines	<p>-Présence chez toutes les espèces étudiées (Straiker <i>et al.</i>, 1999a).</p> <p>-Présence dans les cellules amacrines GABAergic PKC-positives (Yazulla <i>et al.</i>, 1999).</p> <p>-Présence dans cellules amacrines GABAergiques embryonnaires de poulet (Warrier and Wilson, 2007).</p>
IPL	<p>-Présence chez toutes les espèces étudiées (Straiker <i>et al.</i>, 1999a).</p> <p>-Présence dans les synapses des cellules bipolaires liées aux bâtonnets (Yazulla <i>et al.</i>, 1999).</p> <p>-Présence plus importante dans les synapses cellules bipolaires ON que OFF chez le cyprin doré (Yazulla <i>et al.</i>, 2000).</p>
Cellules ganglionnaires	<p>-Présence dans le corps cellulaire et les fibres des cellules ganglionnaires chez toutes les espèces, sauf le poisson (Straiker <i>et al.</i>, 1999a).</p> <p>-Absence dans la couche des cellules ganglionnaires chez le rat albinos (Yazulla <i>et al.</i>, 1999), mais expression observée chez la souris (Yazulla, 2008).</p> <p>-Présence dans le corps cellulaire et les neurites des cellules ganglionnaires chez le rat (Lalonde <i>et al.</i>, 2006).</p>

Tableau 2 : Distribution du récepteur CB1 dans la rétine

5.1.2.2- Le récepteur CB2

Les recherches portant sur la localisation de CB2 ont été peu nombreuses jusqu'à présent et se résument aux travaux de Buckley *et al.*,(1998), Lu *et al.*,(2000) et Lopez *et al.*,(2010).

Buckley *et al.*,(1998) démontrent par hybridation *in situ* que CB2 est absent de la rétine avant la naissance chez le rat.

Lopez *et al.*,(2010), procédant par immunohistochimie, ont détecté la présence du récepteur CB2 dans la rétine du rat adulte. Cette expression se retrouve notamment dans les couches nucléaires externe et interne ainsi que dans la couche des cellules ganglionnaires. En se basant sur la localisation des corps cellulaires et leur morphologie, les auteurs suggèrent que le récepteur CB2 serait exprimé dans le segment interne des photorécepteurs, dans les cellules horizontales, amacrines, amacrines déplacées, ainsi que dans les cellules ganglionnaires. Ils indiquent également une expression importante du récepteur dans la couche plexiforme interne.

Lu *et al.*, (2000) parviennent à des conclusions comparables en utilisant l'hybridation *in situ*, à l'exception de l'IPL pour laquelle les données recueillies n'indiquent qu'une très faible expression. Néanmoins, comme son étude porte sur l'ARNm, il est probable que la localisation de celui-ci ne prédise pas avec exactitude l'emplacement de la protéine CB2 à l'intérieur de la cellule.

Dans l'ensemble, ces données indiquent la présence du récepteur dans la rétine tout en appelant d'autres travaux afin d'en préciser l'emplacement.

5.1.3- Les enzymes de dégradation

Jusqu'à présent, trois enzymes de dégradation ont été localisées dans la rétine:

- l'enzyme FAAH, responsable de la dégradation de l'AEA tel qu'expliqué auparavant,
- l'enzyme MAGL, responsable de la dégradation du 2-AG.
- l'enzyme ABHD6, qui participe également à la dégradation du 2-AG.

Deux équipes se sont penchées sur l'expression de l'enzyme FAAH dans la rétine des rongeurs. L'équipe du Dr. Yazulla a étudié l'expression de cette enzyme chez le rat albinos et la souris. L'équipe du Dr. Straker a établi le patron d'expression de cette enzyme chez la souris pigmentée et albinos.

La première équipe a localisé cette présence dans la couche des photorécepteurs, dans les cellules horizontales ainsi que dans certaines cellules bipolaires associées aux cônes. Les cellules amacrines dopaminergiques et les synapses des cellules amacrines cholinergiques expriment également cette enzyme (Yazulla *et al.*, 1999). Dans cette première étude les auteurs ne mettent en évidence la présence de cette protéine dans les cellules ganglionnaires des rats albinos. À contrario, en 2008, ils retrouvent un marquage dans ces cellules chez la souris (Yazulla, 2008).

Les travaux de la seconde équipe confirment la présence de FAAH dans les photorécepteurs, précisément dans les sphérules des bâtonnets et dans une population de cellules bipolaires liées aux cônes. Par contre, ils ne notent pas d'expression dans les cellules horizontales. Enfin, ils rapportent l'expression de l'enzyme dans les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires CB1R-positives (2010).

Yazulla (2008) s'est également penché sur la distribution globale de l'enzyme MAGL. De la photographie reproduite dans son étude, nous concluons que la MAGL est exprimée dans les cellules bipolaires ainsi que dans certaines cellules ganglionnaires.

Hu *et al.*,(2010) nous donnent davantage de détails et localise l'expression de l'enzyme au niveau des sphérules des bâtonnets et des pédicules des cônes. Ils trouvent également un marquage dans l'IPL selon deux strates distinctes qui ne colocalisent pas avec les synapses des cellules amacrines GABAergiques. Les cellules ganglionnaires expriment également la MAGL.

En ce qui a trait à ABHD6, l'expression en a été localisée par Hu *et al.*,(2010) dans les certaines cellules amacrines GABAergiques. Ils suggèrent également que cette enzyme s'exprimerait dans les cellules ganglionnaires et leurs dendrites, ainsi que dans les dendrites des cellules amacrines déplacées.

Une vue d'ensemble de la distribution des différentes protéines du système des eCBs est présentée dans le tableau 3.

Structures rétiniennes	Enzymes de synthèse	Récepteur		Enzymes de dégradation		
		DAGL α	CB1	CB2	FAAH	MAGL
Photorécepteurs	-	+	+	+	-	-
OPL	+	Pédicule des cônes		Sphérules des bâtonnets	Synapses des photorécepteurs	
Cellules horizontales	-	+	+	+	-	-
Cellules bipolaires	Type 1 OFF	Un type de cellules bipolaires liées aux cônes	-	Cellules CBc	+	-
Cellules amacrines	+	GABAergiques	+	Dopaminergiques et Cholinergiques		GABAergiques
IPL	+	+	+	+	+	+
Cellules ganglionnaires	-	+	+	+	+	+

+ = la protéine est présente,
 - = la protéine n'est pas présente

Tableau 3 : Distribution des protéines du système eCB dans la rétine.

5.2- Données fonctionnelles

Dans la partie précédente, nous avons démontré une importante présence des éléments du système eCB dans la rétine. Dans la présente partie, nous allons nous pencher sur le rôle de ce système dans la fonction rétinienne. Il n'existe que peu de données sur la distribution du récepteur CB2 et aucune donnée sur son rôle dans la rétine. Nous allons donc uniquement décrire les données existantes sur le récepteur CB1. Ces données ont été essentiellement recueillies par l'équipe de Yazulla et proviennent d'une préparation *in vitro* sur des cellules de poissons ou d'amphibiens.

5.2.1-Photorécepteurs

Les effets des eCBs ont été étudiés chez le cyprin doré et la salamandre par deux équipes de recherche dans des conditions *in vitro*.

Fan et Yazulla (2003) rapportent un effet biphasique de la réponse du cône à une exposition au WIN 55212-2, un agoniste des récepteurs canabinoïdes. Ces auteurs mettent donc en évidence une augmentation des courants potassique, chlore et calcique dans les cônes lorsqu'ils sont exposés à de faibles concentrations de cet agoniste (inférieures à 1 μ M). Par contre, à des concentrations supérieures, ces courants sont inhibés. Les auteurs rapportent également que cette suppression implique la voie de la PKA. Ils en concluent qu'à de faibles concentrations de WIN5512-2, le récepteur CB1 augmente les courants mentionnés ci-dessus en s'associant à une protéine G_s , alors que la diminution de ces courants est induite par son association à une protéine $G_{i/o}$.

Straiker et Sullivan (2003) rapportent des données sensiblement similaires à celles de Fan et Yazulla (2003). Ils démontrent également que la réponse au WIN5512-2 des bâtonnets et des cônes est différente. Les courants calciques sont inhibés dans les cônes, mais augmentés dans les bâtonnets, alors que les courants potassiques sont diminués dans les deux.

Cela amène les auteurs à suggérer que cet effet opposé sur les courants calcique et potassique dans les bâtonnets causerait une augmentation de la relâche synaptique qui diminuerait la sensibilité rétinienne.

En 2007, Fan et Yazulla ont démontré une inhibition rétrograde de la relâche synaptique au niveau des cônes à partir des cellules bipolaires chez le cyprin doré. Par ailleurs, leurs données suggèrent une dépendance au calcium de ce mécanisme et que les cellules bipolaires relâcheraient du 2-AG à partir de leur dendrite. Cette relâche s'effectuerait par deux mécanismes différents : l'un dépendant du voltage, qui serait activé par la dépolarisation des cellules bipolaires ON, en réponse à la lumière, et l'autre indépendant du voltage, qui impliquerait une activation du récepteur mGluR1.

Struik et al. (2006) se sont penchés sur l'effet des eCBs sur la réponse des cônes à la lumière chez le cyprin doré. L'agoniste au récepteur CB1, le WIN55 212-2 n'affecte ni la sensibilité absolue des cônes, ni la cinétique du début de la réponse. Ces auteurs ont constaté, en revanche, que les cannabinoïdes accélèrent la cascade de désactivation de la phototransduction dans le segment externe du cône. Ils en concluent que cela aurait pour conséquence de raccourcir le temps de récupération après des flash intenses et pourrait même causer une augmentation de la sensibilité au contraste.

5.2.2- Cellules bipolaires

Straiker et al., (1999a) ont démontré que l'agoniste WIN55212-2 des récepteurs aux cannabinoïdes inhibait les courants calciques provenant des canaux calciques de type L dans les cellules bipolaires de la salamandre.

Par ailleurs, Yazulla et al., (2000) ont établi que les courants potassiques étaient inhibés dans les cellules bipolaires ON suite à l'exposition à l'agoniste WIN55 212-2.

5.2.3- Cellules inhibitrices

L'activation du récepteur CB1 cause une augmentation de la relâche synaptique spontanée dans certaines cellules amacrines GABAergiques embryonnaires. Ceci se fait par un mécanisme dépendant de l'AMPc et indépendant du calcium (Warrier and Wilson, 2007).

5.2.4- Cellules ganglionnaires

L'activation du récepteur CB1 cause une diminution des courants calciques dans les cellules ganglionnaires et ainsi diminue l'excitabilité de ces cellules (Lalonde *et al.*, 2006).

Objectifs

L'implication du système des endocannabinoïdes dans le développement neuronal dans certaines structures cérébrales, a été largement démontrée par plusieurs équipes de chercheurs. Cependant, il n'existe que peu de recherches sur le rôle des endocannabinoïdes dans le développement rétinien.

Dans ce cadre, la présente recherche a pour objectif général d'une part, d'établir la distribution spatio-temporelle de certains éléments du système des endocannabinoïdes durant le développement rétinien et d'autre part, de déterminer si cette distribution soutient l'hypothèse d'un rôle dans le développement de la rétine. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs approches en particulier l'étude anatomique des tissus rétiniens et la biologie moléculaire. Nous avons utilisé des techniques d'immunohistochimie, de microscopie confocale et d'immunobuvardage. Le but étant plus particulièrement de caractériser la distribution spatio-temporelle du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH durant le développement post-natal de la rétine du rat.

Article 1 : Expression du récepteur CB1 dans la rétine durant le développement

Cette étude vise principalement à déterminer dans quels types cellulaires et à quel moment le récepteur CB1 s'exprime dans la rétine du rat en développement. L'hypothèse de cette étude est que la distribution du récepteur CB1 varierait en fonction de l'âge. En particulier il serait présent dans certaines cellules durant le développement du rat, mais absent de ce même type cellulaire chez l'adulte. Cette redistribution indiquant une implication dans un ou plusieurs mécanismes de développement.

Article 2 : Expression de l'enzyme FAAH dans la rétine durant le développement

Étant donné le rôle clé joué par l'enzyme FAAH dans la régulation de l'activité du récepteur CB1, nous avons également étudié sa distribution durant le développement de la rétine. L'hypothèse de cette étude est que la distribution de l'enzyme FAAH varierait en fonction de l'âge. En particulier, elle serait présente dans certaines cellules durant le développement du rat, mais absente de ce même type cellulaire chez l'adulte. Cette redistribution indiquant une implication dans un ou plusieurs mécanismes de développement.

Article 3 : Le rôle fonctionnel des récepteur CB1 et CB2 dans la rétine de la souris adulte

Cette étude porte sur l'effet fonctionnel de l'élimination du récepteur CB1 ou CB2 dans la rétine adulte de la souris. Pour y parvenir, nous avons utilisé des techniques d'électrorétinogramme (ERG) pour mesurer la réponse de la rétine chez des souris transgéniques (*cnr1*^{-/-} ou *cnr2*^{-/-}) et des souris de souche sauvage. Par ailleurs, nous avons eu recours à des méthodes d'immunohistochimie pour déterminer la répartition du récepteur CB2 et pour vérifier l'intégrité des rétines des souris transgéniques. L'hypothèse de cette étude était que l'élimination du récepteur CB1 causerait une modification de la réponse rétinienne et une adaptation anormale. Nous avons également voulu déterminer si le récepteur CB2 avait un rôle physiologique dans la rétine de la souris.

Article 1



**Cannabinoid Receptor Type 1 Expression During
Postnatal Development of the Rat Retina**

Zabouri, N.^{1,2}, Bouchard, J.-F.², Casanova, C.¹

¹Laboratoire des Neurosciences de la vision, ²Laboratoire de Neuropharmacologie, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running Title: CB1 receptors in the developing retina

Associated Editor: Ian A. Meinertzhagen

Keywords: Endocannabinoids, CB1, FAAH, immunohistochemistry, NAPE-PLD, retinogenesis.

Abstract

Cannabinoid receptor type 1 (CB1R) participates to developmental processes in the central nervous system (CNS). The rodent retina represents an interesting and valuable model to study CNS development, because it contains well identified cell types with clearly established and distinct developmental timelines. Very little is known about the distribution or function of CB1R in the developing retina. In this study, we investigated the expression pattern of CB1R in the rat retina during all stages of postnatal development. Western blots were performed on retinal tissue at different time points between P1 and adulthood. In order to identify the cells expressing the receptor and the age at which this expression started, immunohistochemical co-stainings were carried out for CB1R and markers of the different cell types comprising the retina. CB1R was already present at P1 in various cell types i.e. ganglion, amacrine, horizontal and mitotic cells. In the course of development, it appeared in cone photoreceptors and bipolar cells. For some cell types (bipolar, Müller cells and some amacrine cells), CB1R was transiently expressed, suggesting a potential role of this receptor in developmental processes, such as migration, morphological changes, sub-identity acquisition and patterned retinal spontaneous activity. Our results also indicated that CB1R is largely expressed in the adult retina (cone photoreceptors, horizontal, most amacrine and retinal ganglion cells), and may therefore contribute to retinal functions. Overall these results indicate that, as shown in other structures of the brain, CB1R could play an instrumental role in the development and function of the retina.

Introduction

In the last two decades, there has been an increased interest in the physiological role of the endocannabinoid system and its main comprising receptors, cannabinoid receptor types 1 (CB1R) and 2 (CB2R). CB1R has been predominantly studied, relative to CB2R, because of its ubiquitous presence in the central nervous system (CNS), including the retina (Herkenham, 1991; Mailleux et al., 1992; Westlake et al., 1994; Buckley et al., 1998; Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Cravatt et al., 2001; Leonelli et al., 2005; Lalonde et al., 2006; Nucci et al., 2007; Warriar and Wilson, 2007). This receptor is a member of the superfamily of G protein-coupled receptors and is linked to $G_{i/o\alpha}$ proteins. These proteins inhibit most adenylyl cyclases and regulate calcium and potassium ion channels (see Turu and Hunyady, 2009 for review on CB1R signal transduction pathways).

Some constituents of the endocannabinoid system - i.e. ligands, synthesizing and degradative enzymes and receptors - were found in different retinal cell types in several species, from fish to primates (Buckley et al., 1998; Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Leonelli et al., 2005; Lalonde et al., 2006; Nucci et al., 2007; Warriar and Wilson, 2007 and see Yazulla, 2008 for review). For instance, in adult rodents, both CB1R and the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH, responsible for hydrolyzing the CB1R ligand - Deutsch and Chin, 1993; Cravatt et al., 2001; McKinney and Cravatt, 2005) are expressed in cone photoreceptors (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999), bipolar (Yazulla et al., 1999), amacrine (Yazulla et al., 1999; Warriar and Wilson, 2007) and retinal ganglion cells (RGCs – Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Lalonde et al., 2006; Yazulla, 2008). Activation of CB1R can modulate ion currents in retinal cells of adult animals, suggesting the involvement

of the endocannabinoid system in retinal processing (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 2000; Fan and Yazulla, 2003; Struik et al., 2006; Fan and Yazulla, 2007).

Most studies on CB1R expression were conducted in the retina of adult animals, and very little is known on its presence and role(s) in the developing retina. The paucity of information regarding CB1R expression in developing retinas is surprising given that endocannabinoids and their receptors are expressed very early in the CNS (embryonic day 13, Buckley et al., 1998) and are generally considered to play a role in developmental processes. Indeed, several lines of evidence indicate that endocannabinoids are involved in neurogenesis (Aguado et al., 2005; Galve-Roperh et al., 2006; Hill et al., 2006; Harkany et al., 2008), axonal elongation (Williams et al., 2003; Berghuis et al., 2005; Berghuis et al., 2007) and probably in synaptogenesis (Kim and Thayer, 2001; Galve-Roperh et al., 2006; Berghuis et al., 2007; Gomez et al., 2007; Fride, 2008). To our knowledge, only three studies specifically investigated the endocannabinoid system in the retina of immature animals. In the embryonic chick retina, Leonelli et al. (2005) reported an early expression of the receptor in the retinotectal pathway while Warrior and Wilson (2007) demonstrated a modulatory role of CB1R in the spontaneous release of GABA in cultured amacrine cells. The third report revealed that activation of CB1R modified the excitability of cultured rat RGCs (Lalonde et al., 2006). These findings indicate that CB1R is present and functional early on at the retinal level.

In this study, we investigated the expression pattern of CB1R in the retina of young and adult rats. The rodent retina represents a valuable model to study development because it contains several cell types with well established and distinct developmental timelines (Rapaport et al., 2004). The specific aim was to determine the developmental profile of CB1R expression for each of the main

retinal cell types, from birth to adulthood. Part of this work was presented in abstract form (Zabouri N, 2007; 2008).

Materials and methods

Animals

Gestating or non-gestating adult Long Evans rats were obtained from Charles River (St-Constant, QC) and maintained on a 12-hours light/dark cycle. All procedures were in accordance to the guidelines set out by the Canadian Council on Animal Care and NIH guidelines for the care and use of laboratory animals, and were approved by the ethics committee on animal research of the Université de Montréal. Three to seven pups from at least three litters were used at very age for each co-labeling.

Tissue Preparation

The animals were sacrificed at various ages, namely: P1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 21, 30, 45 and adults (\geq P60). Rats were deeply anesthetized either by hypothermia (pups younger than P5) or through excess of isoflurane inhalation. One eye was immediately removed for Western blot analysis. The retina was dissected on ice, promptly frozen and kept at -80°C until further processing. Simultaneously, a transcardiac perfusion was conducted with phosphate buffered 0.9% saline (PBS, 0.1M, pH 7.4), followed by phosphate-buffered 2% paraformaldehyde (PFA), until the head was lightly fixed. The nasal part of the second eye was marked with a suture and removed. Two small holes were made in the cornea, prior to a first post-fixation in 2% PFA for a period varying between 1h30 and 2h, depending on the size of the eye. The cornea and lens were then removed and the eyecups post-fixed for 10 to 30 minutes in 2%

PFA. The degree of fixation was reduced to preserve the antigenicity of CB1R. The eyecups were washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in HistoPrep tissue Embedding Media (Fisher Scientific, Ottawa, ON), flash frozen and kept at -80°C until processing.

Sections (14µm thick) were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Exton, PA) starting at the nasal pole and placed on gelatin/chromium (Double frosted microscope slides, Fisher Scientific, Ottawa, ON) or poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) coated slides. The latter were used only when heating the samples was necessary for antigen retrieval.

Subcellular fractionation and Western blot

Subcellular fractionation

Freshly dissected retinas from adult rats were homogenized and divided into nuclear, cytoplasmic and membrane fractions with Nuclear Extract Kit (Active Motif, California, USA), which was successfully used on retinal tissue by Leu and Ouyang (2006). In brief, retinas were homogenized, then successively incubated, vortexed and centrifuged in detergent-containing hypotonic buffer, complete lysis buffer, and then RIPA buffer (Barker and Shooter, 1994). A protease inhibitor mixture (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin - 1:1000 - and Phenylmethylsulfonyl fluoride - 0.2 mg/ml -; Roche Applied Science, Laval, QC) was added to the buffers. Between each incubation, the supernatant, comprising the cytoplasmic, the nuclear or the membrane fractions was removed and stored at -80°C until use. The insoluble pellet was then resuspended in inch buffer described above until all fractions were collected. Protein contents were equalized using a BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Fischer scientific, Ottawa, ON). Thirty micrograms of protein/sample of the homogenate, cytoplasmic,

nuclear, and membrane, and fractions were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane filter (BioTrace NT, Life sciences, Pall Corporation, Pensacola, Florida, USA), blocked for 1h in 5% skim milk (Carnation, Markham, ON) in TBST_{western} (0.15 M NaCl, 25 mM Tris-HCl, 25 mM Tris, 0.5% Tween-20) and incubated overnight with the primary antibodies, namely: anti-CB1R, anti-GAPDH, anti-NR2E3 and anti-GluR1. The last three antibodies were used to ensure the proper separation of the cytosol (Haque et al., 2008), the nuclei (Kanda and Swaroop, 2009) and the membranes (Xue et al., 2001), respectively. The following day, the blot was exposed to the appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:5000; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) in blocking solution for 2h. Detection was carried out using homemade ECL Western blotting detection reagents. Then membrane was air-stripped, reblocked and exposed to a second primary antibody, until all proteins of interest were tested.

Evolution of CB1R overall expression in time, analyzed by Western blot

Retinas were homogenized by hand using a sterile pestle in RIPA lysis buffer, supplemented with a protease inhibitor mixture. Samples were then centrifuged at 4°C for 10 min and the supernatant was extracted and stored. Protein contents were equalized as previously described. Thirty micrograms of protein/sample were resolved in a 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane, blocked for 1h and incubated overnight with one of these primary antibodies: rabbit anti-CB1R, rabbit anti-FAAH and rabbit anti-NAPE-PLD, rabbit anti-DAGL α and mouse anti-GAPDH in blocking solution. The latter antibody was used to ensure the proper equalization and loading of

all samples, the protein usually used for this – β -actin- was deemed inappropriate as it varies during development (Weinberger et al., 1996; Micheva et al., 1998).

Densitometric analysis was performed using Scion Image software (version 4.03) on scanned films obtained from a series of three independent Western blots, each performed with retinal samples from distinct experimental groups.

Immunohistochemistry

Double-label immunohistochemistry

Sections were washed in buffered saline (phosphate 0.1M, 0.9% based saline were used), post-fixed for 5 minutes in a 70% solution of ethanol, rinsed in 0.03% Triton X-100 buffered saline and blocked in 10% normal donkey serum (NDS, Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA) and 0.5% Triton X-100 in buffered saline for 1h. The sections were then co-incubated overnight in rabbit anti-CB1R solution with one of the following antibodies tagged as mouse and directed against: protein kinase C alpha (PKC α), syntaxin, glutamine synthetase (GS), Brn3 or proliferating cell nuclear antigen (PCNA). For the latter antibody, the buffer used consisted of a Tris 0.05M, 0.9% based saline. The sections were then washed in buffered saline, blocked for 30 minutes and incubated for 1h with secondary antibodies: Alexa donkey anti-rabbit 555 for CB1R and Alexa donkey anti-goat or mouse 488 for cell type markers (Molecular Probes, Eugene, OR). After washes, the sections were mounted with a homemade Dabco-PVD mounting media (Ono et al., 2001).

Immunostaining of Brn3 required an antigen retrieval and amplification protocols where the sections were incubated at 37°C for 30 min in a 0.06% CaCl₂ solution. After several washes, they were incubated in citric buffer (0.1M, pH=6.0) at 80°C for 1h, and then

allowed to cool to room temperature before proceeding with the rest of the protocol as previously described. A biotinylated anti-goat secondary was used (Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA), followed by 2h incubation in an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; Vectastain ABC Elite kit; Vector Laboratories, Burlingame, ON) to ensure proper amplification of the signal. The latter was revealed with streptavidin coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC, 1:200; Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA). All dilution factors for the antibodies, the immunogens and the provenance of antibodies are provided in Table1.

Antibody	Immunogen	Dilution	Host	Company
CB1R	A fusion protein containing the sequence MKSILDGLADTTTFRITITDALLYVGSNDIQYEDIKGDMSKLGYPF QKFPLTSFRGSPFQEKMTAGDNSPLVPAGDT of rat CB1R.	H : 1/150 W: 1/1000	Rabbit	C1233, Sigma-Aldrich; Oakville, ON
FAAH	Synthetic peptide from rat FAAH containing the sequence ELCLRFMREVEQLMTPQKQPS.	W: 1/500	Rabbit	101600, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI
NAPE-PLD	Synthetic peptide from mouse NAPE-PLD containing a sequence the QSPAPSYQYPKETL.	W: 1/3000	Rabbit	NB110-80070, Novus Biologicals, Littleton, CO
DAGL α	The protein sequence CPAKQDELVISAR from the C terminus of human DAGL α .	W: 1/2000	Rabbit	IMG-30833, imgenex corporation, San Diego, CA
GAPDH	The full length rabbit muscle GAPDH protein.	W: 1/20 000	Mouse	G8795, Sigma-Aldrich; Oakville, ON
NR2E3	The full length recombinant protein.	W 1/500	Rabbit	AB2299, Chemicon, Temecula, CA
GluR1	The C-terminus peptide sequence SHSSGMPLGATGL from the rat protein.	W: 1/1000	Rabbit	AB1504, Chemicon, Temecula, CA
Recoverin	The full length recombinant human recoverin.	H: 1/2000	Rabbit	AB5585, Chemicon, Temecula, CA
Cone transducin (G _{o12})	A synthetic peptide containing sequence IDYAEVSCVD from bovine retina.	H: 1/200	Rabbit	Sc-390, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Syntaxin, Clone HPC1	Synaptosomal plasma fraction of rat hippocampus.	H: 1/500	Mouse	S0664, Sigma-Aldrich; Oakville, ON
PKC Clone H7	A synthetic peptide containing sequence DFEGFSYVNPQFVHPILQSSV from the human protein*	H: 1/500	Mouse	Sc-8393, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
GS (Clone GS-6)	The full protein purified from sheep brain.	H: 1/3000	Mouse	MAB302, Chemicon, Temecula, CA
Brn3 C-13	Synthetic sequence RQKQKRMKYSAGI from the human Brn3b protein (Poche et al., 2008).	H: 1/500	Goat	Sc-6026, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
PCNA, Clone PC10	Synthetic peptide containing sequence LVFEAPNQEK (Ino and Chiba, 2000).	H: 1/500	Mouse	M0879, Dako

*Based on the sequencing of the blocking peptide by Tandem Mass Spectrometry
H: immunohistochemistry; W: Western blot.

Table 1: Antibodies

Sequential co-labeling immunohistochemistry

For these experiments, the sections were labeled in a serial manner. The exposition to the first primary antibody was conducted as previously described, followed by incubation for 1h in a goat anti-Fab fragment (Brandon, 1985 - Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA). This allowed us to tag the first primary antibody as a goat rather than a rabbit. The sections were revealed with a secondary Alexa donkey anti-goat 488. Following that, they were exposed to a second primary antibody overnight, the latter revealed with an Alexa donkey anti-rabbit 555 the following day. This type of immuno-staining has been previously used on retinal tissues by Sherry (2003) as well as others. The markers that required this type of protocol were rabbit anti-recoverin (McGinnis et al., 1992a; McGinnis et al., 1997) and anti-cone-transducin (Johnson et al., 2001), co-labeled with rabbit anti-CB1R.

Antibody characterization

The antibodies used against the proteins comprising the endocannabinoid system studied here (NAPE-PLD, DAGL α , CB1R and FAAH) were not characterized before. Consequently, we tested their specificity by western blot using adult rat retina lysates. The full lane of immunoblot analyses are presented in panel A of Figure 1.

The anti-NAPE-PLD yielded a double band at around 50kDa. The anti-DAGL α reacted with a single band at 120kDa as described by the manufacturer and other authors (Suarez et al., 2008; Gao et al., 2010; Suarez et al., 2010).

The anti-CB1R reacted with a robust band at 53kDa and several very light ones below. This could either be due to the presence of several isoforms of the protein or to some degradation bands. Yazulla et al. (1999) reported the presence of a larger band at 160kDa and interpreted it as a dimer of CB1R in albino rats. We did

not observe this band with retinal homogenates from Long Evans rats. However, we did observe this band with mice homogenates (data not shown). This indicates that the presence of CB1R dimmers may be species and/or strain specific. The specificity of the CB1R antibody was also verified by immuno-labeling retinal tissue where the *cnr1* gene – the gene encoding for CB1R has been deleted (*cnr1*^{-/-} - Marsicano et al., 2002). These samples were generously provided by Dr Beat Lutz.

To ensure the closest possible match between wild type and *cnr1*^{-/-} C57BL/6J mice, Dr Lutz provided tissue from both wild type and knockout animals. Sections from both samples were processed together during the same experiment; pictures were taken under the same exact conditions and off-line processing was identical. The results are shown in panels B and C of Figure 1. The CB1R staining in wild type animals yields a clear signal throughout the retina (panel B), while no staining was visible in the knockout, with the exception of some feeble immunofluorescence in the GCL (panel C). We do not know whether it is due to remnants of the CB1R protein containing the epitope or to some non-specific staining. However, the intensity of immunoreactivity is extremely low when compared to that observed in wild type animals and can therefore be considered as negligible.

The antibody reacting with FAAH yielded a dense band at about 66kDa and a very light one below 37kDa. The other antibodies used have been previously characterized by others. NR2E3 protein is a photoreceptor-specific nuclear receptor that belongs to the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-modulated transcription factors (Kobayashi et al., 1999). The antibody rabbit anti-NR2E3 (Chemicon) reacts with a major double band at about 44kDa (manufacturer's technical information). This specific antibody was

used by Leu and Ouyang (2006) as a control for their retinal fractionation experiment.

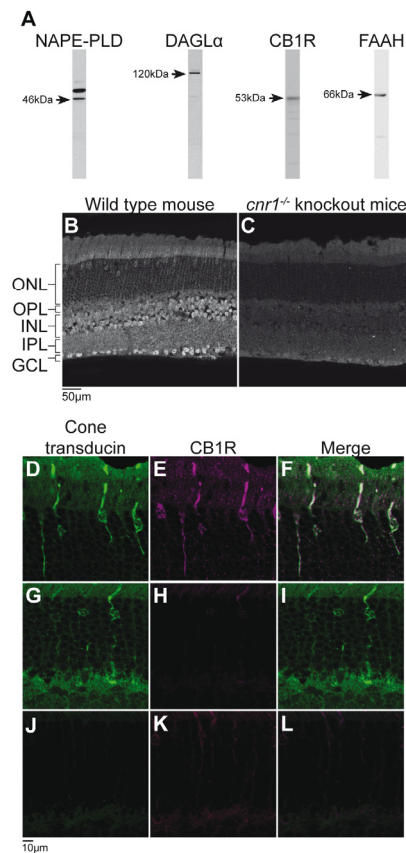


Figure 1: A: Immunoblots of NAPE-PLD, DAGL α , CB1R and FAAH immunoreactivities in the rat retina. B and C: CB1R immunoreactivity in the retina of a wild type and a *cnr1*^{-/-} mice D-L: Cone-transducin (D, G and J), CB1R (E, H and K) signals and their overlay (F, I and L) for the complete sequential protocol (panels D-F), for the control where the second primary antibody was omitted (panel G-I) and for the control where the first secondary and second primary antibodies were omitted (panel J-L).

GluR1 is expressed at the cell membrane and was used as a control for the proper separation of membranes during fractionation. Rabbit anti-GluR1 (Chemicon) was reported to react with the appropriate band at about 110kDa by Nicholson and Geinisman (2009).

The mouse anti-GAPDH (Clone GAPDH-71.1, Sigma) reacted with a single band at about 37kDa.

The protein PKC α is specifically expressed in rod bipolar cells and dopaminergic amacrine cells (Negishi et al., 1988) Mouse anti-PKC α (H7, Santa Cruz biotechnology was shown to exclusively recognize rod bipolar cells (Gaillard et al., 2008). These authors as well as others also reported that this antibody recognizes PKC α , a 80kDa protein (Nagar et al., 2009). The staining pattern we observed was similar to that reported in previous studies (Negishi et al., 1988; Ghosh et al., 2004; Gaillard et al., 2008; Morrow et al., 2008).

The protein syntaxin-1 was recognized as a specific marker of retinal amacrine and horizontal cells by several research teams (Barnstable et al., 1985; Nag and Wadhwa, 2001; Hirano et al., 2005; Li et al., 2010). Mouse anti-syntaxin (HPC-1; sigma) was recognized syntaxin-1, a 35kDa protein, from hippocampal, retinal and cortical neurons (Inoue et al., 1992). The staining pattern observed in the present study was similar to that formerly reported (Li et al., 2004; Voinescu et al., 2009).

The expression of glutamine synthetase in Müller cells was demonstrated by Riepe and Norenburg (1977). Chang et al, (2007) established that the mouse anti-GS antibody (Clone GS-6, Chemicon) was reacted with a single 45kDa protein in adult retinal tissue. The staining obtained with this antibody was comparable to that published elsewhere (Hojo et al., 2000; Gargini et al., 2007; Kim et al., 2008)

PCNA was chosen as a neuroblast and mitotic cell marker because it provides the least false positive and negative immunolabeling of neuroblasts and mitotic cells in the retina (Barton and Levine, 2008). The specificity of this mouse anti-PCNA (Clone PC10, Dako) was fully characterized by Waseem and Lane (1990) and others (Ino and Chiba, 2000); it recognized a single band at 36kDa.

Anti-Brn3 was used to identify retinal ganglion cells. The Brn3 antibody (Clone C-13, Santa Cruz Biotechnology) specifically recognizes three bands in Western blot corresponding to the three Brn3 family members, Brn3a at 53 kDa, Brn3b at 51kDa, and Brn3c at 42kDa (manufacturer's technical information). Its specificity for ganglion cells was demonstrated by Pan et al., (2005). The staining pattern obtained in the present study is similar to that found by others (Pan et al., 2005; Quina et al., 2005; Elshatory et al., 2007; Poche et al., 2008

A number of laboratories showed that recoverin is expressed in a subset of bipolar cells (Milam et al., 1993; McGinnis et al., 1997; Haverkamp and Wassle, 2000; Haverkamp et al., 2003). The immunoreactivity obtained in our study with the rabbit anti-recoverin antibody revealed a pattern of recoverin immunoreactivity identical to that described in the mouse retina (Haverkamp et al., 2003; Gargini et al., 2007; Acosta et al., 2008). This antibody (Chemicon) recognized a single 26kDa band (manufacturer's technical information), in accordance to the reported size of recoverin (Yan and Wiechmann, 1997).

Rabbit anti-cone transducin- α subunit (Santa Cruz Biotechnology) was used to identify cone photoreceptors. The specificity of this antibody was confirmed by pre-adsorption and western blot studies (Coleman et al., 2004); it recognizes a single band at 46kDa.

Validity of the sequential labeling

Validity of the sequential staining was verified for CB1R/Recoverin and CB1R/Cone-transducin co-labeling with two controls: 1) the second primary antibody was omitted yielding a strong staining with the goat secondary 488 but no staining with rabbit secondary 555; 2) The first secondary and second primary antibodies were omitted, yielding no signal for the goat secondary 488 and some low residual signal for the rabbit secondary 555. An example is presented in panels D-L of Figure 1 for CB1R and cone-transducin immunolabeling. The first line (Panels D-F) shows the immunostaining with complete protocol: clear signals for both cone-transducin (D) and CB1R (E) can be seen and this co-labeling shows that CB1R and cone-transducin signals overlap considerably (F). The second line (Panels G-I) illustrates the result of the first control for the same co-immunolabeling. As expected, there is a clear signal for cone-transducin (G and I) while very little staining for CB1R is visible (H and I). The last line (Panels J-L) presents the results for the second control where there is very little staining for both cone-transducin (J and L) and CB1R (K and L). Thus, these control data demonstrate that the sequential Fab fragment protocol remains specific even when there is a lot of overlap between two proteins.

Confocal microscopy

Pictures of the central retina (within 200 μ m of the optic nerve head) and the periphery were taken with a Leica TCS SP2 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Exton, PA), with a 40X objective. Matching images were captured in the Alexa fluo 555/546 and Alexa fluo 488/FITC channels at a definition of 2048*2048 pixels, pseudo colored, merged and exported using Leica LCS software (version 2.61). Throughout this study, retinal cell

markers are always presented in green while CB1R is shown in red. The images were taken sequentially to ensure no 'bleed-through' between channels. Images were selected to illustrate representative findings of the immunostaining at all ages studied. Pictures were pseudocolored in magenta with Adobe Photoshop (CS4). Contrast and brightness were adjusted when necessary using the same software.

No differences were observed in the CB1R expression between the center and the periphery of the retina, with the exception of the expected delay in development (Rapaport et al, 2004 and see Malicki, 2004 for review). Consequently, only pictures of the central retina are presented in the Result section.

When the co-expression of CB1R and retinal cell markers was ambiguous, the presence or absence of co-labeling was demonstrated by taking z-stacks with optimized steps. This allowed the visualization of the cells in the X-Y, X-Z and Y-Z axes, thereby confirming the expression or the lack of CB1R in specific cell types. An example of such analysis is shown in panel U of figure 6.

Results

Temporal and spatial patterns of expression of CB1R and associated enzymes

Western blot analysis

We investigated the temporal pattern of expression of four elements of the endocannabinoid system in the retina by evaluating the total amounts of CB1R, endocannabinoids synthesizing and degradative enzymes (NAPE-PLD, DAGL α and FAAH, respectively) at various postnatal time points from P1 to adult. Representative examples of each protein expression across the different ages are presented in panel A of figure 2. The lower blot shows the expression of the protein GAPDH and demonstrates equal loading in all lanes. The averaged measures \pm SEM, evaluated as the optical densities

(OD) of the bands, of CB1R, NAPE-PLD, DAGL α and FAAH are shown in panels B, C, D and E of Figure 2, respectively. All those proteins varied across development, but have different expression pattern. CB1R expression was fairly stable during the first two weeks. At the end of the second week, there was a sharp increase in the expression that reached a plateau at P19 and remained stable throughout the next developmental stages (P19, 21, 30, 45 and adult are significantly different from P1, Dunnett test, $p \leq 0.05$). The synthesizing and degradative enzymes did not exhibit the same pattern as CB1R. The NAPE-PLD expression was decreased at P21 and reached a plateau at P30 (NAPE-PLD levels at P30 and P45 are significantly different from P1, Dunnett test $p \leq 0.05$). DAGL α expression remained stable until P13, at which point it started to decrease reaching a minimum level at P45 (DAGL α levels at p45 are significantly different from P1, Dunnett test $p \leq 0.05$). The decrease in DAGL α concentration was extensive as it dropped by about half the amount measured at P1. On the other hand, the concentration of FAAH decreased over the first week of life reaching a minimum at P9 (its level is significantly different from P1, Dunnett test $p \leq 0.05$). This was followed by an increase in FAAH concentration during the second and third weeks, reaching a maximum at P15 (FAAH: P15, P19, and adult levels are significantly different from P1, Dunnett test, $p \leq 0.05$).

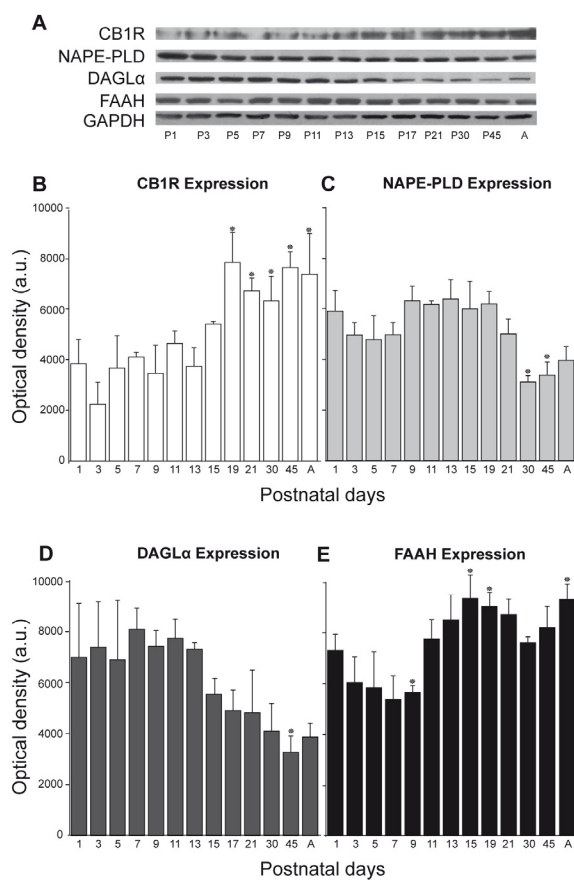


Figure 2: Representative examples of CB1R, NAPE-PLD, DAGL α , and FAAH expression during retinal development (A). Averaged variations of CB1R (\square B), NAPE-PLD (\blacksquare C), DAGL α (\blacksquare D) and FAAH (\blacksquare E) during retinal postnatal development and maturation as measured by Western blot analysis. Specific bands were seen at around 53kDa for CB1R, 46kDa for NAPE-PLD, 120kDa for DAGL α and 66kDa for FAAH. Retinas were collected from rats between P1 and adult. The quantifications were performed on three different sets of samples and mean optical densities \pm SEM in arbitrary units (a.u.) are presented for each age group. The statistical differences were assessed using a Dunnett test, * indicates a significant change compared with P1 ($p\leq 0.05$)

Immunohistochemistry

At birth, the retina is characterized by a neuroblast layer, plexiform and ganglion cell layers (NBL, IPL and GCL respectively). CB1R was already present: it was strongly expressed in the deepest and most superficial parts of the NBL, as well as in distinctive roundish cells located in the upper part of the NBL (Panel A, Figure 3). The remaining parts of the NBL and the IPL showed some fluorescence, although it was not very pronounced. CB1R was strongly expressed in the GCL. A similar pattern of expression was observed at P3 (Panel B).

Starting at P5, some photoreceptors in the forming ONL were immuno-positive for CB1R. Based on their small number, these cells were suspected to be cones (Panels C-D, Figure 3). A wave of CB1R expression appeared in the forming INL (Panel C), reaching the most superficial part of this layer between P7 and P9 (Panels D and E). This expression was of lower intensity than that of fully differentiated neurons located within the same layer. Around P7, there was also some immuno-fluorescence in the IPL and the forming OPL (Panel D).

By P9, CB1R was found in the outer segment of cones as well as their cell bodies, axons and synaptic pedicles (Panel E, Figure 3), the latter accounting for the most intense immuno-labeling in the OPL. CB1R was also present in cells equally distributed just below the forming OPL, a pattern suggestive of horizontal cells. By P11, CB1R expression started to decrease and become more diffuse in the upper part of INL (Panel F, Figure 3). In the IPL, the receptor expression increased, reaching a peak between P7 and P11, after which it decreased and remained stable over the rest of the period we studied.

By eye opening (P12-14), the retinal structure is basically complete, albeit still immature. During the weeks following eye

opening, there are several processes of maturation occurring, including synapse consolidation or elimination and cell death. CB1R expression remained stable in the ONL and OPL throughout this period. In particular, it was strongly expressed in the outer and inner segments, cell bodies, axons and synaptic pedicles of suspected cones (Panels G-L, Figure 3). In the INL, however, several changes can be seen. At P15, most cells in this layer are CB1R immunofluorescent, the cells closer to IPL being more intensely stained than those closer to the OPL (Panel H). By P21, the expression in the outer part of the INL becomes weaker and more diffuse, while it remains stable (i.e., strong) in its inner part (Panel I). One week later, at P30, expression in the whole INL becomes sparse as a number of cells throughout this layer turn immuno-negative for CB1R (Panel J). This expression profile is maintained over the following weeks (Panel K) until adulthood where only a few positive cells can be observed in the INL (Panel L).

In the GCL, the expression of CB1R remained constant and high from P1 to the adult.

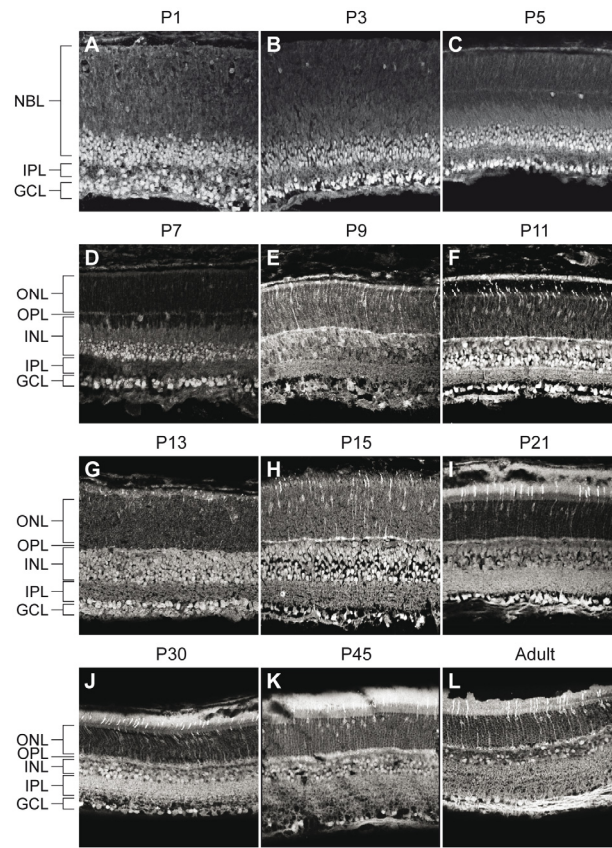


Figure 3: CB1R immunoreactivity in the developing rat retina. A-L: Vertical sections from P1 (A), P3 (B), P5 (C), P7 (D), P9 (E), P11 (F), P13 (G), P15 (H), P21 (I), P30 (J), P45 (K) and adult (L) rat retinas. For all ages, confocal images were obtained from a single focal plan. NBL, neuroblast layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar = 40 μ m.

Subcellular Fractionation

Careful examination of the retina of wild type mice (figure 1 panel A), indicated the absence of CB1R expression in the nuclei of the cells. The observation does not stand for the rat retina as CB1R immunolabeling appeared to be present in some nuclei of rat retinal cells (see for example, panel L in figure 3), which is surprising for a G-coupled protein receptor mainly implicated in neurotransmission modulation. To clearly establish the cellular compartments where CB1R was expressed, subcellular fractionation of adult rat retinas was conducted. Three fractions were isolated: the cytosol, nuclei contents, and membranes. The separation of the fractions was verified using GAPDH, NR2E3, and GluR1, respectively (see figure 4). The fractionation experiments indicated that CB1R was present in cytosolic and membranes compartments, but not in the nuclei fraction (upper blot). Based on this finding, we propose that the observed CB1R expression in some nuclei is most likely to result from our tissue preparation procedure which was characterized by light tissue fixation in order to preserve CB1R antigenicity. This sort of protein redistribution artifacts has been previously reported and associated with light fixation and permeabilization (Goldenthal et al., 1985; Melan and Sluder, 1992; Mayor and Maxfield, 1995; Cinar et al., 2006). The presence of this artifact has no impact on the study since we investigate CB1R expression within cell types rather than its subcellular distribution.

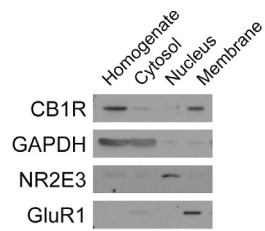


Figure 4: CB1R expression in different cell compartments in adult rat retina. The different cellular fractions were separated by successive centrifugations. The proper separation of the fraction was verified with GAPDH (cytoplasm), NR2E3 (nuclei) and GluR1 (membranes). CB1R was present in cytosol and membranes, but not in nuclei.

Cell types expressing CB1R

Early-born neurons

At birth, almost all horizontal, amacrine, ganglion cells, and cone photoreceptors are already differentiated (these neuron classes are called 'early-born neurons'- Morest, 1970; Rapoport et al., 2004), the remaining ones being generated early after P0 (Rapoport et al., 2004). We investigated the presence of CB1R in these early-born neurons. Horizontal cells expressing CB1R could be distinguished at P1, as shown in panels A-C of Figure 5 (asterisks). The expression in these cells was robust in the cell body and absent from the immature processes. At P5-7, most horizontal cells reached their final position underneath the emergent OPL. At this stage, the expression of CB1R was concentrated in the cell bodies (Panels D-F) and remained so over the maturation period and into adulthood (Panels G-U).

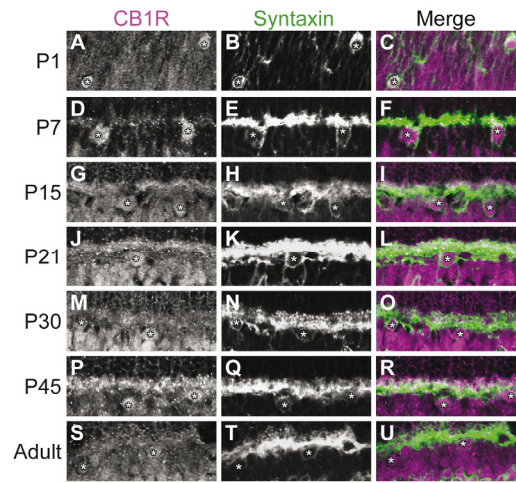


Figure 5 : CB1R immunoreactivity in horizontal cells in the developing rat retina. Vertical sections from P1 (A-C), P7 (D-F), P15 (G-I), P21 (J-L), P30 (M-O), P45 (P-R) and adult (S-U) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R and cell-type-specific marker for the retinal interneurons (horizontal and amacrine cells), syntaxin. Each protein is presented alone in gray scale: CB1R in the 1st column and syntaxin in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column – CB1R in magenta and syntaxin in green). Horizontal somas are immunopositive for CB1R (stars) at all ages. Scale bar = 10 μ m.

CB1R was also expressed in amacrine cells from P1 (Figure 6, Panels A-C). Despite some variations in the intensity of immunolabeling, virtually all amacrine cells expressed CB1R until P15 (Panels D-F). Of interest is the fact that some cells located for the most in the deepest part of the INL showed a transient expression of CB1R as they became immuno-negative (Panels G-I) at P15. CB1R immuno-negative amacrine cells were observed at every age after P15 and into adulthood (Panels J-U). To clearly confirm the absence of CB1R from all parts of these amacrine cells, an additional 3-D analysis was conducted at all ages. An example is shown in the adult in panel U; no CB1R expression was visible along the three axes. These “transient-expressing” CB1R amacrine cells may represent a single population of cells that stopped expressing the receptor at P15 or several cells’ populations that transiently ceased expressing CB1R at different time periods.

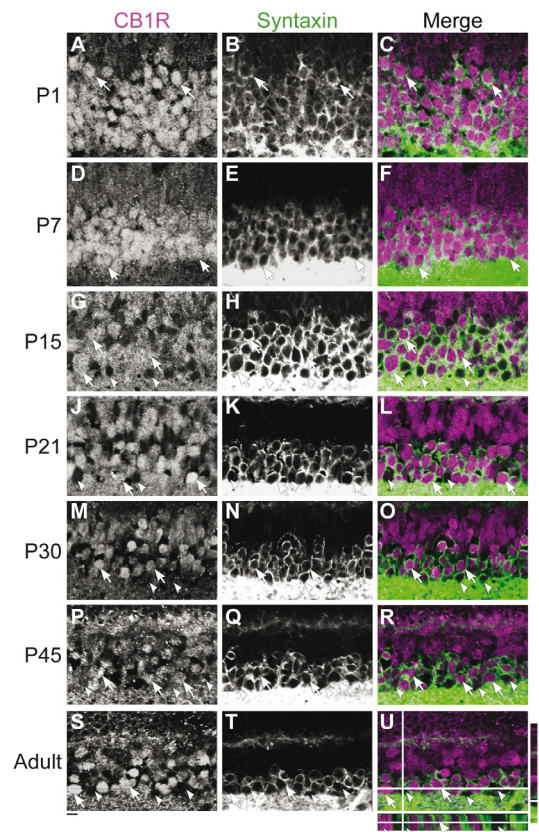


Figure 6 : Vertical sections from P1 (A-C), P7 (D-F), P15 (G-I), P21 (J-L), P30 (M-O), P45 (P-R) and adult (S-U) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R and cell-type-specific marker for the retinal interneurons (horizontal and amacrine cells), syntaxin. Each protein is presented alone in gray scale: CB1R in the 1st column and syntaxin in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column – CB1R in magenta and syntaxin in green). CB1R immunopositive and immunonegative amacrine cells are indicated by arrows and arrow heads, respectively. In panel U, the horizontal and vertical insets show the reconstruction of the section in the X-Z and Y-Z plans respectively, along the white lines.

Ganglion cells expressed CB1R in their cell bodies throughout the entire time interval we studied. Examples of this expression are shown in Figure 7. As expected from previous studies (e.g. Perry et al., 1983; Galli-Resta and Ensini, 1996) a decrease in the number of ganglion cells with age was observed. Although there was no visible change in CB1R expression in the soma of ganglion cells, there was an increase of immuno-fluorescence in their axon between P1 and P15, after which it remained stable (see panels A-H in Figure 3). It is also worth mentioning that GCL cells other than RGCs were also immuno-positive. These cells may be displaced amacrine cells.

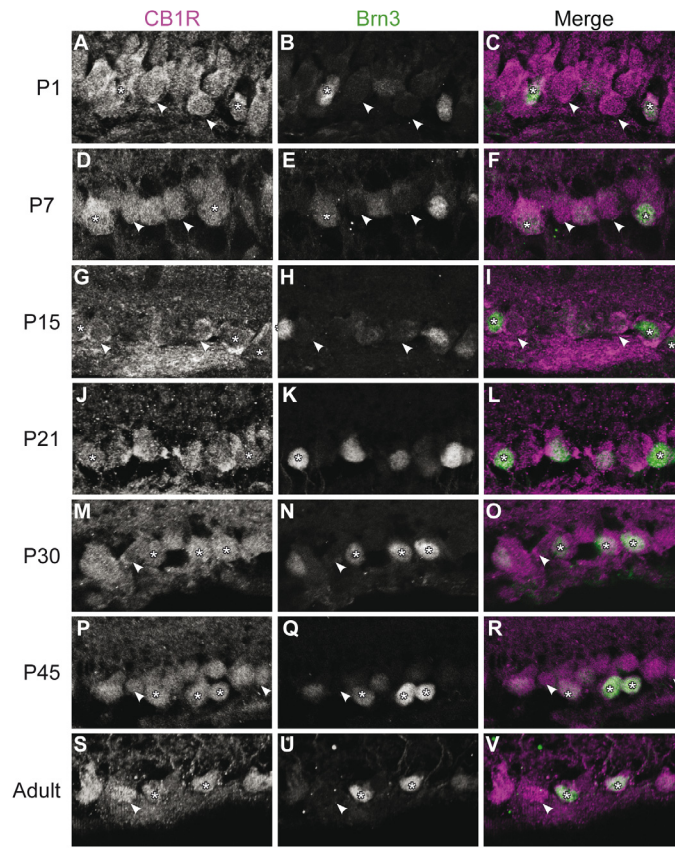


Figure 7: CB1R immunoreactivity in the ganglion cell layer in the developing rat retina. A-G: Vertical sections from P1 (A-C), P7 (D-F), P15 (G-I), P21 (J-L), P30 (M-O), P45 (P-R) and adult (S-V) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R and cell-type-specific marker for RGCs, Brn3. Each protein is presented alone in gray scale: CB1R in the 1st column and Brn3 in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column – CB1R in magenta and Brn3 in green). RGCs are immunopositive for CB1R (stars) at all ages. Other cells within the GCL (arrow heads), presumably displaced amacrine cells, are also immuno-positive for CB1R across all ages. Scale bar = 10 μ m.

Cones constitute the last class of early-born neurons to be generated in the retina (Rapaport et al., 2004). In these photoreceptors, CB1R was not expressed until P5 (see Panels A-C, Figure 3). Detailed pictures of CB1R expression in cones are presented in Panels A-N of Figure 8. Around P5, CB1R was present in the cell bodies (Panel A) and pedicles (Panel B). One can notice that the cone pedicles made synapses onto horizontal cells (Panel B). This neuronal contact was previously described by Rich et al (1997) in their study on early cone development. At P11, The somas of cones are still CB1R immuno-positive but off-positioned compared to adults (Panels C). A refinement of the cone pedicle, consistent with the completion of the cone-horizontal-bipolar triad can be also appreciated at this stage (Panels D). By P15, most cones have reached their final position in the ONL and they strongly expressed CB1R in all their cellular compartments (Panels E and F). Over the following weeks, CB1R expression remained high in the outer and inner segments, cell body, axon and pedicle of all cones throughout the investigated period (Panels G to N).

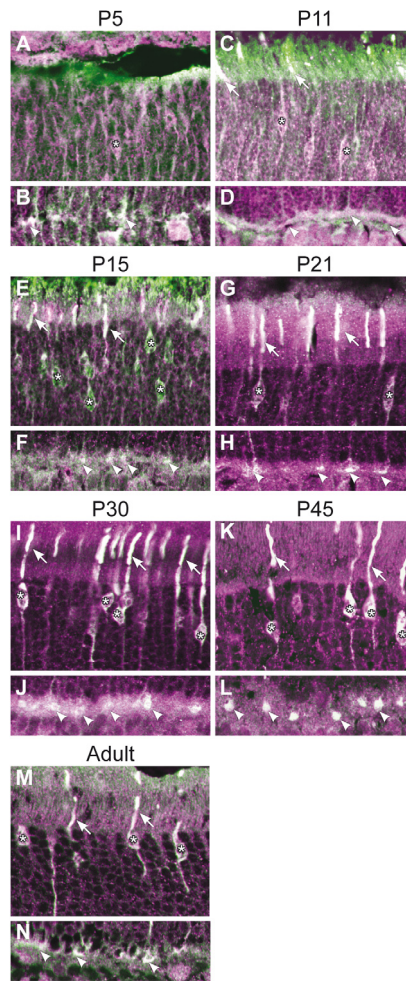


Figure 8 : CB1R immunoreactivity in cone photoreceptors in the developing rat retina. Vertical sections from P5 (A and B), P11 (C and D), P15 (E and F), P21 (G and H), P30 (I and J), P45 (K and L) and adult (M-N) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R (magenta) and cell-type-specific marker for the cones, cone-transducin (green). Cones become immunopositive for CB1R at P5 and remain so throughout development and into adulthood. CB1R is expressed in the outer (arrow) and inner segments of the cone, as well as the cell body (stars), the axon and the synaptic pedicle (arrow heads). Scale bar = 10 μ m.

Late-born neurons

During the first week of life, several developmental processes such as cell division, differentiation and migration overlap. Late-born neurons are generated from neuroblasts, mostly in the five to six days following birth. They give rise to bipolar cells, rod photoreceptors, and Müller cells (Morest, 1970; Rapaport et al., 2004).

At P1, the retina contained neuroblasts and dividing cells, the latter were identified by to their morphology and position at the outer edge of the NBL (Baye and Link, 2007; Barton and Levine, 2008 and see Baye and Link, 2008 for review). Mitotic cells were CB1R positive, while neuroblasts were very lightly stained (Panels A and B, Figure 9). The same pattern of expression was visible at P3, although the number of dividing cells was lower (Panels C and D). At P5, there were only a few mitotic cells. Some of the neuroblasts located in the inner part of the emergent INL displayed an increase in CB1R immuno-fluorescence while those closer to the developing OPL did not express the receptor (Panels E and F). At P7, the few neuroblasts still present showed a light immuno-fluorescence for CB1R (Panels G and H).

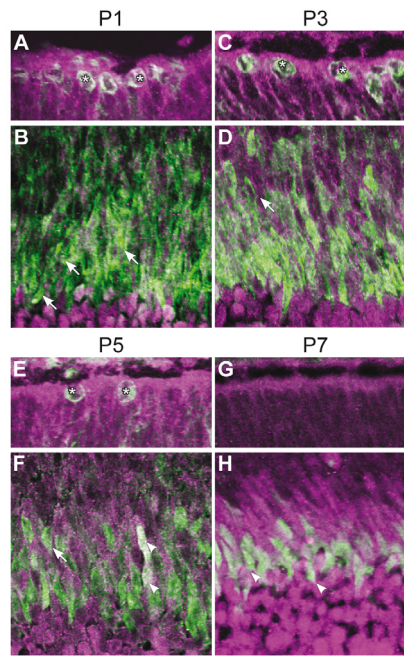


Figure 9 : CB1R immunoreactivity in retinal progenitor (B, D, F and H) and mitotic cells (A, C, E and G) in the developing rat retina. Vertical sections from P1 (A and B), P3 (C and D), P5 (E and F), P7 (G and H) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R (magenta) and cell-type-specific marker for the retinal progenitor and mitotic cells, PCNA (green). Mitotic cells (stars) are CB1R positive as long as they exist in the postnatal period, namely until P5-6. Most neuroblasts are not CB1R positive (arrows). Some neuroblasts closer to the IPL are immunolabeled for CB1R (arrows heads) and their number increases until they are all immunopositive for CB1R at P7. Scale bar = 10 μ m.

The expression of CB1R in rod bipolar cells is presented in figure 10. Before P5, there were a few PKC positive cells that could be either rod bipolar or amacrine cells. These cells could not always be told apart because most rod bipolar cells had not yet reached their final location. An example at P3, where they could be told apart, is presented in panel A-C of figure 10. The cell identified by an arrowhead exhibited immuno-fluorescence level comparable to the surrounding neuroblasts. Based on its location, the unit is likely a rod bipolar cell. On the other hand, the cell identified by the arrow was strongly CB1R positive and, given its location and morphology, was considered to be an amacrine cell. Between P5 and P9, neurons in the INL closer to the IPL were CB1R positive while those near the OPL were immuno-negative (Panel D-F, Figure 10). This upregulation of CB1R expression in the intermediate but not the most superficial part of the INL is consistent with the wave of expression described in panels C and D of Figure 3 at P5 and 7. During the second week of life (P15), CB1R labeling signal increased (Panel G-I, Figure 10), yielding a diffuse and variable expression in the upper part of the INL across animals. By the end of the third week (P21 – Panel J-L), the CB1R expression in rod bipolar somas was decreased and at P30 (Panel M-O), no labeling of cell body structure could be seen and only low and diffuse immuno-fluorescence was present. The latter could represent either some background noise or a weak signal. The fact that the CB1R antibody yielded almost no background in the KO mice (Figure 1, panels A and B) suggests that the immuno-fluorescence is likely to come from CB1R expression in bipolar cells. At P45 and in adults (Panels P-U), no receptor expression was visible in the somas, but some signal was detectable in the OPL at the level of the bipolar cells' dendrites. The white pixels were concentrated at the edges of the dendrites (Panel R), and careful

observation demonstrated that CB1R was outside the postsynaptic elements (i.e. bipolar cells).

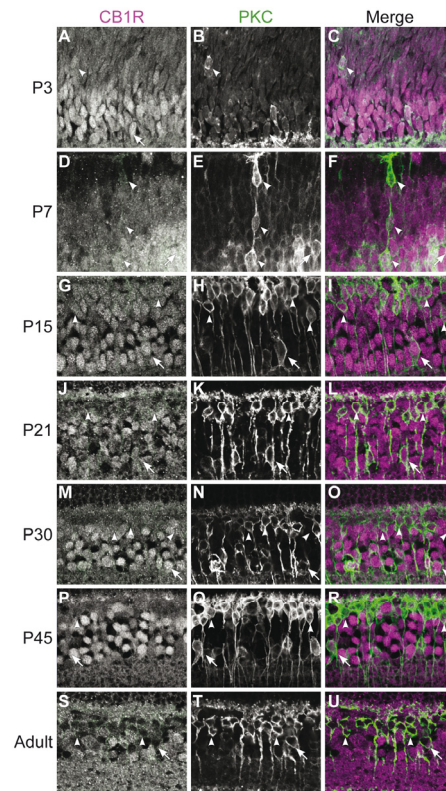


Figure 10 : CB1R immunoreactivity in rod bipolar and some amacrine cells in the developing rat retina. Vertical sections from P3 (A-C), P7 (D-F), P15 (G-I), P21 (J-L), P30 (M-O), P45 (P-R) and adult (S-U) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R and cell-type-specific marker for the rod bipolar and a subtype of amacrine cells, PKC α . Each protein is presented alone in gray scale: CB1R in the 1st column and PKC α in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column -CB1R in magenta and PKC α in green). During their migration period, rod bipolar cells express CB1R when they are closer to the IPL (A and B, arrow heads) and become CB1R positive between P9 and P21 (C and D, arrow heads), after which they progressively lose CB1R labeling (E, F and G, arrow heads). PKC α positive amacrine cells are CB1R immuno-labeled throughout until P30 (A to E, arrows). Throughout the second month of life, CB1R appears to be more concentrated at the membrane of PKC α positive amacrine cells (F and G, arrows). Scale bar = 10 μ m.

CB1R expression in recoverin positive bipolar cells was also investigated. Recoverin positive bipolar cells are type 2 ON and type 8 OFF-cone bipolar cells (McGinnis et al., 1992a; 1992b; 1997). These bipolar cells were not clearly discernable from rods until the OPL was formed i.e. around P5-P7 as previously reported by Sharma et al (2003). At P7, only a subpopulation of recoverin positive cells in the INL was expressing CB1R (Panel A-C, Figure 11). One can ask whether the bipolar cells which are not expressing CB1 are indeed lacking the receptor or are not yet expressing CB1R because they are still at an early developmental stage. The last suggestion seems more likely since all recoverin positive bipolar cells at P21, P30, P45 and in adults express CB1R (Panels D-R, Figure 11).

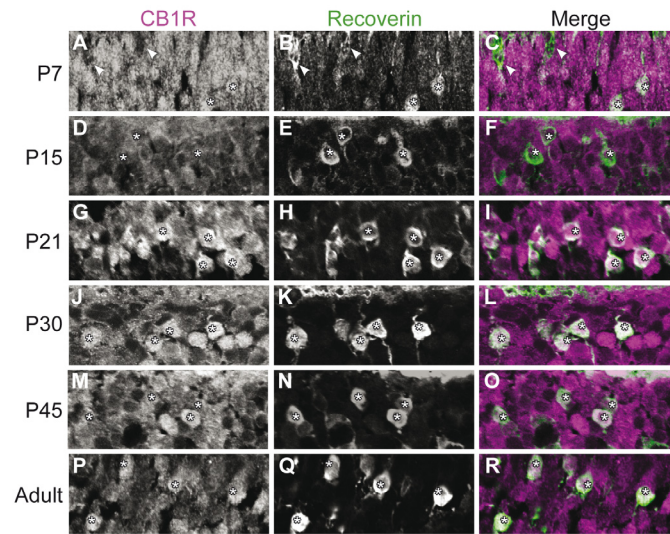


Figure 11 : CB1R immunoreactivity in types 2 and 8 cone bipolar cells in the developing rat retina. Vertical sections from P7 (A-C), P15 (D-F), P21(G-I), P30 (J-L), P45 (M-O) and adult (P-R) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R and cell-type-specific marker for the types 2 and 8 of cone bipolar cells, recoverin. Each protein is presented alone in gray scale: CB1R in the 1st column and recoverin in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column - CB1R in magenta and recoverin in green). During their migration period, cone bipolar cells are not discernable prior to P7 with this marker. At P7, some cone bipolar cells express CB1R when they are closer to the IPL (stars – A to C) while some, closer to the OPL, do not (arrow head – A to C). At older ages, all recoverin positive bipolar cells are CB1R positive (stars). Scale bar = 10 μ m.

Rods constitute the vast majority of photoreceptors in the rat's retina. We showed in Figure 3 that only a few photoreceptors were CB1R positive and suggested that these cells were cones. This was verified using a cone specific marker. Only these cone-transducin labeled cells expressed CB1R (Figure 7). These data indicate that rods do not express CB1R at any age.

Müller cells are generated late in development and begin to express GS around P5 (Riepe and Norenberg, 1978). Müller cells were clearly distinguishable at P5 and already expressed CB1R in their cell bodies and processes (from P5 to P9 – see example at P7 in panels A-C, Figure 12). From P9, CB1R was down regulated in these cells (see the weak immuno-fluorescence at P15, panel D-F) and its expression could not be distinguished from the background at P21 and after (Panels G-R).

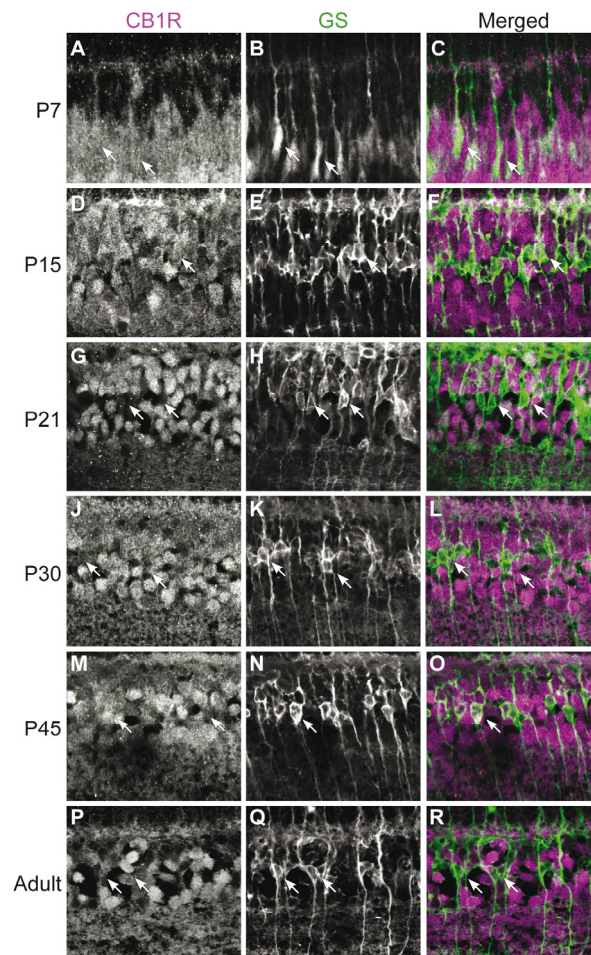


Figure 12 : CB1R immunoreactivity in Müller cells in the developing rat retina. A-F: Vertical sections from P7 (A-C), P15 (D-F), P21 (G-I), P30 (J-L), P45 (M-O) and adult (P-R) rat retinas. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R and cell-type-specific marker for glial Müller cells, glutamine synthetase (GS). Each protein is presented alone in gray scale: CB1R in the 1st column and GS in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column - CB1R in magenta and GS in green). This marker becomes visible in Müller cells around P5 and is well discernable at P7. At P7 Müller cells express CB1R (A to C, arrows) but they become CB1R negative at older ages (P21 – Adult; arrows). Scale bar = 10µm.

Discussion

This study is the first to investigate the postnatal development of CB1R expression in the main cell types of the rodent retina. Using immunohistological staining and immunoblots, we demonstrated that both the localization and total amount of CB1R vary during postnatal development and maturation of the retina of Long-Evans rats. Our data showed evidence of an early and widespread expression of CB1R i.e. most cell types expressed the receptor, either transiently or permanently. Starting at P1, CB1R was expressed by all early-born neurons, except cones. As development occurred, CB1 receptors appeared in cone photoreceptors and bipolar cells. Rod bipolar cells displayed a transient expression of CB1R between P5 and P21, whereas recoverin positive cone bipolar cells started expressing CB1R around the end of the 1st week of life and remained CB1R positive into adulthood. Overall, these data, and particularly the transient nature of the expression of CB1R in some cell types, suggest that the endocannabinoid system is involved in developmental and/or maturational processes.

Temporal expression of the endocannabinoid system

As expected, retinal immunoblots revealed a CB1R band at around 53kDa consistent with its nonglycosylated monomer form reported in rodent and human retinal tissues (Yazulla et al., 1999; Porcella et al., 2000). In the present study, we observed that CB1R expression was age dependent, going from a lower to a higher concentration between the second and third weeks of life. An increase in concentration of the receptor during development has also been reported in brain structures such as the striatum (Rodriguez de Fonseca et al., 1993), hippocampus (Berrendero et al., 1999), cerebellum (McLaughlin and Abood, 1993; Belue et al.,

1995; Berrendero et al., 1999) and the cerebral cortex (Berrendero et al., 1999). Our data are in agreement with these studies, indicating an upregulation of CB1R expression in the rodent CNS during postnatal development.

In contrast to classical neurotransmitters, endocannabinoids, being lipophilic compounds, are not stored in vesicles. They are rather produced locally at the moment of their intended action. This model places both biosynthetic and degradative enzymes as key regulators of lipid signaling. The level of an endogenous CB1R ligand depends on both the activity and genetic expression of these enzymes. We investigated one aspect of this equation by studying the temporal expression of the biosynthetic and degradative enzymes. NAPE-PLD, DAGL α and FAAH bands were found at around 46kDa, 120kDa and 66kDa, respectively, in agreement with previous observations in other structures in the CNS (Cravatt et al., 1996; Egertova et al., 1998; Yazulla et al., 1999; Cravatt et al., 2001; Okamoto et al., 2004; Rimmerman et al., 2008). Our data demonstrated that the expression of FAAH decreased during the first week of life, whereas the expression of NAPE-PLD and DAGL α remained stable, suggesting that the concentration of endocannabinoids increased over this period. This possibility is supported by the fact that AEA level increases during postnatal development in brain areas (Berrendero et al., 1999; Ade and Lovinger, 2007). During the second week of life, FAAH increased while both synthetic enzymes remained stable, suggestive of a reduction in endocannabinoids concentration. The age-dependency of the NAPE-PLD and FAAH expression was also observed in brain areas (Thomas et al., 1997; Morishita et al., 2005), albeit the temporal pattern of expression in these structures differed from the one we observed in the retina (e.g. steady increase until P30 for NAPE-PLD and until P10 for FAAH).

CB1R expression during retinal development

The various phases of retinal postnatal development in mice and rats have been previously described in much detail by several groups, using immunohistochemical and cell dating techniques (Fletcher and Kalloniatis, 1997; Sharma et al., 2003; Rapoport et al., 2004). The chronology of the postnatal events observed here is in total agreement with the above-mentioned studies. Briefly, at birth the retina is comprised of the NBL (which contains undifferentiated neuroblasts, immature cones, interneurons - e.i. horizontal and amacrine cells - and a few rods), the IPL, and the ganglion cell layer (which also includes displaced amacrine cells). During the first week of life, bipolar, Müller cells and rods are generated (Fletcher and Kalloniatis, 1997; Sharma et al., 2003; Rapoport et al., 2004). During the same time interval, early-born neurons continue to mature; one example would be cone photoreceptors which establish synaptic contacts with horizontal cells by P5 and complete the cone-horizontal-bipolar triad by P10 (this study; Rich et al., 1997; Hack et al., 2002).

RGCs and amacrine cells

CB1R was expressed in most early-born neurons as early as P1. This is in line with other studies which revealed the presence of CB1R mRNA in RGCs at E15 in rats (Buckley et al., 1998) and at E18 in chicks (Begbie et al., 2004). CB1R immuno-fluorescence remained constant in RGCs' soma from P1 to P15, but increased in RGCs axons in the nerve fiber layer during the same period (data not shown). This is consistent with the presence of CB1R along the retino-thalamic pathway during postnatal development (Argaw et al, 2008) and the contribution of endocannabinoids in RCGs growth cone navigation and proper targeting, both *in vivo* and *in vitro* (Argaw et al, 2009).

CB1R expression stayed constant in most amacrine cells throughout development. For the remaining cells, it was transiently expressed (CB1R-negative amacrine cells appearing around P15), suggesting that, for these units, CB1R expression is only related to developmental processes (see the section on Functional considerations).

Cones and horizontal cells

CB1R was present in horizontal cells as early as P1 and remained stable throughout the entire postnatal development and into adulthood. CB1R appeared later in cones (around P5), in their cell bodies and pedicles. These findings are in agreement with previous observations made in adult animals. For instance, the presence of CB1R in horizontal cells was demonstrated in the retina of adult albino rats by Yazulla et al. (1999). The receptor's expression in cone terminals was reported in a number of species i.e. chick (Leonelli et al., 2005), goldfish (Struik et al., 2006), salamander (Straiker and Sullivan, 2003), rat (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999), mouse (Straiker et al., 1999; Yazulla, 2008), and monkey (Straiker et al., 1999). Thus, the presence of CB1R in cone pedicles across species suggests that the contribution of this receptor in cone functioning was conserved during evolution. Given the role of CB1R in retrograde signaling (see for review Kreitzer and Regehr, 2002), its appearance in cone synapses at P5, i.e. five days prior to the emergence of the postsynaptic component of the cone-horizontal-bipolar triad (Rich et al., 1997; Hack et al., 2002), is rather intriguing. However, the timing of CB1R expression coincides with the appearance of the first cone-horizontal cells synapses in the forming OPL (Rich et al, 1997; Dhingra et al., 1997; Hack et al, 2002). Thus, the receptor may be necessary to refine synaptic connections between these two cell types. In support of this assumption, cone

photoreceptors are known to modulate the organization of horizontal cell dendritic trees through early glutamatergic activation (starting around P2 - Raven et al, 2008). Also, endocannabinoids synthesis is known to be activity-dependent (see Freund et al., 2003 for review) and CB1R was shown to negatively modulate glutamatergic release from cones in goldfish retina through retrograde signalling (Fan and Yazulla, 2007). The synaptic refinement can also originate from horizontal cells. Around P5, these cells transiently contain GABA (Schnitzer and Rusoff, 1984; Fletcher and Kalloniatis, 1997) and its release was shown to be modulated by CB1R in embryonic retinal interneurons (Warrier and Wilson, 2007). Moreover, GABA release from horizontal cells can modulate cone photoreceptor synaptogenesis in rabbits (Fletcher and Kalloniatis, 1997; Mitchell et al., 1999) and cone mosaic organization in mice (Fei, 2003). This cumulated data places CB1R in a strategic position to modulate synaptogenesis of both cones and horizontal cells, a role demonstrated in the hippocampus by Kim and Thayer (2001). The role of CB1R may not be limited to synaptogenesis. It has been shown that cones are displaced and migrate back to their position between P4 and 12 (Rich et al., 1997). CB1R may be involved in this process as well since it can influence cell migration (Song and Zhong, 2000; Berghuis et al., 2007; Mulder et al., 2008).

CB1R expression in late-born cells

All groups of late-born cells, except rods, expressed CB1R around P5-P9, a period which corresponds to developmental processes such as cell migration, subtype identity acquisition and morphological changes (Sharma et al., 2003; Bramblett et al., 2004; Morgan et al., 2006; Schroeter et al., 2006). However, not all cells in each group were labeled. Neuroblasts expressed CB1R relatively

late (around P5) and only cells closer to the IPL were labeled. The other neuroblasts did not express CB1R. Likewise, recoverin and PKC positive bipolar cells closer to the IPL were immunopositive around P7, while those closer to the OPL were not expressing CB1R. CB1R was transiently expressed in Müller cells during cell migration (P5-P7). These observations suggest that this receptor is likely involved in the cell migration and morphological changes of rod bipolar and Müller cells. A similar statement can be made for cone bipolar cells, but in this case CB1R could also be involved in subtype identity acquisition. A contribution of CB1R in these developmental stages has been reported in the hippocampus and in cultured cortical neurons (Gomez et al., 2003; 2007; 2008a; 2008b; Harkany et al., 2008; Mulder et al., 2008).

It should be noted that CB1R expression in rod bipolar cells was difficult to analyze in late postnatal development (after P15) because it became diffuse and variable. A previous study (Straiker et al., 1999) also reported the intricacy in identifying the presence of CB1R expression in this cell type using immunohistochemical techniques. These authors were however able to demonstrate its presence with electrophysiological techniques. This could indicate that, in this cell type, CB1R antigenicity is very sensitive to fixation process. Given that the antibodies used in this study and in Straiker et al. (1999) were raised against the same portion of the protein (amino acids 1-77), another possible explanation would be that CB1R adopts a conformation that makes the epitope less accessible to these antibodies.

Functional considerations

During the first week of life, spontaneous activity could be an important mechanism by which visual map refinement occurs in

thalamic nuclei (McLaughlin et al., 2003; Syed et al., 2004; Torborg and Feller, 2005; Zheng et al., 2006). Spontaneous discharges have been shown to originate from amacrine and ganglion cells (Masland et al., 1984; Tauchi and Masland, 1984; Feller et al., 1996; Zhou, 1998; Bansal et al., 2000; Sernagor et al., 2000; Wong et al., 2000; Zhou and Zhao, 2000; Stacy et al., 2005; Zheng et al., 2006), two cell types expressing CB1R during the first week of life. Given that both endocannabinoid synthesis and function are modulated by neural activity (see for review Freund et al., 2003), one can propose that a propagating wave of spontaneous activity could cause local changes in endocannabinoids concentration, which would in turn limit the spread of spontaneous activity through CB1R activation. This could be mediated by amacrine cells given that these cells negatively modulate spontaneous retinal waves (Wang et al., 2007) and that endocannabinoid system modulates spontaneous neurotransmitter release in embryonic GABAergic amacrine cell cultures (Warrier and Wilson, 2007).

The proposal that endocannabinoids can modulate spontaneous activity and therefore be involved in the establishment (or refinement) of topographic maps, would be in line with the findings of two previous studies. In the first, the exogenous activation of endocannabinoid signaling in the developing hippocampus caused an abnormal shutdown of neural activity while its down-regulation yielded epileptic activity (Bernard et al., 2005). In the second study, the abnormal activation of CB1R during the critical period caused abnormal maps in the somatosensory cortex in rodents (Li et al., 2009). Altogether, these studies, including ours, place the endocannabinoid system into a strategic position to negatively modulate retinal patterned activity and support the notion that CB1R could be important for the normal organization of visual thalamic nuclei afferents.

Acknowledgements. This work was supported by a FRSQ Vision Network grant to JFB and CC and by a NSERC grant (**194670-2009**) to CC and a CIHR grant (**MOP-177796**) to JFB. NZ was supported by a CIHR-E.A. Baker Foundation scholarship. J.F.B. is a scholar of Rx&D-CIHR Health Research Foundation. We are grateful to Beat Lutz for providing the *CB1R* transgenic tissue and Denis Boire for comments on a draft of the manuscript. We also would like to thank Michel Cayouette for his assistance in the choice of the antibodies.

References

- Acosta ML, Bumsted O'Brien KM, Tan SS, Kalloniatis M. 2008. Emergence of cellular markers and functional ionotropic glutamate receptors on tangentially dispersed cells in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 506(3):506-523.
- Ade KK, Lovinger DM. 2007. Anandamide regulates postnatal development of long-term synaptic plasticity in the rat dorsolateral striatum. *J Neurosci* 27(9):2403-2409.
- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I. 2005. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19(12):1704-1706.
- Argaw, A., Duff, G., Ptito, M., and Bouchard, J.-F. Contribution of the endocannabinoid CB1 receptor during axon guidance Program No. 624.1/B38. *Neuroscience (2008) Abstracts*. Washington, Dc: Society for Neuroscience, [2008]. Online.
- Argaw, A., Duff, G., Tea, N., Ptito, M., and Bouchard, J.-F. The endocannabinoid system modulates axon guidance and target selection during development. Program No. 129.8/B29. *Neuroscience (2009) Abstracts*. Chicago, IL: Society for Neuroscience, [2009]. Online.
- Bansal A, Singer JH, Hwang BJ, Xu W, Beaudet A, Feller MB. 2000. Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal waves in forming ON and OFF circuits in the inner retina. *J Neurosci* 20(20):7672-7681.
- Barker PA, Shooter EM. 1994. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13(1):203-215.
- Barnstable CJ, Hofstein R, Akagawa K. 1985. A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res* 352(2):286-290.
- Barton KM, Levine EM. 2008. Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. *Dev Dyn* 237(3):672-682.

- Baye LM, Link BA. 2007. Interkinetic nuclear migration and the selection of neurogenic cell divisions during vertebrate retinogenesis. *J Neurosci* 27(38):10143-10152.
- Baye LM, Link BA. 2008. Nuclear migration during retinal development. *Brain Res* 1192:29-36.
- Begbie J, Doherty P, Graham A. 2004. Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. *J Anat* 205(3):213-218.
- Belue RC, Howlett AC, Westlake TM, Hutchings DE. 1995. The ontogeny of cannabinoid receptors in the brain of postnatal and aging rats. *Neurotoxicol Teratol* 17(1):25-30.
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T. 2005. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(52):19115-19120.
- Berghuis P, Rajniecek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T. 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science (New York, NY)* 316(5828):1212-1216.
- Bernard C, Milh M, Morozov YM, Ben-Ari Y, Freund TF, Gozlan H. 2005. Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26):9388-9393.
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ. 1999. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33(3):181-191.
- Bramblett DE, Pennesi ME, Wu SM, Tsai MJ. 2004. The transcription factor Bhlhb4 is required for rod bipolar cell maturation. *Neuron* 43(6):779-793.
- Brandon C. 1985. Improved immunocytochemical staining through the use of Fab fragments of primary antibody, Fab-specific second antibody, and Fab-horseradish peroxidase. *J Histochem Cytochem* 33(7):715-719.

- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. 1998. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82(4):1131-1149.
- Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY. 2007. Reactive changes of retinal astrocytes and Muller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *J Anat* 210(1):54-65.
- Cinar O, Semiz O, Can A. 2006. A microscopic survey on the efficiency of well-known routine chemical fixatives on cryosections. *Acta Histochem* 108(6):487-496.
- Coleman JE, Zhang Y, Brown GA, Semple-Rowland SL. 2004. Cone cell survival and downregulation of GCAP1 protein in the retinas of GC1 knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(10):3397-3403.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. 2001. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16):9371-9376.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384(6604):83-87.
- Deutsch DG, Chin SA. 1993. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochemical pharmacology* 46(5):791-796.
- Dhingra NK, Ramamohan Y, Raju TR. 1997. Developmental expression of synaptophysin, synapsin I and syntaxin in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res* 102(2):267-273.
- Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. 1998. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* 265(1410):2081-2085.
- Elshatory Y, Deng M, Xie X, Gan L. 2007. Expression of the LIM-homeodomain protein *Isl1* in the developing and mature mouse retina. *J Comp Neurol* 503(1):182-197.
- Fan SF, Yazulla S. 2003. Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci* 20(2):177-188.

- Fan SF, Yazulla S. 2007. Retrograde endocannabinoid inhibition of goldfish retinal cones is mediated by 2-arachidonoyl glycerol. *Vis Neurosci* 24(3):257-267.
- Fei Y. 2003. Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice. *Mol Vis* 9:31-42.
- Feller MB, Wellis DP, Stellwagen D, Werblin FS, Shatz CJ. 1996. Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science (New York, NY)* 272(5265):1182-1187.
- Fletcher EL, Kalloniatis M. 1997. Localisation of amino acid neurotransmitters during postnatal development of the rat retina. *J Comp Neurol* 380(4):449-471.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83(3):1017-1066.
- Fride E. 2008. Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:75-81.
- Galli-Resta L, Ensini M. 1996. An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J Neurosci* 16(7):2318-2324.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzman M. 2006. Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr Pharm Des* 12(18):2319-2325.
- Gaillard F, Bonfield S, Gilmour GS, Kuny S, Mema SC, Martin BT, Smale L, Crowder N, Stell WK, Sauve Y. 2008. Retinal anatomy and visual performance in a diurnal cone-rich laboratory rodent, the Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Comp Neurol* 510(5):525-538.
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, Shen R, Zhang MY, Strassle BW, Lu P, Mark L, Piesla MJ, Deng K, Kouranova EV, Ring RH, Whiteside GT, Bates B, Walsh FS, Williams G, Pangalos MN, Samad TA, Doherty P. 2010. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30(6):2017-2024.
- Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E. 2007. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant

- mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol* 500(2):222-238.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wassle H. 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469(1):70-82.
- Gomez M, Hernandez M, Fernandez-Ruiz J. 2007. The activation of cannabinoid receptors during early postnatal development reduces the expression of cell adhesion molecule L1 in the rat brain. *Brain Res* 1145:48-55.
- Gomez M, Hernandez M, Fernandez-Ruiz J. 2008a. Cannabinoid signaling system: does it play a function in cell proliferation and migration, neuritic elongation and guidance and synaptogenesis during brain ontogenesis? *Cell Adh Migr* 2(4):246-248.
- Gomez M, Hernandez M, Johansson B, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. 2003. Prenatal cannabinoid and gene expression for neural adhesion molecule L1 in the fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 147(1-2):201-207.
- Gomez M, Hernandez ML, Pazos MR, Tolon RM, Romero J, Fernandez-Ruiz J. 2008b. Colocalization of CB1 receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development: evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance. *Neuroscience* 153(3):687-699.
- Goldenthal KL, Hedman K, Chen JW, August JT, Willingham MC. 1985. Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *J Histochem Cytochem* 33(8):813-820.
- Hack I, Koulen P, Peichl L, Brandstatter JH. 2002. Development of glutamatergic synapses in the rat retina: the postnatal expression of ionotropic glutamate receptor subunits. *Vis Neurosci* 19(1):1-13.
- Haque ME, Thomas KJ, D'Souza C, Callaghan S, Kitada T, Slack RS, Fraser P, Cookson MR, Tandon A, Park DS. 2008. Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(5):1716-1721.
- Harkany T, Keimpema E, Barabas K, Mulder J. 2008. Endocannabinoid functions controlling neuronal specification

- during brain development. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2 Suppl 1):S84-90.
- Haverkamp S, Ghosh KK, Hirano AA, Wassle H. 2003. Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *J Comp Neurol* 455(4):463-476.
- Haverkamp S, Wassle H. 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424(1):1-23.
- Herkenham M. 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. *NIDA Res Monogr* 112:129-145.
- Hill MN, Kambo JS, Sun JC, Gorzalka BB, Galea LA. 2006. Endocannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal cell proliferation and activation of defensive behaviours. *Eur J Neurosci* 24(7):1845-1849.
- Hirano AA, Brandstatter JH, Brecha NC. 2005. Cellular distribution and subcellular localization of molecular components of vesicular transmitter release in horizontal cells of rabbit retina. *J Comp Neurol* 488(1):70-81.
- Hojo M, Ohtsuka T, Hashimoto N, Gradwohl G, Guillemot F, Kageyama R. 2000. Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina. *Development* 127(12):2515-2522.
- Ino H, Chiba T. 2000. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 78(1-2):163-174.
- Inoue A, Obata K, Akagawa K. 1992. Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J Biol Chem* 267(15):10613-10619.
- Johnson PT, Williams RR, Reese BE. 2001. Developmental patterns of protein expression in photoreceptors implicate distinct environmental versus cell-intrinsic mechanisms. *Vis Neurosci* 18(1):157-168.
- Kanda A, Swaroop A. 2009. A comprehensive analysis of sequence variants and putative disease-causing mutations in photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3. *Mol Vis* 15:2174-2184.
- Kim D, Thayer SA. 2001. Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 21(10):RC146.

- Kim DS, Ross SE, Trimarchi JM, Aach J, Greenberg ME, Cepko CL. 2008. Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine retina. *J Comp Neurol* 507(5):1795-1810.
- Kobayashi M, Takezawa S, Hara K, Yu RT, Umesono Y, Agata K, Taniwaki M, Yasuda K, Umesono K. 1999. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9):4814-4819.
- Kreitzer AC, Regehr WG. 2002. Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr Opin Neurobiol* 12(3):324-330.
- Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME. 2006. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* 12:1160-1166.
- Leonelli M, Britto LR, Chaves GP, Torrao AS. 2005. Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Brain Res Dev Brain Res* 156(2):176-182.
- Leu S, Ouyang P. 2006. Spatial and temporal expression profile of pinin during mouse development. *Gene Expr Patterns* 6(6):620-631.
- Li L, Bender KJ, Drew PJ, Jadhav SP, Sylwestrak E, Feldman DE. 2009. Endocannabinoid signaling is required for development and critical period plasticity of the whisker map in somatosensory cortex. *Neuron* 64(4):537-549.
- Li S, Mo Z, Yang X, Price SM, Shen MM, Xiang M. 2004. Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* 43(6):795-807.
- Li Y, Zheng H, Liu PP, Chen YY, She ZJ, Xiao HL, Zhou GM. 2010. The new targets of ouabain in retinal interneurons of Sprague-Dawley rats. *Brain Res Bull* 81(6):617-624.
- Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ. 1992. Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett* 143(1-2):200-204.
- Malicki J. 2004. Cell fate decisions and patterning in the vertebrate retina: the importance of timing, asymmetry, polarity and waves. *Curr Opin Neurobiol* 14(1):15-21.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglansberger W, Di Marzo V, Lutz B. 2002. The endogenous cannabinoid system

- controls extinction of aversive memories. *Nature* 418(6897):530-534.
- Masland RH, Mills JW, Hayden SA. 1984. Acetylcholine-synthesizing amacrine cells: identification and selective staining by using radioautography and fluorescent markers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character* 223(1230):79-100.
- Mayor S, Maxfield FR. 1995. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol Biol Cell* 6(7):929-944.
- McGinnis JF, Stepanik PL, Baehr W, Subbaraya I, Lerious V. 1992a. Cloning and sequencing of the 23 kDa mouse photoreceptor cell-specific protein. *FEBS Lett* 302(2):172-176.
- McGinnis JF, Stepanik PL, Jariangprasert S, Lerious V. 1997. Functional significance of recoverin localization in multiple retina cell types. *J Neurosci Res* 50(3):487-495.
- McGinnis JF, Whelan JP, Donoso LA. 1992b. Transient, cyclic changes in mouse visual cell gene products during the light-dark cycle. *J Neurosci Res* 31(3):584-590.
- McKinney MK, Cravatt BF. 2005. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 74:411-432.
- McLaughlin CR, Abood ME. 1993. Developmental expression of cannabinoid receptor mRNA. *Brain Res Dev Brain Res* 76(1):75-78.
- McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD. 2003. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron* 40(6):1147-1160.
- Melan MA, Sluder G. 1992. Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells. Implications for immunofluorescence microscopy. *J Cell Sci* 101 (Pt 4):731-743.
- Micheva KD, Vallee A, Beaulieu C, Herman IM, Leclerc N. 1998. beta-Actin is confined to structures having high capacity of remodelling in developing and adult rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 10(12):3785-3798.
- Milam AH, Dacey DM, Dizhoor AM. 1993. Recoverin immunoreactivity in mammalian cone bipolar cells. *Vis Neurosci* 10(1):1-12.

- Mitchell CK, Huang B, Redburn-Johnson DA. 1999. GABA(A) receptor immunoreactivity is transiently expressed in the developing outer retina. *Vis Neurosci* 16(6):1083-1088.
- Morest DK. 1970. The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z Anat Entwicklungsgesch* 131(1):45-67.
- Morgan JL, Dhingra A, Vardi N, Wong RO. 2006. Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells. *Nat Neurosci* 9(1):85-92.
- Morishita J, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueno M, Sakamoto H, Maekawa N, Ueda N. 2005. Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. *J Neurochem* 94(3):753-762.
- Morrow EM, Chen CM, Cepko CL. 2008. Temporal order of bipolar cell genesis in the neural retina. *Neural Develop* 3:2.
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzman M, Lu HC, Galve-Roperh I, Harkany T. 2008. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(25):8760-8765.
- Nag TC, Wadhwa S. 2001. Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina. *J Biosci* 26(2):179-191.
- Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, Jain V, Dhingra NK. 2009. Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration. *Neuroscience* 160(2):517-529.
- Negishi K, Kato S, Teranishi T. 1988. Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas. *Neurosci Lett* 94(3):247-252.
- Nicholson DA, Geinisman Y. 2009. Axospinous synaptic subtype-specific differences in structure, size, ionotropic receptor expression, and connectivity in apical dendritic regions of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 512(3):399-418.
- Nucci C, Gasperi V, Tartaglione R, Cerulli A, Terrinoni A, Bari M, De Simone C, Agro AF, Morrone LA, Corasaniti MT, Bagetta G, Maccarrone M. 2007. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-

- induced ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(7):2997-3004.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279(7):5298-5305.
- Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A. 2001. Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 49(3):305-312.
- Pan L, Yang Z, Feng L, Gan L. 2005. Functional equivalence of Brn3 POU-domain transcription factors in mouse retinal neurogenesis. *Development* 132(4):703-712.
- Perry VH, Henderson Z, Linden R. 1983. Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol* 219(3):356-368.
- Poche RA, Furuta Y, Chaboissier MC, Schedl A, Behringer RR. 2008. Sox9 is expressed in mouse multipotent retinal progenitor cells and functions in Muller glial cell development. *J Comp Neurol* 510(3):237-250.
- Porcella A, Maxia C, Gessa GL, Pani L. 2000. The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur J Neurosci* 12(3):1123-1127.
- Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M, Turner EE. 2005. Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci* 25(50):11595-11604.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM. 2004. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474(2):304-324.
- Raven MA, Orton NC, Nassar H, Williams GA, Stell WK, Jacobs GH, Bech-Hansen NT, Reese BE. 2008. Early afferent signaling in the outer plexiform layer regulates development of horizontal cell morphology. *J Comp Neurol* 506(5):745-758.
- Rich KA, Zhan Y, Blanks JC. 1997. Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 388(1):47-63.
- Riepe RE, Norenburg MD. 1977. Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268(5621):654-655.

- Riepe RE, Norenberg MD. 1978. Glutamine synthetase in the developing rat retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 27(4):435-444.
- Rimmerman N, Hughes HV, Bradshaw HB, Pazos MX, Mackie K, Prieto AL, Walker JM. 2008. Compartmentalization of endocannabinoids into lipid rafts in a dorsal root ganglion cell line. *Br J Pharmacol* 153(2):380-389.
- Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernandez-Ruiz JJ. 1993. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4(2):135-138.
- Schnitzer J, Rusoff AC. 1984. Horizontal cells of the mouse retina contain glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity during early developmental stages. *J Neurosci* 4(12):2948-2955.
- Schroeter EH, Wong RO, Gregg RG. 2006. In vivo development of retinal ON-bipolar cell axonal terminals visualized in *nyx::MYFP* transgenic zebrafish. *Vis Neurosci* 23(5):833-843.
- Sernagor E, Eglén SJ, O'Donovan MJ. 2000. Differential effects of acetylcholine and glutamate blockade on the spatiotemporal dynamics of retinal waves. *J Neurosci* 20(2):RC56.
- Sharma RK, O'Leary TE, Fields CM, Johnson DA. 2003. Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 145(1):93-105.
- Sherry DM, Wang MM, Bates J, Frishman LJ. 2003. Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol* 465(4):480-498.
- Song ZH, Zhong M. 2000. CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration. *J Pharmacol Exp Ther* 294(1):204-209.
- Stacy RC, Demas J, Burgess RW, Sanes JR, Wong RO. 2005. Disruption and recovery of patterned retinal activity in the absence of acetylcholine. *J Neurosci* 25(41):9347-9357.
- Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G. 1999. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(25):14565-14570.
- Straiker A, Sullivan JM. 2003. Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander. *J Neurophysiol* 89(5):2647-2654.

- Struik ML, Yazulla S, Kamermans M. 2006. Cannabinoid agonist WIN 55212-2 speeds up the cone response to light offset in goldfish retina. *Vis Neurosci* 23(2):285-293.
- Suarez J, Bermudez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, de Fonseca FR. 2008. Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol* 509(4):400-421.
- Suarez J, Romero-Zerbo SY, Rivera P, Bermudez-Silva FJ, Perez J, De Fonseca FR, Fernandez-Llebrez P. 2010. Endocannabinoid system in the adult rat circumventricular areas: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 518(15):3065-3085.
- Syed MM, Lee S, Zheng J, Zhou ZJ. 2004. Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. *The Journal of physiology* 560(Pt 2):533-549.
- Tauchi M, Masland RH. 1984. The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character* 223(1230):101-119.
- Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB, Sutcliffe JG. 1997. Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J Neurosci Res* 50(6):1047-1052.
- Torborg CL, Feller MB. 2005. Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog Neurobiol* 76(4):213-235.
- Turu G, Hunyady L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol* 44(2):75-85.
- Voinescu PE, Kay JN, Sanes JR. 2009. Birthdays of retinal amacrine cell subtypes are systematically related to their molecular identity and soma position. *J Comp Neurol* 517(5):737-750.
- Wang H, Xie H, Sun X, Kingsley PJ, Marnett LJ, Cravatt BF, Dey SK. 2007. Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 83(1-2):62-74.

- Warrier A, Wilson M. 2007. Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Vis Neurosci* 24(1):25-35.
- Waseem NH, Lane DP. 1990. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 96 (Pt 1):121-129.
- Weinberger R, Schevzov G, Jeffrey P, Gordon K, Hill M, Gunning P. 1996. The molecular composition of neuronal microfilaments is spatially and temporally regulated. *J Neurosci* 16(1):238-252.
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M. 1994. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63(3):637-652.
- Williams EJ, Walsh FS, Doherty P. 2003. The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 160(4):481-486.
- Wong WT, Myhr KL, Miller ED, Wong RO. 2000. Developmental changes in the neurotransmitter regulation of correlated spontaneous retinal activity. *J Neurosci* 20(1):351-360.
- Xue J, Li G, Laabich A, Cooper NG. 2001. Visual-mediated regulation of retinal CaMKII and its GluR1 substrate is age-dependent. *Brain Res Mol Brain Res* 93(1):95-104.
- Yan XX, Wiechmann AF. 1997. Early expression of recoverin in a unique population of neurons in the human retina. *Anat Embryol (Berl)* 195(1):51-63.
- Yazulla S. 2008. Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog Retin Eye Res* 27(5):501-526.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG. 1999. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol*. 1999/12/14 ed. p 80-90.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Fan SF. 2000. Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings. *Vis Neurosci* 17(3):391-401.

- Zabouri N, Bouchard, J.-F. and Casanova C Expression of the endocannabinoid receptor CB1 and the FAAH enzyme during retinal development in the rat. Program No. 461.23/F39 Neuroscience (2007) Abstracts. San Diego, CA: Society for Neuroscience, [2007]. Online.
- Zabouri N, Bouchard, J.-F and Casanova C. Expression of the NAPE-PLD, CB1 receptors, and FAAH during retinal development. Program No. 723.15/C19. Neuroscience (2008) Abstracts. Washington, Dc: Society for Neuroscience, [2008]. Online.
- Zheng J, Lee S, Zhou ZJ. 2006. A transient network of intrinsically bursting starburst cells underlies the generation of retinal waves. *Nat Neurosci* 9(3):363-371.
- Zhou ZJ. 1998. Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina. *J Neurosci* 18(11):4155-4165.
- Zhou ZJ, Zhao D. 2000. Coordinated transitions in neurotransmitter systems for the initiation and propagation of spontaneous retinal waves. *J Neurosci* 20(17):6570-6577.

Article 2



**Fatty Acid Amide Hydrolase Expression
During Retinal Postnatal Development in Rats**

Zabouri, Nawal^{1, 2}, Casanova, Christian¹, Bouchard, Jean-François^{2*}

¹Laboratoire des Neurosciences de la vision, ²Laboratoire de Neuropharmacologie, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract

The endocannabinoid (eCB) system is thought to participate to developmental processes in the central nervous system (CNS). The rodent retina represents a valuable model to study CNS development, because it contains well identified cell types with established developmental timelines. The distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1R) was recently revealed in the developing retina, however the expression patterns of other elements of this system remains unknown. In this study, we investigated the expression pattern of the degradative enzyme Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), a key regulator of the eCB system, in the rat retina during postnatal development. To identify the cells expressing the enzyme, co-stainings were carried out for FAAH and retinal cell type markers. FAAH was expressed at P1 in ganglion and cholinergic amacrine cells. In the course of development, it appeared in cones, horizontal and bipolar cells. For most cell types (horizontal, cholinergic amacrine cells and cone bipolar cells), FAAH was transiently expressed, suggesting an important redistribution of the enzyme during postnatal development and thus, a potential role of the eCB system in developmental processes. Our results also indicated that, in the adult retina, FAAH is expressed in cones, rod bipolar cells, and some retinal ganglion cells. The presence of FAAH in adult animals supports the hypothesis that the eCB system is involved in retinal functions. Overall these results indicate that, as shown in other structures of the brain, the eCB system could play an instrumental role in the development and function of the retina.

Keywords: Endocannabinoids, Anandamide, CB1R, immunohistochemistry, bipolar cells, retinogenesis.

In the last decade, interest in endogenous cannabinoids (eCBs), lipid signalling molecules such as anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), has increased given their role in development as well as in adult neurotransmission. The best characterized eCB receptors are cannabinoid receptor types 1 and 2 (CB1R and CB2R). Due to their lipophilic nature, eCBs cannot be stored in vesicles. Consequently, the enzymes responsible for their synthesis and degradation become key regulators of the physiological actions of eCBs. One enzyme responsible for their degradation is Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH – Deutsch and Chin, 1993, Ueda et al., 1995, Ueda et al., 1998, Cravatt et al., 2001). This enzyme is an integral membrane protein of the plasma membrane and the endoplasmic reticulum (Tsou et al., 1998, Gulyas et al., 2004) and is part of a large class of enzymes known as the amidase signature family (Chebrou et al., 1996). It degrades AEA and 2-AG as well as other eCBs, with a marked preference for the former (Deutsch and Chin, 1993, Cravatt et al., 1996, Goparaju et al., 1998, Ueda et al., 1998). FAAH converts AEA into arachidonic acid and ethanolamide through a hydrolytic reaction (Deutsch and Chin, 1993, Cravatt et al., 1996).

Some constituents of the eCB system - i.e. ligands, synthesizing and degradative enzymes and receptors - were localized in the retina or in specific retinal cell types in adults of several species, from fish to primates (Buckley et al., 1998, Straiker et al., 1999, Yazulla et al., 1999, Leonelli et al., 2005, Lalonde et al., 2006, Nucci et al., 2007, Warriar and Wilson, 2007, Zimov and Yazulla, 2007, Hu et al., 2010, Lopez et al., 2010 and see Yazulla, 2008 for review). For instance, in adult rodents, both CB1R and FAAH have been shown to present in adult retinae. Namely, they are expressed in cone (Straiker et al., 1999, Yazulla et al., 1999, Zabouri et al., 2011), mutually exclusive populations of bipolar cells (Yazulla et al., 1999, Hu et al., 2010), some amacrine (Yazulla et al., 1999, Warriar and Wilson, 2007, Hu et al., 2010, Zabouri et al., 2011) and retinal ganglion cells (RGCs – Straiker et al., 1999, Yazulla et al., 1999, Yazulla, 2008, Hu et al., 2010, Zabouri et al., 2011

). Both the protein and the mRNA of CB2R were shown to be expressed in adult rat retina (Lu et al., 2000, Lopez et al., 2010).

The expression of the eCB system starts early during development of the central nervous system (embryonic day 13 – Buckley et al., 1998) and is age dependent (Thomas et al., 1997, Fernandez-Ruiz et al., 2004, Morishita et al., 2005, Goncalves et al., 2008, Zabouri et al., 2011). Its involvement in developmental processes such as cell fate determination and neurogenesis (Aguado et al., 2005, Galve-Roperh et al., 2006, Hill et al., 2006, Keimpema et al., 2010), axonal elongation and pathfinding (Williams et al., 2003, Berghuis et al., 2005, 2007, Keimpema et al., 2010, Argaw et al., 2011), and synaptogenesis (Kim and Thayer, 2001, Berghuis et al., 2007, Gomez et al., 2007) has been demonstrated in recent years. For instance, a number of studies showed that 2-AG, synthesis and degradative enzymes participate in axonal elongation and pathfinding (e.g. Berghuis et al., 2005, 2007, Keimpema et al., 2010). AEA and FAAH were also linked to developmental processes such as cell fate determination and neurogenesis (Aguado et al., 2005, Soltys et al., 2010).

The rodent retina presents a valuable model to study development as it includes seven cell classes, comprising six neuronal types and one major glial cell type. These cell categories have distinct and well documented developmental timelines (Rapaport et al., 2004). To our knowledge, very few studies examined the impact of the eCB system in the developing retina. For instance, the consequences of CB1R modulation in retinal cells of embryonic and young animals were studied by Lalonde et al. (2006) and Warriar and Wilson (2007). Very recently, our laboratory investigated the spatio-temporal distribution of CB1R expression during postnatal development (Zabouri et al., 2011). Our results demonstrated a differential distribution of CB1R during development, thereby supporting the hypothesis that eCB signalling is important for retinal development. We also revealed an age-dependent concentration change of FAAH and other elements of the eCB system during retinal development.

Apart from CB1R, the distribution pattern of retinal eCB system proteins during development remains unknown. Given that metabolic enzymes exert a key regulator function in the eCB system, knowing their expression pattern during development could prove to be instrumental in our efforts to decipher the role of endocannabinoids in development processes. In this context, we investigated the spatio-temporal expression of FAAH in the retina during postnatal development until adulthood. The results reported here show that FAAH is already present at postnatal day (P) 1, but is greatly redistributed in the retina along postnatal development and maturation. In most cell types, its expression is transient and overlaps spatially with CB1R early in postnatal development. However, this overlap is present only in two cell types in adult retina. These results strengthen the hypothesis that the endocannabinoid system is involved in the development of the retina during the postnatal period.

Methods

Animals

Gestating or non-gestating adult Long Evans rats were obtained from Charles River (St-Constant, QC) and maintained on a 12-hours light/dark cycle. All procedures were in accordance to the guidelines set out by the Canadian Council on Animal Care and the American Association of Anatomists' Guiding Principles in the Care and Use of Animals, and were approved by the ethics committee on animal research of the Université de Montréal. Three to seven pups from at least three different litters were used at very age for each co-labelling.

Tissue Preparation

The animals were sacrificed at various ages, namely: P1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 21, 30, 45 and adults (\geq P60). Rats were deeply anaesthetized either by hypothermia (pups younger than P5) or through excess of isoflurane inhalation. Simultaneously, a transcardiac perfusion was conducted with phosphate buffered 0.9% saline (PBS, 0.1M, pH 7.4), followed by phosphate-buffered 2% paraformaldehyde (PFA), until the head was lightly fixed. The nasal part of one eye was marked with a suture before it was removed. Two small holes were made in the cornea, prior to a post-fixation in 2% PFA for a period varying between 1h30 and 2h, depending on the size of the eye. The cornea and lens were then removed and the eyecups post-fixed for 10 to 30 minutes. Eyecups were washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in HistoPrep tissue Embedding Media (Fisher Scientific, Ottawa, ON), flash frozen and kept at -80°C until processing. Sections (14 μm thick) were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Exton, PA) starting at the nasal pole and placed on gelatin/chromium (Double frosted microscope slides, Fisher Scientific, Ottawa, ON) coated slides.

Immunohistochemistry

Double and triple-label immunohistochemistry

Sections were washed in PBS, post-fixed for 5 minutes in a 70% solution of ethanol, rinsed in 0.03% Triton X-100 in PBS and blocked in 10% donkey serum (NDS, Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA) and 0.5% Triton X-100 in PBS for 1h. The sections were then co-incubated overnight in a rabbit anti-FAAH solution with one or two of the following antibodies tagged as mouse or goat and directed against: protein kinase C alpha (PKC α), syntaxin, glutamine synthetase (GS), choline-acetyltransferase (ChaT), Chx10, Brn3a, proliferating cell nuclear antigen (PCNA). It is to be noted that for the later antibody, a Tris 0.05M, 0.9% based saline was used as a buffer. After incubation with the primary antibodies, the sections were washed in buffered saline, blocked for 30 minutes and incubated for 1h with secondary antibodies: Alexa donkey anti-rabbit 555 for FAAH and Alexa donkey anti-goat 647 and mouse 488 for cell type markers (Molecular Probes, Eugene, OR). After washes, the sections were mounted with a homemade Dabco-PVD mounting media (Ono et al., 2001).

Sequential co-labeling immunohistochemistry

For these experiments, we used a protocol previously described by us (Zabouri et al., 2011) and others (Sherry et al., 2003). Briefly, the sections were labelled in a serial manner: the exposition to the first primary antibody was conducted as described above, followed by incubation in a goat anti Fab fragment solution ((Brandon, 1985) - Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA). This allowed us to tag the first primary antibody as a goat rather than a rabbit. The sections were revealed with a secondary Alexa donkey anti-goat 488. Following that, they were exposed to a second primary antibody overnight, the latter revealed with an Alexa donkey anti-rabbit 555 the following day. The markers that required this type of protocol were rabbit-anti recoverin (McGinnis et al., 1992, McGinnis et al., 1997) and anti-cone

transducin (Johnson et al., 2001) and CB1R (Zabouri et al., 2011) co-labeled with rabbit anti-FAAH.

Antibody characterization

Rabbit anti-CB1R (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) was shown to be specific using retinal tissue from CB1R knockout and wild type mice. Moreover, it was shown to react with one major band using in rat retinal lysates: a robust band at 53kDa and several very light ones below (Zabouri et al., 2011). This is agreement with others using CB1R antibody on rat retinal tissue (Yazulla et al., 1999).

Rabbit anti-FAAH (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) was shown to react with a dense band at about 66kDa and a very light one below 37kDa in rats (Panel A, Figure 12). Moreover, we tested the specificity of this antibody by immuno-labeling adult retinal tissue where the *faah* gene has been deleted (*faah*^{-/-} - (Cravatt et al., 2001)). These samples were generously provided by Dr Gabriella Gobbi from McGill University. To ensure the closest possible match between wild type and *faah*^{-/-} C57BL/6 mice, Dr Gobbi provided tissue from both wild type and knockout animals. Sections from both samples were processed together during the same experiment; pictures were taken under the same exact conditions and off-line processing was identical. The results are shown in panels B and C of Figure 12. The FAAH staining in wild type animals yields a clear signal throughout the retina (panel B), while no staining was visible in the knockouts (panel C). There is a small divergence (9%) between FAAH protein sequences in mice and rats. In the antigen sequence of the antibody used here, only three non-consecutive amino-acids (out of a total of 18) differ between rat and mouse proteins. Using western blot analysis, we found that our antibody recognizes one major band at about 66 KDa in retinal homogenates of mice (panel A of Figure 12). This observation is comparable to the band seen in rat homogenates (panel A). This strongly suggests that, despite the small discrepancy in protein sequence, recognition is not affected and *faah*^{-/-} mice remains a valid control.

The protein PKC α is specifically expressed in rod bipolar cells and dopaminergic amacrine cells (Negishi et al., 1988). Mouse anti-PKC α (H7, Santa Cruz biotechnology, CA) was shown to exclusively recognize these cells (Gaillard et al., 2008). These authors as well as others also reported that this antibody recognizes PKC α , a 80kDa protein by western blot (Nagar et al., 2009). The staining pattern we observed was similar to that reported in previous studies (Negishi et al., 1988, Morrow et al., 2008).

The goat polyclonal anti-Chx10 (Santa Cruz biotechnology, CA) labels a transcription factor that is expressed in bipolar cells (Rowan and Cepko, 2004). This antibody gives a single, 46-kDa band on Western blots of mouse eye extracts according to the manufacturer. The pattern of immunofluorescence that we obtained with this antibody was similar to that previously reported (Rowan and Cepko, 2004).

Goat anti-choline acetyltransferase (ChAT; Chemicon, Temecula, CA) recognizes a single band at 70 kDa in mouse brain lysate (Chemicon datasheet) and in COS cells transfected with ChAT cDNA lysate (Ohno et al., 2001). It has been used by others to stain the cholinergic amacrine cells in rodent retina (Gunhan et al., 2002). The immunoreactivity we observed is in agreement with the reported ChAT distribution using the same antibody as well as others (Voigt, 1986, Jeon et al., 1998, Haverkamp and Wassle, 2000, Majumdar et al., 2008).

The protein syntaxin-1 was recognized as a specific marker of retinal amacrine and horizontal cells by several research teams (Barnstable et al., 1985, Hirano et al., 2005). Mouse anti-syntaxin (HPC-1; Sigma-Aldrich, Oakville, ON) recognizes syntaxin-1, a 35kDa protein, from hippocampal, retinal and cortical neurons (Inoue et al., 1992). The staining pattern observed in the present study was similar to that formerly reported (Li et al., 2004, Voinescu et al., 2009).

The expression of glutamine synthetase (GS) in Müller cells was demonstrated by Riepe and Norenburg (Riepe and Norenburg, 1977). Chang et al, (Chang et al., 2007) established that the mouse anti-GS (Clone GS-6,

Chemicon, Temecula, CA) reacted with a single 45kDa protein in adult retinal tissue. The staining obtained with this antibody was akin to that published elsewhere (Gargini et al., 2007).

PCNA was chosen as a neuroblast and mitotic cell marker because it provides the least false positive and negative immunolabeling of progenitor cells and mitotic cells in the retina (Barton and Levine, 2008). The specificity of this mouse anti-PCNA (Clone PC10, Dako Burlington, ON) was fully characterized by Waseem and Lane (1990) and others (Ino and Chiba, 2000); it recognized a single band at 36kDa.

Anti-Brn3a was used to identify retinal ganglion cells. The Brn3a antibody (clone 5A3.2, Chemicon, Temecula, CA) labels only retinal ganglion cells (RGCs) in retinæ of several vertebrate including rats and mice (Xiang et al., 1995, Nadal-Nicolas et al., 2009). In addition, it was also shown that Brn3a - rather than the other members of the Brn3 family - was present in most RGCs subtypes in rats and mice (Nadal-Nicolas et al., 2009, Badea and Nathans, 2010). The staining pattern obtained in the present study is similar to that found by others (Quina et al., 2005, Liu et al., 2009). According to the manufacturer, this antibody does not stain tissue from Brn-3a knockout mice and a recent study established that it reacted with expected band at 46kDa (Hudson et al., 2008).

A number of laboratories showed that recoverin is expressed in a subset of bipolar cells (Milam et al., 1993, McGinnis et al., 1997, Haverkamp and Wassle, 2000, Haverkamp et al., 2003). The immunoreactivity obtained in our study with the rabbit antibody directed against recoverin revealed a pattern of immunoreactivity identical to that described in the mouse retina (Haverkamp et al., 2003, Gargini et al., 2007, Acosta et al., 2008). This antibody (Chemicon, Temecula, CA) recognized a single 26kDa band (manufacturer's technical information), in accordance to the reported size of recoverin (Yan and Wiechmann, 1997).

Rabbit anti-cone transducin- α subunit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used to identify cone photoreceptors. The specificity of

this antibody was confirmed by pre-adsorption and western blot studies (Coleman et al., 2004); it recognizes a single band at 46kDa.

All working dilutions and provenance are provided in Table 1.

Antibody	Immunogen	Dilution	Host	Company
CB1R	A fusion protein with the sequence MKSILDGLADTTTFRITITDLYVGSNDIQYEDIKGDMSKLG YFPQKFPLTSFRGSPFQEKMTAGDNSPLVPAGDT of rat CB1R	1/150	Rabbit	C1233, Sigma-Aldrich; Oakville, ON
FAAH	Synthetic peptide from rat FAAH with the sequence ELCLRFMREVEQLMTPQKQPS	1/200	Rabbit	101600, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI
Chx10	The antibody was raised against the aa sequence PPSSHPRAALDGLAPGHL human Chx10(Martinez- Navarrete et al., 2008)	1/100	Goat	Sc-21690, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
ChAT	Human placental choline acetyltransferase	1/50	Goat	AB144P, Chemicon, Temecula, CA
Recoverin	The full length recombinant human recoverin	1/200	Rabbit	AB5585, Chemicon, Temecula, CA
Cone transducin (G _{α2})	A synthetic peptide with the sequence IDYAEVSCVD from bovine retina	1/200	Rabbit	Sc-390, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Syntaxin, clone HPC1	Synaptosomal plasma fraction of rat hippocampus	1/500	Mouse	S0664, Sigma-Aldrich; Oakville, ON
PKC Clone H7	A synthetic peptide with the sequence DFEGFSYVNPQFVHPILQSSV from the human protein (Zabouri et al., (2010)	1/500	Mouse	Sc-8393, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
GS (Clone GS-6)	The full protein purified from sheep brain	1/3000	Mouse	MAB302, Chemicon, Temecula, CA
Brn3a (Clone clone 5A3.2)	Sequence : GGSAPHPHMHGLGHLSHPAAAAAMNPMSGL PHPGLVAA fused to the T7 gene 10 protein	1/500	Mouse	MAB1585, Chemicon, Temecula, CA
PCNA, Clone PC10	Synthetic peptide with the sequence LVFEAPNQEK (Ino and Chiba, 2000)	1/500	Mouse	M0879, Dako, Burlington, ON

Table 1: Antibodies.

Validity of the sequential labelings

Validity of the sequential staining was verified for FAAH/Recoverin, FAAH/Cone-transducin and FAAH/CB1R co-labelings with two controls: 1) The second primary antibody was omitted yielding a strong staining with the goat secondary 488 but no staining with rabbit secondary 555; 2) The first secondary and second primary antibodies were omitted, yielding no signal for the goat secondary 488 and some low residual signal for the rabbit secondary 555. An example is presented in panels D-L of Figure 1 for FAAH and recoverin immunolabeling. The first column presents the goat signal (green), the second column the rabbit signal (magenta), and the last column the merged signals. The first line (Panels D-F) shows the immunostaining with complete protocol: clear signals for both recoverin (D) and FAAH (E) can be seen and this co-labeling shows that FAAH and recoverin signals are overlapping (F). The second line (Panels G-I) illustrates the result of the first control for the same co-immunolabeling. As expected, there was a clear signal for recoverin (G and I) with very faint staining for FAAH (H and I). The last line (Panel J-L) presents the results for the second control where there was very little staining for both recoverin (J and L) and FAAH (K and L). Thus, these control data demonstrate that the sequential Fab fragment protocol remains specific even when there is a lot of non-overlapping between two proteins.

One can note that nuclear staining seems to be present in some cells such as the bipolar cells shown in panels E and F. Nuclear staining is not expected given that FAAH is located in the endoplasmic reticulum and at the membrane. This expression was observed in young animals only (up to one month of life); consequently, one could question the specificity of our antibody in younger animals. In a previous study (Zabouri et al., 2011), we used western blot to investigate the age-dependent concentration change of FAAH with the same antibody; we observed that the same bands were visible at all ages. We are thus confident that the specificity of the antibody does not change with age. Furthermore, we also demonstrated that our protocol could

cause intracellular protein redistribution (Zabouri et al., 2011) probably due to a mixture of light fixation and permeabilisation (Goldenthal et al., 1985, Melan and Sluder, 1992, Mayor and Maxfield, 1995, Cinar et al., 2006). This leads us to believe that any nuclear staining observed in the present study is most probably due to the same artefacts as observed in Zabouri et al. (Zabouri et al., 2011) since the experiments were conducted together. The presence of this artifact has no impact on the study since we investigate FAAH expression within cell types rather than its subcellular distribution.

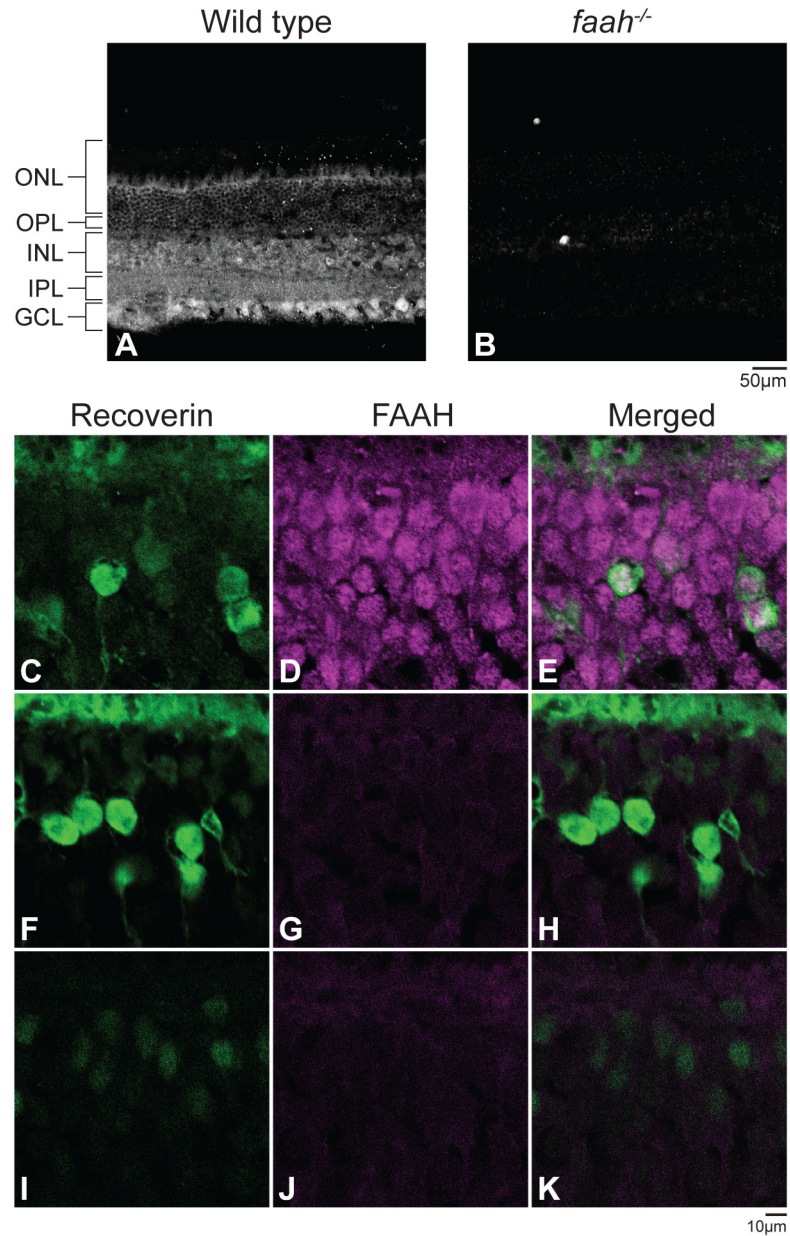


Figure 1: A and B: FAAH immunoreactivity in the retina of a wild type and a *faah*^{-/-} knockout mouse **C-K:** Recoverin (C, F and I), FAAH (D, G and J) signals and their overlay (E, H and K) for the complete sequential protocol (panels C-E), for the control where the second primary antibody was omitted (panel F-H) and for the control where the first secondary and second primary antibodies were omitted (panel I-K).

Confocal microscopy

The fluorescent specimens were visualized using a Leica TCS SP2 confocal laser-scanning microscope. Images were acquired using a 40X oil-immersion objective and were scanned at a 2048x2048 pixel resolution. Pictures of the central retina (within 200 μ m of the optic nerve head) and the periphery were taken. Matching images were captured in the Alexa fluo 555/546, Alexa fluo 488/FITC and Alexa fluo 647 channels, pseudo colored, merged and exported using Leica LCS software (version 2.61). Throughout this study, retinal cell markers are always presented in green and blue while FAAH is shown in magenta for the double labelling or red for the triple staining. The pictures were taken sequentially to ensure no 'bleed-through' between channels. When the co-expression of FAAH and retinal cell markers was ambiguous, the presence or absence of co-labeling was demonstrated by taking z-stacks with optimized steps. This allowed the visualization of the cells in the X-Y, X-Z and Y-Z axes, thereby confirming the expression or the lack of FAAH in specific cell types. Pictures were selected to illustrate representative findings of the immunostaining at all ages studied. Contrast and brightness were adjusted when necessary using Adobe Photoshop (CS4).

As no differences were observed in the expression of FAAH between the center and the periphery – with the exception of the expected delay in development (Rapaport et al., 2004) – only pictures of the central retina are presented in the results section.

Results

Spatial and temporal patterns of expression of FAAH in the retina

The expression of FAAH was studied at different postnatal ages ranging between P1 and adult rats. Briefly, at P1, the retina is characterized by neuroblast, plexiform and ganglion cell layers (NBL, IPL and GCL respectively). The NBL contains mostly progenitor cells, dividing cells, differentiated but immature cones, horizontal and amacrine cells as well as a few rods (Fletcher and Kalloniatis, 1997, Sharma et al., 2003, Rapaport et al., 2004). FAAH was already present at P1 in the rat retina, although its expression was rather scarce. It could be observed in a few cells in the deepest part of the NBL, as well as in the GCL (panel A, Figure 2). The rest of the NBL showed some fluorescence, although it was quite low in intensity.

Some amacrine, bipolar and Müller cells as well as rods are generated during the first week of life (Sharma et al., 2003, Rapaport et al., 2004). At P3/P5, FAAH immunoreactivity was largely upregulated as the immunopositive cells in the deepest part of the NBL and in the GCL presented an increased fluorescence. Some regularly spaced cells in the deepest part of the forming INL and in the GCL presented immunofluorescence in their cytosol and probably at the membrane with clear unmarked nuclei. Other somas in the GCL appeared completely stained (panels B and C). Moreover, a set of regularly spaced cell bodies, strongly reminiscent of horizontal cells, close to the upper part of the NBL (P3, panel B) or just below the forming IPL (P5, panel C) became immunopositive. At P5, some photoreceptors became immunopositive for FAAH in the forming ONL. Their distribution and morphology were indicative of cones (panel C). Between P5 and P7, FAAH immunofluorescence increased in the ONL, appearing in most photoreceptors although suspected cones were more strongly stained than other surrounding cells bodies (panel D). FAAH was also present in the forming OPL and just below, in the upper half of the INL. In the deepest part of this layer and in the GCL, FAAH expression remained essentially the same as that observed at P5.

During the second week of life, one important process occurring is synaptogenesis and synaptic refinement (Weidman and Kuwabara, 1968, Kapfhammer et al., 1994), processes in which endocannabinoids are implicated (Kim and Thayer, 2001). The staining at P9 was very similar to that at P7, i.e., cells in the GCL strongly expressed FAAH. The enzyme was also present in a set of equally distributed cells in the deepest part of the INL. Cells in the upper half of this layer display a light immunoreactivity of FAAH. Photoreceptors also expressed this protein, with one subpopulation more intensely stained than the rest of the cell bodies, (panel E, Figure 2). At P11, FAAH expression in the GCL and INL remained stable while in the ONL, expression in the suspected cones increased and became more defined (panel F).

By eye opening (P12-14), the retinal structure is basically complete, albeit still immature. During the weeks following eye opening, several maturation processes take place, including synapse consolidation or elimination and cell death (see for review Reese, 2010). FAAH expression remained stable in the ONL and OPL throughout this period. In particular, it was strongly expressed in the inner segments, cell bodies, axons and synaptic pedicles of suspected cones (Panels G and H). The enzyme expression in rods also remained stable. In the INL, however, several changes occurred. At P13-P15, cells in the inner most part of the layer expressed FAAH strongly while those in the upper half showed a light expression. In addition, suspected horizontal cells were strongly immunoreactive for the enzyme. Around P15, the immunofluorescence in some cells closer to IPL was upregulated with respect to those closer to the OPL (Panel H). By P21, the expression in the upper half of the INL was increased even more and became more defined, while it remained stable in its inner part (Panel I). Expression of FAAH in regularly spaced cells bodies in the inner part on the INL and in the GCL was eliminated at P21. One week later, at P30, expression in the cells close to outer part of the INL appeared stronger and invaded the axon and synapses. From the morphology of these

cells, we assume that they are rod bipolar cells (Panel J). The timeline for this process was somewhat variable, as it was observed as early as P13 in some cases. In others, it was still absent at P21. However, for most animals, it started at P15 and was completed by P45. The expression in the rest of the INL was strongly down regulated between P21 and P30. This distribution of FAAH expression profile was maintained over the following weeks (Panel K) until adulthood, where only suspected rod bipolar cells expressed FAAH in the INL and OPL (Panel L). In the GCL, the expression of FAAH remained stable until P21 (panel I), at which point it was down regulated but remained present (panels J-L).

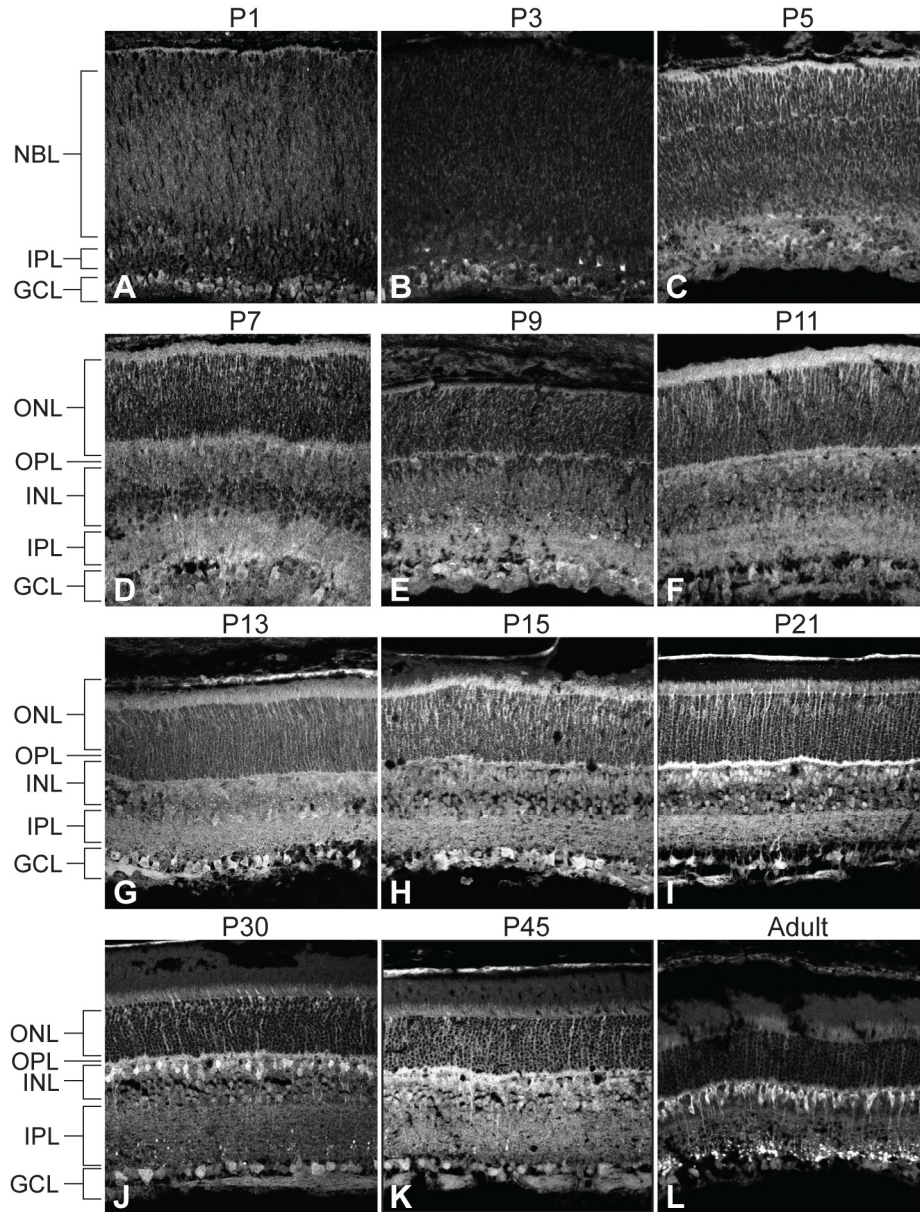


Figure 2: FAAH immunoreactivity in the developing rat retina. **A-L:** Vertical sections from P1 (A), P3 (B), P5 (C), P7 (D), P9 (E), P11 (F), P13 (G), P15 (H), P21 (I), P30 (J), P45 (K) and adult (L) rat retinæ. For all ages, confocal images were obtained from a single focal plan. NBL, neuroblast layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar = 40μm

Identification of cell types expressing FAAH

Expression of FAAH in early born neurons

At P0, the bulk of early-born neurons - horizontal, amacrine, ganglion cells, and cone photoreceptors- are differentiated, with very few of these neurons being generated after birth (Morest, 1970, Rapoport et al., 2004).

We investigated the presence of FAAH in these cell types. Examples of FAAH expression in horizontal and amacrine cells at various ages are presented in Figures 3 and 4, respectively. At P1, no expression of the enzyme could be observed in horizontal cells (Panel A, Figure 3). By P3 and until P7, a light expression, often concentrated in punctae could be detected in this cell type. Between P7 and P21, a clear somatic expression could be seen in horizontal cells (Panels D-L). Over the following two weeks however, this expression decreased (Panels M-O) and from P45, no expression could be seen in horizontal cells (Panels P-U).

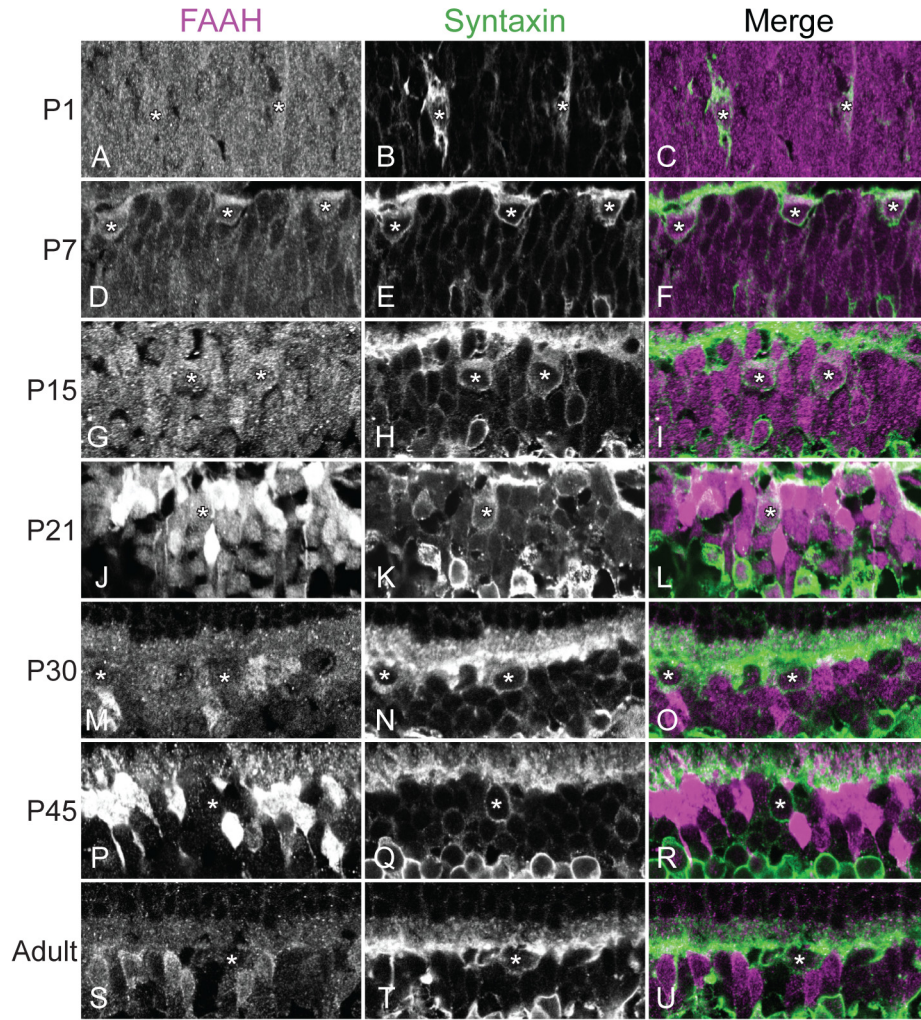


Figure 3: FAAH immunoreactivity in horizontal cells. **A-U:** Vertical sections from P1 (A-C), P7 (D-F), P15 (G-I), P21 (J-L), P30 (M-O), P45 (P-R) and adult (S-U) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH and cell-type-specific marker for the retinal interneurons (horizontal and amacrine cells), syntaxin. Each protein is presented alone in gray scale: FAAH in the 1st column and syntaxin in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column – FAAH in magenta and syntaxin in green). Horizontal somas (stars) are immunonegative for FAAH at the youngest age (P1). They become positive for FAAH between P7 and P21, after which they lose their immunoreactivity for FAAH. Scale bar = 10 μ m.

At P1, FAAH was expressed in most amacrine cells (panels A-C, Figure 4). Starting around P3, a population of regularly dispersed cells stood out. They displayed immunofluorescence distributed over the cytosol and membrane. Because of the position and distribution of these cells, they were considered cholinergic amacrine cells (Panels D-F, stars). The remaining amacrine cells displayed a light immunofluorescence. This pattern of expression was maintained until P15 (Panels G-L). At P21, FAAH expression in amacrine cells was decreased but still present. Over the second month of life, no expression of FAAH was seen in amacrine cells (panels P to X). It is worth noting that two patterns of staining were observed for amacrine cells: in some cases, the whole cells were immunopositive (see for example panels A and C) while in others, FAAH was encapsulated in vesicle-like structures as presented in panels D and F of Figure 4. These patterns were mutually exclusive and present in about half of our sample regardless of the age. We could not determine if these two patterns were caused by an intrinsic change within the retina or an artefact produced by our tissue preparation procedure which was designed to maintain light fixation in order to preserve FAAH antigenicity. This sort of protein relocalization artefacts have been previously reported by several authors (Goldenthal et al., 1985, Melan and Sluder, 1992, Mayor and Maxfield, 1995, Cinar et al., 2006) and correlated with a combination of light fixation and tissue permeabilization. However, this does not influence our findings since we investigated FAAH expression within cell types rather than its subcellular distribution.

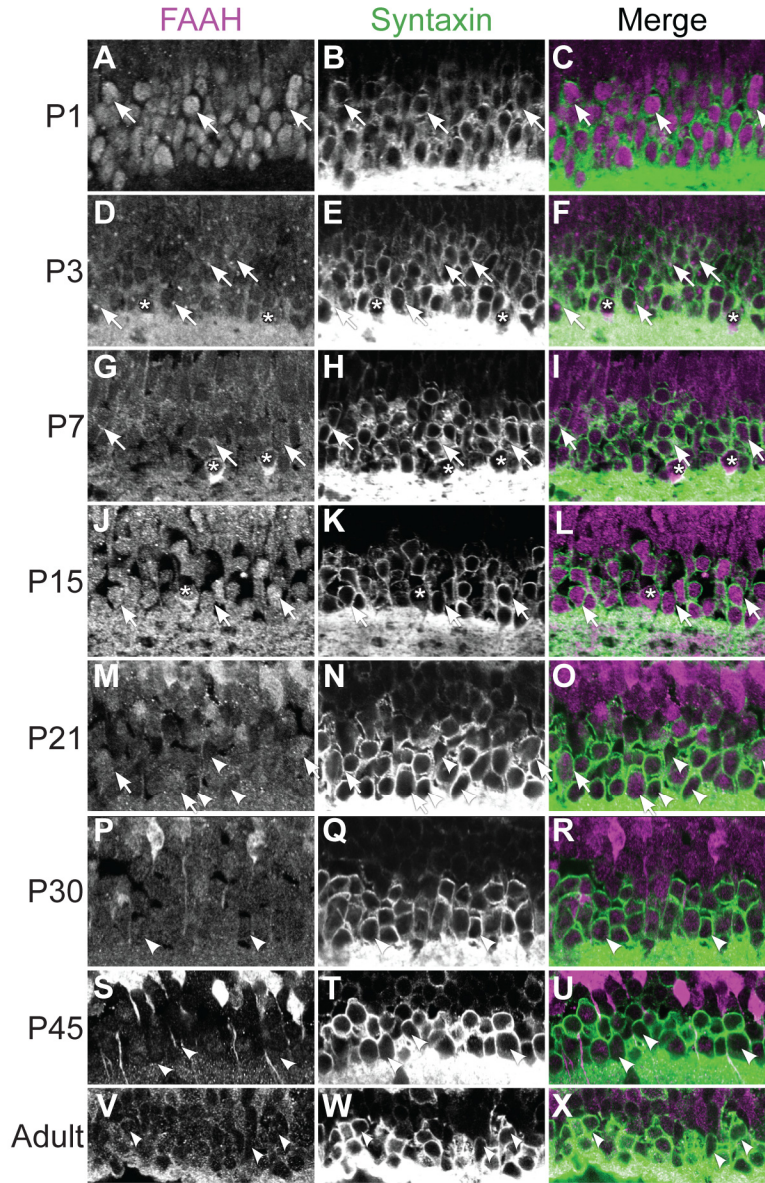


Figure 4: FAAH immunoreactivity in amacrine cells. **A-X:** Vertical sections from P1 (A-C), P3 (D-F), P7 (G-I), P15 (J-L), P21 (M-O), P30 (P-R), P45 (S-U) and adult (V-X) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH and cell-type-specific marker for the retinal interneurons (horizontal and amacrine cells), syntaxin. Each protein is presented alone in gray scale: FAAH in the 1st column and syntaxin in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column – FAAH in magenta and syntaxin in green). FAAH immunopositive and immunonegative amacrine cells are indicated by arrows and arrow heads, respectively. Stars indicate a distinct population of amacrine cells. Scale bar = 10 μ m.

The identity of the suspected amacrine cells was confirmed with co-staining with the cholinergic cell marker ChAT (Figure 5). This marker identifies two distinct populations of cholinergic amacrine cells: OFF and ON-starburst cells. The first group is characterised by somas situated in the INL and dendrites that form a narrow line defining the outer stratum of processes in the IPL. ON-starburst cells have their cell bodies in the GCL and their dendrites mark the inner stratum of processes in the IPL (Voigt, 1986). Both populations were analysed and both expressed FAAH at P1 (panels A-C). Between P3 and P15, both populations of cholinergic cells remained immunopositive for FAAH (panels D-L). Starting at P21, OFF-starburst cells became immunonegative (arrows in panels M-O), while most ON-starburst cells remained immunofluorescence (arrows heads, panels M-O). At P30 both populations of cholinergic cells were immunonegative (Panels P-R). Over the following month of life and into adulthood, all amacrine cells were immunonegative or showed a very light FAAH immunoreactivity (Panels S-X).

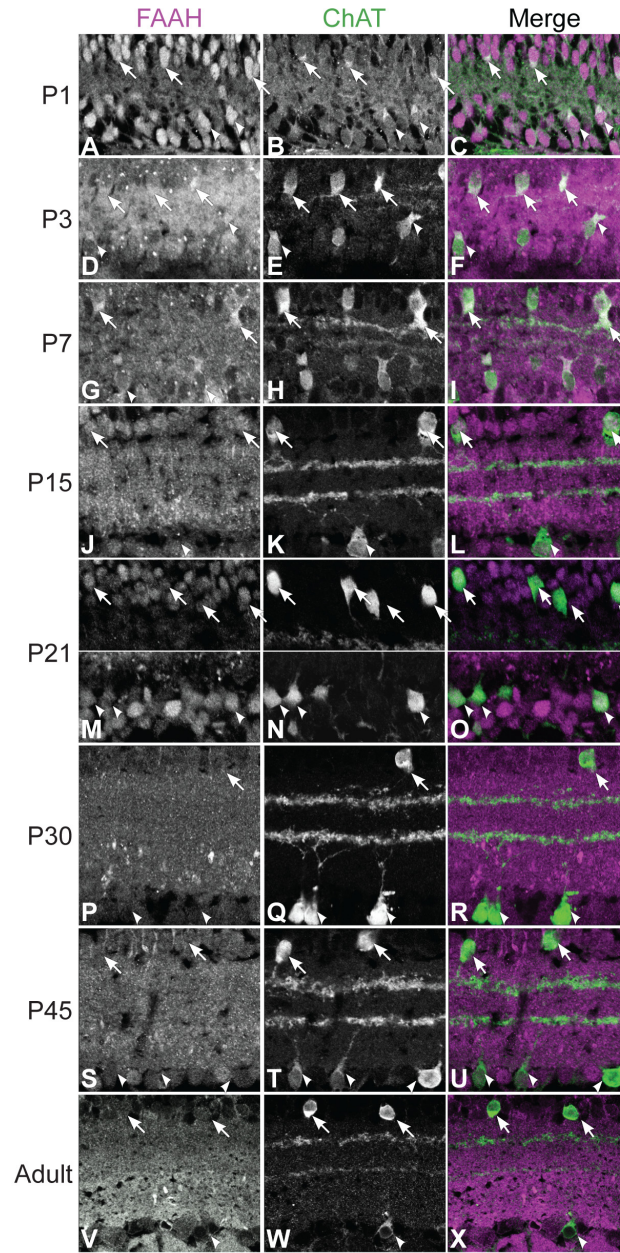


Figure 5: FAAH immunoreactivity in cholinergic amacrine cells. **A-X:** Vertical sections from P1 (A-C), P3 (D-F), P7 (G-I), P15 (J-L), P21 (M-O), P30 (P-R), P45 (S-U) and adult (V-X) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH and cell-type-specific marker for the retinal cholinergic interneurons, ChAT. Each protein is presented alone in gray scale: FAAH in the 1st column and ChAT in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column – FAAH in magenta and ChAT in green). OFF and ON cholinergic amacrine cells are indicated by arrows and arrow heads, respectively. Scale bar = 10 μ m.

Examples of FAAH expression pattern in GCL are displayed in Figure 6. The spatial organization of FAAH expression in ganglion cells did not vary with time. The enzyme was expressed in large ganglion cells (stars, panels A to U), while in others it was not (arrows, panels A to U). It is to be noted, however, that our data does not allow us to determine if FAAH was expressed in all large ganglion cells or in a sub-population. FAAH expression in large ganglion cells was present until adulthood, however, a decrease in the intensity of FAAH immunoreactivity could be noted after P7, suggesting a decrease in FAAH expression after that age (compare panels A to F). As reported in numerous studies, a normal decrease in the number of ganglion cells with age was seen (e.g. Farah and Easter, 2005). FAAH was also present in Brn3a negative somas situated in the GCL: these neurons were considered displaced amacrine cells (Xiang et al., 1995 - arrow heads, panels A to I). These cells could only be seen during the two first weeks of life (arrow heads, panels A to I) suggesting that they were not FAAH positive anymore (panels D to E).

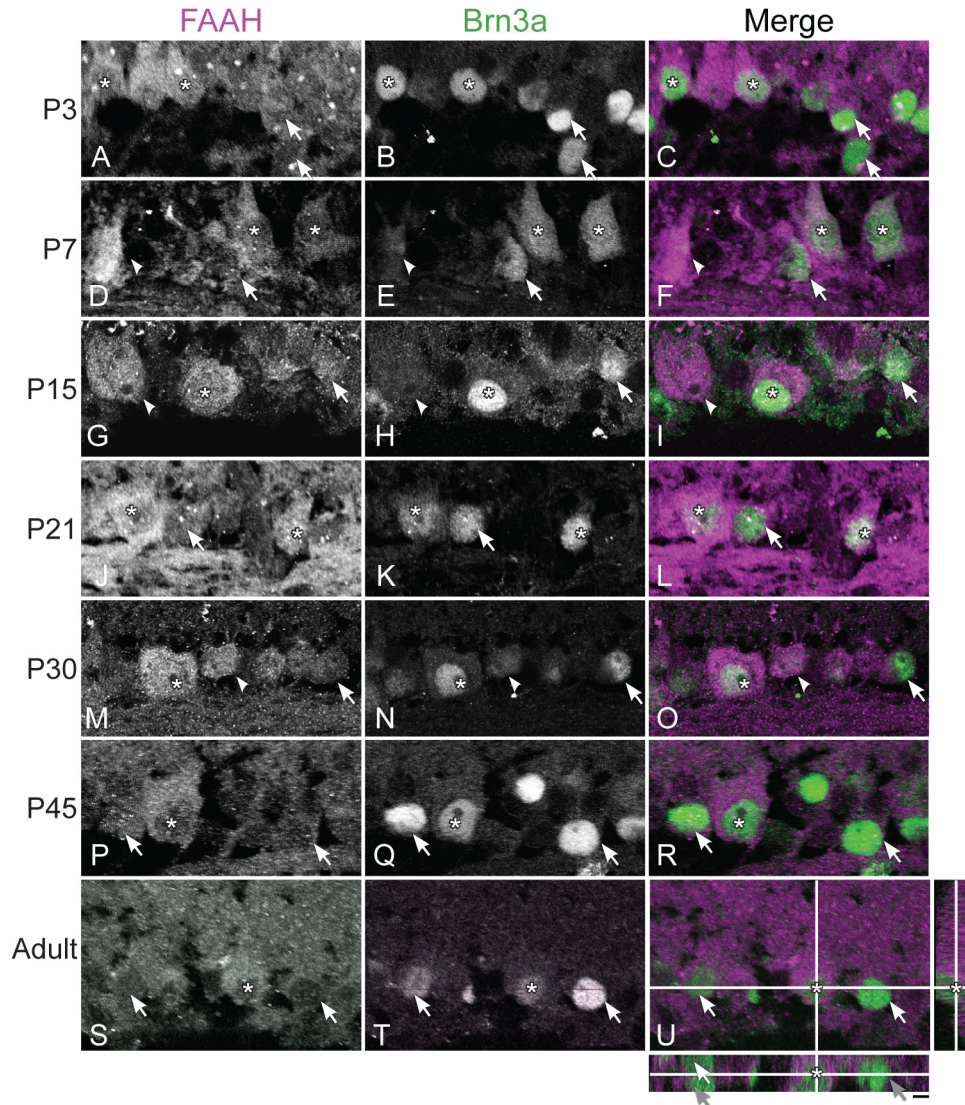


Figure 6: FAAH immunoreactivity in the ganglion cell layer. **A-U:** Vertical sections from P3 (A-C), P7 (D-F), P15 (G-I), P21 (J-L), P30 (M-O), P45 (P-R) and adult (S-U) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH (magenta) and cell-type-specific marker for RGCs, Brn3a (green). In panel U, the horizontal and vertical insets show the reconstruction of the section in the X-Z and Y-Z plans respectively, along the white lines. Some RGCs are immunopositive for FAAH (stars) at all ages, while others are not (arrows). Other cells within the GCL (arrow heads), presumably displaced amacrine cells, are also immunopositive for FAAH across all ages. Scale bar = 10 μ m.

Cones are the last class of early-born neurons to be generated (Rapaport et al., 2004). They did not express FAAH until P5 as shown in Figure 2, panels A to C. More detailed pictures of FAAH expression in cones are presented in Figure 7 (panels A-U). Around P5, FAAH was visible in the cell bodies of cone photoreceptors (stars; panels A-C). FAAH was also expressed in cone pedicles at P5 (data not shown) and its levels remained high throughout the entire time interval investigated. Over the following days, FAAH expression increased in the inner segments as they developed (arrows; panels D-I). Although cone morphology and distribution varied over the following weeks, FAAH expression reached adult-like pattern at P15 and remained the same until adulthood (panels J-U).

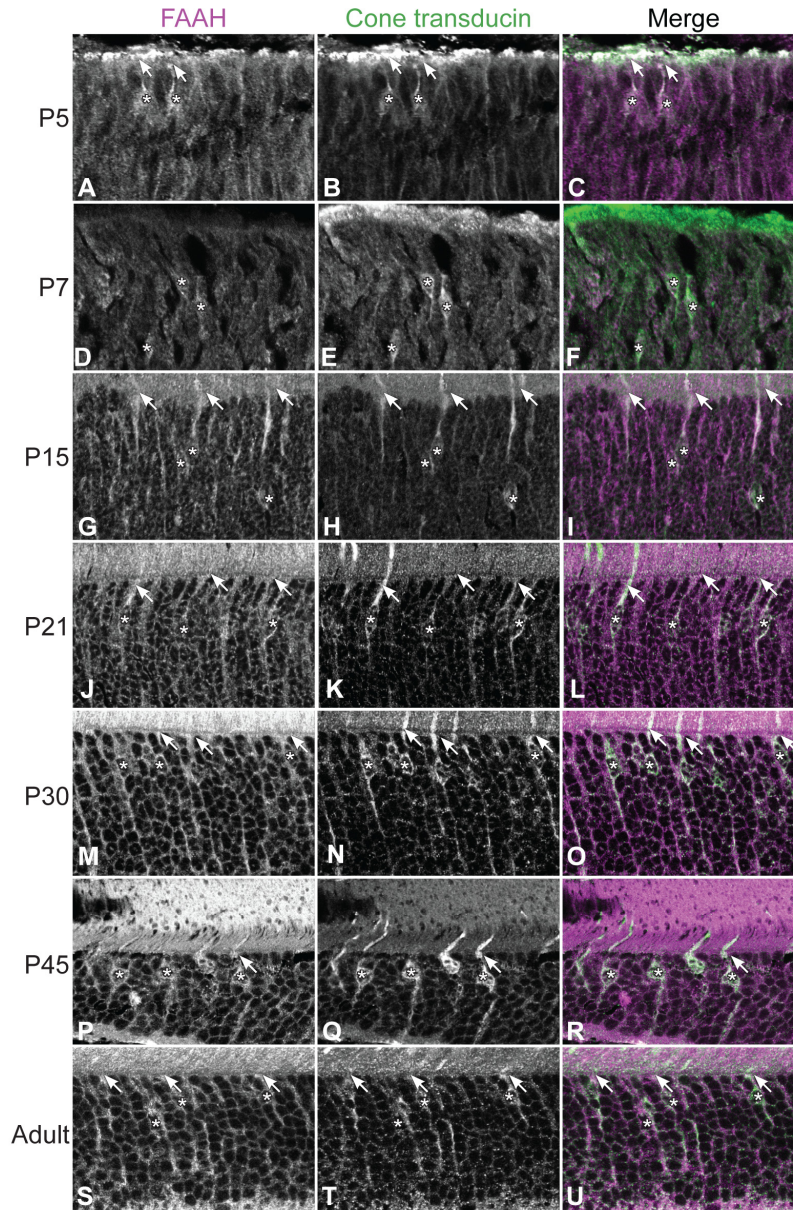


Figure 7: FAAH immunoreactivity in cone photoreceptors. **A-U:** Vertical sections from P5 (A-C), P7 (D-F), P15 (G-I), P21 (J-L), P30 (M-O), P45 (P-R) and adult (S-U) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH and cell-type-specific marker for the cones, cone-transducin. Each protein is presented alone in gray scale: FAAH in the 1st column and cone transducin in the 2nd, then the two are presented merged (3rd column – FAAH in magenta and cone transducin in green). Cones become immunopositive for CB1R at P5 and remain so throughout development and into adulthood. CB1R is expressed in the inner segments of the cone (arrows), as well as the cell body (stars). Scale bar = 10 μ m.

Expression of FAAH in late-born neurons

During the first week, several developmental processes coincide. Late-born neurons are generated from progenitor cells mostly after birth and give rise to different classes of retinal cells: bipolar and Müller cells, as well as rod photoreceptors (Morest, 1970, Rapoport et al., 2004).

PCNA was expressed in the retina between P1 and P7 (Figure 8). At P1, it was present in Progenitor cells undergoing mitosis at the apical surface and interphase progenitors located more basally (panels A-C, G-I, and M-O). Neither mitotic cells (stars; panel A-C) nor progenitor cells (arrows; panel D-F) expressed FAAH at P1. The same pattern was visible at P3 and P5, although the number of dividing cells decreased rapidly, as expected (panels J-L and P-R). At these two time points, however, the somas of mitotic cells appeared surrounded with FAAH positive fibres (panels G-I and M-O). From the morphology and the position of those fibres as well as the developmental timeline, these structures could either be the neurepithelial-like processes described by Morgan et al., (2006) which represent the future dendrites of bipolar cells or processes from young Müller cell. At P7, the few neuroblasts left showed a light immuno-fluorescence for FAAH (arrow heads, panel S-U).

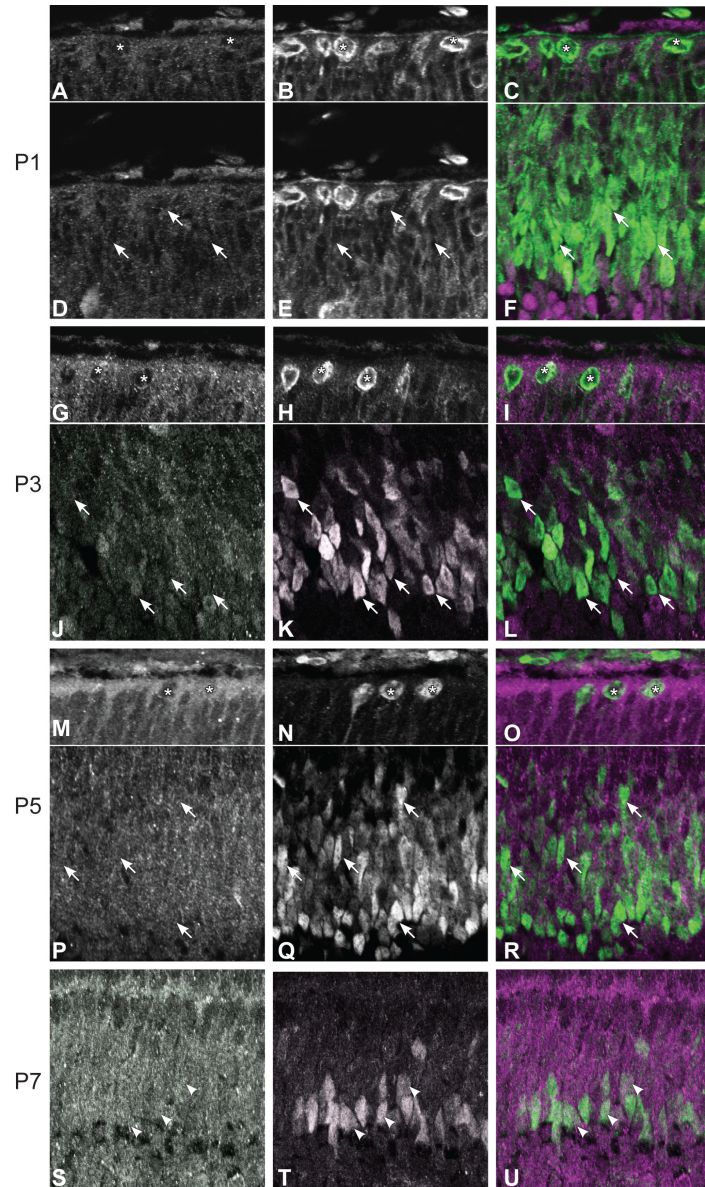


Figure 8: FAAH immunoreactivity in retinal progenitor and mitotic cells. **A-U:** Vertical sections from P1 (A - F), P3 (G - L), P5 (M - R), P7 (S - U) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH (1st column in gray scale and 3rd column in magenta) and cell-type-specific marker for the retinal progenitor and mitotic cells, PCNA (2nd column in gray and 3rd column in green). Mitotic cells (stars) are not FAAH positive as long as they exist in the postnatal period, namely until P5-6. Neuroblasts are not FAAH positive (arrows) until P5, then they become immunoreactive to the enzyme FAAH at P7. Scale bar = 10 μ m.

FAAH expression in bipolar cells is presented in Figures 9 and 10. We used PKC as a marker for rod bipolar cells, along with Chx10, a nuclear marker of all bipolar cells. Consequently, as seen in Figure 9, Chx10-only positive cells, in blue, would be cone bipolar cells, while Chx10 and PKC positive cells, in green/blue, would be rod bipolar cells, and PKC-only positive cells, in green, would be PKC-positive amacrine cells. At P3, most cells did not express FAAH (arrows, Fig.9A), but some showed immunopositivity for the enzyme (arrow heads). At P7, an increase in FAAH immunoreactivity in the upper part of the INL, comprising both cone and rod bipolar cells, was observed (Fig.9B; see also Fig.2D). Between P13 and P30, FAAH expression in cone bipolar cells was progressively downregulated, whereas that in rod bipolar cells was up regulated (Fig.9C to E upper panels). Over this period, FAAH expression in rod bipolar cells was targeted to the membrane and distributed in the soma, axon and synapses (Fig.9C to E lower panels) but was not present in the dendrites. It should also be noted that the time point at which this redistribution happened was relatively variable. In some animals it was already present at P13, whereas in others it was not completed at P30. However, for most animals, this pattern was observed by between P15 and P21. For the second month of life, the expression of FAAH in bipolar cells remained stable (Fig.9F and G).

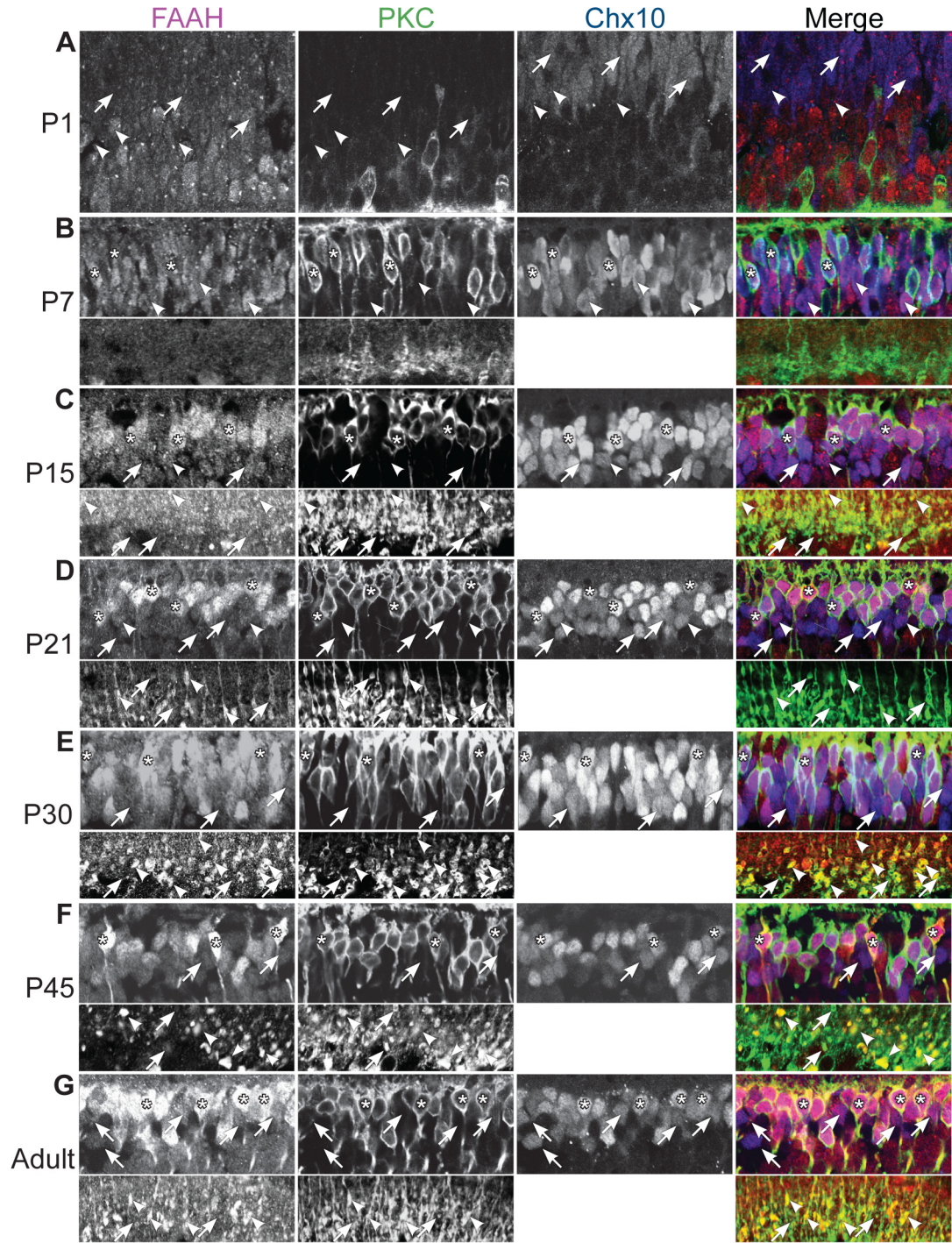


Figure 9: FAAH immunoreactivity in bipolar cells. **A-G:** Vertical sections from P3 (A), P7 (B), P15 (C), P21 (D), P30 (E), P45 (F) and adult (G) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH (red) and cell-type-specific marker for the bipolar Chx10 (blue) and a third marker specific for rod bipolar and a subtype of amacrine cells, PKC α (green). Each protein is presented alone in gray scale: FAAH in the 1st column, PKC in the 2nd and

Chx10 in the 3rd, then all the proteins are presented merged (3rd column – FAAH in red, PKC in green and Chx10 in blue). The upper panels of line depict the cell bodies of bipolar cells, the cells immunopositive for both Chx10 and PKC α are rod bipolar cells (stars), while those cells immunoreactive for Chx10 (arrows and arrow heads) are cone bipolar cells. The lower panels display the synaptic terminals of rod bipolar cells in IPL. Scale bar = 10 μ m

Recoverin was used as a marker to investigate FAAH expression in ON and OFF cone bipolar cells. This marker was chosen because it is present in type 2 and type 8 OFF and ON-cone bipolar cells (Euler and Wassle, 1995, Chun et al., 1999) respectively, thereby allowing us to evaluate whether FAAH expression was expressed according to the type of cone bipolar cell. Examples of recoverin positive cells are shown in Figure 10 (panels A to F) during development. With this marker, bipolar cells are not clearly discernable until the OPL is formed (Sharma et al., 2003). At P7, most recoverin neurons were expressing FAAH (stars, panels A). By P15, however, one can see that all recoverin positive cells were expressing FAAH (panels B). This demonstrates that at this age, both ON and OFF bipolar cells expressed FAAH. The staining of the somas remained the same at P21 and 30. By P45 and into adulthood, expression of FAAH was strongly down regulated if not completely absent (panels E and F). FAAH was never observed at recoverin positive axon terminals regardless of their type (Lower panels A-F).

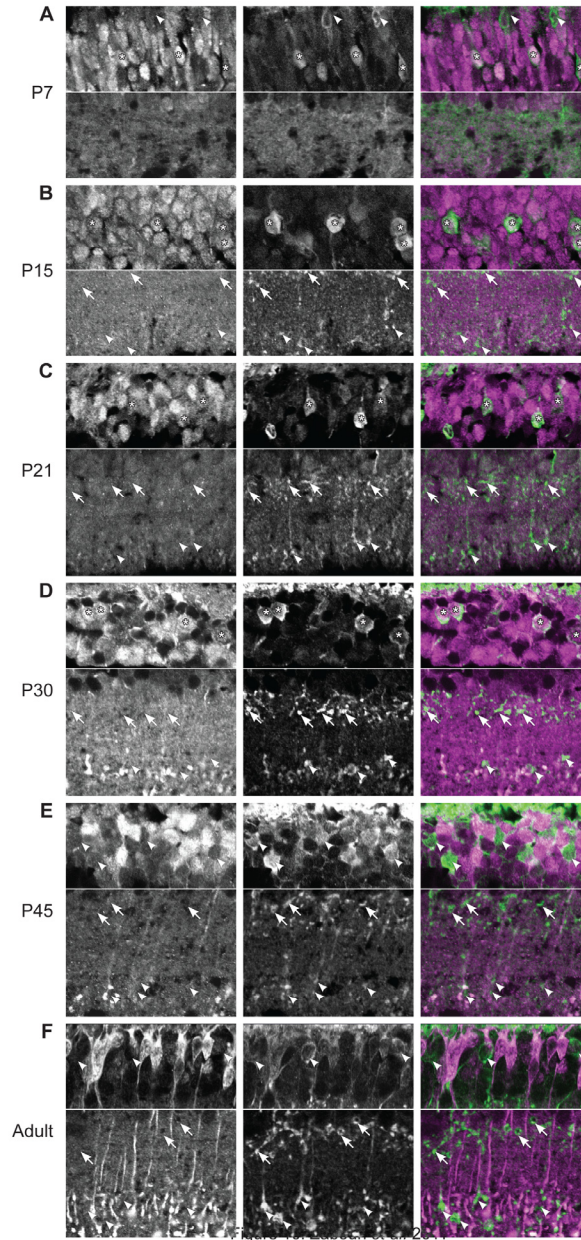


Figure 10: FAAH immunoreactivity in types 2 and 8 cone bipolar cells. **A-L:** Vertical sections from P7 (A), P15 (B), P21 (C), P30 (D), P45 (E) and adult (F) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH (magenta) and cell-type-specific marker for the types 2 and 8 of cone bipolar cells, recoverin (green). The upper panels depict the cell bodies of FAAH positive (stars) and negative (arrow heads) bipolar cells of. The lower panels display the synaptic terminals of types 2 OFF (arrows) and 8 ON (arrow heads) cone bipolar cells in IPL. Scale bar = 10 μ m.

Rods constitute the vast majority of photoreceptors in the rat's retina (99% of the photoreceptors are rods - La Vail, 1976). We showed in Figure 1 that some photoreceptors were more intensely immunopositive for FAAH and suggested that these cells were cones. This was verified using a cone specific marker that also allowed us to analyse the surrounding cells, which were thus considered as rods. These cone-transducin immune-negative cells also expressed FAAH (Figure 7) albeit to a smaller extent than cones. Around P5, a light immunofluorescence could be discerned in rods, but was very close to the background signal (Figure 7, panels A-C). By P7, the immunofluorescence in rods increased above background level and remained stable over the following weeks of development and maturation (panels D-U).

Müller cells are glial cells and the most important support cells in the retina. They are generated late in development and start to express GS around P5 (Riepe and Norenberg, 1978). FAAH was never expressed in Müller cells (Panels A to R, Figure 11).

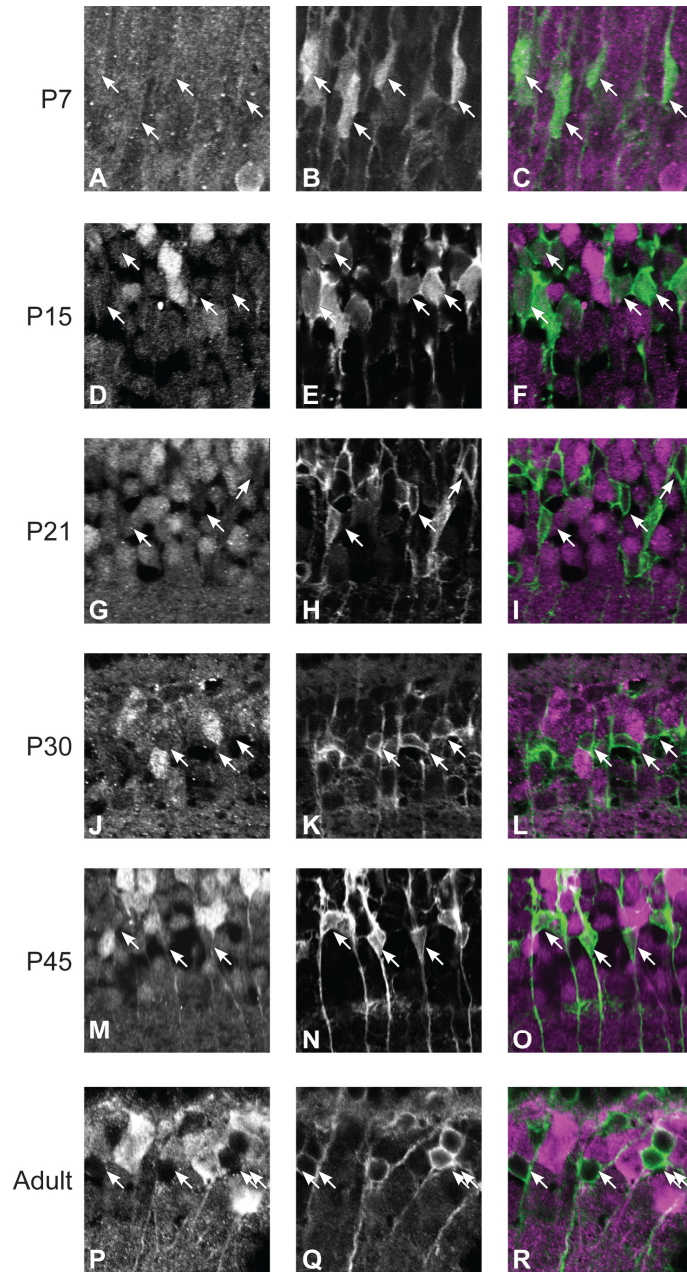


Figure 11: FAAH immunoreactivity in Müller cells in. **A-F:** Vertical sections from P7 (A-C), P15 (D-F), P21 (G-I), P30 (J-L), P45 (M-O) and adult (P-R) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for FAAH (1st column in gray scale and 3rd column in magenta) and cell-type-specific marker for glial Müller cells, glutamine synthetase (GS - 2nd column in gray scale and 3rd column in green). FAAH is never express in Müller cells (arrows), regardless of the age. Scale bar = 10 μ m.

Comparison of the temporal profiles of FAAH and CB1R expression

Figure 12 shows the timelines of FAAH and CB1R expressions in all retinal cells studied. This timeline was constructed from co-immunolabeling of CB1R and FAAH, and from detailed analysis of the expression of both proteins in each cell type. One can see over the first two week of life, there is a great deal of overlapping in the expression of these two proteins. In details, over the first week of life, CB1R and FAAH were both expressed by horizontal, amacrine and ganglion cells as well as cones. During the second week on life, they were still co-expressed, although FAAH upregulation and CB1R down regulation in rod bipolar cells were perceptible at P15. From P15 and on, the amount of overlap in the expression of FAAH and CB1R progressively decreased. During the third and fourth weeks of life, CB1R and FAAH co-expression was maintained in cones, but decreased in the INL. In the latter, FAAH presence was progressively eliminated from all somas but rod bipolar cells, while CB1R was expressed in horizontal cells, recoverin positive cone bipolar cells, and some amacrine cells. These data are summarized in panel F for all ages and cell types. Overall, one can observe that for the most part, CB1R and FAAH expression overlapped spatially during early postnatal development in all neuronal cell types except rods and Müller cells. In adult retinal, however, this overlap was greatly decreased, as it concurred only in two cell types (cones and ganglion cells).

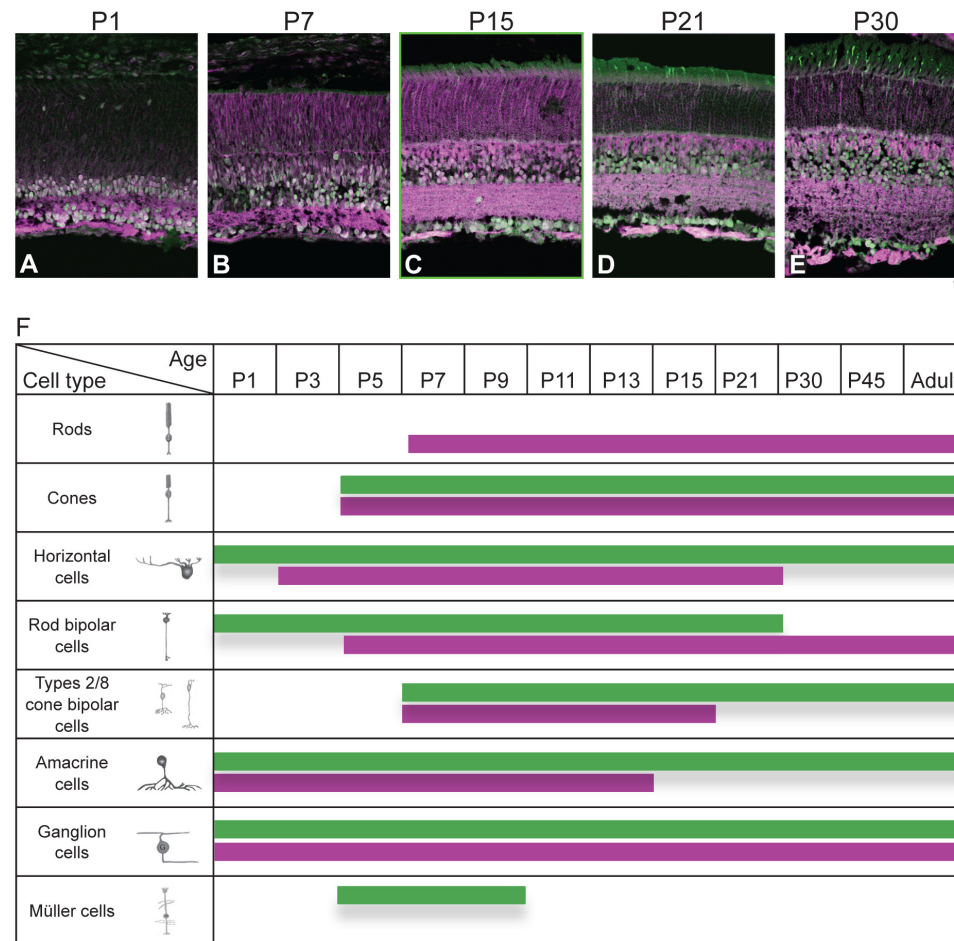


Figure 12: Comparison of CB1R and FAAH expression. **A-E:** Vertical sections from P1 (A), P7 (B), P15 (C), P21 (D), P30 (E) rat retinae. Confocal micrographs of retinae co-immunolabeled for CB1R (green) and FAAH (magenta). Scale bar = 10 μ m. **F:** summary of CB1R (■) and FAAH (■) overlap or lack thereof over the period investigated (P1-Adulthood).

Discussion

This study is the first one investigating the expression of FAAH, a key regulator of the eCB system, during postnatal development of the rodent retina. Using immunohistological staining, we showed that the pattern of expression of FAAH varies during postnatal development and maturation of the retina. Our data presents evidence of an early and widespread expression of FAAH, i.e. most cell types expressed the enzyme, though most demonstrated a transient expression. Around P3, FAAH was expressed by early-born neurons such as cones, horizontal and ganglion cells as well as some amacrine cells. This expression was absent from interneurons by the end of third week of life. Late-born neurons such as rod photoreceptors also expressed FAAH but to a smaller extent than cones. Both ON and OFF recoverin positive cone bipolar cells displayed a transient expression of FAAH between P7 and P30, whereas rod bipolar cells started expressing the enzyme around P15 and remained immunopositive into adulthood. Overall, these data, and particularly the pronounced redistribution of FAAH and transient nature of its expression in most cell types, suggest that the endocannabinoid system could be specifically involved in developmental and/or maturational processes, as well as information processing in adult retina. In brain regions such as hippocampus, the enzyme FAAH is predominantly linked to the metabolism of AEA which is the main eCB ligand found in this structure in adults animals (Berrendero et al., 1999). A different picture is seen at the retinal level as 2-AG is found in much higher concentration than AEA (by a factor of 25) in several adult animal models (Bisogno et al., 1999, Chen et al., 2005). In the rat retina, reports indicate that AEA is either present at low concentration (Nucci et al., 2007) or simply absent (Straiker et al., 1999). Given that FAAH is capable of degrading 2-AG (Goparaju et al., 1998, Ueda et al., 1998), it may well be that the close relation between AEA and FAAH found in brain regions does not stand in the retina. Consequently, FAAH could be as well involved in regulating retinal 2-

AG concentration or other, less characterized, eCBs as has been proposed by Di Marzo and Maccarrone (2008) in a recent review.

In contrast to classical neurotransmitters, eCBs, are rather produced locally at the moment of their intended action. This model places the enzymes responsible for biosynthesis and degradation of eCBs as critical regulators of their signalling. We established the temporal variation of the total amount of FAAH in our previous study (Zabouri et al., 2011). This variation followed a bimodal profile as the total amount of the enzyme decreased during the first week of life, before being upregulated during the second one. In conjunction with our immunohistological data, this timeline suggests that during the first week of life, there was a redistribution of FAAH, as the pool of cells containing FAAH increased (addition of horizontal cells at P3 for example). The production of the enzyme increased during the second week of life as more cell types became FAAH positive. After the second week, FAAH was again redistributed as its expression progressively disappeared from most cell types and became extremely strong in rod bipolar cells.

FAAH expression during retinal development

Postnatal retinal development has been well studied and described by several groups, using different techniques (Fletcher and Kalloniatis, 1997, Koulen, 1997, Rich et al., 1997, Sharma and Johnson, 2000, Hack et al., 2002, Sharma et al., 2003, Rapaport et al., 2004). The order of the events described here is in line with those reports and has been described in details in our previous paper (Zabouri et al., 2011).

RGCs and amacrine cells

FAAH is expressed in most early-born neurons by P3. Our data demonstrate that the enzyme was expressed in some ganglion cells and that this pattern did not vary over time. Its presence in large ganglion cells has been previously reported in adult mice and Sprague-Dawley rats (Yazulla et al., 1999, Hu et al., 2010). The expression of FAAH in the nerve fibre layer

increased over the second month of life (data not shown). This expression is consistent with the demonstrated contribution of eCBs in the establishment of proper axon targeting in the visual system (Argaw et al., 2011) and other sensory systems (Li et al., 2009).

The transient expression of FAAH during development suggests that eCBs need to be controlled in the close environment of temporarily expressing FAAH cells. Such transient expression was observed in amacrine cells. It was present early on in most amacrine cells, and in particular, in ON and OFF cholinergic amacrine cells during the first two weeks of life. One can thus propose that eCB may be involved in developmental processes taking place within the inner retina, such as synapse establishment (Schubert et al., 2008), refinement of ganglion cells dendrites (Kim et al., 2010), and retinal spontaneous waves (see the section on Functional considerations). Moreover, a recent study demonstrated that cholinergic amacrine cells showed evidence of plasticity during early postnatal development (Zhang et al., 2005), a process in which eCBs could be involved.

In non-cholinergic amacrine cells, two patterns of expression were observed, namely a vesicle-like pattern. The association of FAAH with cytoplasmic vesicle has been reported during postnatal hippocampal development (Morozov et al., 2004). In accordance with that study, we do not report any age relation between FAAH cytosolic vesicle-like distribution and postnatal development.

Cones and horizontal cells

FAAH emerged in horizontal cells early during postnatal development, between P1 and P3. It remained stable through the first two weeks of life, after which it was greatly down regulated. As stated before, this transient expression suggests that eCBs need to be controlled in the close environment of these cells during development. FAAH absence from horizontal cells in adult retina is in agreement with a recent study on the

expression of the eCB system in adult mouse retina (Hu et al., 2010). However, it is in disagreement with Yazulla et al. (1999), who reported a light expression of FAAH in rat horizontal cells. Since all three studies used antibodies tested against KO animals, these differences cannot be accounted for by a lack of antibody specificity. A more plausible explanation would be that this discrepancy comes from a species/strains difference. Yazulla et al. (1999) used albino rats, which have been shown to have anatomically and functionally different retinæ from pigmented animals (Crespo et al., 1985, Rachel et al., 2002, Heiduschka and Schraermeyer, 2008).

FAAH appeared later in cones (around P5), in their cell bodies and pedicles and remained strongly present into adulthood. In this cell type, FAAH and CB1R were co-expressed. These data are in agreement with previous findings reported by Yazulla et al. (1999) and Hu et al. (Hu et al., 2010). Given the role of CB1R in retrograde signalling (see for review Kreitzer and Regehr, 2002), the presence of the degradative enzyme in the same cell as the receptor is logical. Since the timing of CB1R and FAAH expressions coincides with the appearance of the first cone-horizontal cell synapses in the forming OPL (Dhingra et al., 1997, Rich et al., 1997, Hack et al., 2002), one could hypothesize that the eCB system may modulate early glutamatergic transmission between cone photoreceptors and horizontal cells (starting around P2 - Raven et al. (Raven et al., 2008)). This type of transmission is considered to participate in the organization of horizontal cell dendritic trees. This hypothesis is further supported by the fact that eCBs have been shown to modulate synaptogenesis in the hippocampus (Kim and Thayer, 2001). Another putative hypothesis is that horizontal cells could also affect cone development, as they are likely to modulate cone synaptogenesis and mosaic organization through GABAergic transmission (Schnitzer and Rusoff, 1984, Fletcher and Kalloniatis, 1997, Mitchell et al., 1999, Fei, 2003). However, a recent study reported only very subtle changes in the retina of animals in which GABA production was selectively knocked out of horizontal cells during

their development (Schubert et al., 2010), making the above mentioned hypothesis less attractive.

FAAH expression in late-born cells

All groups of late-born cells, except glial cells, expressed FAAH around P5-P9, a period which corresponds to developmental processes such as cell migration, subtype identity acquisition and morphological changes (Sharma et al., 2003, Morgan et al., 2006). Neuroblasts soma expressed FAAH lately (around P7).

Using a marker for all bipolar cell types in conjunction with one for rod bipolar cells only, we were able to differentiate cone and rod bipolar cells. Some cone bipolar cells transiently expressed FAAH during the first month of life. Conversely, the enzyme expression in rod bipolar cells appeared toward the end of the second week of life, and reached adult-like expression one month later. The presence of FAAH in adult rod bipolar cells only is at odds with the findings of Yazulla et al. (1999) who reported FAAH expression in at least one type of cone bipolar cells, and its absence from rod bipolar cells in Sprague-Dawley rats. This study and ours were conducted using antibodies raised against similar antigens that were both tested on FAAH knockout mice generated in Dr Cravatt laboratory (Cravatt et al., 2001, see Methods). Thus, differences in FAAH distributions are not likely to be caused by the lack of specificity of the antibodies. It could arise from strain or protocol differences. To investigate this, we replicated our experiments in Sprague-Dawley rats. FAAH expression was clearly found in rod bipolar cells (as in pigmented rats) and in some cone bipolar cells, as in Yazulla et al. (1999 - data not shown). This partial agreement suggests that FAAH is not equally revealed by all antibodies. In support of this last statement, we found a comparable distribution in pigmented rats using another FAAH antibody raised against the N-terminal portion of the protein (Alpha diagnostics). Overall, these data suggest that the enzyme is probably present in both cell types.

To investigate whether the eCB system could affect the development and signalling of both ON and OFF bipolar cells, we studied FAAH expression in ON and OFF recoverin positive cells. During the second and third weeks of life, all recoverin positive cells were immunoreactive for FAAH, after which they lost their immunoresponsiveness to this enzyme. These results suggest that the eCB system could be involved in the maturational processes of these cells. Indeed, during the second week of life, bipolar cells and photoreceptors develop the complete machinery to communicate (Sherry et al., 2003). The transient presence of elements of the eCB system in bipolar cells during this period supports their involvement in developmental processes, whether directly in synaptogenesis, as reported elsewhere (Kim and Thayer, 2001) or simply as an activity regulator.

Rod photoreceptors started to express FAAH around P7 and remained immunoreactive into adulthood. This data, cumulated with FAAH expression in rod bipolar cells raises the possibility that the rod pathway could control the eCB degradation and modulate for example, CB1R activity in cones (Yazulla et al., 1999, Fan and Yazulla, 2003, Struik et al., 2006), thereby modulating the signal transfer from cones to bipolar cells.

Functional considerations

During the first week of life, spontaneous activity could be an important mechanism by which visual map refinement occurs in thalamic nuclei (see for review Torborg and Feller, 2005).

Spontaneous discharges have been shown to originate from cholinergic amacrine and ganglion cells (Feller et al., 1996, Stacy et al., 2005); two cell types expressing CB1R (Zabouri et al., 2011) and FAAH during the first week of life. ACh is the major excitatory input onto ganglion cells in the developing retina, acting via nicotinic receptors and affecting the spontaneous bursting activity of these cells (Feller et al., 1996, Sernagor and Grzywacz, 1996). Although no studies were conducted during development, this neurotransmitter was shown to be modulated by eCB signalling in the adult

cortex (Degroot et al., 2006). We previously proposed the hypothesis that a propagating wave of spontaneous activity could cause local changes in eCB concentration, which would in turn limit the spread of spontaneous activity through CB1R activation (Zabouri et al., 2011). The data presented here demonstrate that cholinergic amacrine cells are well-suited to modulate CB1R activity during the days when spontaneous activity occurs, thereby further supporting this hypothesis.

Given the fact that during developmental and maturational stages, CB1R and FAAH are often found in the same cell types, a pattern that is seldom found in the adult retina, we suggest that this system is self-regulated during development. This idea has been raised by Harkany et al (Harkany et al., 2008) who demonstrated that synthetic enzymes and CB1R were expressed in the same cells in developing neurons.

The adult pattern we reported, i.e. the fact that FAAH and CB1R are not expressed in the same cells (with the exception of cones and some ganglion cells), is in agreement with that described in the retina (Yazulla et al., 1999, Hu et al., 2010) and elsewhere in the nervous system (Egertova et al., 1998). Since for most cells, FAAH and CB1R appear mutually exclusive it may be that eCBs play a role in cell to cell communication.

Conclusion

This study revealed the presence of FAAH in retinal cells of developing and mature rats. We showed that there is a redistribution of FAAH expression from birth to adulthood, which supports the notion that this enzyme is involved in developmental processes. In addition, the overlap of FAAH and CB1R expression patterns in young animals suggests that retinal cells autoregulate CB1R activation during the course of development. Such autoregulation is not likely to occur in adult animals given the absence of overlap expression. Overall these findings indicate that, as shown in other structures of the brain, the eCB system is likely to play an instrumental role in the development and function of the retina.

Acknowledgements. This work was supported by a joint FRSQ Vision Network grant – Fondation des maladies de l’oeil to J.-F.B. and C.C. and by a NSERC grant (194670-2009) to CC and a CIHR grant (MOP 86495) to J-F.B. N.Z. was supported by a CIHR-E.A. Baker Foundation studentship and J.-F.B. by a Chercheur-Boursier Junior 2 from the Fonds de la recherche en santé du Québec. We are grateful to Gabriella Gobbi and Daniele Piomelli for providing the FAAH transgenic tissue. We also would like to thank Michel Cayouette for his assistance in the choice of the antibodies.

Reference

- Acosta ML, Bumsted O'Brien KM, Tan SS, Kalloniatis M (2008) Emergence of cellular markers and functional ionotropic glutamate receptors on tangentially dispersed cells in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 506:506-523.
- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I (2005) The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19:1704-1706.
- Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cecyre B, Chaine N, Cherif H, Tea N, Lutz B, Ptito M, Bouchard JF (2011) Concerted Action of CB1 Cannabinoid Receptor and Deleted in Colorectal Cancer in Axon Guidance. *J Neurosci* 31:1489-1499.
- Badea TC, Nathans J (2010) Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors Brn3a, Brn3b, and Brn3c: Analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling. *Vision Res*.
- Barnstable CJ, Hofstein R, Akagawa K (1985) A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res* 352:286-290.
- Barton KM, Levine EM (2008) Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. *Dev Dyn* 237:672-682.
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:19115-19120.
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* New York, NY 316:1212-1216.
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33:181-191.
- Bisogno T, Delton-Vandenbroucke I, Milone A, Lagarde M, Di Marzo V (1999) Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Arch Biochem Biophys* 370:300-307.
- Brandon C (1985) Improved immunocytochemical staining through the use of Fab fragments of primary antibody, Fab-specific second antibody, and Fab-horseradish peroxidase. *J Histochem Cytochem* 33:715-719.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82:1131-1149.

- Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY (2007) Reactive changes of retinal astrocytes and Muller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *J Anat* 210:54-65.
- Chebrou H, Bigey F, Arnaud A, Galzy P (1996) Study of the amidase signature group. *Biochim Biophys Acta* 1298:285-293.
- Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo V (2005) Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1062-1067.
- Chun MH, Kim IB, Oh SJ, Chung JW (1999) Synaptic connectivity of two types of recoverin-labeled cone bipolar cells and glutamic acid decarboxylase immunoreactive amacrine cells in the inner plexiform layer of the rat retina. *Vis Neurosci* 16:791-800.
- Cinar O, Semiz O, Can A (2006) A microscopic survey on the efficiency of well-known routine chemical fixatives on cryosections. *Acta Histochem* 108:487-496.
- Coleman JE, Zhang Y, Brown GA, Semple-Rowland SL (2004) Cone cell survival and downregulation of GCAP1 protein in the retinas of GC1 knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3397-3403.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9371-9376.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87.
- Crespo D, O'Leary DD, Cowan WM (1985) Changes in the numbers of optic nerve fibers during late prenatal and postnatal development in the albino rat. *Brain Res* 351:129-134.
- Degroot A, Kofalvi A, Wade MR, Davis RJ, Rodrigues RJ, Rebola N, Cunha RA, Nomikos GG (2006) CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Molecular pharmacology* 70:1236-1245.
- Deutsch DG, Chin SA (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochemical pharmacology* 46:791-796.
- Dhingra NK, Ramamohan Y, Raju TR (1997) Developmental expression of synaptophysin, synapsin I and syntaxin in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res* 102:267-273.
- Di Marzo V, Maccarrone M (2008) FAAH and anandamide: is 2-AG really the odd one out? *Trends Pharmacol Sci* 29:229-233.
- Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* 265:2081-2085.

- Euler T, Wassle H (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361:461-478.
- Fan SF, Yazulla S (2003) Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci* 20:177-188.
- Farah MH, Easter SS, Jr. (2005) Cell birth and death in the mouse retinal ganglion cell layer. *J Comp Neurol* 489:120-134.
- Fei Y (2003) Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice. *Mol Vis* 9:31-42.
- Feller MB, Wellis DP, Stellwagen D, Werblin FS, Shatz CJ (1996) Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science New York, NY* 272:1182-1187.
- Fernandez-Ruiz J, Gomez M, Hernandez M, de Miguel R, Ramos JA (2004) Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res* 6:389-401.
- Fletcher EL, Kalloniatis M (1997) Localisation of amino acid neurotransmitters during postnatal development of the rat retina. *J Comp Neurol* 380:449-471.
- Gaillard F, Bonfield S, Gilmour GS, Kuny S, Mema SC, Martin BT, Smale L, Crowder N, Stell WK, Sauve Y (2008) Retinal anatomy and visual performance in a diurnal cone-rich laboratory rodent, the Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Comp Neurol* 510:525-538.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzman M (2006) Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr Pharm Des* 12:2319-2325.
- Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E (2007) Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol* 500:222-238.
- Goldenthal KL, Hedman K, Chen JW, August JT, Willingham MC (1985) Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *J Histochem Cytochem* 33:813-820.
- Gomez M, Hernandez M, Fernandez-Ruiz J (2007) The activation of cannabinoid receptors during early postnatal development reduces the expression of cell adhesion molecule L1 in the rat brain. *Brain Res* 1145:48-55.
- Goncalves MB, Suetterlin P, Yip P, Molina-Holgado F, Walker DJ, Oudin MJ, Zentar MP, Pollard S, Yanez-Munoz RJ, Williams G, Walsh FS, Pangalos MN, Doherty P (2008) A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 38:526-536.
- Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S (1998) Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett* 422:69-73.

- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20:441-458.
- Gunhan E, Choudary PV, Landerholm TE, Chalupa LM (2002) Depletion of cholinergic amacrine cells by a novel immunotoxin does not perturb the formation of segregated on and off cone bipolar cell projections. *J Neurosci* 22:2265-2273.
- Hack I, Koulen P, Peichl L, Brandstatter JH (2002) Development of glutamatergic synapses in the rat retina: the postnatal expression of ionotropic glutamate receptor subunits. *Vis Neurosci* 19:1-13.
- Harkany T, Mackie K, Doherty P (2008) Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol* 18:338-345.
- Haverkamp S, Ghosh KK, Hirano AA, Wassle H (2003) Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *J Comp Neurol* 455:463-476.
- Haverkamp S, Wassle H (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424:1-23.
- Heiduschka P, Schraermeyer U (2008) Comparison of visual function in pigmented and albino rats by electroretinography and visual evoked potentials. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246:1559-1573.
- Hill MN, Kambo JS, Sun JC, Gorzalka BB, Galea LA (2006) Endocannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal cell proliferation and activation of defensive behaviours. *Eur J Neurosci* 24:1845-1849.
- Hirano AA, Brandstatter JH, Brecha NC (2005) Cellular distribution and subcellular localization of molecular components of vesicular transmitter release in horizontal cells of rabbit retina. *J Comp Neurol* 488:70-81.
- Hu SS, Arnold A, Hutchens JM, Radicke J, Cravatt BF, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A (2010) Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J Comp Neurol* 518:3848-3866.
- Hudson CD, Sayan AE, Melino G, Knight RA, Latchman DS, Budhram-Mahadeo V (2008) Brn-3a/POU4F1 interacts with and differentially affects p73-mediated transcription. *Cell Death Differ* 15:1266-1278.
- Ino H, Chiba T (2000) Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 78:163-174.
- Inoue A, Obata K, Akagawa K (1992) Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J Biol Chem* 267:10613-10619.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18:8936-8946.
- Johnson PT, Williams RR, Reese BE (2001) Developmental patterns of protein expression in photoreceptors implicate distinct environmental versus cell-intrinsic mechanisms. *Vis Neurosci* 18:157-168.

- Kapfhammer JP, Christ F, Schwab ME (1994) The expression of GAP-43 and synaptophysin in the developing rat retina. *Brain Res Dev Brain Res* 80:251-260.
- Keimpema E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G, Yanagawa Y, Watanabe M, Mackie K, Harkany T (2010) Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *J Neurosci* 30:13992-14007.
- Kim D, Thayer SA (2001) Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 21:RC146.
- Kim IJ, Zhang Y, Meister M, Sanes JR (2010) Laminar restriction of retinal ganglion cell dendrites and axons: subtype-specific developmental patterns revealed with transgenic markers. *J Neurosci* 30:1452-1462.
- Koulen P (1997) Vesicular acetylcholine transporter (VAChT): a cellular marker in rat retinal development. *Neuroreport* 8:2845-2848.
- Kreitzer AC, Regehr WG (2002) Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr Opin Neurobiol* 12:324-330.
- La Vail MM (1976) Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest Ophthalmol* 15:64-70.
- Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME (2006) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* 12:1160-1166.
- Leonelli M, Britto LR, Chaves GP, Torrao AS (2005) Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Brain Res Dev Brain Res* 156:176-182.
- Li L, Bender KJ, Drew PJ, Jadhav SP, Sylwestrak E, Feldman DE (2009) Endocannabinoid signaling is required for development and critical period plasticity of the whisker map in somatosensory cortex. *Neuron* 64:537-549.
- Li S, Mo Z, Yang X, Price SM, Shen MM, Xiang M (2004) Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* 43:795-807.
- Liu X, Robinson ML, Schreiber AM, Wu V, Lavail MM, Cang J, Copenhagen DR (2009) Regulation of neonatal development of retinal ganglion cell dendrites by neurotrophin-3 overexpression. *J Comp Neurol* 514:449-458.
- Lopez EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, Lopez-Costa JJ (2010) Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse*.
- Lu Q, Straiker A, Maguire G (2000) Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci* 17:91-95.
- Majumdar S, Wassle H, Jusuf PR, Haverkamp S (2008) Mirror-symmetrical populations of wide-field amacrine cells of the macaque monkey retina. *J Comp Neurol* 508:13-27.
- Mayor S, Maxfield FR (1995) Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol Biol Cell* 6:929-944.

- McGinnis JF, Stepanik PL, Baehr W, Subbaraya I, Lerious V (1992) Cloning and sequencing of the 23 kDa mouse photoreceptor cell-specific protein. *FEBS Lett* 302:172-176.
- McGinnis JF, Stepanik PL, Jariangprasert S, Lerious V (1997) Functional significance of recoverin localization in multiple retina cell types. *J Neurosci Res* 50:487-495.
- Melan MA, Sluder G (1992) Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells. Implications for immunofluorescence microscopy. *J Cell Sci* 101 (Pt 4):731-743.
- Milam AH, Dacey DM, Dizhoor AM (1993) Recoverin immunoreactivity in mammalian cone bipolar cells. *Vis Neurosci* 10:1-12.
- Mitchell CK, Huang B, Redburn-Johnson DA (1999) GABA(A) receptor immunoreactivity is transiently expressed in the developing outer retina. *Vis Neurosci* 16:1083-1088.
- Morest DK (1970) The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z Anat Entwicklungsgesch* 131:45-67.
- Morgan JL, Dhingra A, Vardi N, Wong RO (2006) Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells. *Nat Neurosci* 9:85-92.
- Morishita J, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueno M, Sakamoto H, Maekawa N, Ueda N (2005) Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. *J Neurochem* 94:753-762.
- Morozov YM, Ben-Ari Y, Freund TF (2004) The spatial and temporal pattern of fatty acid amide hydrolase expression in rat hippocampus during postnatal development. *European Journal of Neuroscience* 20:459-466.
- Morrow EM, Chen CM, Cepko CL (2008) Temporal order of bipolar cell genesis in the neural retina. *Neural Develop* 3:2.
- Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3860-3868.
- Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, Jain V, Dhingra NK (2009) Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration. *Neuroscience* 160:517-529.
- Negishi K, Kato S, Teranishi T (1988) Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas. *Neurosci Lett* 94:247-252.
- Nucci C, Gasperi V, Tartaglione R, Cerulli A, Terrinoni A, Bari M, De Simone C, Agro AF, Morrone LA, Corasaniti MT, Bagetta G, Maccarrone M (2007) Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2997-3004.
- Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B, Beyring R, Robb S, Kirkham FJ, Engel AG (2001) Choline acetyltransferase

- mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2017-2022.
- Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A (2001) Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 49:305-312.
- Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M, Turner EE (2005) Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci* 25:11595-11604.
- Rachel RA, Dolen G, Hayes NL, Lu A, Erskine L, Nowakowski RS, Mason CA (2002) Spatiotemporal features of early neuronogenesis differ in wild-type and albino mouse retina. *J Neurosci* 22:4249-4263.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474:304-324.
- Raven MA, Orton NC, Nassar H, Williams GA, Stell WK, Jacobs GH, Bech-Hansen NT, Reese BE (2008) Early afferent signaling in the outer plexiform layer regulates development of horizontal cell morphology. *J Comp Neurol* 506:745-758.
- Reese BE (2010) Development of the retina and optic pathway. *Vision Res*.
- Rich KA, Zhan Y, Blanks JC (1997) Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 388:47-63.
- Riepe RE, Norenberg MD (1978) Glutamine synthetase in the developing rat retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 27:435-444.
- Riepe RE, Norenberg MD (1977) Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268:654-655.
- Rowan S, Cepko CL (2004) Genetic analysis of the homeodomain transcription factor Chx10 in the retina using a novel multifunctional BAC transgenic mouse reporter. *Dev Biol* 271:388-402.
- Schnitzer J, Rusoff AC (1984) Horizontal cells of the mouse retina contain glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity during early developmental stages. *J Neurosci* 4:2948-2955.
- Schubert T, Huckfeldt RM, Parker E, Campbell JE, Wong RO (2010) Assembly of the outer retina in the absence of GABA synthesis in horizontal cells. *Neural Dev* 5:15.
- Schubert T, Kerschensteiner D, Eggers ED, Misgeld T, Kerschensteiner M, Lichtman JW, Lukasiewicz PD, Wong RO (2008) Development of presynaptic inhibition onto retinal bipolar cell axon terminals is subclass-specific. *J Neurophysiol* 100:304-316.
- Sernagor E, Grzywacz NM (1996) Influence of spontaneous activity and visual experience on developing retinal receptive fields. *Curr Biol* 6:1503-1508.
- Sharma RK, Johnson DA (2000) Molecular signals for development of neuronal circuitry in the retina. *Neurochem Res* 25:1257-1263.

- Sharma RK, O'Leary TE, Fields CM, Johnson DA (2003) Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 145:93-105.
- Sherry DM, Wang MM, Bates J, Frishman LJ (2003) Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol* 465:480-498.
- Soltys J, Yushak M, Mao-Draayer Y (2010) Regulation of neural progenitor cell fate by anandamide. *Biochem Biophys Res Commun* 400:21-26.
- Stacy RC, Demas J, Burgess RW, Sanes JR, Wong RO (2005) Disruption and recovery of patterned retinal activity in the absence of acetylcholine. *J Neurosci* 25:9347-9357.
- Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G (1999) Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14565-14570.
- Struik ML, Yazulla S, Kamermans M (2006) Cannabinoid agonist WIN 55212-2 speeds up the cone response to light offset in goldfish retina. *Vis Neurosci* 23:285-293.
- Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB, Sutcliffe JG (1997) Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J Neurosci Res* 50:1047-1052.
- Torborg CL, Feller MB (2005) Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog Neurobiol* 76:213-235.
- Tsou K, Nogueron MI, Muthian S, Sanudo-Pena MC, Hillard CJ, Deutsch DG, Walker JM (1998) Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett* 254:137-140.
- Ueda N, Goparaju SK, Katayama K, Kurahashi Y, Suzuki H, Yamamoto S (1998) A hydrolase enzyme inactivating endogenous ligands for cannabinoid receptors. *J Med Invest* 45:27-36.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T (1995) Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem* 270:23823-23827.
- Voigt T (1986) Cholinergic amacrine cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 248:19-35.
- Voinescu PE, Kay JN, Sanes JR (2009) Birthdays of retinal amacrine cell subtypes are systematically related to their molecular identity and soma position. *J Comp Neurol* 517:737-750.
- Warrier A, Wilson M (2007) Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Vis Neurosci* 24:25-35.
- Weidman TA, Kuwabara T (1968) Postnatal development of the rat retina. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 79:470-484.

- Williams EJ, Walsh FS, Doherty P (2003) The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 160:481-486.
- Xiang M, Zhou L, Macke JP, Yoshioka T, Hendry SH, Eddy RL, Shows TB, Nathans J (1995) The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci* 15:4762-4785.
- Yan XX, Wiechmann AF (1997) Early expression of recoverin in a unique population of neurons in the human retina. *Anat Embryol (Berl)* 195:51-63.
- Yazulla S (2008) Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog Retin Eye Res* 27:501-526.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG (1999) Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. In: *J Comp Neurol*, vol. 415, pp 80-90.
- Zabouri N, Bouchard JF, Casanova C (2011) Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina. *J Comp Neurol* 519:1258-1280.
- Zhang J, Yang Z, Wu SM (2005) Development of cholinergic amacrine cells is visual activity-dependent in the postnatal mouse retina. *J Comp Neurol* 484:331-343.
- Zimov S, Yazulla S (2007) Vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1) co-localizes with fatty acid amide hydrolase (FAAH) in retinal amacrine cells. *Vis Neurosci* 24:581-591.

Article 3



Manuscript in preparation - January 13, 2011

**Impact of cannabinoid receptors type 1 and 2 in the retinal
function of adult mice**

Zabouri, N.^{1,2}, Cécyre, B.², Bouchard, J.-F.², Casanova, C.¹

¹Laboratoire des Neurosciences de la vision, ²Laboratoire de Neuropharmacologie, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running Title: Role of CB1R and CB2R in the retina

Keywords: Endocannabinoids, CB1R, CB2R, ERG, photoreceptors

Abstract

The presence of cannabinoid receptor type 1 (CB1R) has been demonstrated in the adult retina of rodents. It is expressed in cones, horizontal, bipolar, some amacrine and ganglion cells. Functional *in vitro* studies have demonstrated an effect of CB1R activation on the response and synaptic release of cones. It has also been showed that CB1R could affect bipolar cells response. No such data are available for CB2R despite the recent demonstration of CB2R mRNA and protein presence in the retina. In the present study, we investigated the consequences of removing either CB1R or CB2R in the retina of transgenic mice by recording electroretinographic responses (ERG). Our results indicate that the amplitude of the a- and b-waves of the ERG is increased in *cnr2^{-/-}* mice in scotopic conditions, while it remains unchanged in *cnr1^{-/-}* mice. However, *cnr1^{-/-}* mice only displayed an abnormal temporal profile for the b-wave. Under photopic conditions, our data revealed an abnormal retinal adaptation to light for *cnr2^{-/-}* animals. No effect was observed in *cnr1^{-/-}* mice. These data demonstrate that both receptors are involved in shaping the retinal response to light and suggest that they have different roles in retinal processing.

Introduction

In the last decades, several studies have investigated the endocannabinoid (eCB) system and its functional role in the retina. Recent anatomical data have shown a substantial expression of both cannabinoid receptor types 1 (CB1R - Yazulla et al., 1999; Hu et al., 2010; Zabouri et al, 2011a) and 2 (CB2R - Lu et al., 2000; Lopez et al., 2010) as well as other elements of the eCB system (Hu et al., 2010; Zabouri et al, 2011b) in the adult retina. CB1R expression was particularly well studied and its pattern of expression was established in several species, ranging from fish to primates (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 2000; Leonelli et al., 2005; Lalonde et al., 2006; Nucci et al., 2007; Warriar and Wilson, 2007; Hu et al., 2010; Zabouri et al, 2011a and see Yazulla, 2008 for review). Briefly, CB1R is present in cones (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Zabouri et al, 2011a), horizontal cells (Hu et al., 2010; Zabouri et al, 2011a), some bipolar (Yazulla et al., 1999; Leonelli et al., 2005; Hu et al., 2010; Zabouri et al, 2011a) and amacrine cells (Yazulla et al., 1999; Leonelli et al., 2005; Warriar and Wilson, 2007; Hu et al., 2010; Zabouri et al, 2011a) and ganglion cells (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Leonelli et al., 2005; Lalonde et al., 2006; Yazulla, 2008; Zabouri et al, 2011a). The presence of CB2R is not as well characterized as only two studies (Lu et al., 2000; Lopez et al., 2010) have established its presence in the retina. In the first Lu et al. (2000) demonstrate the presence of the mRNA of the CB2 receptor in the retina, but its exact distribution was not determined. In the second, Lopez et al. (2010) detected the CB2R protein using immunohistochemical techniques and CB2R was localized, using cell morphology and position, in the inner segment of photoreceptors, horizontal, amacrine, displaced amacrine and ganglion cells.

In addition to this, both CB1R and CB2R have been associated with development and maturation of the CNS in structures such the hippocampus, the cerebellum, the cortex and the retina, among others. In particular, recent data from our laboratory showed a redistribution of both CB1R and FAAH during retinal

postnatal development, thereby suggesting a role for this system in retinal development (Zabouri et al, 2011a, b).

Functional studies have demonstrated that CB1R activation affects cone photoreceptors' response to light (Fan and Yazulla, 2003; Straiker and Sullivan, 2003) and synaptic release (Fan and Yazulla, 2007). This receptor may also modify bipolar cells synaptic release through the modulation of calcium currents (Straiker et al., 1999) as well as the temporal characteristics of their responses via a modulation of potassium rectifying currents (Yazulla et al., 2000). In addition, CB1R activation can modulate GABAergic release from amacrine cells (Warrier and Wilson, 2007) and impact excitability of cultured ganglion cells (Lalonde et al., 2006). The effect of activating CB2R in the retina remains unknown. All studies aimed at unveiling the functional role of CB1R were carried out *in vitro*, in non-mammalian species. To our knowledge, there are no studies which investigated the role of eCB receptors in mammals, nor *in vivo* preparations. In the present study, we have investigated the functional consequences of removing either CB1R or CB2R in the retina of transgenic mice (*cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-}) by comparing the electroretinogram (ERG) of WT and KO mice. Our results suggest that both receptors are involved in a different way in retinal processing.

Materials and Methods

Animals

All procedures were in accordance to the guidelines set out by the Canadian Council on Animal Care and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the ethics committee on animal research of the Université de Montréal. CB1R, CB2R transgenic mice and their appropriate wild type counter parts were obtained from Beat Lutz (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Germany) and Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), respectively. The

colonies were maintained in-house. The animals were kept under a normal lighting environment (12 hours dark/12 hours light).

Electroretinography

The age of animals at the date of the ERGs recording was between 3 and 4 months. ERG recordings were performed as previously reported (Plaziac et al., 2003). Briefly, after a 12-hour period of dark adaptation, mice were anaesthetized with an intramuscular injection of ketamine (85 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Pupils were dilated with a drop of 1% cyclopentolate hydrochloride. The mice were then positioned in a Ganzfeld which housed a photostimulator (PS33plus, Grass Instruments). The ERGs were recorded with a silver electrode inserted in a custom-made corneal lens adapted for mice (Sagdullaev et al., 2004). Reference and ground electrodes (E2 subdermal electrode; Grass Instruments) were inserted subcutaneously at the base of the head. Broadband ERGs (bandwidth, 1–1000 Hz; 10,000x; P511, Grass, West Warwick, RI) and oscillatory potentials (bandwidth, 100–1000 Hz; 50,000x) were recorded simultaneously. Signals were fed to an analogue-digital interface (1401, CED, Cambridge, UK) and were acquired using the software Signal (v.3.01x, CED, Cambridge UK). Scotopic luminance-response functions were obtained in response to progressively brighter stimuli spanning a 4.4 log-unit range (interstimulus interval: 10s; average: 5 flashes; intensity interval -3.0 to 1.4 log cd.s.m⁻²). The photopic (cone-mediated) signal was recorded thereafter: ERGs were recorded every 5 min for 20 minutes under a photopic background of 30 cd.m⁻² (flash intensity: 1.4 log cd.s.m⁻²; interstimulus interval: 1s, averaged over 20 flashes).

Analysis

Analysis of the ERG waveforms was performed according to standard practice (Marmor et al., 2009). The amplitude of the a-wave was measured from baseline to the most negative trough, whereas that of the b-wave was measured from the trough of the a-wave to the highest positive peak of the retinal response. Implicit times were measured from flash onset to the peak responses. Scotopic

luminance-response function curves were obtained by plotting the amplitude of the b-wave against the intensity of the flash used to evoke each response. The rod V-max value (maximum rod-mediated response) was defined as the amplitude of the b-wave measured when the a-wave appeared clearly on the ERG. The mixed V-max referred to the highest evoked b-wave. The amplitude of each oscillatory potential (OP) was measured. OP amplitudes were reported as the sum of the OPs ($OP_{1/2} + OP_3 + OP_4 + OP_5$ in scotopic conditions and $OP_1 + OP_2 + OP_3$ in photopic conditions). Statistical analysis was performed using either repeated measures ANOVA or one-way ANOVA and Dunnett post hoc test (SPSS 19, IBM, Somers, NY). In some cases, an independent Student t-test was used.

Tissue Preparation

Mice were sacrificed after the recordings by an overdose of Isoflurane. One eye was immediately removed for Western blot analysis. The retina was dissected on ice and promptly frozen.

Western blot

Retinas were homogenized in RIPA lysis buffer, supplemented with a protease inhibitor mixture (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin - 1:1000 - and Phenylmethylsulfonyl fluoride - 0.2 mg/ml -; Roche Applied Science, Laval, QC) then centrifuged and the supernatant was extracted and stored. Protein contents were equalized using a BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Fischer scientific, Ottawa, ON). Twenty to thirty micrograms of protein/sample of the homogenate were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane filter (BioTrace NT, Life sciences, Pall Corporation, Pensacola, Florida, USA), blocked 5% skim and incubated overnight with the primary antibodies, namely: anti-CB1R, anti-CB2R, anti-MGL, anti-FAAH, anti-DAGL α , anti-NAPE-PLD and anti-GAPDH, the last antibody was used to ensure the proper loading. The following day, the blot was exposed to the appropriate secondary antibody (Jackson Immunoresearch

Laboratories, West Grove, PA). Detection was carried out using homemade ECL Western blotting detection reagents.

Densitometric analysis was performed using Scion Image software (version 4.03) on scanned films obtained from a series of three independent Western blots, each performed with retinal samples from distinct experimental groups.

Results

The dark adapted retinal function

Representative examples of scotopic ERG responses in wild type (WT), *Cnr1*^{-/-} and *Cnr2*^{-/-} animals are illustrated in figure 1. Close inspection of the waveforms revealed no change in the *Cnr1*^{-/-} mice (compare panels A and B) and increased amplitudes of both the a- and b-waves in *Cnr2*^{-/-} mice (compare panels A and C). The averaged responses \pm SEM are presented as a function of flash intensity for both ERG components in the panels D and E. A significant change in the a-wave amplitude was observed at all intensities in *Cnr2*^{-/-} mice only (repeated measures ANOVA with Dunnett posthoc, for intensities -0.17 to 1.37 log cd.s.m⁻², $p=0.991$ for *Cnr1*^{-/-} and 0.032 for *Cnr2*^{-/-} mice). The amplitude of the b-wave (panel E) was not changed in *Cnr1*^{-/-} mice but increased in *Cnr2*^{-/-} mice at specific intensities (one-way ANOVA, with Dunnett posthoc for intensities -0.03 to 0.73 log cd.s.m⁻², $p\leq 0.05$ for *Cnr2*^{-/-} mice).

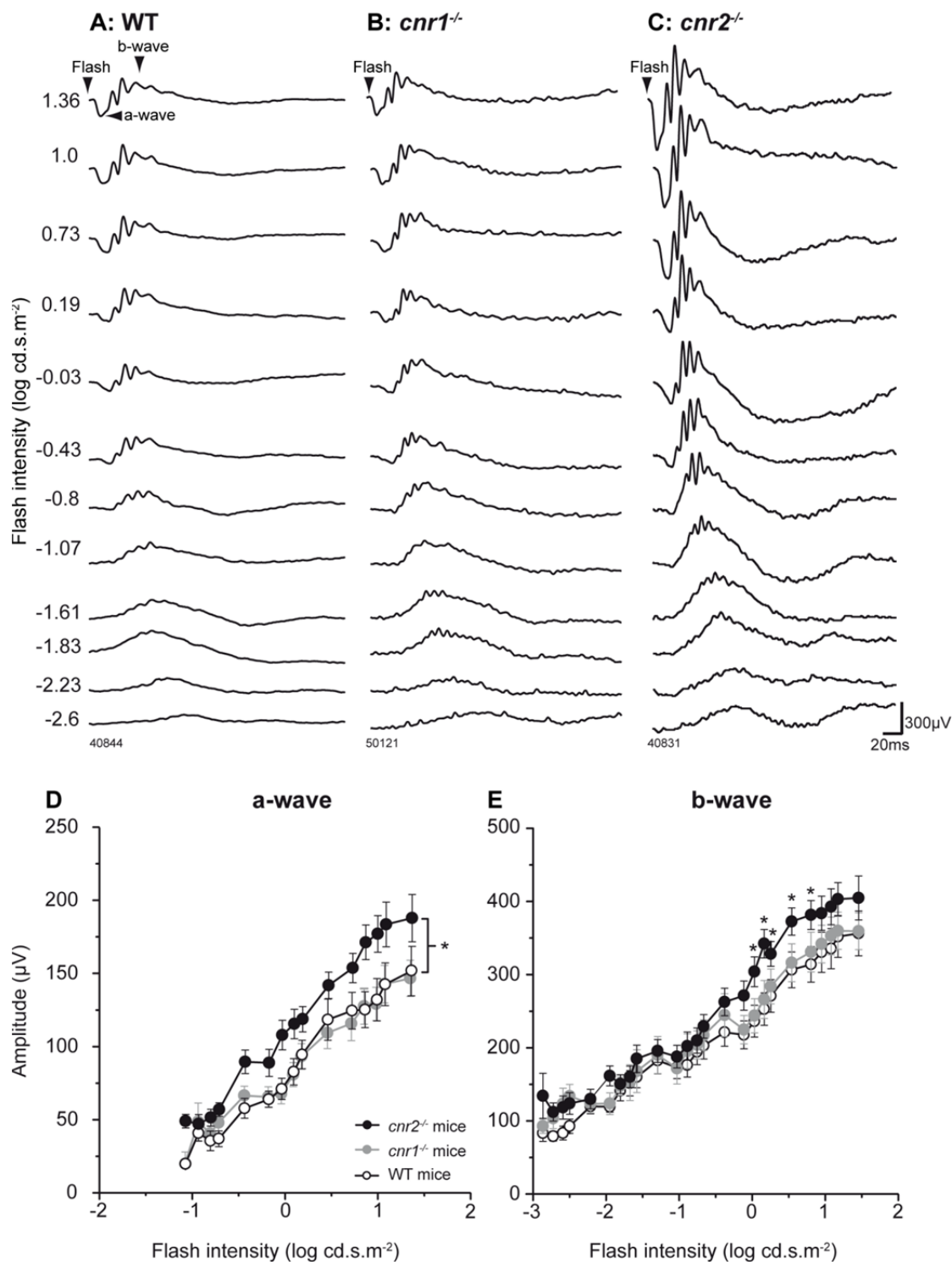


Figure 1: Representative scotopic ERGs (A–C) recorded in wild type (A), *cnr1*^{-/-} (B) and *cnr2*^{-/-} mice (C). The ERG a- and b-waves are indicated on the top trace in A with horizontal and vertical arrows, respectively. Progressively brighter flashes (bottom to top) indicated to the right of the traces as the log intensity (cd.s.m⁻²) were used to establish the luminance-response function of each

animal. **D**, **E**, The amplitudes of scotopic ERG a- (**D**) and b- (**E**) waves are plotted as a function of flash intensity to compute the luminance-response function curve for each waveform. The values are means \pm SEM from all animals in each group (wild types: open circles, N=16; *cnr1*^{-/-}: grey circles, N=15; *cnr2*^{-/-}: closed circles, N=15). The *cnr2*^{-/-} mice displayed significantly higher amplitudes for all intensities for the a-wave (repeated measures ANOVA) and for five intensities for the b-wave (one-way ANOVA. *=p values \leq 0.05 for both parameters.

The percentages of change observed in the a- and b-wave amplitude of *cnr2*^{-/-} mice were computed for each flash intensity (figure 2). The increase of the a-wave amplitude varied between 15 and 60% and was intensity dependent. This relation was not linear but rather characterized by a bimodal distribution and the fact that the larger changes were observed at low intensities (intensity interval - 0.93 to 0.47). The maximum values were significantly different from the minimum change observed (independent student t-test, $p \leq 0.05$). The second set of points, however, did not display a significant difference from the minimum change. For the b-wave, we observed a single non-linear distribution, with significant statistical changes ranging between 20 and 32%. The maximum change was significantly different from the minimum change (independent Student t-test, $p \leq 0.05$).

The averaged rod- and mixed V-max were computed and these values are presented as a function of flash intensities in panel C. Both the rod- and mixed V-max were increased by 23% and 12%, respectively in *cnr2*^{-/-} mice (independent Student t-test, $p \leq 0.05$). No change was observed in *cnr1*^{-/-} mice. The intensities needed to evoke those responses were decreased by 25% and 19%, respectively for *cnr2*^{-/-} mice (independent Student t-test, $p \leq 0.05$). The intensity needed to evoke the mixed V-max was also decreased by 12% in *cnr1*^{-/-} mice (independent student t-test, $p \leq 0.05$). No changes were observed in the latency of the a- and b-waves in both KO groups.

To evaluate whether the profile of the ERG changed in the knockout groups, other parameters of the evoked waveform were analyzed: duration of the b-wave, duration, amplitude and latency of the negative overshoot occurring after the b-wave. These values were computed at the intensities evoking the rod V-max and the mixed V-max for each animal. None of these parameters were modified in the *cnr2*^{-/-} mice. However, two significant changes were observed in *cnr1*^{-/-} mice. First, in these animals, the duration of the b-wave was greater by 36% (independent student t-test, $p = 0.015$, average length \pm SEM of b-wave for *cnr1*^{-/-} 90 ± 31 ms versus 66 ± 26 ms for the WT animals). Second, the amplitude of the negative overshoot was reduced by 45% (independent student t-test,

$p=0.006$, average amplitude \pm SEM of the overshoot for *cnr1*^{-/-} $57 \pm 21 \mu\text{V}$ versus $103 \pm 55\mu\text{V}$ for the WT animals).

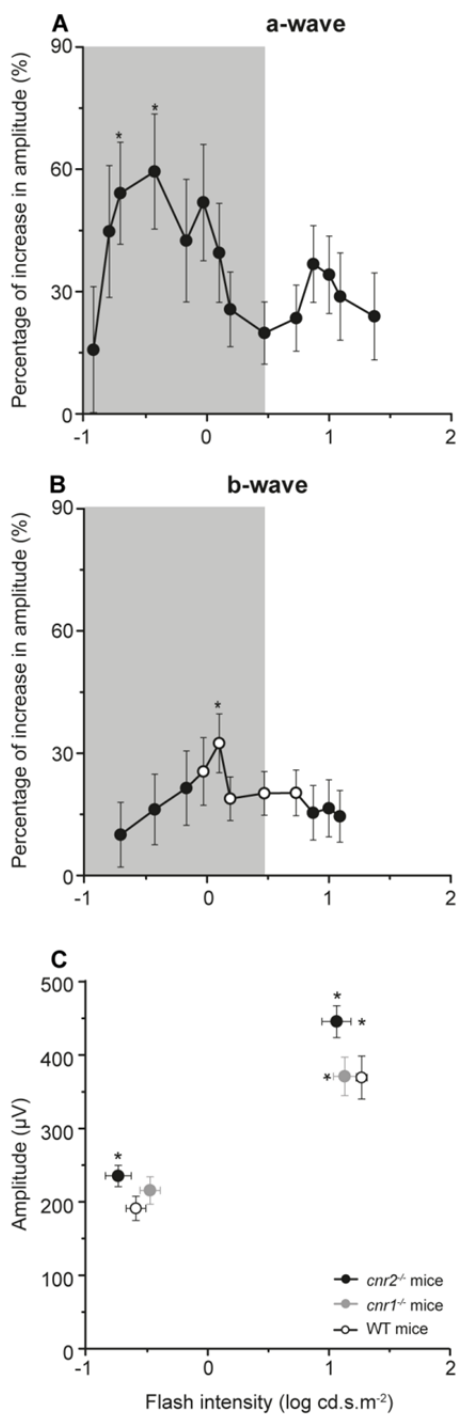


Figure 2: The computed averaged \pm SEM percentage of change for the a- (**A**) and b-waves (**B**) of the *cnr2*^{-/-} with respect to the averaged amplitude values of the wild type group. The maximum percentage of change was compared to the minimum percentage of change by Student t-test. $*=p$ values are ≤ 0.05 for both parameters. The open circles in **B** indicate the values for the b-wave amplitude is significantly higher for the *cnr2*^{-/-} group. The computed rod and mixed V-max are

presented in (C) as a function of intensity. The amplitude of b-wave at the rod and mixed V-max are increased in *cnr2*^{-/-} mice and the intensities needed to evoke them are decreased (one-way ANOVA. *=*p* values ≤0.05). The intensity needed to evoke the mixed V-max is decreased *cnr1*^{-/-} mice (one-way ANOVA. *=*p* values ≤0.05).

Oscillatory potentials (OPs) constitute a high frequency signal that overlays the ERG and can be isolated by filtering the low frequency out. Although, the provenance of this signal remains controversial some authors suggest it may reflect amacrine cells activity, a cell type that express both CB1R and CB2R. Representative examples of such recordings for each group are presented in figure 3. (A: WT, B: *cnr1*^{-/-} and C: *cnr2*^{-/-}). The OPs were first analyzed individually. None of them displayed a significant effect but both OP₃ and OP₄ tended to be increased in the *cnr2*^{-/-} mice when compared to wild type mice. In a second analysis, the sum of all scotopic OPs was computed and compared. The averaged total amplitude \pm SEM is presented as a function of flash intensity in panel D. A significant increase in total amplitude can be observed in CB2-KO mice when compared to WT animals (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, intensity interval -1.07 to $0.1 \log \text{cd.s.m}^{-2}$). Of interest is the fact that, although the intensities at which the OPs amplitude is affected overlap with those where the b-wave was increased, the effect on the OPs appeared at a lower intensity ($-1.07 \log \text{cd.s.m}^{-2}$ for OPs versus $-0.03 \log \text{cd.s.m}^{-2}$ for b-wave) and disappeared just after the maximum effect observed on the b-wave. This suggests that the change in OPs amplitude may reflect changes in the inner retina rather than be an inherited modification from the increased b-wave amplitude. No difference was observed in the latency of any of the analyzed OPs.

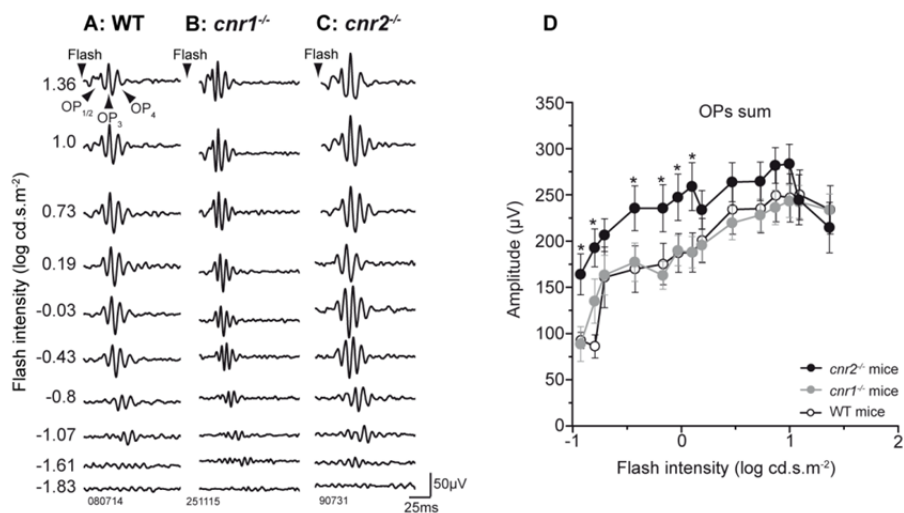


Figure 3: Representative scotopic oscillatory potentials (A–C) recorded in wild type (A), *cnr1*^{-/-} (B) and *cnr2*^{-/-} mice (C). Each individual potentials is indicated on the top trace in A. Progressively brighter flashes (*bottom* to *top*) indicated to the right of the traces as the log intensity (cd.s.m⁻²) were used to establish the luminance-response function of each animal. D The total sum of the amplitudes of all oscillatory potentials is plotted as a function of flash intensity to compute the luminance-response function curve. The values are means ± SEM from all animals in each group (wild types: open circles, N=16; *cnr1*^{-/-}: grey circles, N=15; *cnr2*^{-/-}: closed circles, N=15). The *cnr2*^{-/-} mice displayed significantly higher amplitudes for six intensities for the b-wave (one-way ANOVA. *=p values ≤0.05).

The light adapted retinal function

In order to evaluate the adaptation abilities of the retina, the ERG was recorded under photopic conditions at different time points. A representative example from each group is presented in figure 4 (A: WT, B: *cnr1*^{-/-} and C: *cnr2*^{-/-}). The averaged amplitude \pm SEM of the photopic b-wave is displayed as a function of time in panel D. While the responses observed in *cnr1*^{-/-} and WT mice are comparable, those in *cnr2*^{-/-} mice have higher amplitudes (about 20% increase) at the intermediate time points (10 and 15 min, one-way ANOVA, $p \leq 0.05$). The latency of the photopic b-wave did not vary regardless of the group. Photopic OPs were also analyzed. No significant difference was observed on the total or individual amplitudes or latency.

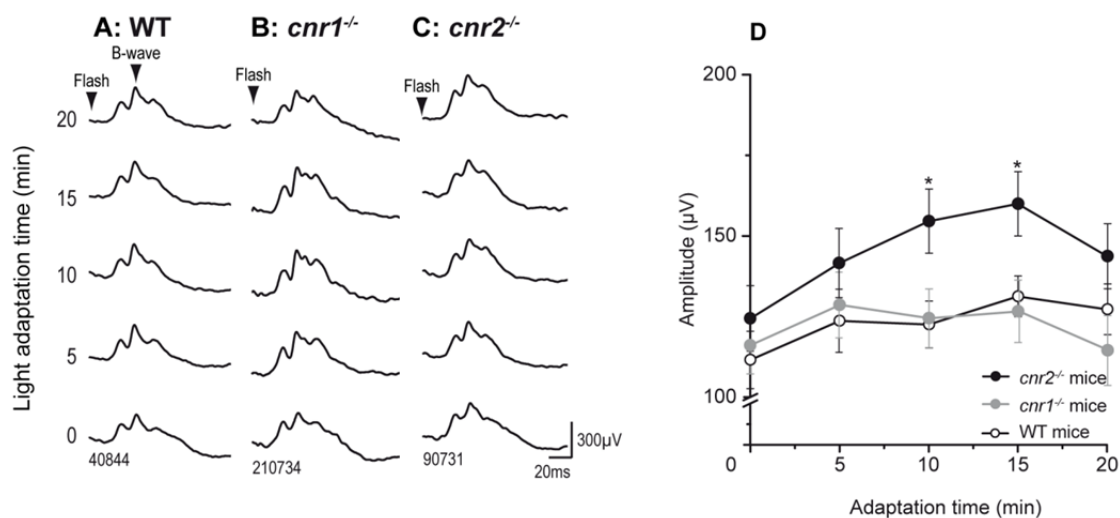


Figure 4: Representative examples of photopic ERGs (**A–C**) recorded in wild type (**A**), *cnr1*^{-/-} (**B**) and *cnr2*^{-/-} mice (**C**). The ERG b-waves is indicated on the top trace in **A** with vertical arrow. Repeat ERGs were taken (time points are indicated to the left of the traces) and were used to evaluate the retina ability to adapt to light. **D** The amplitudes of photopic ERG b-wave are plotted as a function of time. The values are means \pm SEM from all animals in each group (wild types: open circles, N=16; *cnr1*^{-/-}: grey circles, N=15; *cnr2*^{-/-}: closed circles, N=15). The *cnr2*^{-/-} mice displayed significantly higher amplitudes at two intermediate time points (one-way ANOVA. $*=p$ values ≤ 0.05).

*Total amounts of eCB system protein in WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice*

In order to establish if the elimination of one receptor affected other elements of the eCB system, we measured the total amounts of CB2R, N-acyl Phosphatidylethanolamine Phospholipase D (NAPE-PLD), Diacylglycerol Lipase- α or DAGL α (endocannabinoids synthesizing enzymes), Fatty acid amide hydrolase (FAAH) and Monoacylglycerol Lipase or MGL (eCBs degradative enzymes) in the *cnr1*^{-/-} and wild type animals. Examples of selected proteins expression are presented in panel A of figure 5 (FAAH and NAPE-PLD). The lower blot shows the expression of the protein GAPDH and demonstrates equal loading in all lanes. The averaged measures of CB2R, NAPE-PLD, DAGL α , FAAH and MGL, were evaluated as the optical densities (OD) of the bands and normalized relative to the WT averaged value. The computer ratios \pm SEM are shown in panel B. No differences were found in the total amount of those proteins in the *cnr1*^{-/-} mice. We also evaluated the total amounts of CB1R, eCBs synthesizing and degradative enzymes in the *cnr2*^{-/-} mice and compared them to controls. Representative examples of each protein expression of are presented in panel C. The computed ratios \pm SEM relative to WT values are shown in panel D. In this group, the total concentration of synthesis enzyme NAPE-PLD and degradative enzyme FAAH were significantly increased by $79.7 \pm 42\%$ and $73.6 \pm 31\%$ respectively (Dunnett test, $p \leq 0.005$)

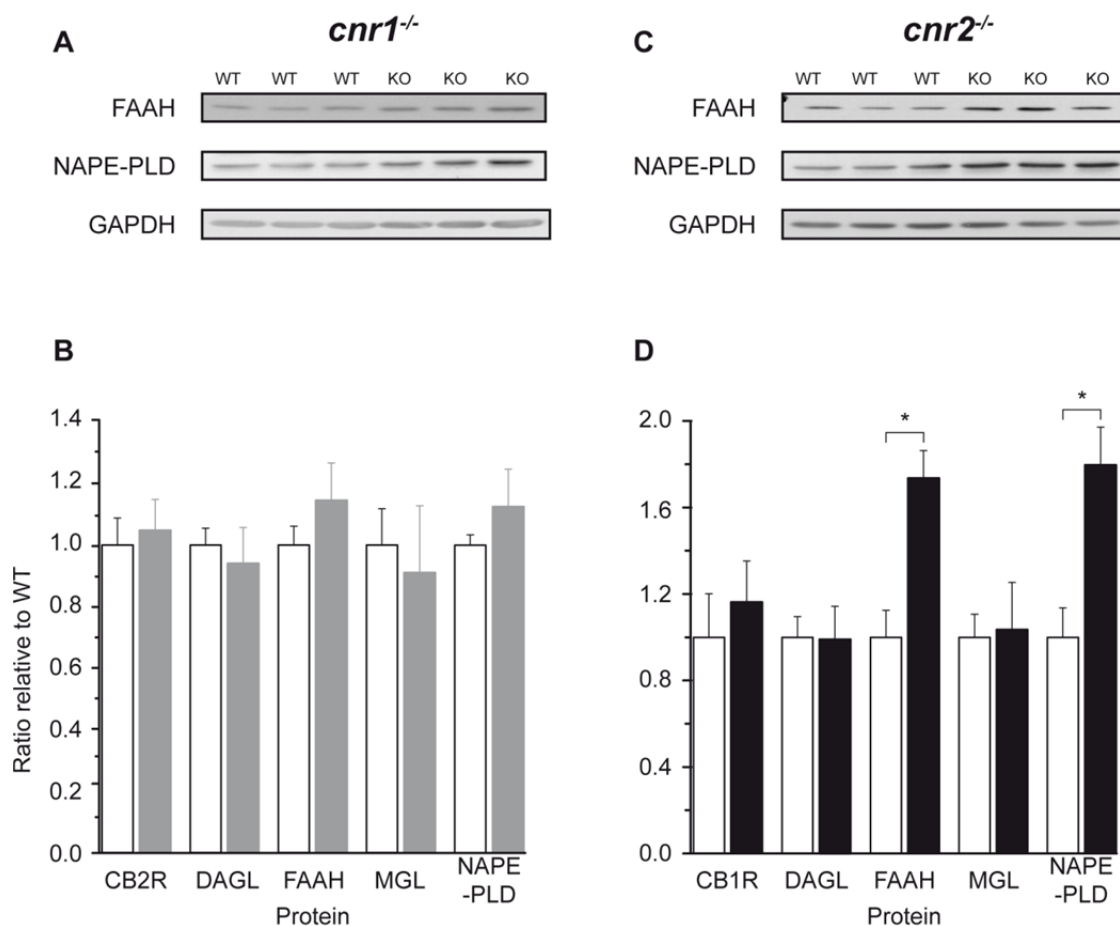


Figure 5: Total retinal concentration of proteins from the eCB system. **(A)** Representative examples of FAAH, NAPE-PLD and GAPDH in three wild type animals and *cnr1^{-/-}* mice. **(B)** Averaged ratio \pm SEM relative to WT of FAAH, NAPE-PLD and GAPDH in wild type (\square) and *cnr1^{-/-}* mice (\blacksquare) as measured by Western blot analysis. **(C)** Representative examples of, FAAH, NAPE-PLD in three wild type animals and *cnr2^{-/-}* mice. **(D)** Averaged ratio \pm SEM relative to WT in CB1R, DAGL α , FAAH, MGL, NAPE-PLD in wild type (\square) and *cnr2^{-/-}* mice (\blacksquare) as measured by Western blot analysis. Specific bands were seen at around 53 for CB1R, 45kDa for CB2R, 120kDa for DAGL α , 66kDa for FAAH, 37 for MGL and 46kDa for NAPE-PLD. Retinas were collected from adult mice. The quantifications were performed on at least 6 different animals treated. Optical densities (OD) were computed and the ratio relative to the averaged WT was calculated for each animal including WTs. The Averaged ratios \pm SEM relative to WT are presented for each group. The statistical differences were assessed with analysis performed on the averaged values using a Dunnett test, *= a significant change compared with wild type mice ($p \leq 0.05$).

Discussion

This study investigated the functional consequences of removing one of the two main eCBs receptors in the mammalian retina. Using ERG techniques, we showed that under scotopic conditions, the removal of CB1R affected the profile of the response but not its latency or amplitude, while the absence of the CB2R affected the amplitude of both a- and b-waves as well as the summed up OPs amplitude without affecting the response profile or latency. In photopic conditions, removal of CB1R did not affect the retinal response but the elimination of CB2R yielded a different adaptation pattern. Our data also presents evidence of some compensation in *cnr2*^{-/-} but not *cnr1*^{-/-} mice, as we reported a strong increase in the concentration of the synthesizing and degradative enzymes of CB1R ligand anandamide in *cnr2*^{-/-} mice.

Effect of CB1R removal

The data presented in this study indicates that CB1R removal does not have a strong impact on global retinal activity (recorded as ERGs). Indeed, no changes of the a- or b-wave amplitudes and latencies were noted under scotopic conditions. The most notable effects following CB1R removal were a modification of the response profile at the rod V-max and a decrease in the amplitude of the overshoot following the b-wave. We also report a decrease in the intensity needed to evoke the mixed V-max, but without any change in the response amplitude. The lack of a strong effect is rather surprising given that several authors, using synthetic cannabinoids WIN55212-2, CP55940 and endogenous cannabinoid 2-AG, reported that CB1R activation leads to inhibition of potassium currents in both rods and cones, while increased calcium currents in the former and its suppression in the latter (Fan and Yazulla, 2003; Straiker and Sullivan, 2003; Fan and Yazulla, 2007). The authors of these studies suggest that the combined effect on potassium and calcium would lead to a decreased sensitivity to light in rods upon CB1R activation. The overall effect on cones is more difficult to predict as the change in ionic currents would lead to opposing outcomes. Our results are partially in line with these observations as we report a decrease in the

intensity needed to evoke the mixed V-max but not change in that needed to evoke the rod V-max.

The most notable changes observed in *cnr1*^{-/-} mice were a modification of the response profile at the rod V-max and a decrease in the amplitude of the overshoot following the b-wave. The fact that the b-wave lasts longer in *cnr1*^{-/-} mice without a modification of the duration of the a-wave suggests that the effect is solely post-receptor, although it could be due to an abnormal synaptic transmission. Our data are in partial agreement with several lines of evidence suggesting the implication of CB1R in the temporal aspects of the retinal response. One study (Fan and Yazulla, 2003) reported that WIN55212-2, a cannabinoid receptor agonist, exerts a biphasic effect on potassium, calcium and chloride currents in goldfish. Briefly, at low concentrations all three ionic currents were enhanced while at higher concentrations, they were suppressed. The authors interpreted these results as an indication that CB1R would affect the temporal signal transmission from cone to bipolar cells and that it would affect the neurotransmitter release at the cone pedicle. It was further demonstrated that CB1R agonists such as WIN55212-2 can alter the kinetics of the light-offset response in cones as it became faster, with an enhanced depolarizing overshoot (Struik et al., 2006). In the present study, the effects observed on the b-wave happened prior to the onset of the cone response, suggesting that they are rod rather than cone driven. To our knowledge no study evaluated the effect of CB1R activation on the temporal aspects of rods' responses. Furthermore, it was shown that CB1R activation inhibits calcium currents in salamander bipolar cells (Straiker et al., 1999), thereby modulating the synaptic transmission downstream of bipolar cells. CB1R activation has also been shown to inhibit delayed rectifier potassium currents in goldfish ON-bipolar cells (Yazulla et al., 2000), and that, through this, it would affect the temporal aspects of the retinal response. This last finding supports our data showing that CB1R removal modified the temporal timeline of the b-wave at the rod V-max, response driven by ON bipolar cells.

Effect of CB2R removal

Under scotopic conditions, our data indicates that the amplitude of the a-wave is larger in *cnr2*^{-/-} than in WT mice, at all intensities. The percentage of change is intensity dependent and follows a 'bimodal' distribution. The first part of this distribution demonstrated a larger effect (up to 60% at the maximum) and occurred between -0.93 to 0.47 log cd.s.m⁻² whereas a much smaller effect was observed in the second part at higher intensities. Given the receptor origin of the a-wave, the different sensitivities of rods and cones evoking this response (Toda et al., 1999), one could suggest that biphasic effect may reflect the consequences of CB2R removal on these two cell types, separately. A differential effect of synthetic cannabinoids on rods and cones has been previously demonstrated in goldfish (Fan and Yazulla, 2003; Straiker and Sullivan, 2003). For example, WIN55212-2 inhibits potassium currents in both rods and cones while it enhances calcium currents in the former and suppressed it in the latter. As stated earlier, the effect of activating cannabinoid receptors with WIN55212-2 would thus lead to a decreased retinal sensitivity, in agreement with our data. The end result of cannabinoid receptors on cones is more difficult to predict and depends on the extent to which each current is affected. We report a modest increase in the cones response (about half that reported in rods) which is in line with the reported effects from the in vitro studies

The increased amplitude of the b-wave observed here was confined to intermediate intensities. Of interest is the fact that intensities evoking the increased b-wave occurred just after those evoking the maximum change in the a-wave amplitude. Assuming that the largest a-wave change comes from an increased rod response, one could suggest that the increased in the amplitude of the b-wave is the result of an increased response of rod bipolar cells. This is further supported by the fact the CB2R is strongly expressed by those cells. One should also notice that the effect on the b-wave is relatively subtle and limited, while the effect on the a-wave is large and across all intensities. This raises the question of compensation. We partially addressed this question by measuring the total amounts of most proteins from the eCBs system and found that there was a

large increase in CB1R ligand synthesizing and degradative enzymes in *cnr2*^{-/-} mice. Given the role attributed to CB1R in activity-dependent down regulation of synaptic release in the retina (Fan and Yazulla, 2007) this receptor maybe responsible for the modest effect of CB2R removal on the b-wave, though further experimentation is needed to demonstrate it.

Our data also revealed that, under scotopic conditions, the total amplitude of the OPs was enhanced when compared to recordings in WT animals. Individual analysis of each OP indicated no significant effect but a tendency for OPs 3 and 4 amplitudes to be increased. The observation that the intensities at which this effect was mediated are not the same as those at which the b-wave was affected is of interest. It suggests that the increase in the OP amplitude is not linked to the b-wave changes but rather come from an independent effect of CB2R removal on the inner retina, believed to be the site of origin of the OPs (see for review Wachtmeister, 1998). Information pertaining to the origin of those potentials remains rather sparse, one potential sources being the amacrine cells (Heynen et al., 1985; Yanagida et al., 1987). It is now well known that CB2R is a G-coupled receptor that interacts with G_{i/o} G-protein (Felder et al., 1995) and that the latter can either down regulate or up regulate the activity of the adenylyl cyclase enzyme, depending on the isoform (Rhee et al., 1998). One isoform of the adenylyl cyclase enzyme has recently be shown to be important for generating normal OPs since the elimination of adenylyl cyclase I causes a major reduction of the amplitude of the OPs (Tremblay et al., 2002). Given that the effect of CB2R activation would inhibit adenylyl cyclase I activity (Rhee et al., 1998), one could propose that the effects we observed on OPs amplitude could come from an up-regulation of adenylyl cyclase I activity in some amacrine cells, caused by the removal of CB2R. This is further supported by the observation that amacrine cells express the receptor in their cell bodies and CB2R is intensely expressed in the IPL.

Under photopic conditions, an enhanced b-wave was observed at intermediate recording time points. No effect on the response latency was noted.

Among the roles most commonly attributed to cannabinoid receptors are adaptative mechanisms such as long-term-depression (Sjostrom et al., 2003; Huang et al., 2008; Liu et al., 2008) and down-regulation of synaptic release (Fan and Yazulla, 2007) in the visual system and elsewhere. Thus, the eCBs is likely to be involved in retinal adaptation mechanisms as suggested by our findings. Our method does not allow us to determine whether the reported effect is mediated at the level of the cone response or at the level of the transfer of the information from cones to bipolar cells.

Furthermore, although there is not direct prove of the association of the eCBs with developmental processes in retina, the redistribution of some of eCB protheins during postnatal development suggests an implication of the system in retinal development. It follows that we have to consider the fact that some of the effects report here could stem from abnormal development. We have not found any evidence of a major change in retinal structure or connectivity but we cannot discard the possibility of some subtle that abnormalities due to abnormal development.

In conclusion, this study demonstrated that both CB1R and CB2R contribute to retinal functions. The two receptors are likely to be involved in different aspects of the retinal processing, CB1R being involved in the temporal aspects of the retinal response while CB2R being implicated in rods and cones sensitivity and light adaption.

Acknowledgements. This work was supported by a joint FRSQ Vision Network grant – Fondation des maladies de l’oeil to J.-F.B. and C.C. and by a NSERC grant (194670-2009) to CC and a CIHR grant (MOP 177796) to J-F.B. N.Z. was supported by a CIHR-E.A. Baker Foundation studentshipship and J.-F.B. by a Chercheur-Boursier Junior 2 from the Fonds de la recherche en santé du Québec.. We also would like to thank Michel Cayouette for his assistance in the choice of the antibodies.

References

- Fan SF, Yazulla S. 2003. Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci* 20(2):177-188.
- Fan SF, Yazulla S. 2007. Retrograde endocannabinoid inhibition of goldfish retinal cones is mediated by 2-arachidonoyl glycerol. *Vis Neurosci* 24(3):257-267.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular pharmacology* 48(3):443-450.
- Heynen H, Wachtmeister L, van Norren D. 1985. Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. *Vision Res* 25(10):1365-1373.
- Hu SS, Arnold A, Hutchens JM, Radicke J, Cravatt BF, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A. 2010. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J Comp Neurol* 518(18):3848-3866.
- Huang Y, Yasuda H, Sarihi A, Tsumoto T. 2008. Roles of endocannabinoids in heterosynaptic long-term depression of excitatory synaptic transmission in visual cortex of young mice. *J Neurosci* 28(28):7074-7083.
- Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME. 2006. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* 12:1160-1166.
- Leonelli M, Britto LR, Chaves GP, Torrao AS. 2005. Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Brain Res Dev Brain Res* 156(2):176-182.
- Liu CH, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. 2008. Cannabinoid receptor blockade reveals parallel plasticity mechanisms in different layers of mouse visual cortex. *Neuron* 58(3):340-345.
- Lopez EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, Lopez-Costa JJ. 2010. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse*.
- Lu Q, Straiker A, Maguire G. 2000. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci* 17(1):91-95.
- Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M. 2009. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol* 118(1):69-77.
- Nucci C, Gasperi V, Tartaglione R, Cerulli A, Terrinoni A, Bari M, De Simone C, Agro AF, Morrone LA, Corasaniti MT, Bagetta G, Maccarrone M. 2007. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(7):2997-3004.
- Plaziac C, Lachapelle P, Casanova C. 2003. Effects of methanol on the retinal function of juvenile rats. *Neurotoxicology* 24(2):255-260.
- Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. 1998. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem* 71(4):1525-1534.

- Sagdullaev BT, DeMarco PJ, McCall MA. 2004. Improved contact lens electrode for corneal ERG recordings in mice. *Doc Ophthalmol* 108(3):181-184.
- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. 2003. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 39(4):641-654.
- Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G. 1999. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(25):14565-14570.
- Straiker A, Sullivan JM. 2003. Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander. *J Neurophysiol* 89(5):2647-2654.
- Struik ML, Yazulla S, Kamermans M. 2006. Cannabinoid agonist WIN 55212-2 speeds up the cone response to light offset in goldfish retina. *Vis Neurosci* 23(2):285-293.
- Toda K, Bush RA, Humphries P, Sieving PA. 1999. The electroretinogram of the rhodopsin knockout mouse. *Vis Neurosci* 16(2):391-398.
- Tremblay F, Abdel-Majid R, Neumann PE. 2002. Electroretinographic oscillatory potentials are reduced in adenylyl cyclase type I deficient mice. *Vision Res* 42(14):1715-1725.
- Wachtmeister L. 1998. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res* 17(4):485-521.
- Warrier A, Wilson M. 2007. Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Vis Neurosci* 24(1):25-35.
- Yanagida T, Koshimizu M, Kawasaki K, Yonemura D. 1987. Microelectrode depth study of the electroretinographic oscillatory potentials in the frog retina. *Doc Ophthalmol* 67(4):355-361.
- Yazulla S. 2008. Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog Retin Eye Res* 27(5):501-526.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG. 1999. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol*. 1999/12/14 ed. p 80-90.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Fan SF. 2000. Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings. *Vis Neurosci* 17(3):391-401.
- Zabouri N, Bouchard J-F and Casanova C. 2010. Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina. *J Comp Neurol*. In press.
- Zabouri N, Bouchard J-F and Casanova C. 2010. Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Expression During Retinal Postnatal Development in Rats. Submitted to *J Comp Neurol*.

Discussion



6- Résumé des résultats

6.1- Aspects du développement de la rétine

Nous avons indiqué dans l'introduction que les eCBs étaient impliqués dans plusieurs processus de développement de la rétine tels que la neurogenèse, le guidage axonal et la synaptogenèse dans divers structures cérébrales. Le manque de données sur l'expression des eCBs durant le développement de la rétine ne permettait pas de poser d'hypothèse quant à leur(s) rôle(s) joué lors du développement de cette structure. Nous avons donc étudié la distribution spatiotemporelle du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH et analysé ces données en fonction des processus développementaux en cours au moment de leur expression.

6.1.1- L'expression du récepteur CB1 durant le développement

Dans la première étude, nous démontrons que la concentration totale et la distribution du récepteur CB1 varient au cours du développement postnatal et de la maturation de la rétine du rat. Nos données démontrent une expression précoce et répandue de ce récepteur. Ainsi, il est présent dans la majorité des cellules de la rétine, de façon permanente ou transitoire. À partir de P1, le récepteur CB1 est présent dans tous les neurones précoces à l'exception des cônes. Au cours du développement postnatal, le récepteur apparaît dans les cônes et dans les cellules bipolaires. Certaines cellules bipolaires liées aux bâtonnets démontrent une expression transitoire de ce récepteur entre P5 et P21, alors que d'autres types de cellules bipolaires (types 2 et 8) commencent à l'exprimer seulement vers P7 et restent CB1R-positives sur tout l'intervalle de temps étudié.

6.1.2- L'expression de l'enzyme FAAH durant le développement

Dans la seconde étude, nos résultats démontrent que l'enzyme FAAH est exprimée par presque toutes les cellules rétinienne, de façon transitoire dans la majorité des cas. Autour de P3-5, FAAH est présente dans les neurones précoces, soit les cônes, les cellules horizontales, les cellules

amacrines et les cellules ganglionnaires. Cette expression disparaît des interneurons (cellules horizontales et amacrines) vers la fin de la troisième semaine de vie. FAAH est également exprimée par les bâtonnets et les cellules bipolaires. Dans cette dernière catégorie, certaines cellules bipolaires liées aux cônes ON et OFF démontrent une présence transitoire de cette enzyme, alors que les cellules bipolaires liées aux bâtonnets commencent à l'exprimer tardivement (vers P15) et maintiennent cette expression sur le reste de l'intervalle temporel étudié.

6.1.3- Conclusions tirées de ces deux études

Les données cumulées dans ces deux études, en particulier la redistribution massive de l'enzyme FAAH et celle plus modeste du récepteur CB1 suggèrent que le système des eCBs pourrait être impliqué dans les processus de développement et/ou de maturation de la rétine, notamment dans la synaptogenèse.

Par ailleurs, la présence importante du système des eCBs dans la rétine adulte suggère un rôle de ce système dans la fonction rétinienne adulte.

6.2- Aspects fonctionnels

Plusieurs articles portant sur les aspects à la fois fonctionnels et anatomiques, évoqués en introduction, nous amènent à penser que le récepteur CB1 pourrait moduler la réponse rétinienne. Cependant, il n'existe pas d'étude fonctionnelle traitant du rôle du récepteur CB2 dans la rétine adulte et seules deux études démontrent sa présence sans évoquer les détails de sa distribution. Nous avons donc évalué les conséquences fonctionnelles de l'élimination des récepteurs CB1 ou CB2 sur la réponse rétinienne telle que mesurée par ERG.

6.2.1- Rôle fonctionnel de CB1 et CB2 en condition scotopique

L'élimination du récepteur CB1 n'a pas causé de modification de l'amplitude ou de la latence des ondes a, b ou des potentiels oscillatoires. Par

contre, l'élimination de ce récepteur a modifié le profil temporel de la réponse rétinienne, et en particulier celui de l'onde b, rallongeant cette dernière d'environ 24 ms (36%). Le deuxième effet observé sur le profil de la réponse des souris *cnr1^{-/-}* est une atténuation de 45% de l'amplitude de l'onde négative qui suit l'onde b. Enfin, l'élimination du récepteur CB1 diminue légèrement l'intensité nécessaire pour évoquer la réponse rétinienne maximale (baisse de 12%).

L'élimination du récepteur CB2 a causé une augmentation de l'amplitude de l'onde a, quelque soit l'intensité utilisée et de l'amplitude de l'onde b aux intensités intermédiaires. Nous avons également observé une augmentation de l'amplitude cumulée des potentiels oscillatoires aux intensités faibles et intermédiaires. L'élimination du récepteur CB2 ne semble pas affecter le profil temporel de la réponse rétinienne ou sa latence.

6.2.2- Rôle fonctionnel de CB1 et CB2 en condition photopique

L'élimination du récepteur CB1 n'a pas causé de modification dans l'amplitude ou la latence l'onde b photopique, ni des potentiels oscillatoires.

L'élimination du récepteur CB2 a causé un patron d'adaptation anormal chez les souris *cnr2^{-/-}*.

6.3- Expression du récepteur CB2 dans la rétine de la souris adulte

La littérature décrivant l'expression du récepteur CB2 dans la rétine se limitant à deux articles portant sur le rat, nous avons étudié sa distribution dans notre modèle, la souris. Bien que nous n'ayons pas pu inclure d'illustrations de cette expression dans le présent travail, nous allons faire état brièvement de nos résultats.

Ainsi, le récepteur CB2 est exprimé dans toutes les couches de la rétine, avec une intensité particulièrement forte dans les couches synaptiques et axonale (IPL, OPL et couche des fibres des cellules ganglionnaires). Le patron d'expression du récepteur CB2 a été étudié par co-localisations immunohistochimiques avec les marqueurs des différents types cellulaires de la rétine. Dans l'ONL, nous retrouvons le récepteur CB2 dans les cônes et

dans une moindre mesure dans les bâtonnets. Dans l'INL, il s'exprime dans les cellules horizontales et les cellules bipolaires associées aux cônes, mais également dans celles associées aux bâtonnets. Il est à noter que sa présence dans ces cellules est nettement plus importante que dans les cellules bipolaires liées aux cônes. Ce récepteur s'exprime également dans certaines cellules amacrines.

Dans la couche des cellules ganglionnaires, le récepteur CB2 est présent et semble particulièrement concentré dans leur axone. Il ne semble pas s'exprimer dans les cellules amacrines déplacées.

7- Aspects méthodologiques

7.1- Justification du modèle

Le choix de la rétine comme sujet d'étude est basé sur plusieurs raisons. En premier lieu, cette structure est considérée comme un modèle de développement du SNC. Elle présente l'avantage d'être bien connue et bien caractérisée anatomiquement et fonctionnellement, et ce, tant chez l'animal adulte que durant son développement. Plusieurs processus du développement de la rétine (neurogenèse, migration cellulaire, synaptogenèse, maturation) ont fait l'objet d'études dans plusieurs types cellulaires rétiniens. D'autre part, l'organisation et le développement de la rétine sont assez similaires chez tous les mammifères, de sorte qu'il est possible de faire des comparaisons et des extrapolations. Enfin, cette structure est facilement accessible et manipulable.

7.2- Considérations techniques

L'existence dans la rétine de marqueurs, permettant une identification aisée et précoce des différents types cellulaires, rend possible une bonne caractérisation de la distribution des différentes protéines étudiées dans le présent travail. De ce fait, le choix des anticorps et la validité des protocoles utilisés prend une importance d'autant plus grande que nos deux premières études sont anatomiques et se basent essentiellement, voire exclusivement,

sur l'identification des types cellulaires rétiniens par marquage immunohistochimique et le marquage adéquat des protéines d'intérêt.

7.2.1- Spécificité des anticorps

Le fait que les anticorps révélant les marqueurs des types cellulaires rétiniens soient bien connus et que leur utilisation soit souvent mentionnée dans la littérature constituent un avantage incontestable. La majorité des anticorps utilisés, dans le présent travail, sont inclus dans la base de données du *Journal of Comparative Neurology*. Cela implique que ces anticorps ont été bien caractérisés et souvent testés sur des animaux transgéniques chez qui la protéine qu'ils marquent était absente, ce qui est garant de leur spécificité.

En ce qui concerne les anticorps contre les éléments du système des eCBs qui sont accessibles sur le marché, bien que peu caractérisés et n'ayant été utilisés que dans un nombre restreint d'études, ils présentent l'avantage de leur disponibilité et de leur accessibilité. Les autres anticorps, étant la propriété de laboratoires, sont souvent mieux caractérisés, mais sont évidemment moins accessibles. Nous avons privilégié d'utiliser des anticorps commerciaux et de les caractériser systématiquement. Cela est particulièrement important car une récente étude a démontré que certains anticorps commerciaux contre CB1 n'étaient pas spécifiques (Grimsey *et al.*, 2008).

Pour en vérifier la spécificité, nous avons testé de nombreux anticorps par le biais d'immunobuvardage et lorsque cela était possible par marquage immunohistochimique sur du tissu de souris chez qui la protéine d'intérêt était absente (souris KO). Puis, nous avons sélectionné pour nos travaux les anticorps donnant les résultats les plus probants, repris dans le tableau 3.

Protéines	Numéro de l'anticorps	Compagnie	Tests
CB1R	C1233	Sigma-Aldrich	Immunobuvardage Souris KO
FAAH	10600	Cayman Chemical	Immunobuvardage Souris KO
CB2R	10550	Cayman Chemical	Immunobuvardage Souris KO
MAGL	1035	Cayman Chemical	Immunobuvardage
DAGL α	IMG30833	IMGENEX	Immunobuvardage
NAPE-PLD	NB110-80070	NOVUS	Immunobuvardage

Tableau 4 : Anticorps sélectionnés

7.2.2- Le protocole de marquage séquentiel avec un fragment Fab

Le problème de l'utilisation de plusieurs anticorps, provenant du même hôte, s'est posé pour certains co-marquages immunohistochimiques, en particulier pour colocaliser les différentes protéines du système des eCBs, car ces anticorps proviennent presque tous du lapin. Comme les marquages sur des coupes sérielles diminuaient grandement l'intérêt de cette colocalisation, nous nous sommes tournés vers les marquages séquentiels avec un fragment Fab (Brandon, 1985; Negoescu *et al.*, 1994). Ce dernier est un fragment monovalent d'anticorps, qui dans notre cas, provient de la chèvre et s'associe à la partie "lapin" de l'anticorps primaire (Ac primaire 1). Cela a eu comme résultat de masquer cette portion de l'anticorps primaire et d'en 'transformer' l'hôte de "lapin" en "chèvre". Par la suite, l'anticorps secondaire (Ac secondaire 1) approprié a été utilisé pour révéler la première protéine en fluorescence (en vert, par exemple). Puis, un second anticorps primaire (Ac primaire 2), provenant également du lapin, a été ajouté. Ce dernier est révélé par un autre anticorps secondaire contre le lapin (Ac secondaire 2) de couleur rouge, par exemple. Ces réactions sont schématisées dans la figure 9 panneau A. Il est, néanmoins, important de mentionner que les liens entre l'Ac primaire 1 et le complexe Fab-Ac secondaire 1 est sujet à compétition lorsque l'Ac secondaire 2 est ajouté. Il est donc de rigueur de s'assurer que cette compétition reste en faveur du complexe Fab-Ac secondaire 1. Pour ce faire, nous avons systématiquement testé l'ordre dans lequel les Acs primaires ont été appliqués. Dans certains cas, les résultats démontrent une ségrégation inadéquate des deux signaux. Nous avons utilisé deux conditions témoins pour tester cette ségrégation.

La première condition témoin implique l'élimination de l'Ac primaire 2. Dans ce cas, une ségrégation adéquate signifie la présence du signal de l'Ac primaire 1 et l'absence du signal de l'Ac primaire 2. Cela indique que le Fab masque adéquatement la portion de l'anticorps primaire appartenant au lapin et que l'Ac secondaire 2 ne peut s'associer à l'Ac primaire 1 (figure 9B). Dans

le cas d'une ségrégation inadéquate, nous aurions vu du signal dans les deux canaux.

La seconde condition témoin consiste en l'élimination à la fois de l'Ac secondaire 1 et de l'Ac primaire 2. Dans ce cas, une ségrégation adéquate implique l'absence de signal dans les deux canaux. Cela signifie que le Fab masque adéquatement la portion de l'anticorps primaire appartenant au lapin et que l'Ac secondaire 2 ne peut s'associer à l'Ac primaire 1. Étant donné que le Fab n'est pas révélé, son signal n'est pas visible. Dans le cas du second canal, en l'absence de l'Ac primaire 2, l'Ac secondaire 2 ne peut s'associer à aucune protéine (figure 9C). Dans le cas d'une ségrégation inadéquate, nous aurions vu du signal dans le canal de l'Ac secondaire 2.

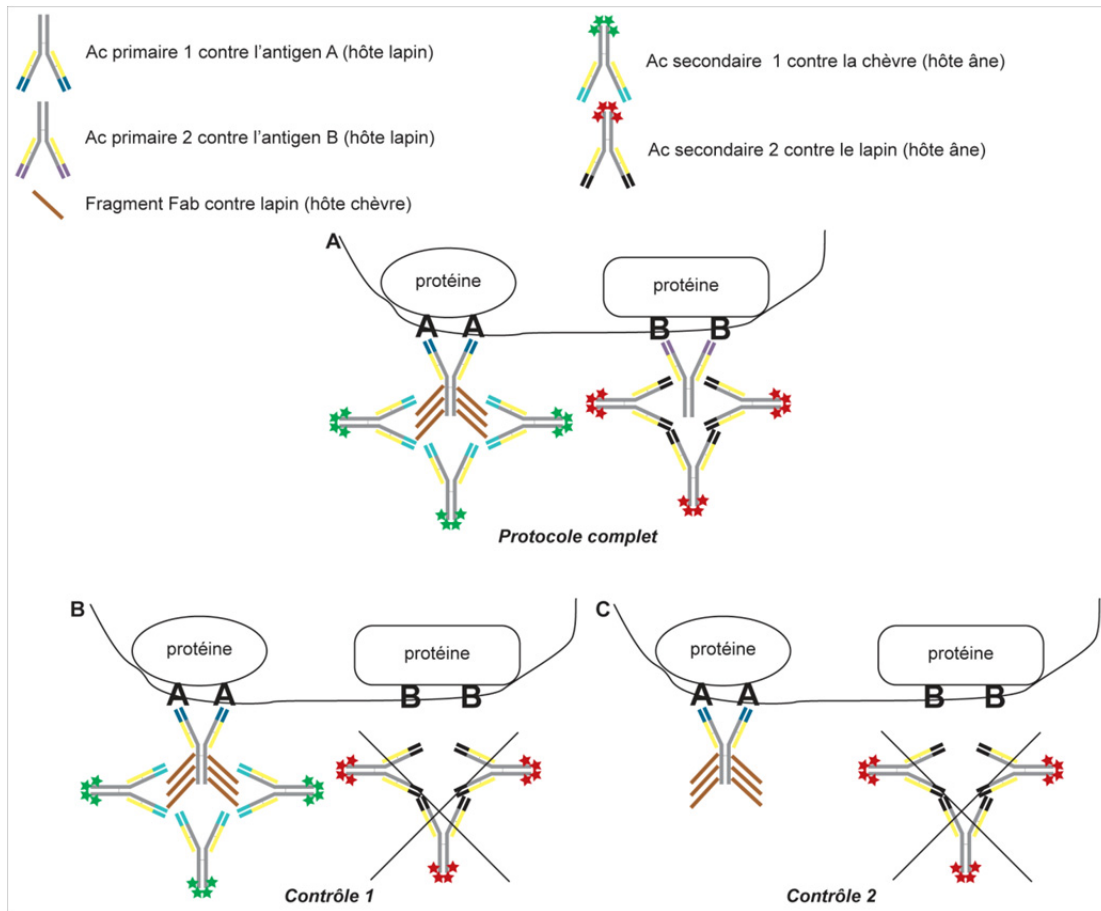


Figure 9 : protocole de marquage séquentiel avec un Fab

7.2.3- Les artefacts de redistribution

Nos protéines d'intérêt étant sensibles à la fixation (Yazulla et al., 1999), nos protocoles de traitement de tissus ont été conçus pour limiter cette fixation. Cela a entraîné certains artefacts de redistribution intracellulaires des protéines, notamment dans le cas du récepteur CB1 et probablement dans celui de l'enzyme FAAH. Ainsi, dans certaines expériences immunohistochimiques, nous avons constaté un marquage nucléaire anormal pour le récepteur CB1. Pour démontrer cette anomalie, nous avons effectué un protocole permettant de séparer les cellules rétiniennes lysées en trois fractions : nucléaire, cytoplasmique et membranaire ("subcellular fractionation"). Cette expérience a révélé la présence du récepteur CB1 dans les fractions cytoplasmique et membranaire, démontrant ainsi que le marquage nucléaire visible en immunohistochimie est un artefact. Dans la littérature, ce type d'artefact a déjà été rapporté suite à une fixation légère associée à une perméabilisation cellulaire (Goldenthal *et al.*, 1985; Melan and Sluder, 1992; Mayor and Maxfield, 1995; Cinar *et al.*, 2006). La présence de ces artefacts ne remet pas en cause la validité de nos résultats puisque notre objectif était de déterminer le type cellulaire exprimant ce récepteur et non sa distribution intracellulaire.

8- Rôles potentiels des eCBs dans le développement rétinien

8.1- Variation de l'expression des eCBs selon l'âge

Toutes les protéines du système des eCBs étudiées ont montré des variations de concentration totale liées à l'âge. La méthode utilisée pour évaluer ces changements est l'immunobuvardage avec les homogénats de rétines complètes. Cette méthode nous fournit des données sur les changements globaux de concentration, mais pas sur les changements de concentrations locales. Cette limite de la méthode implique que si ces changements se sont produits seulement pour certaines structures rétiniennes nous n'avons pas pu les documenter.

Nous avons observé une concentration totale et stable des enzymes de synthèse des eCBs (NAPE-PLD et DAGL α) jusqu'à la fin du premier mois de vie, accompagnée d'une baisse de l'expression de l'enzyme de dégradation FAAH. Durant le second mois de vie, nous avons constaté une baisse de la concentration des enzymes de synthèse associée à une augmentation de la quantité de l'enzyme de dégradation FAAH. La quantité de ligands du récepteur CB1 est déterminée par deux éléments, soit l'expression génétique et protéique des enzymes de synthèse et de dégradation d'une part, et leur efficacité d'autre part. Nos données nous ont permis d'évaluer l'expression génétique et protéique des enzymes. L'étude de (Morishita *et al.*, 2005) a évalué l'activité de FAAH et de NAPE-PLD dans des homogénats de cerveaux complets chez des rats âgés entre P1 et P56. Cette étude démontre une augmentation de l'activité de FAAH sur les trois premières semaines de vie. L'activité de NAPE-PLD globalement stable jusqu'à P14, est suivie d'une augmentation d'activité maintenue jusqu'à P56 (Morishita *et al.*, 2005). Les auteurs de cette étude ont également observé une corrélation entre les changements de concentration des enzymes et les changements d'activité s'appliquant à plusieurs structures du SNC. Ces données suggèrent donc que les changements d'activité enzymatique seraient davantage attribuables à des variations de l'expression génétique et protéique des enzymes plutôt qu'à des modifications dans leur efficacité dans le système des eCBs. En admettant que ces changements s'appliquent à toutes les structures du SNC, nous pouvons, à partir de nos données, faire une extrapolation et conclure que les changements de concentration des eCBs démontrent une augmentation durant le premier mois de vie, puis une diminution durant le second. Cette conclusion est, néanmoins, à prendre avec précaution étant donné que :

- l'enzyme NAPE-PLD n'est pas la seule source d'AEA.
- L'importance relative des enzymes de synthèse du 2-AG (DAGL α et β) dans la rétine n'est pas connue.

- Nous n'avons pas quantifié l'expression de l'enzyme MAGL qui est responsable de la dégradation du 2-AG.

En somme, nos données suggèrent qu'il pourrait y avoir des changements dans la concentration des eCBs durant la période de développement postnatal, mais des expérimentations complémentaires seraient nécessaires pour compléter ces données.

Parallèlement aux variations de concentration des enzymes de synthèse et de dégradation, le récepteur CB1 augmente en concentration totale. Ainsi, la concentration reste stable durant les deux premières semaines de vie. Puis elle augmente en quelques jours pour se stabiliser à nouveau après P19, qui correspond au moment où le récepteur atteint sa distribution adulte. La période de transition entre les concentrations chez la souris en développement et adulte correspond à la période durant laquelle il y a le plus de redistribution du récepteur.

8.2- Distribution de CB1 et FAAH dans les cellules précoces de la rétine

Nous avons étudié la distribution spatiale du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH pendant le développement postnatal de la rétine. Ces deux protéines sont présentes dès le premier jour postnatal dans plusieurs types cellulaires et dans certains cas leur expression est passagère. Étant donné la nature lipophile des eCBs et le fait qu'ils ne sont pas encapsulés dans des vésicules synaptiques, les enzymes de synthèse et de dégradation jouent un rôle clé dans la modulation de la fonction des récepteurs CB1 et CB2. Nous nous proposons donc, dans le cadre de cette discussion, d'établir un parallèle entre l'expression du récepteur CB1 et celle de l'enzyme FAAH en fonction des types cellulaires et du développement rétinien.

8.2.1- Les cellules ganglionnaires et amacrines

Dans le cas des cellules ganglionnaires et des cellules amacrines, le récepteur CB1 est exprimé à partir de P1. L'enzyme FAAH, quant à elle, est exprimée dans certaines cellules ganglionnaires et amacrines à partir de P1.

Durant toute la période étudiée, la présence de ces deux protéines reste stable dans le soma des cellules ganglionnaires. Nous avons pu, néanmoins, constater des changements de l'expression de ces protéines dans la couche des fibres des cellules ganglionnaires. Durant les deux premières semaines de vie, l'intensité de l'expression du récepteur CB1 augmente dans cette couche, puis se stabilise durant le reste de la période étudiée. L'enzyme FAAH, quant à elle, reste stable durant le premier mois de vie, puis augmente durant le second mois de vie.

Dans les cellules amacrines, le récepteur CB1 est présent de façon constante durant toute la période étudiée. Cependant, certaines cellules, situées dans la partie la plus profonde de l'INL, à la limite de l'IPL, cessent de l'exprimer dès P15. La distribution et la position de ces cellules suggèrent que ces dernières pourraient être des cellules amacrines cholinergiques OFF. L'enzyme FAAH, quant à elle, s'exprime dans les cellules amacrines de façon transitoire. Dans un premier temps, elle est présente dans la majorité des cellules amacrines, puis essentiellement dans les cellules amacrines cholinergiques ON et OFF jusqu'à P15, moment à partir duquel elle cesse de s'exprimer dans les cellules amacrines.

Cette expression transitoire de l'enzyme FAAH et potentiellement du récepteur CB1 dans les cellules amacrines cholinergiques suggère que l'action des eCBs dans la fonction de ces cellules est liée à leurs rôles durant le processus de développement. L'activité de ces cellules est impliquée dans plusieurs processus tels que l'établissement des synapses (Olney, 1968), le raffinement des dendrites des cellules ganglionnaires (Kim *et al.*, 2010) et les vagues d'activité spontanée dans la rétine. Enfin, les cellules amacrines, elles-mêmes, montrent une certaine plasticité durant la période postnatale qui pourrait être également influencée par les eCBs.

8.2.2- Les cellules horizontales et les cônes

Le récepteur CB1 est présent dans les cellules horizontales à partir de P1 et reste stable tout au long de la période étudiée. Ce récepteur apparaît dans les corps cellulaires et les pédicules synaptiques des cônes

autour de P5. L'enzyme FAAH apparaît dans les cellules horizontales entre P1 et P3 et demeure stable au cours des deux premières semaines de vie, après quoi son expression diminue. Elle apparaît également dans les cônes à partir de P5.

Sachant que les eCBs sont souvent impliqués dans la relâche synaptique, la présence du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH dans la triade cône-cellule horizontale-cellules bipolaires avant qu'elle ne soit entièrement constituée nous permet, en accord avec les résultats de plusieurs études, de considérer que les eCBs sont dans une position stratégique pour moduler la synaptogenèse à la fois des cônes et des cellules horizontales et bipolaires. Il est à noter que ce rôle leur a été attribué dans l'hippocampe par Kim et Thayer (2001). Ainsi, le récepteur et l'enzyme apparaissent dans les cellules horizontales avant que le pédicule du cône n'entre en contact avec la cellule horizontale. En effet, ces synapses commencent à se former à P2 et se généralisent à P5 (Raven *et al.*, 2008).

En outre, le récepteur CB1 et l'enzyme FAAH apparaissent dans les pédicules des cônes vers P5, soit 5 jours avant l'apparition de l'élément post-synaptique de la triade cône-cellule horizontale-cellule bipolaire liées aux cônes (Rich *et al.*, 1997; Hack *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'expression transitoire de l'enzyme FAAH dans les cellules horizontales suggère que le système des eCBs pourrait être impliqué dans les processus de développement de ce type cellulaire ou dans les processus développementaux modulés par celui-ci.

L'étude de Huckfeldt *et al.* (2009) montre, quant à elle, que durant la première semaine de vie postnatale, les cellules horizontales immatures développent des neurites verticales temporaires qui leur permettent d'acquérir leur organisation en mosaïque. Durant cette période, ces cellules migrent de façon à la fois radiale et latérale avant d'adopter leur position finale. Ces processus pourraient impliquer le système eCBs. Bien que l'implication du récepteur CB1 dans la modulation de la longueur des neurites *in vitro* ait été démontrée par Berghuis *et al.* (2007) et Argaw *et al.* (2010),

cette possibilité reste, cependant, moins probable étant donné que le marquage du récepteur CB1 est concentré dans le soma des cellules horizontales et ne semble pas s'exprimer dans les neurites (Keimpema *et al.*, 2010). D'autres auteurs ont démontré que les eCBs jouaient un rôle dans la migration cellulaire (Song and Zhong, 2000; Berghuis *et al.*, 2007; Mulder *et al.*, 2008). Il est intéressant de mentionner que plusieurs auteurs rapportent que le récepteur CB1 et les enzymes de dégradation des eCBs sont co-exprimés dans la même cellule pendant le développement (Berghuis *et al.*, 2007; Harkany *et al.*, 2008a; Harkany *et al.*, 2008b; Keimpema *et al.*, 2010). C'est un patron que nous retrouvons également dans la rétine.

L'apparition du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH coïncide avec l'apparition des synapses entre les cônes et les cellules horizontales (Dhingra *et al.*, 1997; Rich *et al.*, 1997; Hack *et al.*, 2002). Le système des eCBs pourrait jouer un rôle dans le raffinement des connexions synaptiques entre ces deux types cellulaires. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'il a été démontré que les cônes pouvaient moduler l'organisation dendritique des cellules horizontales à travers une transmission glutamatergique précoce (Raven *et al.*, 2008). De plus, il a été établi que la synthèse des eCBs dépend de l'activité neuronale et que le récepteur CB1 peut moduler à la baisse la relâche glutamatergique au niveau des pédicules des cônes (Fan and Yazulla, 2007).

Le raffinement synaptique pourrait également provenir des cellules horizontales. En effet, autour de P5, ces cellules contiennent du GABA (Schnitzer and Rusoff, 1984; Fletcher and Kalloniatis, 1997; Deniz *et al.*, 2010), un neurotransmetteur dont la relâche pourrait être régulée par le récepteur CB1 (Warrier and Wilson, 2007). De plus, la relâche de GABA par les cellules horizontales peut moduler la synaptogenèse des cônes chez le lapin (Fletcher and Kalloniatis, 1997; Mitchell *et al.*, 1999) et l'organisation spatiale de ces derniers chez la souris (Fei, 2003). Cela dit, la récente étude de Schubert *et al.* (2010) a démontré que l'élimination sélective du GABA des cellules horizontales ne cause que des changements mineurs dans la rétine

externe de la souris. Cependant, les auteurs soulignent que la faible portée de ces changements pourrait être le résultat de mécanismes de compensation, plutôt que la conséquence directe de l'élimination du GABA.

Ainsi, les eCBs pourraient moduler la synaptogenèse des cônes et des cellules horizontales.

8.3- Distribution de CB1 et FAAH dans les cellules tardives de la rétine

Selon Rapaport et al., (2004) certaines classes de cellules rétinienne émergent durant la période postnatale chez le rat; ce sont les cellules tardives de la rétine. Dans ces classes, deux types sont neuronaux, les cellules bipolaires et les bâtonnets, et un type est glial, les cellules de Müller. Nous avons donc étudié l'expression du récepteur CB1 et de FAAH dans les cellules tardives de la rétine ainsi que dans les neuroblastes et les cellules mitotiques présents dans la rétine postnatale.

8.3.1- Les cellules neuroblastes et mitotiques

Nous avons évalué l'expression des récepteurs CB1 et de l'enzyme FAAH dans les neuroblastes et dans les cellules mitotiques présents dans la rétine entre E0 et P6-7. Pendant la période postnatale, les neuroblastes sont situés dans la partie intermédiaire de la NBL, puis dans la partie intermédiaire de l'INL naissante. Les cellules mitotiques, quant à elles, sont situées à la surface apicale de la rétine et se distinguent visuellement des neuroblastes par leur morphologie plus ronde. Le récepteur CB1 s'exprime dans les cellules mitotiques jusqu'à P5. L'expression et le rôle des eCBs dans la prolifération cellulaire ont été observés dans d'autres structures cérébrales chez l'animal adulte et en développement par différents auteurs (Galve-Roperh *et al.*, 2006; Harkany *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Harkany *et al.*, 2008b). De plus, il a été rapporté que l'activation du récepteur CB1 favorise la division cellulaire et la génération de neurosphères (Aguado *et al.*, 2006; Trazzi *et al.*, 2010). Il a également été observé que la division des cellules progénitrices est augmentée lorsque celles-ci sont soumises à une forte concentration d'AEA, le ligand du récepteur CB1 (Aguado *et al.*, 2005). Il est

donc envisageable que le récepteur CB1 puisse moduler la division des cellules progénitrices de la rétine. Par ailleurs, autour des cellules progénitrices, au point d'attachement des filaments des neuroblastes à la membrane limitante externe, nous avons pu observer l'expression de l'enzyme FAAH qui pourrait, de ce fait, moduler l'activité du récepteur CB1.

Nous avons pu constater une augmentation tardive de l'expression du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH dans les neuroblastes. Cette expression dans la partie intermédiaire de l'INL à P5 atteint la partie superficielle de cette couche entre P5 et P9. Elle est d'une intensité inférieure à celle que l'on peut retrouver dans un neurone différencié dans la même couche. La localisation de cette expression et le patron temporel qu'elle suit correspondent au moment où les neuroblastes commencent à exprimer les marqueurs protéiques des cellules bipolaires ou de Müller, puis au développement et à la migration de celles-ci. Ceci est d'autant plus intéressant que des chercheurs ont démontré que l'AEA peut causer la différenciation des cellules progénitrices après un court traitement. Ces cellules continuent à se différencier pour devenir des neurones après un traitement prolongé. (Soltys *et al.*, 2010). Cela amène ces auteurs à émettre l'hypothèse que les eCBs pourraient affecter la division et la différenciation des cellules progénitrices, voire même participer à l'établissement d'un équilibre entre les populations neuronale et gliale. Cela peut suggérer que les eCBs puissent avoir un impact similaire dans la rétine, mais de plus amples expérimentations seraient nécessaires afin de le démontrer.

8.3.2- Les cellules bipolaires

Nous avons étudié la présence du récepteur CB1 dans trois types de cellules bipolaires : les cellules bipolaires liées aux bâtonnets, les cellules bipolaires associées aux cônes de type 2 OFF et de type 8 ON. Le récepteur CB1 s'exprime dans chacun de ces sous-types de cellules bipolaires. Il est important de noter qu'à P7, certaines cellules de chacun de ces sous-types expriment le récepteur, alors que d'autres ne l'expriment pas. La position du soma de ces cellules semble être le paramètre expliquant cette dichotomie.

En effet, ce sont les cellules plus basales qui expriment le récepteur CB1, alors que celles plus proches de l'OPL ne l'expriment pas. Il est de rigueur de rappeler que la position des cellules est également un marqueur de leur stade de développement. Les cellules plus basales sont plus immatures que les cellules plus apicales. Ces observations suggèrent que ces récepteurs pourraient être impliqués dans la migration cellulaire, dans les changements morphologiques qui accompagnent la maturation cellulaire, ainsi que de l'acquisition de l'identité du sous-type.

À partir de la seconde semaine de vie, l'expression du récepteur CB1 dans les cellules bipolaires associées aux bâtonnets diminue progressivement jusqu'à disparaître, alors qu'elle reste présente dans les deux autres sous-types de cellules bipolaires étudiés. Cependant, après P15, le signal du récepteur CB1 dans la partie supérieure de l'INL (correspondant à la position des cellulaires bipolaires des bâtonnets) devient diffus et variable d'un animal à l'autre. Pour évaluer la présence du récepteur CB1 dans les cellules qui occupent cet espace, nous avons dû adopter un critère d'analyse. Ainsi, si les contours cellulaires ne sont pas visibles lorsque le canal du co-marqueur est masqué, la fluorescence visible dans le canal du récepteur CB1 est considérée comme étant du bruit. Ce critère est justifié par le fait que le récepteur CB1 est souvent membranaire et que dans tous les autres types cellulaires, le marquage du récepteur CB1 délimite clairement les contours des cellules, y compris quand le signal du marqueur cellulaire est masqué. Par ailleurs, d'autres auteurs ont observé une "absence" du récepteur CB1 par immunohistochimie, tout en observant un effet fonctionnel dû à son activation dans les cellules bipolaires liées aux bâtonnets (Straiker *et al.*, 1999a). Il est donc possible que ce récepteur soit plus difficile à mettre en évidence dans ce type cellulaire après P15.

L'enzyme FAAH s'exprime de façon transitoire dans les cellules bipolaires de type 2 et 8. Dans les cellules bipolaires liées aux bâtonnets, l'enzyme apparaît assez tardivement (P21) et cette expression est maintenue pour le reste de la période étudiée. Cette présence tardive suggère que les

cellules bipolaires liées aux bâtonnets seraient en charge de contrôler la concentration d'AEA dans la fonction adulte plutôt que dans le développement dans l'INL. L'expression transitoire dans les deux autres types de cellules bipolaires renforce l'hypothèse émise ci-dessus selon laquelle les eCBs pourraient être impliqués dans le développement de ces sous-types cellulaires, notamment dans la migration, l'acquisition du sous-type et la synaptogenèse. Enfin, une contribution des eCBs à ces étapes du développement a été observée dans l'hippocampe et dans des cellules corticales en culture (Gomez *et al.*, 2003; 2007; 2008a; 2008b; Harkany *et al.*, 2008a; Mulder *et al.*, 2008).

Il est à noter que nos observations d'une expression de FAAH dans les cellules bipolaires liées aux bâtonnets et l'absence du récepteur CB1 dans ces cellules chez l'adulte sont en contradiction avec les données présentées par Yazulla *et al.* (1999). Ces auteurs ont constaté, le patron inverse, chez le rat albinos adulte. Ils ont observé une expression du récepteur CB1 dans les cellules bipolaires liées aux bâtonnets et l'absence de FAAH dans ces cellules.

Parallèlement à cette contradiction, nous avons pu observer, tout comme Yazulla *et al.* (1999), que les cellules bipolaires qui expriment le récepteur CB1 et celles qui expriment FAAH sont mutuellement exclusives. Ces résultats pourraient traduire le fait que le système des eCBs est un système qui module la communication entre ce type de cellules bipolaires. En effet, l'activité de l'enzyme FAAH modifie l'activité du récepteur CB1 et ces deux protéines sont situées dans des types de cellules bipolaires différents. De plus, ce système peut servir de lien entre la voie des cônes et celle des bâtonnets. Le sens dans lequel ce lien s'effectue est opposé entre nos observations et celles de Yazulla *et al.* (1999). Il est possible que cela provienne du fait que les modèles utilisés sont différents. Heiduschka *et Schraermeyer* (2008) ont démontré que la réponse de la rétine interne, enregistrée par ERG, chez les rats albinos est différente de celles des rats pigmentés. D'autres auteurs ont, quant à eux, démontré que la rétine des rats

albinos est fonctionnellement et anatomiquement différente de celle des rats pigmentés (Crespo *et al.*, 1985; Rachel *et al.*, 2002).

8.3.3- Les bâtonnets

Le récepteur CB1 n'est pas exprimé dans les somas des bâtonnets ni chez l'adulte, ni pendant le développement. Il semblerait donc que ce récepteur ne soit pas impliqué dans le développement de ce type cellulaire. Ces données sont en accord avec celles présentées par d'autres auteurs dont les recherches ont porté sur la rétine du rat (Yazulla *et al.*, 1999). Cependant, Hu *et al.*, (2010) rapportent une présence du récepteur CB1 dans les sphérules des bâtonnets de souris que nous n'avons pas décelé chez le rat. Nous avons obtenu, dans l'OPL, un marquage diffus à l'exception du marquage des pédicules de cônes. Ceci est en accord avec les données de Yazulla *et al.* (1999).

Par ailleurs, nous avons observé la présence de l'enzyme FAAH dans les somas des bâtonnets, ce qui est en accord avec les données des autres études sur le système des eCBs chez les rongeurs adultes (Yazulla *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2010). Cependant, il faut noter que Hu *et al.*, (2010) rapportent une forte expression de cette enzyme dans les sphérules des bâtonnets, marquage que nous n'avons pas retrouvé. Cette disparité pourrait être due à des différences entre les espèces car Yazulla *et al.*, (1999) ne rapportent pas non plus de marquage dans ces structures. Il est aussi possible que ces divergences soient attribuables à des différences entre les anticorps utilisés, les trois études ayant utilisé des anticorps différents.

8.3.4- Les cellules de Müller

Nous avons testé la présence du récepteur CB1 et de FAAH dans les cellules de Müller. FAAH n'est jamais présent dans ce type cellulaire alors que le récepteur CB1 est exprimé de façon transitoire entre P5 et P9 dans ce type cellulaire. Sachant qu'il a été démontré que l'AEA - le ligand du récepteur CB1 pouvait moduler la différenciation des cellules progénitrices en cellules gliales (Soltys *et al.*, 2010), cela pourrait signifier que la présence

transitoire du récepteur CB1 dans les cellules de Müller au moment où celles-ci acquiert leur identité et leur morphologie est un indice, mais non une confirmation de l'implication de ce récepteur dans ces processus.

8.4- Les endocannabinoïdes et le développement du système visuel

Dans la rétine, durant la période postnatale, la synaptogenèse et le raffinement synaptique sont des processus importants. Un des mécanismes qui semble réguler ces processus est l'activité spontanée. Étant donné le rôle attribué aux eCBs dans la relâche synaptique, y compris spontanée, nous nous proposons dans les paragraphes qui suivent d'examiner la possibilité selon laquelle les eCBs pourraient moduler la synaptogenèse et le raffinement synaptique, dans la rétine et dans ses projections, en agissant sur l'activité spontanée.

8.4.1- Activité spontanée

Dans la rétine, avant l'ouverture des yeux, les cellules ganglionnaires présentent une activité spontanée périodique qui se propage sur une portion de la GCL (Syed et al., 2004; Zheng et al., 2006 et voir pour revue Torborg and Feller, 2005). Ces vagues d'activités très corrélées, qui se propagent, sont appelées "les vagues rétinienne". Elles sont générées par trois circuits synaptiques différents selon l'étape du développement (Bansal *et al.*, 2000; Syed *et al.*, 2004).

Chez la souris, l'activité spontanée rétinienne apparaît avant la naissance et se poursuit jusqu'à l'ouverture des yeux. Au cours de la dernière semaine de gestation, cette activité est contrôlée par les cellules amacrines cholinergiques et les connexions synaptiques électriques qui les relient (Bansal *et al.*, 2000). De P0 à P11, cette activité est toujours contrôlée par la transmission cholinergique, mais la présence de récepteurs cholinergiques nicotiques, contenant les sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 2$ est nécessaire (Feller *et al.*, 1996; Bansal *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2006). Les cellules amacrines cholinergiques relâchent l'acétylcholine (ACh) qui dépolarise les cellules amacrines cholinergiques et ganglionnaires voisines causant ainsi la

propagation des vagues rétinienne. De P11 à P14 (Bansal *et al.*, 2000), l'activité spontanée est contrôlée par la transmission glutamatergique provenant des cellules bipolaires et les récepteurs glutamatergiques ionotropiques dans les cellules ganglionnaires. Elle est également modulée par les cellules amacrines cholinergiques (Wong *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2000; Zhou and Zhao, 2000).

En outre, les vagues rétinienne sont modulées par différents systèmes de neurotransmission, par exemple, le GABA peut moduler la fréquence des vagues rétinienne à toutes les étapes (Wong *et al.*, 2000; Syed *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Un autre neuromodulateur est l'adénosine (Stellwagen *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 2006; Dunn and Feller, 2008). Ce dernier est sécrété par les cellules cholinergiques (Blazynski, 1989) et agit par des changements de concentration d'AMPC (Stellwagen *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 2006; Dunn and Feller, 2008). Le rôle de ce messenger secondaire dans l'organisation des projections rétinienne est important et sera abordé en détail dans la section consacrée à ces dernières.

De nombreuses études ont abordé le rôle des eCBs dans la relâche synaptique ainsi que la synthèse des eCBs en réponse à l'activité neuronale dans diverses structures corticales (voir introduction). Quelques études existent sur le rôle des eCBs dans la maturation des connections synaptiques en fonction de l'expérience visuelle (Sjostrom *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008a; Jiang *et al.*, 2010a; Jiang *et al.*, 2010b). Ces études soulignent que le rôle des eCBs dépend de l'activité neuronale. L'activité spontanée est une forme d'activité neuronale. Mais, à notre connaissance, une seule étude a abordé le rôle des eCBs dans la relâche synaptique spontanée. Ainsi, Warrier et Wilson (2007) ont démontré que l'activation du récepteur CB1 pouvait moduler la relâche synaptique spontanée dans certaines cellules amacrines GABAergiques embryonnaires. De plus, Lalonde *et al.*, (2006) ont rapporté que l'activation du récepteur CB1 pouvait moduler l'excitabilité des cellules ganglionnaires vers la fin de la première semaine de vie. On sait également que les eCBs modulent les taux d'AMPC dans les

cellules ganglionnaires (Argaw et al 2010) et que ce dernier a une grande influence sur l'activité spontanée rétinienne (Stellwagen *et al.*, 1999). Ces auteurs ont démontré que lorsque le niveau d'AMPc est élevé, la taille, la vitesse et la fréquence des ondes sont augmentées.

Nos données ont démontré la présence du récepteur CB1 dans les cellules ganglionnaires, amacrines et bipolaires durant la période postnatale, qui précède l'ouverture des yeux. Nous avons également constaté la présence de l'enzyme FAAH dans les cellules cholinergiques amacrines uniquement durant cette période. Cela nous amène à suggérer que ces cellules contrôlent la concentration des eCBs dans la rétine interne durant cette période. L'hypothèse suivante pourrait être posée : l'activité spontanée peut causer une augmentation locale de la concentration des eCBs qui peuvent alors en moduler l'étendue et/ou la fréquence et ainsi réguler les connections synaptiques dans la rétine interne et l'organisation des projections rétinienne.

L'activité spontanée, selon une définition stricte, est limitée aux neurones qui génèrent des potentiels d'action, à savoir les cellules ganglionnaires et quelques cellules amacrines. Cependant, il existe également "une activité spontanée" dans le sens d'un changement de potentiel membranaire dû à une relâche synaptique spontanée ailleurs dans la rétine. C'est le cas, par exemple, entre les cônes et les cellules horizontales où cette "activité spontanée" module également la synaptogenèse entre ces cellules. Dans la section 3.2.2, nous avons présenté une hypothèse selon laquelle les eCBs pourraient moduler la relâche synaptique des cônes et/ou des cellules horizontales et modulerait ainsi leur synaptogenèse et leur organisation spatiale. L'hypothèse élaborée dans le paragraphe ci-dessus irait donc dans le même sens, mais ne s'applique pas aux mêmes cellules.

8.4-2- L'activité spontanée et la synaptogenèse dans la rétine interne

Le rôle de l'activité spontanée dans le façonnement des connexions synaptiques à l'intérieur de la rétine est beaucoup moins connu que son rôle

dans le façonnement des projections rétiniennes, qui a fait l'objet de nombreuses recherches. Cela dit, quelques auteurs commencent à étudier ce phénomène.

Différentes recherches ont démontré que les connections synaptiques initialement établies dans la rétine interne sont grandement altérées durant la période postnatale pour former les voies ON et OFF. Par exemple, les dendrites de certaines cellules ganglionnaires démontrent des ramifications diffuses initialement, qui se réduisent pour occuper une seule strate dans l'IPL durant la période postnatale (Bodnarenko and Chalupa, 1993; Bodnarenko *et al.*, 1995; Deplano *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2010). Certains auteurs rapportent que les dendrites des cellules ganglionnaires occupent jusqu'à 60% de l'épaisseur de l'IPL à la naissance, pour n'en occuper que 20% deux semaines plus tard (Bansal *et al.*, 2000; Diao *et al.*, 2004; Xu and Tian, 2007; Ren *et al.*, 2010). En particulier, Rachel Wong et son équipe ont publié plusieurs études sur le rôle de l'activité spontanée rétinienne dans l'établissement des connections synaptiques dans la rétine interne (Wong *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 2002; Wong and Ghosh, 2002; Kerschensteiner *et al.*, 2009). Ainsi, Kerschensteiner *et al.*, (2009) rapportent que la diminution de la relâche de glutamate durant la période postnatale affecte la formation de synapse entre les cellules ganglionnaires et les cellules bipolaires. Lohmann *et al.*, (2002) observent que des changements de concentrations calciques intracellulaires, évoqués par la relâche de neurotransmetteur (probablement l'acétylcholine) causent la stabilisation de synapses formées par les cellules ganglionnaires.

Toutes ces données démontrent que l'activité neuronale en général, et spontanée en particulier, est un facteur important pour l'établissement et le maintien des connections synaptiques dans la rétine interne. En outre, il est maintenant connu que le récepteur CB1 et l'enzyme FAAH sont présents dans les cellules amacrines et ganglionnaires qui contrôlent les vagues rétiniennes durant les deux premières semaines de vie et que le récepteur CB1 peut moduler la relâche de certains neurotransmetteurs, ainsi que

l'excitabilité des cellules ganglionnaires. Cela suggère que le système des eCBs pourrait également jouer un rôle dans les mécanismes qui contrôlent l'établissement et le maintien des synapses par le biais de la modulation de l'activité spontanée dans la rétine.

L'activité spontanée et les eCBs affectent également l'organisation des projections rétiniennes vers le collicule supérieur et le corps genouillé latéral, dont nous allons traiter dans la partie suivante.

8.4.3- Les endocannabinoïdes modulent les projections rétino-fuges

Avant d'aborder les résultats de notre troisième étude, nous allons discuter des données présentée en annexe 1 qui s'inscrivent dans le contexte du rôle des eCB dans le développement du système visuel. Ces résultats démontrent que les eCBs peuvent moduler à la fois la morphologie et le guidage du cône de croissance des cellules ganglionnaires *in vivo* et *ex vivo*. Ainsi, la stimulation du récepteur CB1 avec un agoniste cause une diminution de l'aire du cône de croissance et du nombre de filopodes sur le cône croissance. L'utilisation d'un agoniste inverse a pour conséquence l'effet opposé sur des cellules ganglionnaires en culture. La fonction du cône de croissance étant de détecter l'environnement immédiat de l'axone et d'y adapter sa navigation, nous avons étudié l'effet d'une stimulation locale et en gradient d'agents pharmacologiques agissant via le récepteur CB1 sur le comportement du cône de croissance. Nos données montrent que les agonistes du récepteur CB1 causent la rétraction du cône de croissance, mettant en évidence l'effet répulsif des eCBs sur les axones des cellules ganglionnaires. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Berghuis *et al.*, 2007) et démontrent l'implication du récepteur CB1 dans le guidage axonal des cellules ganglionnaires. Afin de déterminer si ce récepteur pouvait moduler la croissance axonale dans un système un peu plus complet, nous avons stimulé des explants de rétine avec un agoniste ou un agoniste inverse du récepteur CB1. L'agoniste a ralenti la croissance des projections rétiniennes alors que l'agoniste inverse l'a favorisée. Ces données sont en accord avec les résultats de certaines études (Vitalis *et al.*,

2008), mais en désaccord avec d'autres (Williams *et al.*, 2003; Mulder *et al.*, 2008; Keimpema *et al.*, 2010). Bien qu'il soit clair que les eCBs affectent la croissance et le guidage axonal, nous n'avons pas encore les connaissances nécessaires pour construire une vision consensuelle des effets des eCBs sur ces processus.

Plusieurs voies de signalisation en aval du récepteur peuvent aboutir à une réorganisation du cône de croissance, y compris les voies AMPc/PKA, MAPK, PI3K et mTOR que nous avons évaluées dans ce travail. Nos données montrent que la manipulation de l'activité du récepteur CB1 altère l'activité de la voie AMPc/PKA, l'agoniste diminuant le niveau d'AMPc et la phosphorylation de la PKA, alors que l'agoniste inverse a induit les conséquences opposées. En outre, l'inhibition de la PKA a bloqué l'effet induit par l'agoniste inverse du récepteur CB1, démontrant ainsi que cette voie était nécessaire à l'effet du récepteur CB1 sur le cône de croissance. Un des éléments qui peut être affecté par la voie AMPc/PKA est la translocation de DCC, récepteur à la nétrine, vers la membrane plasmique. La translocation de ce récepteur joue un rôle important dans le guidage axonal (Bouchard *et al.*, 2004). Nous avons donc testé ce lien et nos données démontrent qu'un blocage pharmacologique du récepteur CB1 cause l'augmentation de la concentration de DCC au niveau de la membrane, ce qui produit une réorganisation du cône de croissance. De plus, la modulation de l'activité du récepteur CB1 n'a causé aucune réorganisation du cône de croissance dans les cultures neuronales isolées de souris dont le gène *dcc* a été muté. Ces résultats démontrent que la réorganisation morphologique du cône de croissance enclenchée par le récepteur CB1 dépend du récepteur DCC.

In vivo, la perturbation du système des eCBs oculaire affecte le développement des projections rétino-fuges. En effet, l'injection intraoculaire d'un agoniste du récepteur CB1 a ralenti le développement de ces dernières alors que l'agoniste inverse en favorise la croissance. L'agoniste inverse a entraîné également l'émergence ou le maintien de branches aberrantes dans

le collicule supérieur. Ainsi, une injection intraoculaire à P1 cause l'augmentation de la projection ipsilatérale dans le collicule supérieur du hamster. Étant donné la densité de la projection controlatérale, il nous a été impossible d'évaluer si cette projection était également accrue dans notre paradigme expérimental. Il s'en suit que nos données ne nous permettent pas d'affirmer si :

- ces projections ipsilatérales accrues sont dues à une stabilisation de branches, qui dans le développement normal, se seraient rétractées;
- ces branches sont dues à une « mauvaise décision » dans le guidage du cône de croissance des cellules ganglionnaires. Cette dernière option est cependant peu probable, car la majorité des axones des cellules ganglionnaires ont déjà traversé le point décussation à P0 chez le hamster (Woo *et al.*, 1985; Jhaveri *et al.*, 1996).

Nous pouvons alors nous poser la question de savoir par quel mécanisme l'injection intraoculaire d'un agoniste inverse du récepteur CB1 pourrait stabiliser des projections aberrantes. Comme nous l'avons vu précédemment, durant la période périnatale la rétine est balayée de manière sporadique par des vagues d'activité spontanée. Ce type d'activité semble influencer le patron des connections rétino-fuges (Firth *et al.*, 2005; Feller, 2009). Ces vagues ont été impliquées dans le raffinement des projections rétinothalamiques et rétino-colliculaires par un mécanisme hébbien (Shatz and Stryker, 1988; Sretavan *et al.*, 1988; Penn *et al.*, 1998; Chapman, 2000; Chandrasekaran *et al.*, 2005; Shah and Crair, 2008). Nous avons également souligné le lien entre l'activité spontanée et les taux d'AMPc. C'est par ce biais que l'AMPc peut moduler pour le développement des projections rétinothalamiques et l'établissement d'une rétino-topie. Stellwagen and Shatz (2002) ont mis en évidence que l'augmentation unilatérale de l'activité rétinienne par le biais d'injections intraoculaires d'AMPc suscite un élargissement de la superficie occupée par les projections rétino-fuges de l'œil

traité par rapport à l'autre. De plus, une oscillation plutôt qu'une augmentation maintenue du niveau d'AMPC est nécessaire pour l'élimination des branches aberrantes. La fluctuation de l'AMPC dans le cône de croissance rend celui-ci sensible à l'éphrine-A5 causant la rétraction des branches aberrantes (Nicol *et al.*, 2007).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle l'augmentation locale de la concentration des eCBs (due à l'activité spontanée) pourrait causer l'activation du récepteur CB1 qui modulerait la relâche synaptique de certains neurotransmetteurs et l'excitabilité des cellules ganglionnaires d'une part et la concentration en AMPC d'autre part.

Cette hypothèse est également soutenue par les données que nous avons recueillies chez les souris *cnr1^{-/-}*. En effet, nos données démontrent que l'absence du récepteur CB1 affecte la ségrégation des projections ipsilatérales et contralatérales, phénomène qui se retrouve souvent lorsque sont créés un déséquilibre de l'activité spontanée entre les deux yeux ou des changements dans la concentration d'AMPC cellulaire (Tavares Gomes *et al.*, 2009).

Toutes ces données cumulées suggèrent que le système de eCBs pourrait participer à l'établissement de la circuiterie du système visuel tant au niveau de la rétine que de ces projections.

9- Rôles des éléments du système eCB dans la rétine adulte

Dans la littérature, les données relatives à l'expression des éléments du système des eCBs suggèrent que ce dernier aurait un rôle dans la fonction rétinienne adulte. Les données fonctionnelles accumulées dans les rétines du cyprin doré et de la salamandre démontrent une implication du récepteur CB1 dans la réponse des cônes et des bâtonnets. Cependant, ces études ayant été faites *in vitro* avec des méthodes de "patch clamp", il est difficile d'en extrapoler un effet global du récepteur CB1 dans la rétine. Nous avons donc entrepris d'évaluer les rôles des récepteurs CB1 et CB2 dans la

fonction de la rétine adulte et la distribution du récepteur CB2, compte tenu du fait que ce récepteur a été très peu étudié jusqu'à présent.

9.1- La distribution du récepteur CB2

Nous avons analysé le patron d'expression du récepteur CB2, dans la rétine de la souris adulte, par co-localisation. Bien que nous n'ayons pas pu en intégrer les illustrations dans le présent travail, nous allons, néanmoins, en exposer les résultats brièvement. Nos données nous ont permis de constater que le récepteur CB2 s'exprime dans toutes les couches de la rétine et, en particulier, dans les couches synaptiques comme cela a été observé par Lopez et al. (2010) chez le rat. En utilisant des marqueurs des types cellulaires rétiniens, nous avons localisé précisément ce récepteur dans les cônes, les bâtonnets, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, certaines cellules amacrines et les cellules ganglionnaires. Ces données sont partiellement en accord avec les résultats de Lopez et al., (2010) qui, en se basant sur la morphologie et la position des cellules rétiniennes, ont conclu que ce récepteur s'exprime dans les cellules horizontales, amacrines et ganglionnaires. Il est possible que la différence dans la distribution du récepteur CB2, entre les deux études, soit due à l'espèce étudiée. Cependant, l'analyse des photos publiées dans l'article de Lopez et al. (2010) nous permet de constater que l'intensité du bruit de fond est telle qu'il peut avoir masqué la présence du récepteur CB2 dans certains types cellulaires.

9.2- Condition scotopique

9.2.1- Le rôle du récepteur CB2

Les électrorétinogrammes (ERG) enregistrés chez les souris *cnr2^{-/-}* démontrent plusieurs anomalies par rapport à ceux enregistrés chez des souris de souche sauvage. Ainsi, nous avons pu observer une augmentation de l'amplitude de l'onde a, quelque soit l'intensité utilisée, et une augmentation de l'onde b, aux intensités intermédiaires. En analysant ces augmentations, nous avons constaté l'existence d'une relation non linéaire

entre le pourcentage de changements de l'onde a et l'intensité qui l'évoque. Ce pourcentage de changements suit une distribution bimodale qui peut être interprétée comme l'effet du récepteur CB2 sur chaque type de photorécepteurs. Il permet de constater que l'effet sur les bâtonnets a une envergure nettement supérieure à celui sur les cônes. Cette différence dans l'ampleur de l'effet n'est pas sans rappeler une conclusion tirée par Fan et Yazulla (2003; 2007) et Straiker et Sullivan (2003). Ces auteurs ont pu observer que l'exposition de rétines au WIN55212-2 (un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes) entraîne une diminution des courants potassiques et une augmentation des courants calciques dans les bâtonnets, ainsi qu'une diminution des deux types de courants dans les cônes. Sur la base de ces résultats, ils ont suggéré que l'activation des récepteurs aux eCBs causerait une diminution de la sensibilité des bâtonnets. Ils ne se sont pas prononcés en ce qui concerne les cônes, puisque l'effet de la diminution des deux courants a des conséquences opposées. Ces résultats peuvent expliquer la différence d'impact de l'élimination du récepteur CB2 sur les bâtonnets et sur les cônes que nous avons observé.

L'analyse de nos résultats nous a permis de constater que l'intensité qui évoque le changement maximal de l'onde b est comprise dans l'intervalle d'intensité qui suscite le premier pic de changement de l'onde a. Si nous souscrivons à l'hypothèse que ce changement de l'onde a est dû à une réponse accrue des bâtonnets, nous pouvons alors conclure que l'effet obtenu sur l'onde b serait dû à une réponse accrue des cellules bipolaires liées aux bâtonnets. De plus, nous avons remarqué qu'aux intensités supérieures, l'amplitude de l'onde b chez les animaux *cnr2^{-/-}* n'est pas différente de celle des souris de souche sauvage. Cela peut s'expliquer par le fait que l'importance relative de la réponse des cellules bipolaires liées aux bâtonnets diminue au fur et à mesure que l'intensité utilisée est augmentée, car il y a de plus en plus de cellules bipolaires liées aux cônes qui répondent.

En outre, cette augmentation de l'amplitude de l'onde a, visible à toutes les intensités, atteint un maximum de 60% et s'accompagne d'une

augmentation de l'amplitude de l'onde b, visible à cinq intensités intermédiaires seulement, qui atteint un maximum 32%. La dichotomie entre l'effet important sur l'onde a et celui nettement plus modeste sur l'onde b suggère qu'il pourrait y avoir un mécanisme de compensation en action dans la synapse entre le bâtonnet et la cellule bipolaire. Une hypothèse plausible serait que le récepteur CB1 puisse compenser dans une certaine mesure l'élimination du récepteur CB2 étant donné que jusqu'à présent il existe une grande superposition entre les rôles découverts pour ces deux récepteurs. Cette compensation pourrait se traduire par un changement de concentration totale du récepteur CB1, de son ligand ou des enzymes de synthèse et de dégradation de ce ligand. Pour évaluer cela, nous avons mesuré, chez les souris *cnr2^{-/-}* et de souches sauvages, les concentrations totales des protéines mentionnées ci-dessus. Nos résultats montrent une surexpression des enzymes de synthèse et de dégradation du ligand du récepteur CB1, mais pas de changement dans la concentration du récepteur lui-même. Ceci suggère que le récepteur CB1 pourrait être plus actif dans la rétine des souris *cnr2^{-/-}*. Étant donné le rôle de ce récepteur dans la régulation de la baisse de la relâche synaptique (Fan and Yazulla, 2007) l'effet subtil sur l'onde b pourrait donc être dû à une compensation par le récepteur CB1.

Nos données nous ont également permis de mettre en évidence une augmentation de l'amplitude cumulée des potentiels oscillatoires due à l'élimination du récepteur CB2. Nous constatons que l'intervalle d'intensités qui évoque cette augmentation dans l'amplitude des OPs cumulés ne correspond pas à celui qui suscite les changements de l'onde b. Cela nous amène à penser que l'effet observé sur les potentiels oscillatoires n'est pas hérité de l'effet observé sur l'onde b, mais qu'il est causé par des changements au niveau de la rétine interne. En effet, une récente étude (Tremblay *et al.*, 2002) a démontré que l'élimination de l'isoforme I de l'adénylate cyclase entraîne une importante atténuation de l'amplitude des potentiels oscillatoires sans atteinte de l'onde b. Sachant que l'interaction entre le récepteur CB2 et l'adénylate cyclase I est inhibitrice, nous pouvons

poser l'hypothèse que l'élimination de ce dernier causerait une suractivité de l'adénylate cyclase I qui provoquerait des potentiels oscillatoires accrus.

9.2.2- Le rôle du récepteur CB1

L'élimination du récepteur CB1 n'a pas affecté l'amplitude de la réponse rétinienne. Toutefois, nous avons noté une diminution de l'intensité nécessaire pour susciter une réponse maximale de la rétine. Cela suggère que ce récepteur a un léger impact sur la sensibilité des photorécepteurs, probablement sur les cônes étant donné que l'on ne voit pas de changement dans la réponse maximale des bâtonnets. Ceci est en accord avec les données rapportées dans la littérature, par Fan et Yazulla (2003; 2007) ainsi que Straiker et Sullivan (2003). Ces auteurs ont pu observer que l'exposition de rétines au WIN55212-2 (un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes – voir tableau 3) a entraîné une atténuation des courants calciques et potassiques dans les cônes.

Par ailleurs, l'élimination du récepteur CB1 a causé un changement dans le profil temporel de la réponse rétinienne. En effet, à l'intensité évoquant le "rod V-max", l'onde b dure plus longtemps et l'amplitude de l'onde négative qui la suit est inférieure. Bien que cela ne s'applique pas au même type cellulaire, cette observation n'est pas sans rappeler l'effet rapporté par Struik et al., (2006). Ces auteurs ont examiné l'effet de l'agoniste des récepteurs aux CBs, WIN55212-2, sur la réponse des cônes et ils rapportent une accélération de la pente de descendante durant la repolarisation du cône et une augmentation de l'hyperpolarisation qui suit. Les auteurs suggèrent que le récepteur CB1 pourrait être impliqué dans les mécanismes de désactivation de la cascade de phototransduction dans les cônes. En outre, Yazulla et al.,(2000) ont également démontré que l'activation du récepteur CB1 avec WIN55212-2 pouvait inhiber certains courants potassiques dans les cellules bipolaires ON du cyprin doré.

Mis ensemble, les résultats de ces auteurs et les nôtres suggèrent que le récepteur CB1 participe à l'établissement du profil temporel de la

réponse rétinienne et, en particulier, aux mécanismes de repolarisation et d'hyperpolarisation après une dépolarisation.

En conclusion, l'élimination des deux récepteurs aux endocannabinoïdes affecte la réponse rétinienne en condition scotopique. Nous constatons également que les deux récepteurs semblent affecter des aspects différents de la réponse rétinienne. L'élimination du récepteur CB1 module l'aspect temporel de la réponse, particulièrement le temps nécessaire pour mettre fin à l'activation et à l'hyperpolarisation qui la suit. L'élimination du récepteur CB2, quant à elle, module l'amplitude de la réponse et la sensibilité rétinienne.

9.3- Condition photopique

9.3.1- Le rôle du récepteur CB2

Nous avons également enregistré des ERGs en condition photopique. Cela nous a permis d'évaluer la capacité des rétines des souris *cnr2^{-/-}* à s'adapter à un environnement lumineux. Nos résultats démontrent que la rétine des souris *cnr2^{-/-}* est capable de s'adapter à son environnement lumineux. Toutefois, elle affiche une réponse anormalement forte aux temps intermédiaires.

Étant donné le rôle établi des récepteurs aux eCBs dans la modulation de la relâche synaptique et des mécanismes d'adaptation comme la dépression synaptique à long terme, le système eCB est dans une position stratégique pour participer aux mécanismes d'adaptation de la rétine. Ainsi, il a été démontré que le système des eCBs pouvait interagir avec la dopamine (DA) dans la rétine (Fan and Yazulla, 2004). La DA est un neuromodulateur important pour l'adaptation à la lumière (voir pour revue Witkovsky, 2004). La DA est libérée par les cellules dopaminergiques inter-plexiformes et amacrines (Savy *et al.*, 1995), suite à un changement d'illumination de la rétine (Witkovsky *et al.*, 2000). La DA peut alors moduler à la hausse la sensibilité des cônes à la lumière en agissant sur plusieurs mécanismes

détaillés par Witkovsky (2004). Il existe cinq types de récepteurs dopaminergiques, D1 à D5, (Gingrich and Caron, 1993), qui sont tous des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés à une protéine G. Ces récepteurs sont groupés en deux sous-familles appelées "D1-like" incluant les récepteurs D1 et D5 et "D2-like" incluant les récepteurs D2, D3 et D4 (Gingrich and Caron, 1993). Ces deux familles de récepteurs modulent toutes deux la voie AMPc/PKA, mais dans des sens opposés. Les récepteurs "D1-like" sont des modulateurs positifs de cette voie (Monsma *et al.*, 1990) alors que les récepteurs "D2-like" sont des modulateurs négatifs (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994). Il a été démontré que l'élimination du récepteur D4, présent dans les photorécepteurs (Cohen *et al.*, 1992; Klitten *et al.*, 2008), causait une réponse photopique diminuée chez la souris (Nir *et al.*, 2002).

Par ailleurs, Fan et Yazulla (2004) ont mis en évidence une interaction entre les récepteurs aux eCBs et les récepteurs "D2-like" dans les cônes de la rétine du cyprin doré. Dans cette étude, une seule application de WIN55212-2 à faible concentration causait une augmentation des courants calciques, potassiques et chloriques, alors qu'une co-application de cette même drogue avec un agoniste des récepteurs D2 éliminait ces effets. Les auteurs de cette étude concluaient que cet effet dépendait du récepteur CB1, qui était considéré comme le seul récepteur aux cannabinoïdes présent dans la rétine. Cette conclusion doit maintenant être remise en question étant donné la présence du récepteur CB2 dans la rétine et le fait que l'agoniste WIN55212-2 n'est pas spécifique au récepteur CB1 (voir tableau 3). Ainsi, il serait envisageable que l'adaptation anormale de la rétine des souris *cnr2*^{-/-} que nous avons mise en évidence soit due à une augmentation de la sensibilité des cônes par un mécanisme dépendant de la DA, dont l'action n'est plus contrebalancée par les récepteurs CB2.

L'interaction entre la DA et le système eCBs a également été mise en évidence dans les cellules bipolaires (Fan and Yazulla, 2005). Cette étude de Fan et Yazulla démontre notamment que la co-activation du récepteur CB1 et

du récepteur D1 dans les cellules bipolaires produit des effets antagonistes sur les courants potassiques, le récepteur CB1 les supprimant et le récepteur D1 les augmentant. La conclusion selon laquelle cet effet dépend du récepteur CB1 repose sur l'utilisation de l'antagoniste SR141716A (Pertwee, 2005) et sur le fait que le récepteur CB1 était considéré comme le seul récepteur aux cannabinoïdes exprimé dans la rétine. Cependant, l'antagoniste SR141716A n'étant pas un antagoniste parfaitement sélectif au récepteur CB1 (voir tableau 3 pour les valeurs de K_i) et sachant que le récepteur CB2 s'exprime également dans la rétine, il est concevable qu'une partie des effets, mis en évidence dans cette étude, soit imputable au récepteur CB2. En outre, chez le rongeur, certaines cellules bipolaires expriment le récepteur D1 (Veruki and Wassle, 1996; Nguyen-Legros *et al.*, 1997) et sont donc soumises à l'influence de la DA. Nous pouvons alors poser l'hypothèse que l'effet mesuré sur l'onde b, en condition photopique, pourrait être dû à une action du système dopaminergique dont l'influence est moins contrebalancée par le système eCB à la fois au niveau des cônes et au niveau des cellules bipolaires.

9.3.2- Le rôle du récepteur CB1

L'élimination du récepteur CB1 ne semble pas avoir affecté la réponse rétinienne en condition photopique. Ceci est très surprenant étant donné que plusieurs études montrent un impact de l'activation ce récepteur sur plusieurs courants ioniques dans les cônes et dans les cellules bipolaires liées aux cônes. Plusieurs explications sont possibles, la première étant que chez les animaux *cnr1*^{-/-}, il existe des mécanismes de compensation qui masquent l'impact de l'élimination de ce récepteur. Pour tenter d'évaluer cette possibilité, nous avons quantifié les autres éléments du système des eCBs. Nos données ne nous ont pas permis d'observer de sur-expression du récepteur CB2 et des enzymes de synthèse et de dégradation du système des eCBs. Cela n'élimine pas la possibilité que le récepteur CB2 soit simplement plus actif, mais cela est moins probable étant donné ces

observations. Par ailleurs, il est également possible que d'autres mécanismes se soient mis en place pour compenser l'élimination du récepteur CB1.

La deuxième option est que le récepteur CB1 ne joue pas le même rôle dans les rétines de rongeurs que dans les rétines des poissons et des amphibiens. Étant donné que notre étude est la seule qui ait la souris comme modèle animal, nous n'avons pas de base de comparaison pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Il est également possible que chez les poissons et les amphibiens, le récepteur CB2 ne soit pas exprimé dans la rétine et que le récepteur CB1 soit en charge de tous les rôles, qui chez la souris, sont répartis entre les deux récepteurs. De plus amples expérimentations permettraient de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

Ligands	Valeurs K_i (nM)	
	Récepteur CB1	Récepteur CB2
SR141716A	1.8 à 12.3	514 à 13200
CP54490	0.5 à 5.0	0.69 à 2.8
WIN55212-2	1.89 à 123	0.28 à 16
2-AG	58.3	145

Données tirées de Cannabinoids and the Brain - Köfalvi, 2008

Tableau 5 : Valeurs des constantes d'inhibition des ligands de CB1 et CB2

En conclusion, nos données démontrent que le récepteur CB2 est impliqué dans les mécanismes d'adaptation de la rétine, et ce potentiellement en interaction avec la dopamine. Ce qui n'est pas le cas du récepteur CB1.

Nos données fonctionnelles démontrent que chacun des récepteurs aux cannabinoïdes participe à l'établissement de la réponse rétinienne chez la souris, mais affecte cette réponse différemment. De plus amples expériences devront être réalisées pour construire une image claire du rôle de chacun des récepteurs dans la fonction rétinienne et réconcilier toutes les données de la littérature.

10- Perspectives

Nos études nous ayant permis de poser de nouvelles hypothèses en ce qui concerne le développement et le fonctionnement de la rétine, l'étape à venir sera de les valider.

10.1- Études futures relatives au développement

En ce qui concerne le rôle du système eCB dans la synaptogenèse, une première étape pourrait être d'utiliser des souris transgéniques dont diverses cellules rétiniennes sont fluorescentes et de les exposer à divers cannabinoïdes synthétiques afin d'en évaluer l'impact sur la synaptogenèse. L'utilisation du même type de protocole expérimental avec des souris dont quelques cellules ganglionnaires sont fluorescentes permettrait d'étudier le rôle du système des eCBs dans le raffinement des synapses à la fois au niveau de la rétine, du collicule supérieur et du corps genouillé latéral.

L'étude du rôle du récepteur CB1 dans les ondes rétiniennes spontanées serait également un sujet très intéressant. Des rétines isolées, à diverses étapes de développement, pourraient être exposées à plusieurs cannabinoïdes synthétiques pour évaluer leurs effets sur l'amplitude, l'étendue et la fréquence des vagues rétiniennes.

Par ailleurs, nos études ayant permis d'établir le patron d'expression du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH, il reste à étudier, par immunohistochimie, le patron d'expression d'autres protéines du système des eCBs, notamment celui du récepteur CB2 qui n'est que très peu connu.

Enfin, l'étude de l'évolution temporelle des ligands endogènes des récepteurs aux eCBs durant le développement postnatal apporterait une meilleure compréhension du rôle de ces derniers dans le développement.

10.2- Études futures chez l'adulte

Bien que nos données aient permis de mettre en évidence un rôle du récepteur CB2 dans le fonctionnement de la rétine adulte, la méthode utilisée ne permettait pas une compréhension détaillée de ce rôle. Il serait intéressant de poursuivre l'investigation en faisant des enregistrements *in vitro* sur des rétines exposées à des cannabinoïdes synthétiques spécifiques aux récepteurs CB2. De plus, ce rôle du récepteur CB2 dans le fonctionnement de la rétine remet en question, dans une certaine mesure, les rôles jusqu'ici attribués uniquement au récepteur CB1. Il faudrait donc revalider ces données en utilisant des drogues spécifiques au récepteur CB1.

Il serait également très intéressant d'étudier davantage l'interaction entre la dopamine et le système des eCBs, et particulièrement le récepteur CB2. Il serait possible de vérifier, par exemple, si l'injection d'un agoniste du récepteur CB2 pourrait avoir l'effet inverse de celui que nous avons observé dans notre étude. Puis, de déterminer si l'application d'un agoniste dopaminergique en conjonction avec cet agoniste du récepteur CB2 pourrait éliminer cet effet.

Par ailleurs, pour palier à l'écueil que constitue l'utilisation de souris génétiquement modifiées (élimination du récepteur CB1 ou CB2), il faudrait utiliser des injections de cannabinoïdes synthétiques spécifiques à chacun des récepteurs chez les souris de souche sauvage. Cela permettrait d'évaluer si les effets obtenus sont inverses de ceux décrits dans le présent travail et de confirmer ou infirmer certaines de nos hypothèses.

Enfin, étant donné qu'il existe de nombreux recoupements dans les rôles des deux récepteurs, il serait intéressant d'évaluer la fonction rétinienne chez des souris transgéniques n'ayant ni récepteurs CB1, ni CB2.

Conclusion

Les recherches qui sous-tendent cette thèse ont permis de mieux comprendre le rôle des endocannabinoïdes dans la rétine au cours du développement et chez la souris adulte.

Durant le développement de la souris, le patron d'expression du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH ainsi que leur redistribution massive nous permet de poser des hypothèses quant au rôle de ce système dans le développement de la rétine :

Le système des eCBs pourrait participer à la synaptogenèse, en particulier celle dépendante de l'activité.

Le patron d'expression du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH, qui se superposent tôt dans le développement et sont mutuellement exclusifs chez l'adulte, permet de supposer que durant le développement, le système des eCBs jouerait un rôle d'automodulation, alors que dans la rétine adulte, il jouerait un rôle de communication entre les cellules.

Par ailleurs, notre troisième étude a permis, pour la première fois, de mettre en évidence le rôle du système eCB dans la rétine d'un mammifère. En effet, nous démontrons un rôle du récepteur CB2 dans la modulation de la sensibilité rétinienne, en particulier pour la vision issue des bâtonnets. Nous avons également démontré un rôle de ce récepteur dans l'adaptation de la rétine à la lumière.

Le récepteur CB1, quant à lui, semble davantage impliqué dans l'établissement du profil temporel de la réponse rétinienne.

Bibliographie

- Adams, A. J., B. Brown, G. Haegerstrom-Portnoy, M. C. Flom and R. T. Jones (1978). "Marijuana, alcohol, and combined drug effects on the time course of glare recovery." *Psychopharmacology (Berl)* **56**(1): 81-86.
- Aguado, T., K. Monory, J. Palazuelos, N. Stella, B. Cravatt, B. Lutz, G. Marsicano, Z. Kokaia, M. Guzman and I. Galve-Roperh (2005). "The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation." *FASEB J* **19**(12): 1704-1706.
- Aguado, T., J. Palazuelos, K. Monory, N. Stella, B. Cravatt, B. Lutz, G. Marsicano, Z. Kokaia, M. Guzman and I. Galve-Roperh (2006). "The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells." *J Neurosci* **26**(5): 1551-1561.
- Alexiades, M. R. and C. Cepko (1996). "Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina." *Dev Dyn* **205**(3): 293-307.
- Applebury, M. L., M. P. Antoch, L. C. Baxter, L. L. Chun, J. D. Falk, F. Farhangfar, K. Kage, M. G. Krzystolik, L. A. Lyass and J. T. Robbins (2000). "The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning." *Neuron* **27**(3): 513-523.
- Arango-Gonzalez, B., A. Szabo, G. Pinzon-Duarte, A. Lukats, E. Guenther and K. Kohler (2010). "In vivo and in vitro development of S- and M-cones in rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(10): 5320-5327.
- Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cécyre B, Chainé N, Cherif H, Tea N, Lutz B, Ptito M and Bouchard J-B. 2010. Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and Deleted in Colorectal Cancer (DCC) in axon guidance. *J Neurosci* (in press)
- Atwood, B. K. and K. Mackie (2010). "CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis." *Br J Pharmacol* **160**(3): 467-479.
- Bansal, A., J. H. Singer, B. J. Hwang, W. Xu, A. Beaudet and M. B. Feller (2000). "Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal waves in forming ON and OFF circuits in the inner retina." *J Neurosci* **20**(20): 7672-7681.
- Baye, L. M. and B. A. Link (2008). "Nuclear migration during retinal development." *Brain Res* **1192**: 29-36.
- Begbie, J., P. Doherty and A. Graham (2004). "Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo." *J Anat* **205**(3): 213-218.
- Berghuis, P., M. B. Dobszay, X. Wang, S. Spano, F. Ledda, K. M. Sousa, G. Schulte, P. Erfors, K. Mackie, G. Paratcha, Y. L. Hurd and T. Harkany (2005). "Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(52): 19115-19120.
- Berghuis, P., A. M. Rajnicek, Y. M. Morozov, R. A. Ross, J. Mulder, G. M. Urban, K. Monory, G. Marsicano, M. Matteoli, A. Canty, A. J. Irving, I. Katona, Y. Yanagawa, P. Rakic, B. Lutz, K. Mackie and T. Harkany (2007). "Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity." *Science* **316**(5828): 1212-1216.
- Berrendero, F., L. Garcia-Gil, M. L. Hernandez, J. Romero, M. Cebeira, R. de Miguel, J. A. Ramos and J. J. Fernandez-Ruiz (1998). "Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development." *Development* **125**(16): 3179-3188.
- Berrendero, F., N. Sepe, J. A. Ramos, V. Di Marzo and J. J. Fernandez-Ruiz (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): 181-191.
- Bingham, B., P. G. Jones, A. J. Uveges, S. Kotnis, P. Lu, V. A. Smith, S. C. Sun, L. Resnick, M. Chlenov, Y. He, B. W. Strassle, T. A. Cummons, M. J. Piesla, J. E. Harrison, G. T. Whiteside and J. D. Kennedy (2007). "Species-specific in vitro pharmacological effects of the cannabinoid receptor 2 (CB2) selective ligand AM1241 and its resolved enantiomers." *Br J Pharmacol* **151**(7): 1061-1070.
- Bisogno, T., I. Delton-Vandenbroucke, A. Milone, M. Lagarde and V. Di Marzo (1999). "Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina." *Arch Biochem Biophys* **370**(2): 300-307.
- Bisogno, T., F. Howell, G. Williams, A. Minassi, M. G. Cascio, A. Ligresti, I. Matias, A. Schiano-Moriello, P. Paul, E. J. Williams, U. Gangadharan, C. Hobbs, V. Di Marzo and P. Doherty (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): 463-468.
- Bisogno, T., N. Sepe, L. De Petrocellis and V. Di Marzo (1997a). "Biosynthesis of 2-arachidonoyl-glycerol, a novel cannabimimetic eicosanoid, in mouse neuroblastoma cells." *Adv Exp Med Biol* **433**: 201-204.
- Bisogno, T., N. Sepe, D. Melck, S. Maurelli, L. De Petrocellis and V. Di Marzo (1997b). "Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells." *Biochem J* **322 (Pt 2)**: 671-677.
- Blankman, J. L., G. M. Simon and B. F. Cravatt (2007). "A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol." *Chem Biol* **14**(12): 1347-1356.
- Blazynski, C. (1989). "Displaced cholinergic, GABAergic amacrine cells in the rabbit retina also contain adenosine." *Vis Neurosci* **3**(5): 425-431.
- Bloomfield, S. A., D. Xin and S. E. Persky (1995). "A comparison of receptive field and tracer coupling size of horizontal cells in the rabbit retina." *Vis Neurosci* **12**(5): 985-999.
- Bodnarenko, S. R. and L. M. Chalupa (1993). "Stratification of ON and OFF ganglion cell dendrites depends on glutamate-mediated afferent activity in the developing retina." *Nature* **364**(6433): 144-146.
- Bodnarenko, S. R., G. Jeyarasasingam and L. M. Chalupa (1995). "Development and regulation of dendritic stratification in retinal ganglion cells by glutamate-mediated afferent activity." *J Neurosci* **15**(11): 7037-7045.
- Bouaboula, M., B. Bourrie, M. Rinaldi-Carmona, D. Shire, G. Le Fur and P. Casellas (1995a). "Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells." *J Biol Chem* **270**(23): 13973-13980.
- Bouaboula, M., N. Desnoyer, P. Carayon, T. Combes and P. Casellas (1999a). "Gi protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB2: implication for intracellular signalization cross-regulation." *Mol Pharmacol* **55**(3): 473-480.
- Bouaboula, M., D. Dussosoy and P. Casellas (1999b). "Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses." *J Biol Chem* **274**(29): 20397-20405.
- Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, B. Bourrie, X. Canat, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, G. Le Fur and P. Casellas (1995b). "Activation of mitogen-activated protein kinases by

- stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." Biochem J **312** (Pt 2): 637-641.
- Bouchard, J. F., S. W. Moore, N. X. Tritsch, P. P. Roux, M. Shekarabi, P. A. Barker and T. E. Kennedy (2004). "Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension." J Neurosci **24**(12): 3040-3050.
- Brandon, C. (1985). "Improved immunocytochemical staining through the use of Fab fragments of primary antibody, Fab-specific second antibody, and Fab-horseradish peroxidase." J Histochem Cytochem **33**(7): 715-719.
- Bringmann, A., M. Francke, T. Pannicke, B. Biedermann, H. Kodol, F. Faude, W. Reichelt and A. Reichenbach (2000). "Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Muller cells." Glia **29**(1): 35-44.
- Bringmann, A., T. Pannicke, B. Biedermann, M. Francke, I. Iandiev, J. Grosche, P. Wiedemann, J. Albrecht and A. Reichenbach (2009). "Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism." Neurochem Int **54**(3-4): 143-160.
- Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. N. Skatchkov, N. N. Osborne and A. Reichenbach (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.
- Buckley, N. E., S. Hansson, G. Harta and E. Mezey (1998). "Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat." Neuroscience **82**(4): 1131-1149.
- Buczynski, M. W. and L. H. Parsons (2010). "Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls." Br J Pharmacol **160**(3): 423-442.
- Cabral, G. A. and L. Griffin-Thomas (2009). "Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation." Expert Rev Mol Med **11**: e3.
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch and J. Striessnig (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 411-425.
- Cayouette, M., L. Poggi and W. A. Harris (2006). "Lineage in the vertebrate retina." Trends Neurosci **29**(10): 563-570.
- Chalupa, L. M. and R. W. Williams (2008). Eye, retina, and visual system of the mouse. Cambridge, MA, MIT Press.
- Chandrasekaran, A. R., D. T. Plas, E. Gonzalez and M. C. Crair (2005). "Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse." J Neurosci **25**(29): 6929-6938.
- Chapman, B. (2000). "Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus." Science **287**(5462): 2479-2482.
- Chebrou, H., F. Bigey, A. Arnaud and P. Galzy (1996). "Study of the amidase signature group." Biochim Biophys Acta **1298**(2): 285-293.
- Chen, J., I. Matias, T. Dinh, T. Lu, S. Venezia, A. Nieves, D. F. Woodward and V. Di Marzo (2005). "Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma." Biochem Biophys Res Commun **330**(4): 1062-1067.
- Cinar, O., O. Semiz and A. Can (2006). "A microscopic survey on the efficiency of well-known routine chemical fixatives on cryosections." Acta Histochem **108**(6): 487-496.
- Cohen, A. I., R. D. Todd, S. Harmon and K. L. O'Malley (1992). "Photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled to adenylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12093-12097.

- Coombs, J., D. van der List, G. Y. Wang and L. M. Chalupa (2006). "Morphological properties of mouse retinal ganglion cells." Neuroscience **140**(1): 123-136.
- Cravatt, B. F., K. Demarest, M. P. Patricelli, M. H. Bracey, D. K. Giang, B. R. Martin and A. H. Lichtman (2001). "Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9371-9376.
- Cravatt, B. F., D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner and N. B. Gilula (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." Nature **384**(6604): 83-87.
- Crespo, D., D. D. O'Leary and W. M. Cowan (1985). "Changes in the numbers of optic nerve fibers during late prenatal and postnatal development in the albino rat." Brain Res **351**(1): 129-134.
- Daigle, T. L., C. S. Kearns and K. Mackie (2008). "Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling." Neuropharmacology **54**(1): 36-44.
- Davenport, C. M., P. B. Detwiler and D. M. Dacey (2008). "Effects of pH buffering on horizontal and ganglion cell light responses in primate retina: evidence for the proton hypothesis of surround formation." J Neurosci **28**(2): 456-464.
- Dawson, W. W., C. F. Jimenez-Antillon, J. M. Perez and J. A. Zeskind (1977). "Marijuana and vision--after ten years' use in Costa Rica." Invest Ophthalmol Vis Sci **16**(8): 689-699.
- de Melo Reis, R. A., A. L. Ventura, C. S. Schitine, M. C. de Mello and F. G. de Mello (2008). "Muller glia as an active compartment modulating nervous activity in the vertebrate retina: neurotransmitters and trophic factors." Neurochem Res **33**(8): 1466-1474.
- Demuth, D. G. and A. Molleman (2006). "Cannabinoid signalling." Life Sci **78**(6): 549-563.
- Deniz, S., E. Wersinger, Y. Schwab, C. Mura, F. Erdelyi, G. Szabo, A. Rendon, J. A. Sahel, S. Picaud and M. Roux (2010). "Mammalian retinal horizontal cells are unconventional GABAergic neurons." J Neurochem.
- Deplano, S., C. Gargini, R. Maccarone, L. M. Chalupa and S. Bisti (2004). "Long-term treatment of the developing retina with the metabotropic glutamate agonist APB induces long-term changes in the stratification of retinal ganglion cell dendrites." Dev Neurosci **26**(5-6): 396-405.
- Desarnaud, F., H. Cadas and D. Piomelli (1995). "Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization." J Biol Chem **270**(11): 6030-6035.
- Deutsch, D. G. and S. A. Chin (1993). "Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist." Biochem Pharmacol **46**(5): 791-796.
- Deutsch, D. G., N. Ueda and S. Yamamoto (2002). "The fatty acid amide hydrolase (FAAH)." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **66**(2-3): 201-210.
- DeVries, S. H. (2000). "Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels." Neuron **28**(3): 847-856.
- Dhingra, N. K., Y. Ramamohan and T. R. Raju (1997). "Developmental expression of synaptophysin, synapsin I and syntaxin in the rat retina." Brain Res Dev Brain Res **102**(2): 267-273.
- Di Marzo, V. (2008). "Endocannabinoids: synthesis and degradation." Rev Physiol Biochem Pharmacol **160**: 1-24.
- Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J. C. Schwartz and D. Piomelli (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." Nature **372**(6507): 686-691.

- Diao, L., W. Sun, Q. Deng and S. He (2004). "Development of the mouse retina: emerging morphological diversity of the ganglion cells." *J Neurobiol* **61**(2): 236-249.
- Dinh, T. P., D. Carpenter, F. M. Leslie, T. F. Freund, I. Katona, S. L. Sensi, S. Kathuria and D. Piomelli (2002a). "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10819-10824.
- Dinh, T. P., T. F. Freund and D. Piomelli (2002b). "A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation." *Chem Phys Lipids* **121**(1-2): 149-158.
- Drager, U. C. (1975). "Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex." *J Comp Neurol* **160**(3): 269-290.
- Drager, U. C. (1985). "Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **224**(1234): 57-77.
- Dunn, T. A. and M. B. Feller (2008). "Imaging second messenger dynamics in developing neural circuits." *Dev Neurobiol* **68**(6): 835-844.
- Dunn, T. A., C. T. Wang, M. A. Colicos, M. Zacco, L. M. DiPilato, J. Zhang, R. Y. Tsien and M. B. Feller (2006). "Imaging of cAMP levels and protein kinase A activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades." *J Neurosci* **26**(49): 12807-12815.
- Elliott, J., C. Jolicoeur, V. Ramamurthy and M. Cayouette (2008). "Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells." *Neuron* **60**(1): 26-39.
- Emrich, H. M., M. M. Weber, A. Wendl, J. Zihl, L. von Meyer and W. Hanisch (1991). "Reduced binocular depth inversion as an indicator of cannabis-induced censorship impairment." *Pharmacol Biochem Behav* **40**(3): 689-690.
- Espinoza, S. G. (1983). "Single unit studies in the visual cortex of rodents." *Arch Biol Med Exp (Santiago)* **16**(3-4): 305-315.
- Espinoza, S. G. and H. C. Thomas (1983). "Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the hooded rat." *Brain Res* **272**(1): 137-144.
- Famiglietti, E. V., Jr. and H. Kolb (1976). "Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells." *Science* **194**(4261): 193-195.
- Fan, S. F. and S. Yazulla (2003). "Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2." *Vis Neurosci* **20**(2): 177-188.
- Fan, S. F. and S. Yazulla (2004). "Inhibitory interaction of cannabinoid CB1 receptor and dopamine D2 receptor agonists on voltage-gated currents of goldfish cones." *Vis Neurosci* **21**(1): 69-77.
- Fan, S. F. and S. Yazulla (2005). "Reciprocal inhibition of voltage-gated potassium currents (I_{K(V)}) by activation of cannabinoid CB1 and dopamine D1 receptors in ON bipolar cells of goldfish retina." *Vis Neurosci* **22**(1): 55-63.
- Fan, S. F. and S. Yazulla (2007). "Retrograde endocannabinoid inhibition of goldfish retinal cones is mediated by 2-arachidonoyl glycerol." *Vis Neurosci* **24**(3): 257-267.
- Farquhar-Smith, W. P., M. Egertova, E. J. Bradbury, S. B. McMahon, A. S. Rice and M. R. Elphick (2000). "Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord." *Mol Cell Neurosci* **15**(6): 510-521.
- Fei, Y. (2003). "Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice." *Mol Vis* **9**: 31-42.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, A. L. Ma and R. L. Mitchell (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." *Mol Pharmacol* **48**(3): 443-450.

- Feller, M. B. (2009). "Retinal waves are likely to instruct the formation of eye-specific retinogeniculate projections." *Neural Dev* **4**: 24.
- Feller, M. B., D. P. Wellis, D. Stellwagen, F. S. Werblin and C. J. Shatz (1996). "Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves." *Science* **272**(5265): 1182-1187.
- Fernandez-Ruiz, J., F. Berrendero, M. L. Hernandez and J. A. Ramos (2000). "The endogenous cannabinoid system and brain development." *Trends Neurosci* **23**(1): 14-20.
- Firth, S. I., C. T. Wang and M. B. Feller (2005). "Retinal waves: mechanisms and function in visual system development." *Cell Calcium* **37**(5): 425-432.
- Fisher, L. J. (1979). "Development of synaptic arrays in the inner plexiform layer of neonatal mouse retina." *J Comp Neurol* **187**(2): 359-372.
- Fletcher, E. L. and M. Kalloniatis (1997). "Localisation of amino acid neurotransmitters during postnatal development of the rat retina." *J Comp Neurol* **380**(4): 449-471.
- Fu, Y. and K. W. Yau (2007). "Phototransduction in mouse rods and cones." *Pflugers Arch* **454**(5): 805-819.
- Fujitani, Y., S. Fujitani, H. Luo, F. Qiu, J. Burlison, Q. Long, Y. Kawaguchi, H. Edlund, R. J. MacDonald, T. Furukawa, T. Fujikado, M. A. Magnuson, M. Xiang and C. V. Wright (2006). "Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development." *Development* **133**(22): 4439-4450.
- Fukumitsu, H., M. Ohtsuka, R. Murai, H. Nakamura, K. Itoh and S. Furukawa (2006). "Brain-derived neurotrophic factor participates in determination of neuronal laminar fate in the developing mouse cerebral cortex." *J Neurosci* **26**(51): 13218-13230.
- Galve-Roperh, I., T. Aguado, D. Rueda, G. Velasco and M. Guzman (2006). "Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development." *Curr Pharm Des* **12**(18): 2319-2325.
- Gao, Y., D. V. Vasilyev, M. B. Goncalves, F. V. Howell, C. Hobbs, M. Reisenberg, R. Shen, M. Y. Zhang, B. W. Strassle, P. Lu, L. Mark, M. J. Piesla, K. Deng, E. V. Kouranova, R. H. Ring, G. T. Whiteside, B. Bates, F. S. Walsh, G. Williams, M. N. Pangalos, T. A. Samad and P. Doherty (2010). "Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice." *J Neurosci* **30**(6): 2017-2024.
- Gaoni, Y. and R. Mechoulam. (1964). "Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish." *Journal of American Chemical Society* Retrieved 8, 86, from <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01062a046>.
- Ghosh, K. K., S. Bujan, S. Haverkamp, A. Feigenspan and H. Wässle (2004). "Types of bipolar cells in the mouse retina." *J Comp Neurol* **469**(1): 70-82.
- Gias, C., N. Hewson-Stoate, M. Jones, D. Johnston, J. E. Mayhew and P. J. Coffey (2005). "Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging." *Neuroimage* **24**(1): 200-206.
- Gingrich, J. A. and M. G. Caron (1993). "Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors." *Annu Rev Neurosci* **16**: 299-321.
- Girman, S. V., Y. Sauve and R. D. Lund (1999). "Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex." *J Neurophysiol* **82**(1): 301-311.
- Glaser, S. T., N. A. Abumrad, F. Fatade, M. Kaczocha, K. M. Studholme and D. G. Deutsch (2003). "Evidence against the presence of an anandamide transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 4269-4274.

- Glass, M., M. Dragunow and R. L. Faull (1997). "Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain." *Neuroscience* **77**(2): 299-318.
- Godinho, L., J. S. Mumm, P. R. Williams, E. H. Schroeter, A. Koerber, S. W. Park, S. D. Leach and R. O. Wong (2005). "Targeting of amacrine cell neurites to appropriate synaptic laminae in the developing zebrafish retina." *Development* **132**(22): 5069-5079.
- Godley, B. F. and R. J. Wurtman (1988). "Release of endogenous dopamine from the superfused rabbit retina in vitro: effect of light stimulation." *Brain Res* **452**(1-2): 393-395.
- Goldenthal, K. L., K. Hedman, J. W. Chen, J. T. August and M. C. Willingham (1985). "Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins." *J Histochem Cytochem* **33**(8): 813-820.
- Gomez, M., M. Hernandez and J. Fernandez-Ruiz (2007). "The activation of cannabinoid receptors during early postnatal development reduces the expression of cell adhesion molecule L1 in the rat brain." *Brain Res* **1145**: 48-55.
- Gomez, M., M. Hernandez and J. Fernandez-Ruiz (2008a). "Cannabinoid signaling system: does it play a function in cell proliferation and migration, neuritic elongation and guidance and synaptogenesis during brain ontogenesis?" *Cell Adh Migr* **2**(4): 246-248.
- Gomez, M., M. Hernandez, B. Johansson, R. de Miguel, J. A. Ramos and J. Fernandez-Ruiz (2003). "Prenatal cannabinoid and gene expression for neural adhesion molecule L1 in the fetal rat brain." *Brain Res Dev Brain Res* **147**(1-2): 201-207.
- Gomez, M., M. L. Hernandez, M. R. Pazos, R. M. Tolon, J. Romero and J. Fernandez-Ruiz (2008b). "Colocalization of CB1 receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development: evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance." *Neuroscience* **153**(3): 687-699.
- Gomez, O., A. Arevalo-Martin, D. Garcia-Ovejero, S. Ortega-Gutierrez, J. A. Cisneros, G. Almazan, M. A. Sanchez-Rodriguez, F. Molina-Holgado and E. Molina-Holgado (2010). "The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation." *Glia*.
- Gong, J. P., E. S. Onaivi, H. Ishiguro, Q. R. Liu, P. A. Tagliaferro, A. Brusco and G. R. Uhl (2006). "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain." *Brain Res* **1071**(1): 10-23.
- Goparaju, S. K., N. Ueda, H. Yamaguchi and S. Yamamoto (1998). "Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand." *FEBS Lett* **422**(1): 69-73.
- Grimaldi, P., P. Orlando, S. Di Siena, F. Lolicato, S. Petrosino, T. Bisogno, R. Geremia, L. De Petrocellis and V. Di Marzo (2009). "The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(27): 11131-11136.
- Grimsey, N. L., C. E. Goodfellow, E. L. Scotter, M. J. Dowie, M. Glass and E. S. Graham (2008). "Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal!" *J Neurosci Methods* **171**(1): 78-86.
- Gulyas, A. I., B. F. Cravatt, M. H. Bracey, T. P. Dinh, D. Piomelli, F. Boscia and T. F. Freund (2004). "Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala." *Eur J Neurosci* **20**(2): 441-458.

- Hack, I., P. Koulen, L. Peichl and J. H. Brandstatter (2002). "Development of glutamatergic synapses in the rat retina: the postnatal expression of ionotropic glutamate receptor subunits." Vis Neurosci **19**(1): 1-13.
- Hampson, A. J., L. M. Bornheim, M. Scanziani, C. S. Yost, A. T. Gray, B. M. Hansen, D. J. Leonoudakis and P. E. Bickler (1998). "Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission." J Neurochem **70**(2): 671-676.
- Hanus, L. O. (2009). "Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids." Med Res Rev **29**(2): 213-271.
- Harkany, T., M. Guzman, I. Galve-Roperh, P. Berghuis, L. A. Devi and K. Mackie (2007). "The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development." Trends Pharmacol Sci **28**(2): 83-92.
- Harkany, T., E. Keimpema, K. Barabas and J. Mulder (2008a). "Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development." Mol Cell Endocrinol **286**(1-2 Suppl 1): S84-90.
- Harkany, T., K. Mackie and P. Doherty (2008b). "Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage." Curr Opin Neurobiol **18**(3): 338-345.
- Hashimoto-dani, Y., T. Ohno-Shosaku and M. Kano (2007). "Ca(2+)-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities." Curr Opin Neurobiol **17**(3): 360-365.
- Haverkamp, S., K. K. Ghosh, A. A. Hirano and H. Wässle (2003). "Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina." J Comp Neurol **455**(4): 463-476.
- He, S., R. Weiler and D. I. Vaney (2000). "Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina." J Comp Neurol **418**(1): 33-40.
- Heiduschka, P. and U. Schraermeyer (2008). "Comparison of visual function in pigmented and albino rats by electroretinography and visual evoked potentials." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **246**(11): 1559-1573.
- Herkenham, M. (1991). "Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections." NIDA Res Monogr **112**: 129-145.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, B. R. de Costa and E. K. Richfield (1991). "Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat." Brain Res **547**(2): 267-274.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, M. D. Little, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. de Costa and K. C. Rice (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1932-1936.
- Hoddah, H., A. Marcantoni, V. Comunanza, V. Carabelli and E. Carbone (2009). "L-type channel inhibition by CB1 cannabinoid receptors is mediated by PTX-sensitive G proteins and cAMP/PKA in GT1-7 hypothalamic neurons." Cell Calcium **46**(5-6): 303-312.
- Hohmann, A. G. and M. Herkenham (2000). "Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study." Synapse **37**(1): 71-80.
- Hollander, H., F. Makarov, Z. Dreher, D. van Driel, T. L. Chan-Ling and J. Stone (1991). "Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells." J Comp Neurol **313**(4): 587-603.
- Horti, A. G. and K. Van Laere (2008). "Development of radioligands for in vivo imaging of type 1 cannabinoid receptors (CB1) in human brain." Curr Pharm Des **14**(31): 3363-3383.

- Howlett, A. C. (1985). "Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes." *Mol Pharmacol* **27**(4): 429-436.
- Howlett, A. C. (1987). "Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: relative activity of constituents and metabolites of marihuana." *Neuropharmacology* **26**(5): 507-512.
- Howlett, A. C. (2002). "The cannabinoid receptors." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 619-631.
- Howlett, A. C. (2005). "Cannabinoid receptor signaling." *Handb Exp Pharmacol*(168): 53-79.
- Howlett, A. C. and R. M. Fleming (1984). "Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes." *Mol Pharmacol* **26**(3): 532-538.
- Hu, S. S., A. Arnold, J. M. Hutchens, J. Radicke, B. F. Cravatt, J. Wager-Miller, K. Mackie and A. Straiker (2010). "Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina." *J Comp Neurol* **518**(18): 3848-3866.
- Hu, S. S., H. B. Bradshaw, J. S. Chen, B. Tan and J. M. Walker (2008). "Prostaglandin E2 glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NFkappaB activity." *Br J Pharmacol* **153**(7): 1538-1549.
- Huang, Y., H. Yasuda, A. Sarihi and T. Tsumoto (2008). "Roles of endocannabinoids in heterosynaptic long-term depression of excitatory synaptic transmission in visual cortex of young mice." *J Neurosci* **28**(28): 7074-7083.
- Huckfeldt, R. M., T. Schubert, J. L. Morgan, L. Godinho, G. Di Cristo, Z. J. Huang and R. O. Wong (2009). "Transient neurites of retinal horizontal cells exhibit columnar tiling via homotypic interactions." *Nat Neurosci* **12**(1): 35-43.
- Huxlin KR, Sefton AJ, Furby JH (1992). "The origin and development of retinal astrocytes in the mouse." *J Neurocytol* **21**:530-544.
- Jackson, D. M. and A. Westlind-Danielsson (1994). "Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects." *Pharmacol Ther* **64**(2): 291-370.
- Jacobs, G. H. (1993). "The distribution and nature of colour vision among the mammals." *Biol Rev Camb Philos Soc* **68**(3): 413-471.
- Jadhav, A. P., K. Roesch and C. L. Cepko (2009). "Development and neurogenic potential of Muller glial cells in the vertebrate retina." *Prog Retin Eye Res* **28**(4): 249-262.
- Jeon, C. J., E. Strettoi and R. H. Masland (1998). "The major cell populations of the mouse retina." *J Neurosci* **18**(21): 8936-8946.
- Jhaveri, S., R. S. Erzurumlu and G. E. Schneider (1996). "The optic tract in embryonic hamsters: fasciculation, defasciculation, and other rearrangements of retinal axons." *Vis Neurosci* **13**(2): 359-374.
- Jiang, B., S. Huang, R. de Pasquale, D. Millman, L. Song, H. K. Lee, T. Tsumoto and A. Kirkwood (2010a). "The maturation of GABAergic transmission in visual cortex requires endocannabinoid-mediated LTD of inhibitory inputs during a critical period." *Neuron* **66**(2): 248-259.
- Jiang, B., K. Sohya, A. Sarihi, Y. Yanagawa and T. Tsumoto (2010b). "Laminar-specific maturation of GABAergic transmission and susceptibility to visual deprivation are related to endocannabinoid sensitivity in mouse visual cortex." *J Neurosci* **30**(42): 14261-14272.
- Jiang, S., Y. Fu, J. Williams, J. Wood, L. Pandarinathan, S. Avraham, A. Makriyannis and H. K. Avraham (2007). "Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells." *PLoS One* **2**(7): e641.
- Jiang, W., Y. Zhang, L. Xiao, J. Van Cleemput, S. P. Ji, G. Bai and X. Zhang (2005). "Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and

- produce anxiolytic- and antidepressant-like effects." *J Clin Invest* **115**(11): 3104-3116.
- Kaczocha, M., A. Hermann, S. T. Glaser, I. N. Bojesen and D. G. Deutsch (2006). "Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase." *J Biol Chem* **281**(14): 9066-9075.
- Kano, M., T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimotodani, M. Uchigashima and M. Watanabe (2009). "Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission." *Physiol Rev* **89**(1): 309-380.
- Karlsson, M., J. A. Contreras, U. Hellman, H. Tornqvist and C. Holm (1997). "cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases." *J Biol Chem* **272**(43): 27218-27223.
- Kawamura, Y., M. Fukaya, T. Maejima, T. Yoshida, E. Miura, M. Watanabe, T. Ohno-Shosaku and M. Kano (2006). "The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum." *J Neurosci* **26**(11): 2991-3001.
- Keimpema, E., K. Barabas, Y. M. Morozov, G. Tortoriello, M. Torii, G. Cameron, Y. Yanagawa, M. Watanabe, K. Mackie and T. Harkany (2010). "Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding." *J Neurosci* **30**(42): 13992-14007.
- Kerschensteiner, D., J. L. Morgan, E. D. Parker, R. M. Lewis and R. O. Wong (2009). "Neurotransmission selectively regulates synapse formation in parallel circuits in vivo." *Nature* **460**(7258): 1016-1020.
- Kim, D. and S. A. Thayer (2001). "Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture." *J Neurosci* **21**(10): RC146.
- Kim, I. J., Y. Zhang, M. Meister and J. R. Sanes (2010). "Laminar restriction of retinal ganglion cell dendrites and axons: subtype-specific developmental patterns revealed with transgenic markers." *J Neurosci* **30**(4): 1452-1462.
- Kiplinger, G. F., J. E. Manno, B. E. Rodda and R. B. Forney (1971). "Dose-response analysis of the effects of tetrahydrocannabinol in man." *Clin Pharmacol Ther* **12**(4): 650-657.
- Klitten, L. L., M. F. Rath, S. L. Coon, J. S. Kim, D. C. Klein and M. Moller (2008). "Localization and regulation of dopamine receptor D4 expression in the adult and developing rat retina." *Exp Eye Res* **87**(5): 471-477.
- Köfalvi, A. and SpringerLink (Service en ligne) (2008). *Cannabinoids and the brain*. New York, Springer.
- Kofuji, P., B. Biedermann, V. Siddharthan, M. Raap, I. Iandiev, I. Milenkovic, A. Thomzig, R. W. Veh, A. Bringmann and A. Reichenbach (2002). "Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering." *Glia* **39**(3): 292-303.
- Kong, J. H., D. R. Fish, R. L. Rockhill and R. H. Masland (2005). "Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits." *J Comp Neurol* **489**(3): 293-310.
- Koyasu, T., M. Kondo, K. Miyata, S. Ueno, T. Miyata, Y. Nishizawa and H. Terasaki (2008). "Photopic electroretinograms of mGluR6-deficient mice." *Curr Eye Res* **33**(1): 91-99.
- La Vail, M. M. (1976). "Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light." *Invest Ophthalmol* **15**(1): 64-70.
- La Vail, M. M., D. H. Rapaport and P. Rakic (1991). "Cytogenesis in the monkey retina." *J Comp Neurol* **309**(1): 86-114.

- Lalonde, M. R., C. A. Jollimore, K. Stevens, S. Barnes and M. E. Kelly (2006). "Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells." Mol Vis **12**: 1160-1166.
- Leung, D., A. Saghatelian, G. M. Simon and B. F. Cravatt (2006). "Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids." Biochemistry **45**(15): 4720-4726.
- Leweke, F. M., U. Schneider, M. Thies, T. F. Munte and H. M. Emrich (1999). "Effects of synthetic delta9-tetrahydrocannabinol on binocular depth inversion of natural and artificial objects in man." Psychopharmacology (Berl) **142**(3): 230-235.
- Li, L., K. J. Bender, P. J. Drew, S. P. Jadhav, E. Sylwestrak and D. E. Feldman (2009). "Endocannabinoid signaling is required for development and critical period plasticity of the whisker map in somatosensory cortex." Neuron **64**(4): 537-549.
- Liu, C. H., A. J. Heynen, M. G. Shuler and M. F. Bear (2008a). "Cannabinoid receptor blockade reveals parallel plasticity mechanisms in different layers of mouse visual cortex." Neuron **58**(3): 340-345.
- Liu, J., L. Wang, J. Harvey-White, B. X. Huang, H. Y. Kim, S. Luquet, R. D. Palmiter, G. Krystal, R. Rai, A. Mahadevan, R. K. Razdan and G. Kunos (2008b). "Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide." Neuropharmacology **54**(1): 1-7.
- Liu, Q. R., C. H. Pan, A. Hishimoto, C. Y. Li, Z. X. Xi, A. Llorente-Berzal, M. P. Viveros, H. Ishiguro, T. Arinami, E. S. Onaivi and G. R. Uhl (2009). "Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands." Genes Brain Behav **8**(5): 519-530.
- Lohmann, C., K. L. Myhr and R. O. Wong (2002). "Transmitter-evoked local calcium release stabilizes developing dendrites." Nature **418**(6894): 177-181.
- Long, J. Z., D. K. Nomura and B. F. Cravatt (2009a). "Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism." Chem Biol **16**(7): 744-753.
- Long, J. Z., D. K. Nomura, R. E. Vann, D. M. Walentiny, L. Booker, X. Jin, J. J. Burston, L. J. Sim-Selley, A. H. Lichtman, J. L. Wiley and B. F. Cravatt (2009b). "Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20270-20275.
- Lopez, E. M., P. Tagliaferro, E. S. Onaivi and J. J. Lopez-Costa (2010). "Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina." Synapse.
- Lu, Q., A. Straiker and G. Maguire (2000). "Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina." Vis Neurosci **17**(1): 91-95.
- Lukasiewicz, P. D. (2005). "Synaptic mechanisms that shape visual signaling at the inner retina." Prog Brain Res **147**: 205-218.
- Lukats, A., A. Szabo, P. Rohlich, B. Vigh and A. Szel (2005). "Photopigment coexpression in mammals: comparative and developmental aspects." Histol Histopathol **20**(2): 551-574.
- Mackie, K. (2006). "Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength." Int J Obes (Lond) **30 Suppl 1**: S19-23.
- Mackie, K., W. A. Devane and B. Hille (1993). "Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells." Mol Pharmacol **44**(3): 498-503.
- 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): 3825-3829.

- Mackie, K., Y. Lai, R. Westenbroek and R. Mitchell (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): 6552-6561.
- Mackie, K. and N. Stella (2006). "Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players." *AAPS J* **8**(2): E298-306.
- MacNeil, M. A. and R. H. Masland (1998). "Extreme diversity among amacrine cells: implications for function." *Neuron* **20**(5): 971-982.
- Mailleux, P., M. Parmentier and J. J. Vanderhaeghen (1992). "Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides." *Neurosci Lett* **143**(1-2): 200-204.
- Maison, P., D. J. Walker, F. S. Walsh, G. Williams and P. Doherty (2009). "BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids." *Neurosci Lett* **467**(2): 90-94.
- Mangini, N. J. and A. L. Pearlman (1980). "Laminar distribution of receptive field properties in the primary visual cortex of the mouse." *J Comp Neurol* **193**(1): 203-222.
- Marrs, W. R., J. L. Blankman, E. A. Horne, A. Thomazeau, Y. H. Lin, J. Coy, A. L. Bodor, G. G. Muccioli, S. S. Hu, G. Woodruff, S. Fung, M. Lafourcade, J. P. Alexander, J. Z. Long, W. Li, C. Xu, T. Moller, K. Mackie, O. J. Manzoni, B. F. Cravatt and N. Stella (2010). "The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors." *Nat Neurosci* **13**(8): 951-957.
- Marsicano, G. and B. Lutz (1999). "Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain." *Eur J Neurosci* **11**(12): 4213-4225.
- Masland, R. H. (1988). "Amacrine cells." *Trends Neurosci* **11**(9): 405-410.
- Matias, I., J. W. Wang, A. S. Moriello, A. Nieves, D. F. Woodward and V. Di Marzo (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): 413-418.
- Matsuda, L. A., T. I. Bonner and S. J. Lolait (1993). "Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain." *J Comp Neurol* **327**(4): 535-550.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young and T. I. Bonner (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* **346**(6284): 561-564.
- Matsuda, S., N. Kanemitsu, A. Nakamura, Y. Mimura, N. Ueda, Y. Kurahashi and S. Yamamoto (1997). "Metabolism of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, in porcine ocular tissues." *Exp Eye Res* **64**(5): 707-711.
- Maudsley, S., B. Martin and L. M. Luttrell (2007). "G protein-coupled receptor signaling complexity in neuronal tissue: implications for novel therapeutics." *Curr Alzheimer Res* **4**(1): 3-19.
- Mayor, S. and F. R. Maxfield (1995). "Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment." *Mol Biol Cell* **6**(7): 929-944.
- McAllister, S. D., G. Griffin, L. S. Satin and M. E. Abood (1999). "Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system." *J Pharmacol Exp Ther* **291**(2): 618-626.
- McDonald, A. J. and F. Mascagni (2001). "Localization of the CB1 type cannabinoid receptor in the rat basolateral amygdala: high concentrations in a subpopulation of cholecystinin-containing interneurons." *Neuroscience* **107**(4): 641-652.
- McKinney, M. K. and B. F. Cravatt (2005). "Structure and function of fatty acid amide hydrolase." *Annu Rev Biochem* **74**: 411-432.

- McLaughlin, C. R. and M. E. Abood (1993). "Developmental expression of cannabinoid receptor mRNA." Brain Res Dev Brain Res **76**(1): 75-78.
- Melan, M. A. and G. Sluder (1992). "Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells. Implications for immunofluorescence microscopy." J Cell Sci **101 (Pt 4)**: 731-743.
- Miller, A. M. and N. Stella (2008). "CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way." Br J Pharmacol **153**(2): 299-308.
- Mitchell, C. K., B. Huang and D. A. Redburn-Johnson (1999). "GABA(A) receptor immunoreactivity is transiently expressed in the developing outer retina." Vis Neurosci **16**(6): 1083-1088.
- Molina-Holgado, F., A. Rubio-Araiz, D. Garcia-Ovejero, R. J. Williams, J. D. Moore, A. Arevalo-Martin, O. Gomez-Torres and E. Molina-Holgado (2007). "CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation." Eur J Neurosci **25**(3): 629-634.
- Monsma, F. J., Jr., L. C. Mahan, L. D. McVittie, C. R. Gerfen and D. R. Sibley (1990). "Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6723-6727.
- Morgan, J. L., A. Dhingra, N. Vardi and R. O. Wong (2006). "Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells." Nat Neurosci **9**(1): 85-92.
- Morgan, N. H., I. M. Stanford and G. L. Woodhall (2009). "Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses." Neuropharmacology **57**(4): 356-368.
- Morishita, J., Y. Okamoto, K. Tsuboi, M. Ueno, H. Sakamoto, N. Maekawa and N. Ueda (2005). "Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain." J Neurochem **94**(3): 753-762.
- Morrow, E. M., C. M. Chen and C. L. Cepko (2008). "Temporal order of bipolar cell genesis in the neural retina." Neural Develop **3**: 2.
- Mu, J., S. Y. Zhuang, M. T. Kirby, R. E. Hampson and S. A. Deadwyler (1999). "Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture." J Pharmacol Exp Ther **291**(2): 893-902.
- Mulder, J., T. Aguado, E. Keimpema, K. Barabas, C. J. Ballester Rosado, L. Nguyen, K. Monory, G. Marsicano, V. Di Marzo, Y. L. Hurd, F. Guillemot, K. Mackie, B. Lutz, M. Guzman, H. C. Lu, I. Galve-Roperh and T. Harkany (2008). "Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(25): 8760-8765.
- Mule, F., A. Amato, S. Baldassano and R. Serio (2007). "Involvement of CB1 and CB2 receptors in the modulation of cholinergic neurotransmission in mouse gastric preparations." Pharmacol Res **56**(3): 185-192.
- Munro, S., K. L. Thomas and M. Abu-Shaar (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." Nature **365**(6441): 61-65.
- Negoescu, A., F. Labat-Moleur, P. Lorimier, L. Lamarcq, C. Guillermet, E. Chambaz and E. Brambilla (1994). "F(ab) secondary antibodies: a general method for double immunolabeling with primary antisera from the same species. Efficiency control by chemiluminescence." J Histochem Cytochem **42**(3): 433-437.
- Newman, E. A. (2004). "Glial modulation of synaptic transmission in the retina." Glia **47**(3): 268-274.
- Nguyen-Legros, J., A. Simon, I. Caille and B. Bloch (1997). "Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals." Vis Neurosci **14**(3): 545-551.

- Nicol, X., S. Voyatzis, A. Muzerelle, N. Narboux-Neme, T. C. Sudhof, R. Miles and P. Gaspar (2007). "cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map." Nat Neurosci **10**(3): 340-347.
- Nir, I., J. M. Harrison, R. Haque, M. J. Low, D. K. Grandy, M. Rubinstein and P. M. Iuvone (2002). "Dysfunctional light-evoked regulation of cAMP in photoreceptors and abnormal retinal adaptation in mice lacking dopamine D4 receptors." J Neurosci **22**(6): 2063-2073.
- Nomura, A., R. Shigemoto, Y. Nakamura, N. Okamoto, N. Mizuno and S. Nakanishi (1994). "Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells." Cell **77**(3): 361-369.
- Nucci, C., V. Gasperi, R. Tartaglione, A. Cerulli, A. Terrinoni, M. Bari, C. De Simone, A. F. Agro, L. A. Morrone, M. T. Corasaniti, G. Bagetta and M. Maccarrone (2007). "Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(7): 2997-3004.
- Oguni, M., T. Setogawa, H. Shinohara and K. Kato (1998). "Calbindin-D 28 kD and parvalbumin in the horizontal cells of rat retina during development." Curr Eye Res **17**(6): 617-622.
- Okamoto, Y., J. Wang, J. Morishita and N. Ueda (2007). "Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide." Chem Biodivers **4**(8): 1842-1857.
- Olney, J. W. (1968). "An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina." Invest Ophthalmol **7**(3): 250-268.
- Onaivi, E. S., H. Ishiguro, J. P. Gong, S. Patel, A. Perchuk, P. A. Meozzi, L. Myers, Z. Mora, P. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B. E. Akinshola, Q. R. Liu, B. Hope, S. Iwasaki, T. Arinami, L. Teasenfitz and G. R. Uhl (2006). "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." Ann N Y Acad Sci **1074**: 514-536.
- Palazuelos, J., T. Aguado, A. Egia, R. Mechoulam, M. Guzman and I. Galve-Roperh (2006). "Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation." FASEB J **20**(13): 2405-2407.
- Pannicke, T., A. Bringmann and A. Reichenbach (2002). "Electrophysiological characterization of retinal Muller glial cells from mouse during postnatal development: comparison with rabbit cells." Glia **38**(3): 268-272.
- Patel, K. D., J. S. Davison, Q. J. Pittman and K. A. Sharkey (2010). "Cannabinoid CB(2) receptors in health and disease." Curr Med Chem **17**(14): 1393-1410.
- Peichl, L. and J. Gonzalez-Soriano (1994). "Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig." Vis Neurosci **11**(3): 501-517.
- Penn, A. A., P. A. Riquelme, M. B. Feller and C. J. Shatz (1998). "Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity." Science **279**(5359): 2108-2112.
- Perry, V. H. and M. Walker (1980). "Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat." Proc R Soc Lond B Biol Sci **208**(1173): 415-431.
- Pertwee, R. G. (2005). "Pharmacological actions of cannabinoids." Handb Exp Pharmacol(168): 1-51.
- Pertwee, R. G. (2009). "Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines." Br J Pharmacol **156**(3): 397-411.

- Poinot-Chazel, C., M. Portier, M. Bouaboula, N. Vita, F. Pecceu, D. Gully, J. G. Monroe, J. P. Maffrand, G. Le Fur and P. Casellas (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24." *Biochem J* **320** (Pt 1): 145-151.
- Rachel, R. A., G. Dolen, N. L. Hayes, A. Lu, L. Erskine, R. S. Nowakowski and C. A. Mason (2002). "Spatiotemporal features of early neurogenesis differ in wild-type and albino mouse retina." *J Neurosci* **22**(11): 4249-4263.
- Rapaport, D. H., J. T. Fletcher, M. M. LaVail and P. Rakic (1992). "Genesis of neurons in the retinal ganglion cell layer of the monkey." *J Comp Neurol* **322**(4): 577-588.
- Rapaport, D. H., P. Rakic and M. M. LaVail (1996). "Spatiotemporal gradients of cell genesis in the primate retina." *Perspect Dev Neurobiol* **3**(3): 147-159.
- Rapaport, D. H., L. L. Wong, E. D. Wood, D. Yasumura and M. M. LaVail (2004). "Timing and topography of cell genesis in the rat retina." *J Comp Neurol* **474**(2): 304-324.
- Raven, M. A., N. C. Orton, H. Nassar, G. A. Williams, W. K. Stell, G. H. Jacobs, N. T. Bech-Hansen and B. E. Reese (2008). "Early afferent signaling in the outer plexiform layer regulates development of horizontal cell morphology." *J Comp Neurol* **506**(5): 745-758.
- Reese, B. E., R. W. Guillery and C. Mallarino (1992). "Time of ganglion cell genesis in relation to the chiasmatic pathway choice of retinofugal axons." *J Comp Neurol* **324**(3): 336-342.
- Ren, L., H. Liang, L. Diao and S. He (2010). "Changing dendritic field size of mouse retinal ganglion cells in early postnatal development." *Dev Neurobiol* **70**(6): 397-407.
- Rhee, M. H., M. Bayewitch, T. Avidor-Reiss, R. Levy and Z. Vogel (1998). "Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes." *J Neurochem* **71**(4): 1525-1534.
- Rich, K. A., Y. Zhan and J. C. Blanks (1997). "Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina." *J Comp Neurol* **388**(1): 47-63.
- Robbe, D., G. Alonso, F. Duchamp, J. Bockaert and O. J. Manzoni (2001). "Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens." *J Neurosci* **21**(1): 109-116.
- Rodieck, R. W. (1998). *The first steps in seeing*. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Rodriguez de Fonseca, F., J. A. Ramos, A. Bonnin and J. J. Fernandez-Ruiz (1993). "Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages." *Neuroreport* **4**(2): 135-138.
- Romero, J., E. Garcia-Palomero, F. Berrendero, L. Garcia-Gil, M. L. Hernandez, J. A. Ramos and J. J. Fernandez-Ruiz (1997). "Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development." *Synapse* **26**(3): 317-323.
- Rueda, D., B. Navarro, A. Martinez-Serrano, M. Guzman and I. Galve-Roperh (2002). "The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway." *J Biol Chem* **277**(48): 46645-46650.
- Russo, E. B. (2007). "History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet." *Chem Biodivers* **4**(8): 1614-1648.
- Russo, E. B., A. Merzouki, J. M. Mesa, K. A. Frey and P. J. Bach (2004). "Cannabis improves night vision: a case study of dark adaptometry and scotopic sensitivity in kif smokers of the Rif mountains of northern Morocco." *J Ethnopharmacol* **93**(1): 99-104.
- Sanchez-Pastor, E., X. Trujillo, M. Huerta and F. Andrade (2007). "Effects of cannabinoids on synaptic transmission in the frog neuromuscular junction." *J Pharmacol Exp Ther* **321**(2): 439-445.

- Savy, C., F. Moussafi, J. Durand, J. Yelnik, A. Simon and J. Nguyen-Legros (1995). "Distribution and spatial geometry of dopamine interplexiform cells in the retina. II. External arborizations in the adult rat and monkey." J Comp Neurol **355**(3): 392-404.
- Schmid, R. S. and P. F. Maness (2008). "L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth." Curr Opin Neurobiol **18**(3): 245-250.
- Schnitzer, J. and A. C. Rusoff (1984). "Horizontal cells of the mouse retina contain glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity during early developmental stages." J Neurosci **4**(12): 2948-2955.
- Schubert, T., R. M. Huckfeldt, E. Parker, J. E. Campbell and R. O. Wong (2010). "Assembly of the outer retina in the absence of GABA synthesis in horizontal cells." Neural Dev **5**(1): 15.
- Schubert, T., D. Kerschensteiner, E. D. Eggers, T. Misgeld, M. Kerschensteiner, J. W. Lichtman, P. D. Lukasiewicz and R. O. Wong (2008). "Development of presynaptic inhibition onto retinal bipolar cell axon terminals is subclass-specific." J Neurophysiol **100**(1): 304-316.
- Schuett, S., T. Bonhoeffer and M. Hubener (2002). "Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging." J Neurosci **22**(15): 6549-6559.
- Semple, D. M., F. Ramsden and A. M. McIntosh (2003). "Reduced binocular depth inversion in regular cannabis users." Pharmacol Biochem Behav **75**(4): 789-793.
- Sernagor, E. (2006). Retinal development. Cambridge, Cambridge University Press.
- Shah, R. D. and M. C. Crair (2008). "Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retinal waves." J Neurosci **28**(1): 292-303.
- Shatz, C. J. and M. P. Stryker (1988). "Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents." Science **242**(4875): 87-89.
- Sherry, D. M., M. M. Wang, J. Bates and L. J. Frishman (2003). "Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits." J Comp Neurol **465**(4): 480-498.
- Simon, G. M. and B. F. Cravatt (2010). "Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo." Mol Biosyst **6**(8): 1411-1418.
- Sjostrom, P. J., G. G. Turrigiano and S. B. Nelson (2003). "Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors." Neuron **39**(4): 641-654.
- Skaper, S. D., A. Buriani, R. Dal Toso, L. Petrelli, S. Romanello, L. Facci and A. Leon (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): 3984-3989.
- Slaughter, M. M. and R. F. Miller (1985). "Characterization of an extended glutamate receptor of the on bipolar neuron in the vertebrate retina." J Neurosci **5**(1): 224-233.
- Slipetz, D. M., G. P. O'Neill, L. Favreau, C. Dufresne, M. Gallant, Y. Gareau, D. Guay, M. Labelle and K. M. Metters (1995). "Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase." Mol Pharmacol **48**(2): 352-361.
- Soltys, J., M. Yushak and Y. Mao-Draayer (2010). "Regulation of neural progenitor cell fate by anandamide." Biochem Biophys Res Commun **400**(1): 21-26.
- Song, Z. H. and M. Zhong (2000). "CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration." J Pharmacol Exp Ther **294**(1): 204-209.
- Sretavan, D. W., C. J. Shatz and M. P. Stryker (1988). "Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin." Nature **336**(6198): 468-471.

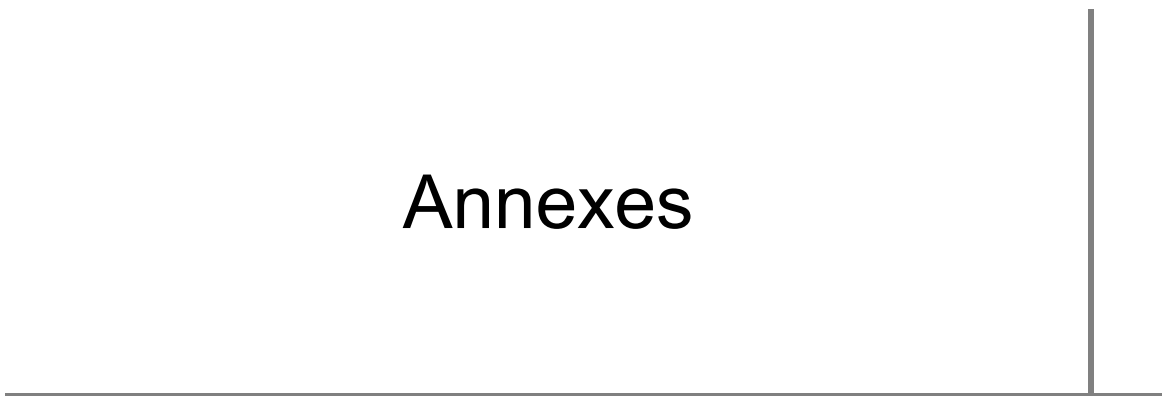
- Stamer, W. D., S. F. Golightly, Y. Hosohata, E. P. Ryan, A. C. Porter, E. Varga, R. J. Noecker, C. C. Felder and H. I. Yamamura (2001). "Cannabinoid CB(1) receptor expression, activation and detection of endogenous ligand in trabecular meshwork and ciliary process tissues." Eur J Pharmacol **431**(3): 277-286.
- Stella, N. (2010). "Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas." Glia **58**(9): 1017-1030.
- Stellwagen, D. and C. J. Shatz (2002). "An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity." Neuron **33**(3): 357-367.
- Stellwagen, D., C. J. Shatz and M. B. Feller (1999). "Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP." Neuron **24**(3): 673-685.
- Straiker, A., N. Stella, D. Piomelli, K. Mackie, H. J. Karten and G. Maguire (1999a). "Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14565-14570.
- Straiker, A. and J. M. Sullivan (2003). "Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander." J Neurophysiol **89**(5): 2647-2654.
- Straiker, A. J., G. Maguire, K. Mackie and J. Lindsey (1999b). "Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(10): 2442-2448.
- Strettoi, E., E. Novelli, F. Mazzoni, I. Barone and D. Damiani (2010). "Complexity of retinal cone bipolar cells." Prog Retin Eye Res **29**(4): 272-283.
- Struik, M. L., S. Yazulla and M. Kamermans (2006). "Cannabinoid agonist WIN 55212-2 speeds up the cone response to light offset in goldfish retina." Vis Neurosci **23**(2): 285-293.
- Sullivan, J. M. (1999). "Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons." J Neurophysiol **82**(3): 1286-1294.
- Sun, W., N. Li and S. He (2002). "Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells." J Comp Neurol **451**(2): 115-126.
- Sun, Y. X., K. Tsuboi, Y. Okamoto, T. Tonai, M. Murakami, I. Kudo and N. Ueda (2004). "Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D." Biochem J **380**(Pt 3): 749-756.
- Sunahara, R. K., C. W. Dessauer and A. G. Gilman (1996). "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 461-480.
- Suzuki, H. and L. H. Pinto (1986). "Response properties of horizontal cells in the isolated retina of wild-type and pearl mutant mice." J Neurosci **6**(4): 1122-1128.
- Svizenska, I., P. Dubovy and A. Sulcova (2008). "Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review." Pharmacol Biochem Behav **90**(4): 501-511.
- Syed, M. M., S. Lee, J. Zheng and Z. J. Zhou (2004). "Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina." J Physiol **560**(Pt 2): 533-549.
- Szel, A. and P. Rohlich (1992). "Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies." Exp Eye Res **55**(1): 47-52.
- Szel, A., P. Rohlich, A. R. Caffè, B. Juliusson, G. Aguirre and T. Van Veen (1992). "Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina." J Comp Neurol **325**(3): 327-342.

- Szel, A., T. van Veen and P. Rohlich (1994). "Retinal cone differentiation." Nature **370**(6488): 336.
- Tavares Gomes, A. L., F. B. Maia, P. Oliveira-Silva, A. L. Marques Ventura, R. Paes-De-Carvalho, C. A. Serfaty and P. Campello-Costa (2009). "Purinergetic modulation in the development of the rat uncrossed retinotectal pathway." Neuroscience **163**(4): 1061-1068.
- tom Dieck, S. and J. H. Brandstatter (2006). "Ribbon synapses of the retina." Cell Tissue Res **326**(2): 339-346.
- Torborg, C. L. and M. B. Feller (2005). "Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections." Prog Neurobiol **76**(4): 213-235.
- Touw, M. (1981). "The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet." J Psychoactive Drugs **13**(1): 23-34.
- Trazzi, S., M. Steger, V. M. Mitrugno, R. Bartesaghi and E. Ciani (2010). "CB1 cannabinoid receptors increase neuronal precursor proliferation through AKT/glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling." J Biol Chem **285**(13): 10098-10109.
- Tremblay, F., R. Abdel-Majid and P. E. Neumann (2002). "Electroretinographic oscillatory potentials are reduced in adenylyl cyclase type I deficient mice." Vision Res **42**(14): 1715-1725.
- Tsou, K., S. Brown, M. C. Sanudo-Pena, K. Mackie and J. M. Walker (1998a). "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system." Neuroscience **83**(2): 393-411.
- Tsou, K., K. Mackie, M. C. Sanudo-Pena and J. M. Walker (1999). "Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation." Neuroscience **93**(3): 969-975.
- Tsou, K., M. I. Nogueron, S. Muthian, M. C. Sanudo-Pena, C. J. Hillard, D. G. Deutsch and J. M. Walker (1998b). "Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry." Neurosci Lett **254**(3): 137-140.
- Ueda, N., S. K. Goparaju, K. Katayama, Y. Kurahashi, H. Suzuki and S. Yamamoto (1998). "A hydrolase enzyme inactivating endogenous ligands for cannabinoid receptors." J Med Invest **45**(1-4): 27-36.
- Ueda, N., Y. Kurahashi, S. Yamamoto and T. Tokunaga (1995). "Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide." J Biol Chem **270**(40): 23823-23827.
- Van Sickle, M. D., M. Duncan, P. J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J. S. Davison, L. J. Marnett, V. Di Marzo, Q. J. Pittman, K. D. Patel and K. A. Sharkey (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." Science **310**(5746): 329-332.
- Veldhuis, W. B., M. van der Stelt, M. W. Wadman, G. van Zadelhoff, M. Maccarrone, F. Fezza, G. A. Veldink, J. F. Vliegthart, P. R. Bar, K. Nicolay and V. Di Marzo (2003). "Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases." J Neurosci **23**(10): 4127-4133.
- Veruki, M. L. and H. Wassle (1996). "Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in rat retina." Eur J Neurosci **8**(11): 2286-2297.
- Vitalis, T., J. Laine, A. Simon, A. Roland, C. Leterrier and Z. Lenkei (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): 1705-1718.

- Voinescu, P. E., J. N. Kay and J. R. Sanes (2009). "Birthdays of retinal amacrine cell subtypes are systematically related to their molecular identity and soma position." J Comp Neurol **517**(5): 737-750.
- Volgyi, B., S. Chheda and S. A. Bloomfield (2009). "Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina." J Comp Neurol **512**(5): 664-687.
- Wagor, E., N. J. Mangini and A. L. Pearlman (1980). "Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the mouse." J Comp Neurol **193**(1): 187-202.
- Walsh, C., E. H. Polley, T. L. Hickey and R. W. Guillery (1983). "Generation of cat retinal ganglion cells in relation to central pathways." Nature **302**(5909): 611-614.
- Wang, C. T., A. G. Blankenship, A. Anishchenko, J. Elstrott, M. Fikhman, S. Nakanishi and M. B. Feller (2007). "GABA(A) receptor-mediated signaling alters the structure of spontaneous activity in the developing retina." J Neurosci **27**(34): 9130-9140.
- Wang, J. and N. Ueda (2009). "Biology of endocannabinoid synthesis system." Prostaglandins Other Lipid Mediat **89**(3-4): 112-119.
- Warrier, A. and M. Wilson (2007). "Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells." Vis Neurosci **24**(1): 25-35.
- Wassle, H. (2004). "Parallel processing in the mammalian retina." Nat Rev Neurosci **5**(10): 747-757.
- Wassle, H. and B. B. Boycott (1991). "Functional architecture of the mammalian retina." Physiol Rev **71**(2): 447-480.
- Wassle, H., C. Puller, F. Muller and S. Haverkamp (2009). "Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina." J Neurosci **29**(1): 106-117.
- Watanabe, T. and M. C. Raff (1988). "Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve." Nature **332**(6167): 834-837.
- Watson, S., D. Chambers, C. Hobbs, P. Doherty and A. Graham (2008). "The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation." Mol Cell Neurosci **38**(1): 89-97.
- Wei, B. Q., T. S. Mikkelsen, M. K. McKinney, E. S. Lander and B. F. Cravatt (2006). "A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals." J Biol Chem **281**(48): 36569-36578.
- Werblin, F. S. and J. E. Dowling (1969). "Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording." J Neurophysiol **32**(3): 339-355.
- Westlake, T. M., A. C. Howlett, T. I. Bonner, L. A. Matsuda and M. Herkenham (1994). "Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains." Neuroscience **63**(3): 637-652.
- Williams, E. J., F. S. Walsh and P. Doherty (2003). "The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response." J Cell Biol **160**(4): 481-486.
- Witkovsky, P. (2004). "Dopamine and retinal function." Doc Ophthalmol **108**(1): 17-40.
- Witkovsky, P., R. Gabriel, J. W. Haycock and E. Meller (2000). "Influence of light and neural circuitry on tyrosine hydroxylase phosphorylation in the rat retina." J Chem Neuroanat **19**(2): 105-116.
- Wong, R. O. and A. Ghosh (2002). "Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning." Nat Rev Neurosci **3**(10): 803-812.
- Wong, W. T., K. L. Myhr, E. D. Miller and R. O. Wong (2000). "Developmental changes in the neurotransmitter regulation of correlated spontaneous retinal activity." J Neurosci **20**(1): 351-360.

- Wong, W. T., J. R. Sanes and R. O. Wong (1998). "Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina." *J Neurosci* **18**(21): 8839-8852.
- Woo, H. H., L. S. Jen and K. F. So (1985). "The postnatal development of retinocollicular projections in normal hamsters and in hamsters following neonatal monocular enucleation: a horseradish peroxidase tracing study." *Brain Res* **352**(1): 1-13.
- Wu, C. S., J. Zhu, J. Wager-Miller, S. Wang, D. O'Leary, K. Monory, B. Lutz, K. Mackie and H. C. Lu (2010). "Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections." *Eur J Neurosci*.
- Xin, D. and S. A. Bloomfield (1999). "Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina." *J Comp Neurol* **405**(1): 75-87.
- Xu, H. P. and N. Tian (2007). "Retinal ganglion cell dendrites undergo a visual activity-dependent redistribution after eye opening." *J Comp Neurol* **503**(2): 244-259.
- Yasuda, H., Y. Huang and T. Tsumoto (2008). "Regulation of excitability and plasticity by endocannabinoids and PKA in developing hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 3106-3111.
- Yates, M. L. and E. L. Barker (2009). "Organized trafficking of anandamide and related lipids." *Vitam Horm* **81**: 25-53.
- Yazulla, S. (2008). "Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection." *Prog Retin Eye Res* **27**(5): 501-526.
- Yazulla, S., K. M. Studholme, H. H. McIntosh and D. G. Deutsch. (1999, Dec 6). "Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina." *J Comp Neurol*
- Yazulla, S., K. M. Studholme, H. H. McIntosh and S. F. Fan (2000). "Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings." *Vis Neurosci* **17**(3): 391-401.
- Young, R. W. (1985a). "Cell differentiation in the retina of the mouse." *Anat Rec* **212**(2): 199-205.
- Young, R. W. (1985b). "Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse." *Brain Res* **353**(2): 229-239.
- Zheng, J., S. Lee and Z. J. Zhou (2006). "A transient network of intrinsically bursting starburst cells underlies the generation of retinal waves." *Nat Neurosci* **9**(3): 363-371.
- Zheng, J. J., S. Lee and Z. J. Zhou (2004). "A developmental switch in the excitability and function of the starburst network in the mammalian retina." *Neuron* **44**(5): 851-864.
- Zhou, Z. J. and D. Zhao (2000). "Coordinated transitions in neurotransmitter systems for the initiation and propagation of spontaneous retinal waves." *J Neurosci* **20**(17): 6570-6577.
- Zuardi, A. W. (2006). "History of cannabis as a medicine: a review." *Rev Bras Psiquiatr* **28**(2): 153-157.

Annexes



Article 4



Journal Section: Development/Plasticity/Repair

Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and Deleted in Colorectal Cancer (DCC) in axon guidance

Abbreviated title: CB1R and RGC axon guidance

Anteneh Argaw^{1,2}, Gabriel Duff^{2,3}, Nawal Zabouri², Bruno Cécyre², Natacha Chainé², Hosni Cherif², Nicolas Tea², Beat Lutz⁴, Maurice Ptito² and Jean-François Bouchard^{2,3}

¹Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

²School of Optometry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1

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

⁴Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center Mainz, Duesbergweg 6, 55128 Mainz, Germany

Number of figures: 5

Supplemental material: 4 supplemental figures

Number of pages: 39

Number of words for Abstract: 225

Number of words for Introduction: 497

Number of words for Discussion: 1046

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

Acknowledgments

This work is supported by a grant to J.F.B. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). A.A. was supported by a doctoral research award from E.A. Baker Foundation and The Institute of Neuroscience, Mental Health and Addiction (INMHA) of the CIHR. G.D. was supported by a studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). M.P. holds the Harland Sanders Chair for Visual Science. J.F.B. holds a Chercheur Junior 2 Award from the FRSQ. We thank Robert Weinberg for the *dcc* transgenic mice. We thank Matthieu Vanni for the image analysis script programmed with MatLab software and Florence Dotigny, Marc Dufresne, Sophie Charron and Denis Latendresse for their excellent technical assistance.

Abstract

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

Introduction

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

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

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

Materials and Methods

All animal experiments were approved by the *Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux* from the University of Montreal and were handled in accordance with the recommendations provided by the Canadian Council on Animal Care. CB1R were generated and genotyped as previously described (Marsicano et al., 2002). *dcc* transgenic mice were obtained from Robert Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) and were genotyped as described (Fazeli et al., 1997). All surgical

procedures were carried out under deep general anesthesia using either hypothermia (pups < P4) or isoflurane.

Reagents

Bovine serum albumin (BSA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), dibutyl cAMP (db-cAMP), DNase, forskolin (FSK), Hoechst 33258, insulin, KT5720, laminin, monoclonal anti- β -actin, monoclonal anti-MAP Kinase (Diphosphorylated Erk-1&2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, pyruvate, selenium, apo-Transferrin, triiodothyronine, trypsin, anti-syntaxin, and anti-CB1R were purchased from Sigma (Oakville, ON). ACEA, AM251 and O2050 were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MI). B27, N2, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), foetal bovine serum (FBS), glutamine, Neurobasal media, penicillin-streptomycin, S-MEM and sodium pyruvate were purchased from Invitrogen (Burlington, ON). Papain solution was from Worthington Biochemicals (Lakewood, NJ), normal donkey serum (NDS) from Jackson Immuno (West Grove, PA), and ovomucoid from Roche Diagnostics (Laval, QC). Rabbit-anti-mouse-macrophage and mouse-anti-Thy-1.2 monoclonal IgM (μ chain specific) were obtained from Accurate Chemical (Wesbury, NY). Anti-cAMP, anti-ERK and anti-GAP-43 were from Chemicon International (Temecula, CA). Antibodies directed against CB1R, MGL and FAAH were purchased from Cayman (Ann Arbor, MI). Anti-NAPE-PLD and DAGL α were kind gifts from Ken Mackie (Department of Psychological & Brain Sciences, Indiana University, Bloomington, IN). Monoclonal DCC antibodies against extracellular (DCC_{EX}, G92-13) or intracellular (DCC_{IN}, G97-449) epitopes of DCC were obtained from PharMingen (Mississauga, ON, Canada). α DCCfb AF5, H89, LNAC were purchased from EMD (La Jolla, CA). Goat and -HRP coupled secondary antibodies raised against rabbit IgG (H+L) or mouse IgM (μ chain specific) were from Jackson Immuno (West Grove, PA) and L1 and Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Alexa 488 and Alexa 546) were from Invitrogen. Avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit and donkey

anti-goat biotinylated secondary antibody were from Vector Labs (Burlingame, CA). The B fragment of the cholera toxin (CTb) and goat-anti-CTb antibody were from List Biological Laboratories (Campbell, CA).

Retinal explant culture

Mouse E14-15 embryos retinas were isolated and dissected in small segments in DPBS and plated on 12 mm glass coverslips previously coated with poly-D-Lysine (20 µg/ml) and laminin (5 µg/ml) in 24 well plates. Explants were cultured in Neurobasal supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 5 µg/ml LNAC, 1% B27, 40 ng/ml selenium, 16 µg/ml putrescine, 0.04 ng/ml triiodo-thyronine, 100 µg/ml transferrin, 60 ng/ml progesterone, 100 µg/ml BSA, sodium pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), ciliary neurotrophic factor (CNTF; 10 ng/ml), insulin (5 µg/ml), and FSK (10 µM) at 37°C and 5% CO₂. Explants were treated for 15 hours at DIV0 for projections analysis or 1 hour at DIV1 for growth cone analysis. Photomicrographs were taken using an Olympus BX51FI microscope (Olympus Canada, Markham, ON) and analyzed with Image Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD). The total length of axon bundles was quantified and expressed as mean ±sem. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

Purified retinal ganglion cell culture

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

suspension was centrifuged and washed in a high concentration ovomucoid-BSA solution (10 mg/ml for each in DPBS). The dissociated cells were resuspended in DPBS containing BSA (0.2 mg/ml) and insulin (5 µg/ml).

RGCs were purified using the two-step panning procedure (Barres et al., 1988; Meyer-Franke et al., 1995). Briefly, to remove macrophages, the retinal suspension was incubated at room temperature in petri dishes coated with affinity-purified goat anti-rabbit IgG (H+L). The nonadherent cells were then transferred to a petri dish that had been coated with affinity purified goat anti-mouse IgM (µ chain specific) followed by anti-Thy-1.2 monoclonal IgM. The adherent RGCs were first released enzymatically by incubating them in a 0.125% trypsin solution at 37°C and 5% CO₂ followed by manually pipetting an enzyme inhibitor solution (30% FBS in Neurobasal) along the surface of the dish.

Purified RGCs were plated on poly-D-lysine (10 µg/ml) and laminin (5 µg/ml) coated glass coverslips (number 0 Deckgläser; Carolina Biological, Burlington, NC) in 24-well plates. RGCs were cultured in 600 µl of serum-free medium modified from Bottenstein and Sato (1979). Neurobasal media was supplemented with B27, selenium, putrescine, triiodo-thyronine, transferrin, progesterone, pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), ciliary neurotrophic factor (CNTF; 10 ng/ml), brain-derived neurotrophic factor (BDNF; 50 ng/ml), insulin (5 µg/ml), and FSK (10 µM). RGCs were cultured at 37°C and 5% CO₂. All experiments on purified RGCs were performed 36-40 hours following plating.

Primary neuron culture

Primary cortical neurons are used in the present study because of the large amount of cells that can easily be cultured and harvested for biochemical assays, as opposed to RGC cultures. Staged pregnant CD1 mouse were obtained from Charles Rivers (St-Constant, Qc). E14-15 embryos brain were dissected and the superior layer of each cortex was isolated and transferred in 2 ml S-MEM at 37°C with 2.5% trypsin and 2 mg/ml DNase for 15 minutes. Pellet was transferred into 10 ml S-MEM with 10% FBS and stored at 4°C.

Following centrifugation, pellet was again transferred in 2 ml S-MEM with 10% FBS and triturated 3 to 4 times. Supernatant was transferred in 10 ml Neurobasal medium. Dissociated cells were counted and plated at 50,000 cells per well on 12mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (20 µg/ml). Cells were cultured for 2 days in Neurobasal medium containing 1% B-27, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25% N2 and 0.5 mM glutamine. Wells were treated with either a CB1R agonist (50 nM ACEA) or a CB1R inverse agonist (300 nM AM251) combined with adenylate cyclase activator (10 µM FSK) or PKA inhibitors (200 nM KT5720 and 2 µM H89), respectively, for 60 min for GC morphology or 15 min for cAMP and PKA immunoreactivities. In another set of experiments, neurons were treated for 15 min. with DCC function blocking antibody (α DCCfb; 3.5 µg/ml), followed by 1 hour stimulation with AM251, O2050 or FSK.

Growth cone turning assay

Embryonic retinal explants were cultured on a coverglass in a borosilicate chamber (Lab-Tek; Rochester, NY) for 2 DIV and placed in an incubator mounted on an inverted microscope (Olympus IX71). They were kept at 37°C and 5% CO₂ with a Live Cell chamber (Neve Bioscience) throughout the whole experiment. A gradient was created using a micro-injector (Picoplus, Harvard Apparatus). The diameter of the tips of the glass microelectrodes used to eject the pharmacological agents were < 3 µm and the tip was positioned at \approx 45° and \approx 100 µm away from the GC of interest.

Immunocytochemistry

Following treatments, retinal explants, RGC and primary cortical neuron cultures were washed with PBS (pH 7.4), fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) and blocked with 2% normal goat serum (NGS) and 2% BSA in PBS containing 0.1% Tween 20 (pH 7.4) for 30 min. at room temperature. Neurons were then incubated overnight at 4°C in blocking solution containing anti-GAP-43 (1:1000) for GC morphology analysis, anti-cAMP (1:1000), anti-

CB1R (1:1000), anti-NAPE-PLD (1:200), anti-DAGL α (1:200) anti-FAAH (1:100), anti-MGL (1:500), anti-DCC_{IN} (1:500), anti-NFL (1:500), anti- β -actin (1:1000). The following day, cells were washed and labelled with Alexa secondary antibodies (488 and 546) and Hoechst 33258, and the coverslips were mounted with Immu-Mount (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

Surface biotinylation

Cortical neurons from E14-15 embryo cortices were dissociated, plated and cultured for 2 DIV at a density of \sim 2,000,000 cells per 100 mm PDL-coated tissue culture dish. Then, cells were treated with 300 nM AM251, 300 nM O2050, 10 μ M FSK, 200 nM KT5720 + AM251, 2 μ M H89 + AM251, KT5720 + FSK or H89 + FSK for 1 hour. Neurons were then washed with ice-cold PBS containing 0.1 mM calcium chloride and 1 mM magnesium chloride, pH 7.4, to halt protein trafficking. Surface biotinylation was performed by adding EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Scientific, Rockford, IL), 5 ml per plate at 0.5 mg/ml in PBS at 4°C for 30 min (Bouchard et al., 2004), removed, and the reaction was quenched by the addition of 5 ml of 10 mM ice-cold glycine in PBS at 4°C for two periods of 10 min. Subsequently, cell cultures were washed twice with 5 ml of ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer. Biotinylated proteins were precipitated with streptavidin–agarose (Thermo Scientific) and analyzed by Western blot.

Western blot analysis

Dissociated primary cortical neurons were cultured for 2 DIV at a density of \approx 250 000 cells/dish in 35 mm poly-D-lysine coated petri dishes. After treatment, cells were washed once with pH 7.4 ice-cold PBS and then lysed with Laemmli sample buffer. Primary antibodies were used at following concentrations: anti-CB1R (1:1000), anti-DCC_{IN} (1:2000), anti-DCC_{EX} (1:2000), anti-GAP43 (1:4000), anti- β -actin (1:5000), anti-AKT (1:1000), anti-p-AKT (1:1000), anti-ERK1/2 (1:5000), anti-p-ERK1/2 (1:2000), anti-S6

(1:2000) and anti-p-S6 (1:2000). Results were visualized using chemiluminescence (Perkin Elmer, Montreal, QC).

Intraocular injections

Syrian golden hamsters (Charles River, St-Constant, QC) were used for studies investigating, *in vivo*, the implication of the CB1R during retinal ganglion cell projection growth during postnatal development. These mammals are born with a premature nervous system (Clancy et al., 2001). Twenty four hours following birth, at postnatal day 1 (P1), anesthetized hamsters received a unilateral injection of 2 μ l solution of CTb, a highly sensitive anterograde tracer, with either 0.9% saline solution, 300 μ M of the CB1R agonist ACEA or 300 μ M of AM251, a CB1R inverse agonist (**Supplementary Figure 4A**). Briefly, under an operating microscope, a small incision was made in the eyelids to access to the right eye. The injections were administered using a glass micropipette attached to a 10 μ l Hamilton syringe. The micropipette was carefully inserted into the vitreous at an angle to avoid damage to the lens. Following the injection, the eyelids were closed with surgical glue (Vetbond; 3M, St-Paul, MN).

Perfusion

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

Immunohistochemistry

The presence of the eCB system during early postnatal development was investigated by immunohistochemistry. The RGC fiber layer was labeled with syntaxin. Retinal sections were washed in 0.1M PBS, post fixed for 5 minutes in a 70% solution of ethanol, rinsed in 0.03% Triton X-100 buffered saline and

blocked in 10% normal donkey serum (NDS, Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA) and 0.5% Triton X-100 in buffered saline for 1h. The sections were then co-incubated overnight in rabbit anti-CB1R, rabbit anti-NAPE-PLD, goat anti-DAGL α , rabbit anti-FAAH, or rabbit anti-MGL solution with an antibody tagged as mouse and directed against syntaxin. After incubation with the primary antibodies, the sections were washed in buffered saline, blocked for 30 minutes and incubated for 1h with secondary antibodies: Alexa donkey anti-rabbit 555 for CB1R, NAPE-PLD, FAAH, or MGL, Alexa donkey anti-goat 555 for DAGL α , and Alexa donkey anti-goat or mouse 488 for cell type markers (Molecular Probes, Eugene, OR). After washes, the sections were mounted with a homemade Dabco-PVD mounting media (Ono et al., 2001).

The effects of intraocular injection of CB1R agonist, inverse agonist and antagonist were visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described (Argaw et al., 2008). Briefly, 40 μ m thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3% H₂O₂ in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 20 min. They were then rinsed and incubated in 0.1 M glycine in PBS for 30 min, followed by an overnight incubation (4°C) in PBS containing 4% NDS, 2.5% BSA, and 1% Triton X-100. Sections were subsequently rinsed and immersed for 48 h at room temperature in a solution containing goat anti-CTb diluted 1:4000 in PBS with 2% NDS, 2.5% BSA, and 2% Triton X-100. Afterwards, sections were rinsed and incubated in 2% NDS and 2.5% BSA/PBS for 10 min. This was followed by a 1-h incubation in donkey anti-goat biotinylated secondary antibody diluted 1:200 in PBS with 2% NDS, 2.5% BSA, and 1% Triton X-100. Tissue was rinsed, incubated in 2% NDS and 2.5% BSA in PBS for 10 min, and subsequently processed by an avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit (diluted 1:100 in PBS) for 1h, in the dark and at room temperature. Sections were then rinsed and preincubated in 3, 39-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in PBS for 5 min. The peroxidase was visualized by adding 0.004% H₂O₂ to the DAB

solution for 2–4 min. Sections were finally washed five times (1 min each) with PBS, mounted on gelatine-chrome alum-subbed slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylenes, and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA).

Retinogeniculate projection patterns analysis

For eye specific segregation studies in the dLGN, CB1R^{-/-} and CB1R^{+/+} adult mice were injected with the B fragment of the cholera toxin (CTb) conjugated to Alexa -546 (CTb-546; red) into the left eye and CTb-488 (green) into the right eye (1.5 – 2 μ l; 0.5% in sterile saline; **Supplementary Figure 4A and D**). Forty-eight hours later brain tissue was harvested and postfixed overnight in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose and then sectioned coronally at 40 μ m thickness, mounted onto slides and coverslipped with Immu-Mount. Images were collected and quantified by an observer “blind” to the experimental conditions to minimize any bias. Universal gains and exposures were established for each label. Raw images of the dLGN were imported to Matlab and an area of interest comprising the dLGN was cropped excluding the ventral LGN and the intergeniculate leaflet, then the degree of left and right eye projection overlap was quantified using an established multi-threshold method of analysis (Torborg and Feller, 2004; Bjartmar et al., 2006; Stevens et al., 2007). This approach best permits the analysis of overlapping regions independent of the threshold. Values are expressed as the mean \pm sem. Significance of differences between means was evaluated by student t-test analysis (Systat).

Quantification method

Photomicrographs were taken with an inverted Olympus IX71 microscope (Olympus Canada, Markham, ON) and an Evolution VF camera (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Images were analyzed with Image Pro Plus 5.1 image analysis software (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Axon branch growth was quantified on consecutive photomicrographs of coronal

slices of brain tissue comprising the DTN. On each photomicrograph, the distance between the lateral border of the nucleus of interest and the tips of the longest axon branches were measured (**Supplementary Figure 4B**). To take into account for differences in brain sizes axon branch lengths were normalized with the interthalamic distance (distance between the right and left lateral borders of the thalamus). Axon collateral number was quantified on consecutive photomicrographs comprising the DTN using an adaptation of the Sholl technique (**Supplementary Figure 4C**)(Sholl, 1953). Values are expressed as the mean \pm sem. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

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

Results

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

To explore the involvement of the eCB system during retinal projection guidance, E14-E15 mice retinas were dissected and cultured. We then examined the expression of the CB1R, the eCB synthesizing enzymes NAPE-PLD (one of the enzymes implicated in anandamide (AEA) synthesis) and DAGL α (2-arachidonoylglycerol (2-AG) synthesizing enzyme) and the eCB degrading enzymes FAAH (AEA) and MGL (2-AG). These components of the eCB system were found to be expressed in the retinal projection axons as indicated by the co-localization of their immunoreactivities with NFL labeling (**Figure 1A**). CB1R and FAAH were expressed in the GCs and filopodia while

NAPE-PLD, DAGL α and MGL were mainly restricted to the retinal projection GCs **Figure 1A**). Furthermore, the CB1R is present in purified cultures of RGC (**Figure 1B**). Components of the eCB system were also investigated in primary cultures of cortical neurons. CB1R, DAGL α and MGL were localized in cortical neuron cell bodies, neurites and GCs (**Figure 1C** and **Supplementary Figure 1A**) and CB1R continued to be expressed for several days *in vitro* (DIV) as shown by western analysis (**Figure 1D** and **Supplementary Figure 1B**).

To explore the implication of the eCB system during retinal axon guidance, the spatio-temporal expression of CB1R, NAPE-PLD, DAGL α , FAAH, and MGL was investigated in the retinal ganglion cell fiber layer (**Supplementary Figure 1C**). During early postnatal development, these proteins are expressed in the retina (**Supplementary Figure 1C**), optic chiasm, dLGN, and the SC (Unpublished data (Argaw et al., 2009)). In the retina, CB1R and eCB synthesizing and degrading enzymes are expressed in retinal axons as they localize along the RGC fibers labeled with syntaxin, an axon marker (**Supplementary Figure 1C**). Overall, we observed that during the first days of postnatal development, CB1R, NAPE-PLD, DAGL α , FAAH, and MGL are expressed along the visual pathway. Taken together, these results indicate that the CB1R and the eCB synthesizing and degrading enzyme expressions are spatially and temporally coordinated with the development of RGCs and cortical neurons.

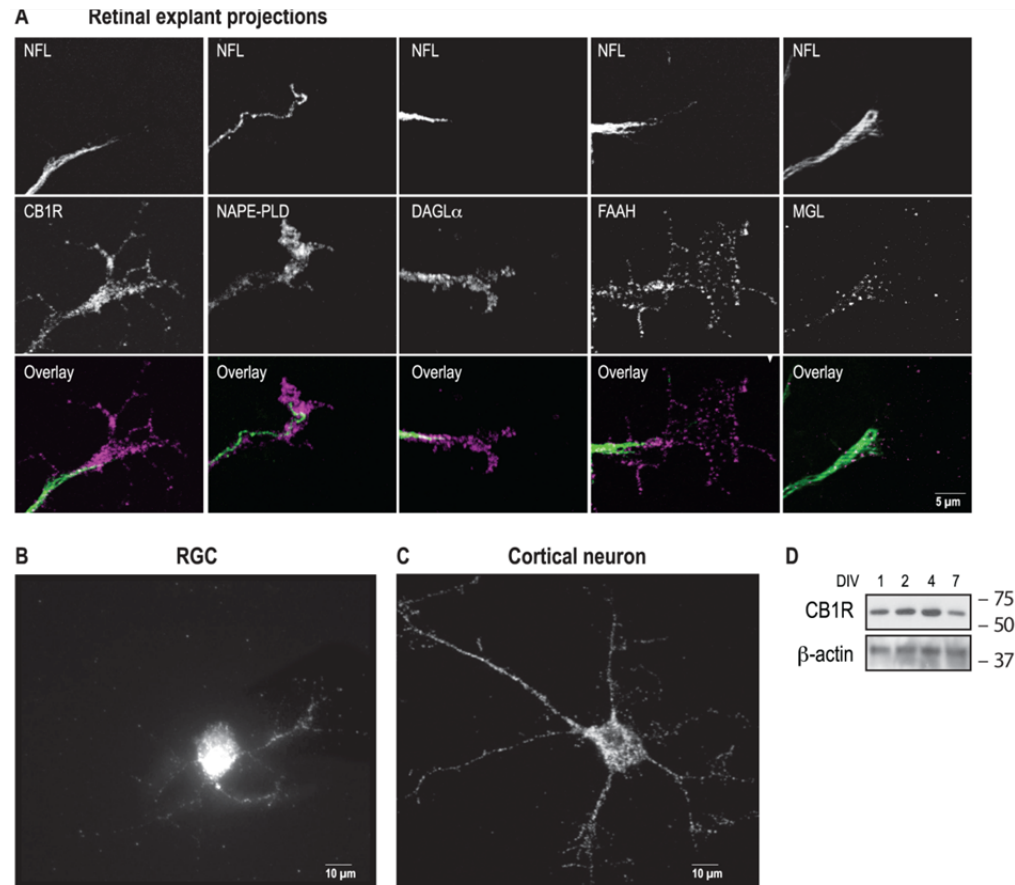
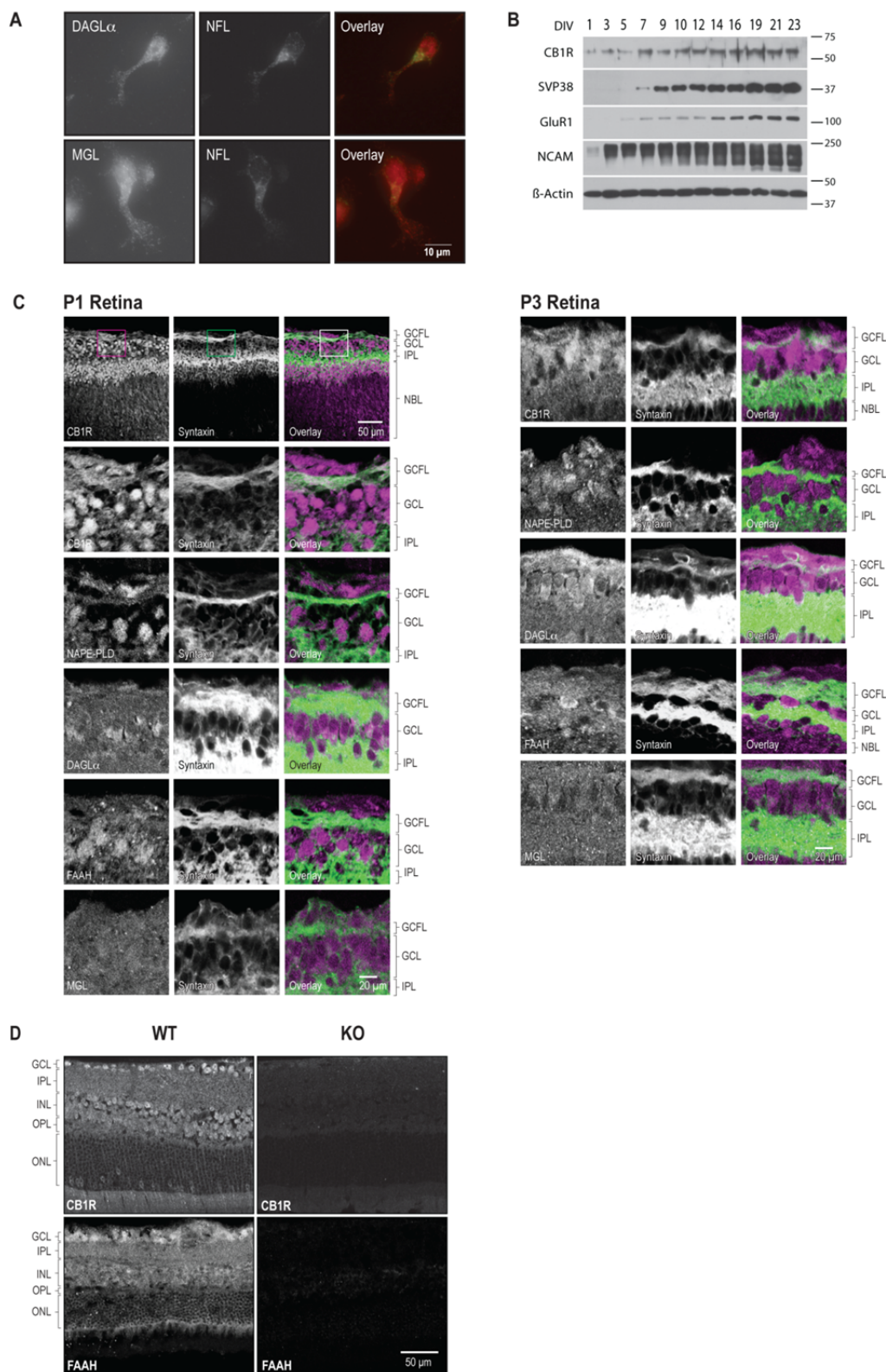


Figure 1. Expression of the eCB system in retinal projections. **A**, Retinal ganglion cell projections of E14-15 mice retinal explants cultured for 1DIV and immunolabeled for CB1R, NAPE-PLD, DAGL α , FAAH, MGL, and NFL. **B** and **C**, A retinal ganglion cell and a primary cortical neuron immunostained for CB1R. **D**, Western analysis of CB1R expression in primary cortical neuron cultures at different DIVs. Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel.



Supplementary figure 1. Expression of the eCB system.

A, primary cortical neurons immunolabeled for DAGL α , MGL and NFL. **B**, Western blot analysis of CB1R expression in primary neuron cultures at

several DIVs. Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel. **C**, Photomicrographs of retinal cross-sections showing CB1R, eCB synthesizing (NAPE-PLD, DAGL α) and eCB degrading (FAAH, MGL) enzyme expression (magenta) during early postnatal development. Syntaxin was used to label retinal projections (green). ONL, Outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, Inner nuclear layer; IPL, Inner plexiform layer; GCL, Ganglion cell layer; GCFL, Ganglion cell fiber layer. **D**, Photomicrographs of retinal tissues from CB1R^{-/-} and FAAH^{-/-} mice and matched wild type animals showing CB1R and FAAH antibodies specificity.

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

To assess the role of eCBs during retinal axon growth and guidance, embryonic mice retinal explants were cultured for 2 DIV, and treated with pharmacological modulators of the CB1R pathway. Anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) are the two most characterized eCBs. They can act as agonists for the CB1R and the CB2R (Pertwee, 2005). Since the present study focuses on the contribution of the CB1R in retinal axon guidance, ACEA, a highly selective synthetic CB1R agonist, has been used for the pharmacological experiments. When primary retinal (pure glutamatergic) and cortical (mixed population of GABA- and glutamatergic) neuron cultures were treated with ACEA, GC surface area and number of filopodia diminished significantly (**Figure 2A-F**). In contrast, application of AM251, a selective CB1R inverse agonist, or O2050, a CB1R antagonist, to the cultures significantly increased GC surface and filopodia number in RGCs and cortical neurons (**Figure 2A-F**). As expected, AM251 or O2050 antagonized the effects of ACEA. Forskolin, a selective activator of adenylate cyclase, increased retinal projection GC surface area and filopodia number (**Figure 2A-F**). To test the effects of CB1R signaling on axon growth, retinal explants were treated overnight with ACEA, AM251, or O2050. Agonist (ACEA) treatment diminished total neurite length whereas the inverse agonist (AM251) and pure antagonist (O2050) increased total neurite growth (**Figure 2G and H**). Here again, the effect of ACEA was blocked by AM251 or O2050. Taken together, these results indicate that the CB1R modulates GC morphology and axon growth in retinal explants.

To evaluate whether the CB1R is involved in retinal axon steering, the turning assay was performed on embryonic mice retinal cultures. A microgradient application of ACEA induced GC collapse and neurite retraction while db-cAMP, a stable analogue of cAMP; a cytoplasmic messenger involved GC steering, elicited attractive turning (**Figure 2I-L**). The vehicle did not induce a

significant directional GC turning. These data are in agreement with a recent study reporting the repulsive turning responses of GABAergic interneuron GCs following a CB1R agonist (WIN55,212-2) stimulation (Berghuis et al., 2007).

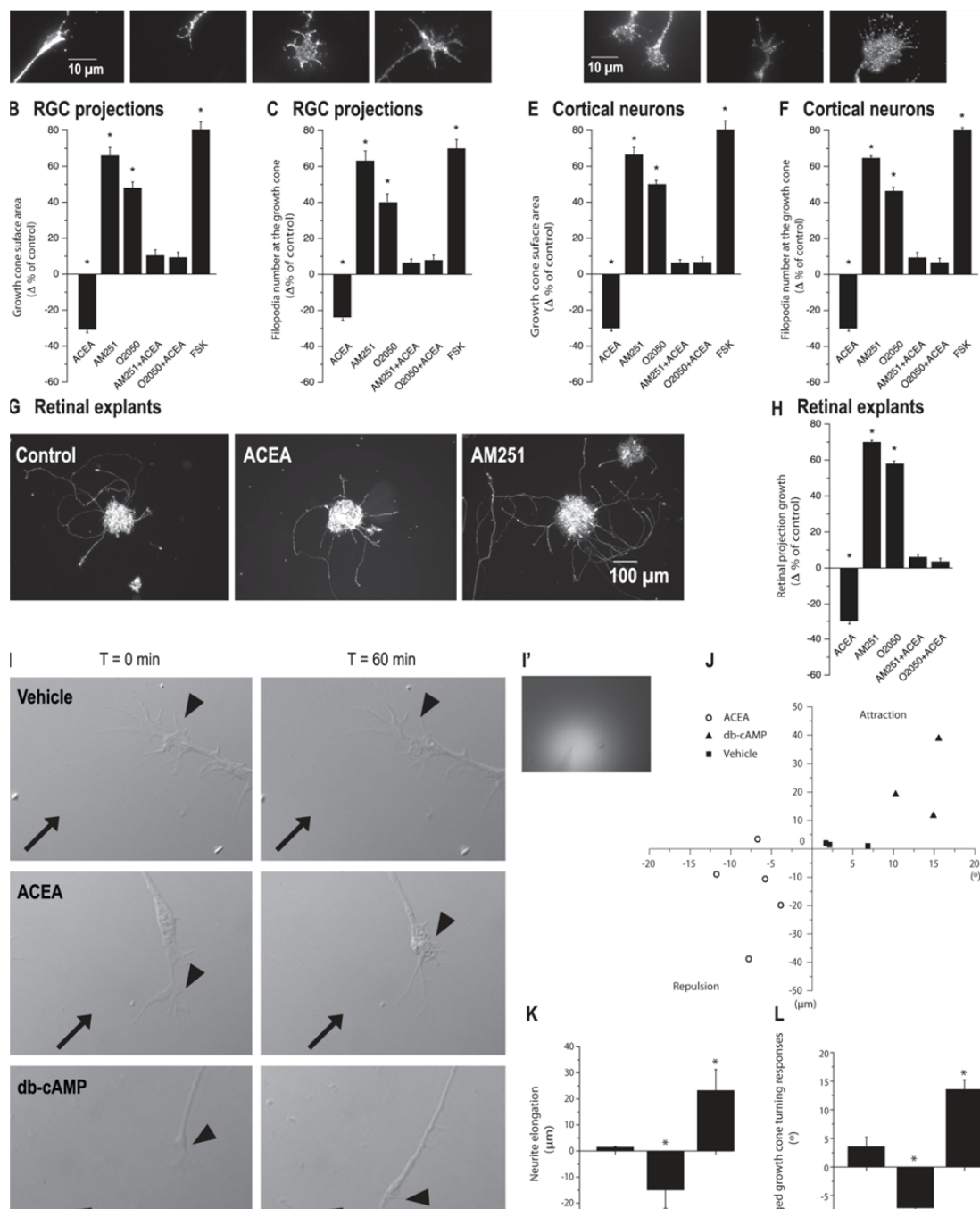


Figure 2. Pharmacological activation and blockade of the CB1R reorganizes the morphology of the GC and modulates axonal growth and navigation. **A** and **D**, Photomicrographs of retinal projection GCs cultured for 1DIV (**A**) and of primary neurons cultured for 2DIV (**D**) treated with a CB1R agonist (ACEA), an inverse agonist (AM251), an antagonist (O2050), or FSK. **B**, **C**, **E**, and **F**, GC surface area and filopodia number analysis following a 60 min. pharmacological treatment of retinal explant (**B** and **C**) and cortical neuron cultures (**E** and **F**). **G**, Photomicrographs of retinal

explant cultures treated with ACEA or AM251. **H**, Quantification of retinal projection growth subsequent to treatments with CB1R agonist or inverse agonist. **I**, Photomicrographs of RGC projection GCs taken at t = 0 min and 60 min. during GC turning assay experiments. Arrows indicate the direction of the microgradient while arrowheads show the neurite stimulated. **I'**, Representative photomicrograph of the microgradient created during drug stimulation. **J**, Scatter plot analysis of GC behaviour as a result of CB1R agonist, db-cAMP or vehicle application. **K** and **L**, Quantifications of neurite elongation and GC turning responses following drug stimulation. Values are presented as means \pm sem. * indicates a significant change compared with the control group; $p < 0.01$ (**B**, **C**, **E,F**, and **H**).

The CB1R modulates GC morphology via the cAMP/PKA pathway

Endocannabinoids and their CB1Rs have a diverse range of signal transduction mechanisms. Upon activation, CB1 receptors recruit distinct second-messenger cascades translating into numerous downstream kinase interactions including the Raf-1/ERK1/2 (Derkinderen et al., 2003), and PI3K/AKT (Sánchez et al., 2003; Ozaita et al., 2007) signalling pathways. The implication of these signaling cascades was tested by western blot analysis. In addition, we also investigated the implication of the cell growth regulating signalling pathway mTOR/S6K (Jaworski and Sheng, 2006; Puighermanal et al., 2009) following CB1R stimulation. Interestingly, in primary neuron cultures, 10 min. stimulation of the CB1R did not induce changes in ERK1/2, AKT or S6 phosphorylation levels (**Figure 3A and B**). To confirm the validity of these observations, the experiments were repeated for a 20 min. stimulation period without any discernible activation of these pathways (**Supplementary Figure 2A-D**). Furthermore, CB1R stimulation following KCl induced depolarization or insulin treatment did not result in additional changes in ERK1/2, AKT or S6 phosphorylation levels (**Supplementary Figure 2E and F**). Since it is well documented that the stimulation of CB1Rs and subsequent activation of $G_{i/o\alpha}$ inhibits adenylate cyclase (Irving et al., 2008), we tested whether the CB1R modulates the cAMP/PKA pathway during axon growth and guidance. ACEA stimulation induced a significant decrease in cAMP levels at the GC whereas AM251, O2050 and FSK increased them, as indicated by fluorescence intensity (**Figure 3C and D**). Furthermore, PKA phosphorylation was significantly lower following ACEA stimulation while the opposite was true after AM251 application as indicated by western blot analysis (**Figure 3E and F**). To further assess the implication of the cAMP/PKA pathway, primary neuron cultures were first treated with PKA-selective inhibitors followed by pharmacological manipulation of the CB1R. PKA inhibition blocked AM251 induced increases in GC surface area and filopodia number (**Figure 3G-I**). ACEA reversed FSK-induced GC surface and filopodia increases (**Figure 3I-**

K). These data demonstrate that CB1R activation modulates GC morphology via the cAMP/PKA pathway.

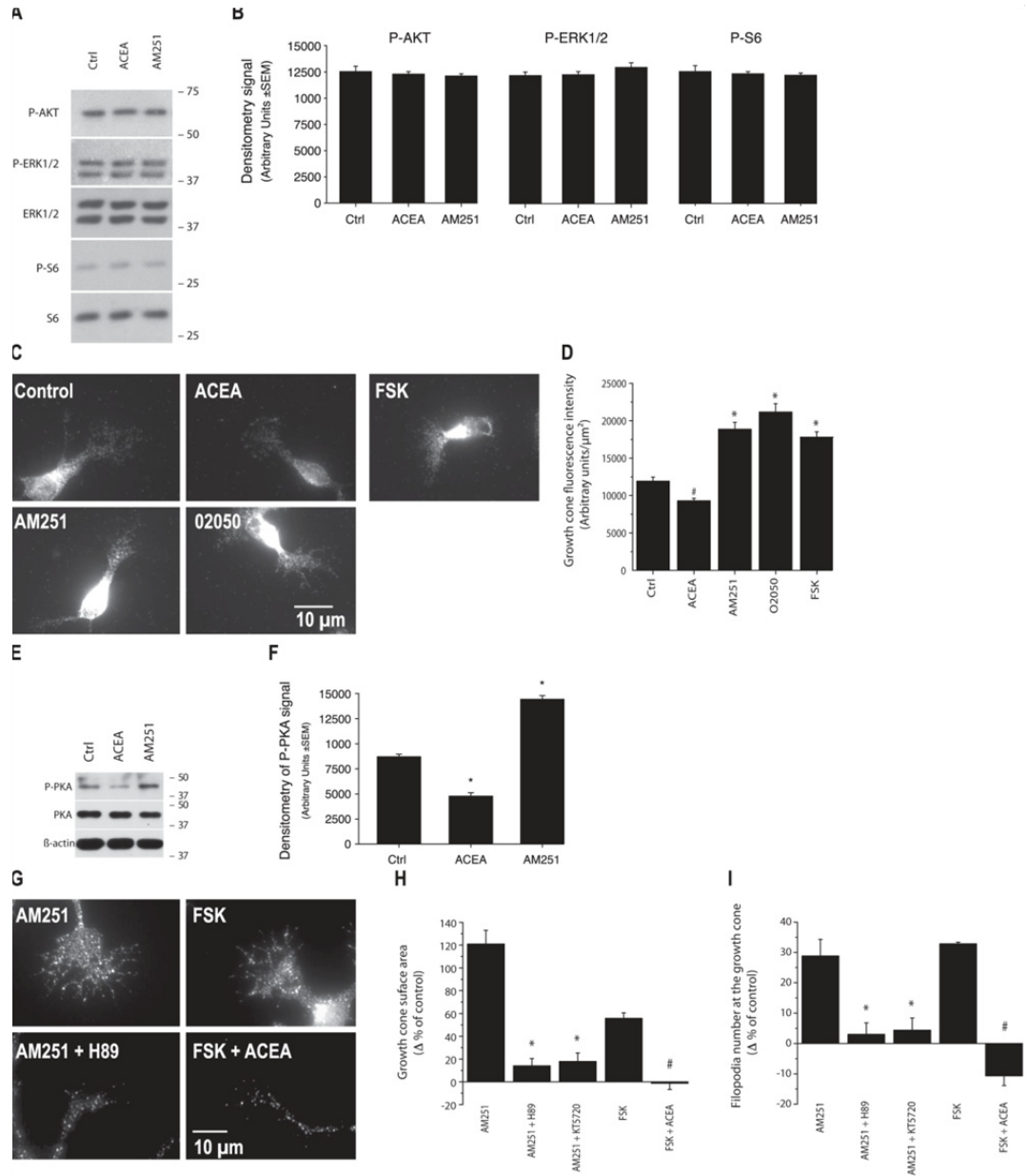
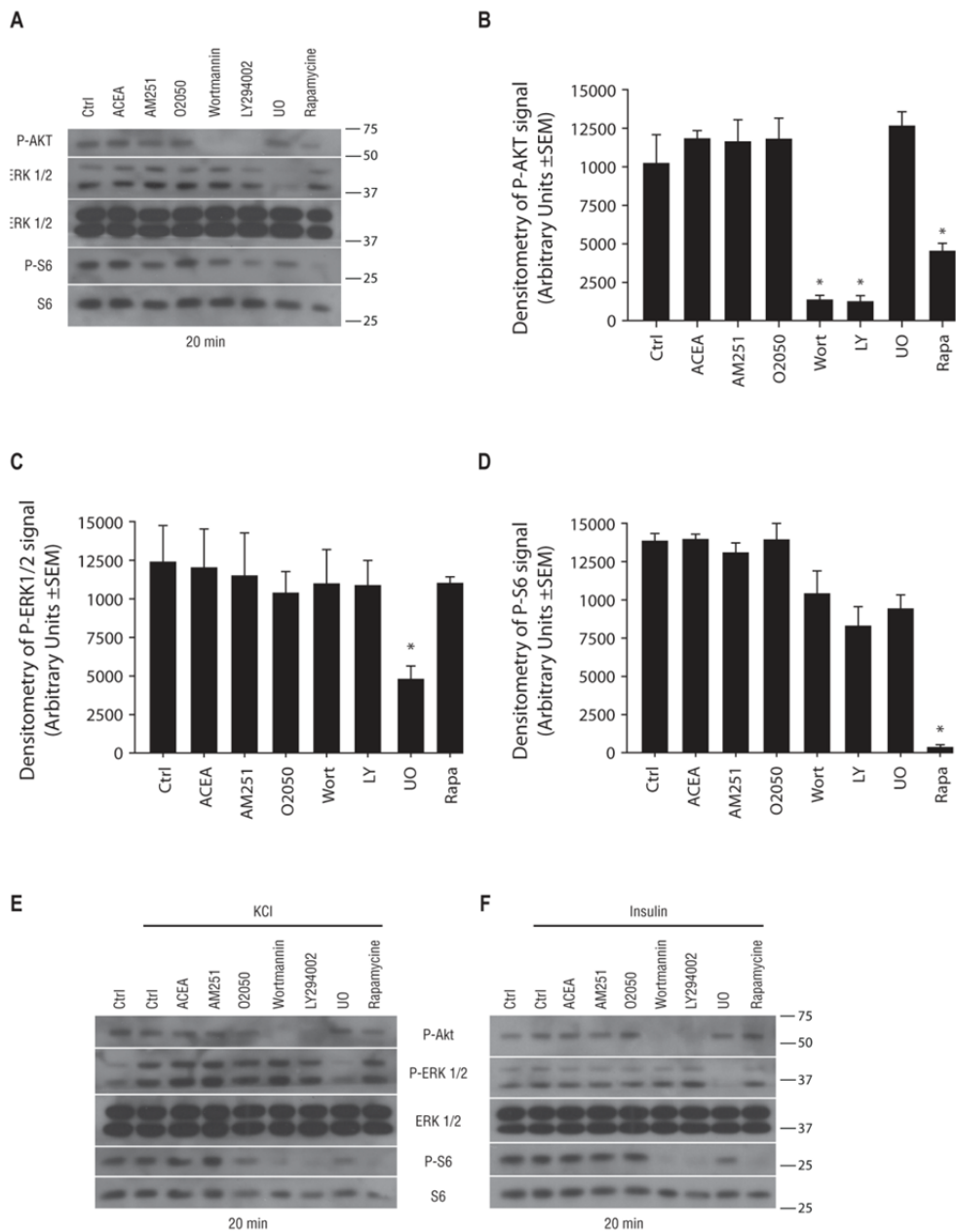


Figure 3. The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway. **A**, Western blot analysis of downstream kinases previously suggested to modulate eCB action. Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel. **B**, Quantification of the optical density for P-AKT, P-ERK1/2 and P-S6 following 10 min. stimulation with ACEA or AM251. **C**, Photomicrographs of cortical neuron cultures immunolabeled for cAMP following 15 min stimulation with ACEA, AM251, O2050, or FSK. **D**, Quantification of cAMP fluorescence intensity at the GC. # and * indicate a significant change compared with the control group, $p < 0.05$ and $p < 0.0001$, respectively. **E**, Western blot analysis of PKA phosphorylation following 10 min. stimulation with ACEA or AM251. Molecular weight markers are

indicated on the right side of the panel. **F**, Quantification of the optical density for P-PKA. **G**, Photomicrographs of GCs treated with CB1R inverse agonist and agonist, FSK and PKA inhibitors. **H** and **I**, GC surface area and filopodia analysis subsequent to the addition of a CB1R inverse agonist and simultaneous inhibition of PKA or the activation of PKA and the addition of a CB1R agonist. Values are presented as mean \pm sem. * indicates a significant change compared with the AM251 group and # with the FSK group ($p < 0.0001$).



Supplementary figure 2. CB1R activity and second-messenger cascades.

CB1R agonist, inverse agonist and antagonist did not activate the PI3K, ERK1/2 or mTOR pathways following a 20 min treatment (**A**). Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel. Quantification of the optical density for P-AKT (**B**), P-ERK1/2 (**C**) and P-S6 (**D**). CB1R stimulation following KCl induced depolarisation (**E**) or insulin treatment (**F**) failed to recruit PI3K, ERK1/2 or mTOR second messenger cascades. Molecular weight markers are indicated on the right side of the panel.

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

The cAMP/PKA pathway has been suggested to influence the GC's sensitivity to netrin-1 (Ming et al., 1997). Several studies have reported that activation of PKA increases netrin dependent recruitment of DCC to the plasma membrane (Bouchard et al., 2004; Moore and Kennedy, 2006; Bouchard et al., 2008). Our results suggest that the cAMP/PKA pathway function as a downstream effector for eCBs during GC guidance. Since CB1R and DCC are expressed in developing neurons, it is reasonable to investigate the potential interactions between these two receptors. Previous reports showed that DCC is expressed in primary cortical neurons (Bouchard et al., 2008) and retinal projection axons and GCs (Deiner et al., 1997). Our results indicated that the CB1R and DCC are expressed in embryonic retinal explant axons, GCs and filopodia (**Figure 4A**). We further examined whether DCC and CB1R are expressed in transgenic mice where CB1R (CB1R^{-/-}) or DCC (*dcc*^{-/-}) were functionally inactivated respectively. Immunocytochemical and western blot analysis clearly indicated that DCC is expressed in CB1R^{-/-} while CB1R is present in *dcc*^{-/-} neurons (**Figure 4B-E**). To determine whether CB1R activation modulates DCC trafficking to the plasma membrane, neuron cultures were treated with AM251, O2050, or FSK. Plasma membrane DCC was assessed by biotinylating cell surface proteins and the relative amount of DCC present on the neuronal surface following the treatments was visualized by western blot analysis (**Figure 4F**). Interestingly, CB1R antagonist and inverse agonist significantly increased the amount of DCC at the plasma membrane (**Figure 4F**). FSK also augmented the presence of DCC at the neuronal surface. To verify that CB1R induced DCC trafficking is upstream or downstream of PKA activation, neuronal cultures were treated with KT5720+AM251, H89+AM251, KT5720+FSK or H89+FSK. As visualized by western blot, inhibition of PKA abolished AM251, O2050 and FSK induced increases in DCC at the plasma membrane (**Figure 4F**). To determine

whether DCC is required for CB1R induced reorganization of GC morphology, primary neuron cultures were exposed to DCC function blocking antibody (α DCCfb) for 15 min before the addition of CB1R modulators. α DCCfb blocked AM251 and O2050 induced GC area and filopodia number increases (**Figure 4G** and **H**, respectively and **Supplementary Figure 3A**). These effects were also observed for FSK (**Figure 4G** and **H**). The importance of DCC for eCB-mediated axon development was further investigated in transgenic mice for DCC function ($dcc^{-/-}$) and their wild-type ($dcc^{+/+}$) littermates. Pharmacological modulation of the CB1R did not induce any significant changes neither in GC surface area nor filopodia number in primary neuron cultures obtained from $dcc^{-/-}$ mouse embryos (**Figure 4I, K** and **Supplementary Figure 3B**). In contrast, ACEA induced a decrease in GC surface and filopodia number while AM251, O2050 and FSK augmented these endpoints in $dcc^{+/+}$ neuron cultures (**Figure 4J, L** and **Supplementary Figure 3C**). Taken together, these results demonstrate that DCC is required for CB1R mediated GC reorganization during axon guidance and development. Furthermore, these findings unravel the mechanism by which cannabinoids modulate guidance cue regulated GC steering (**Supplementary Figure 4E**).

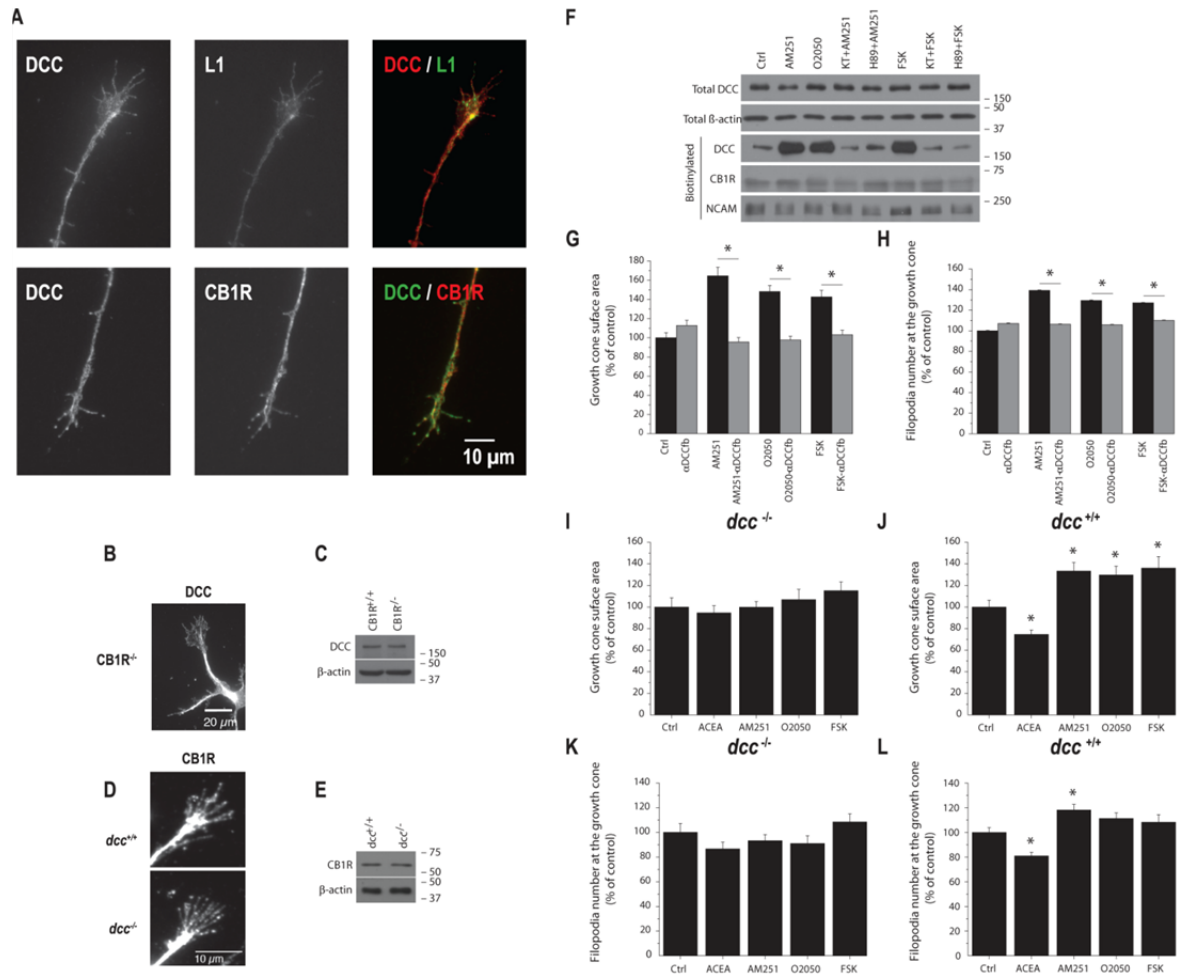
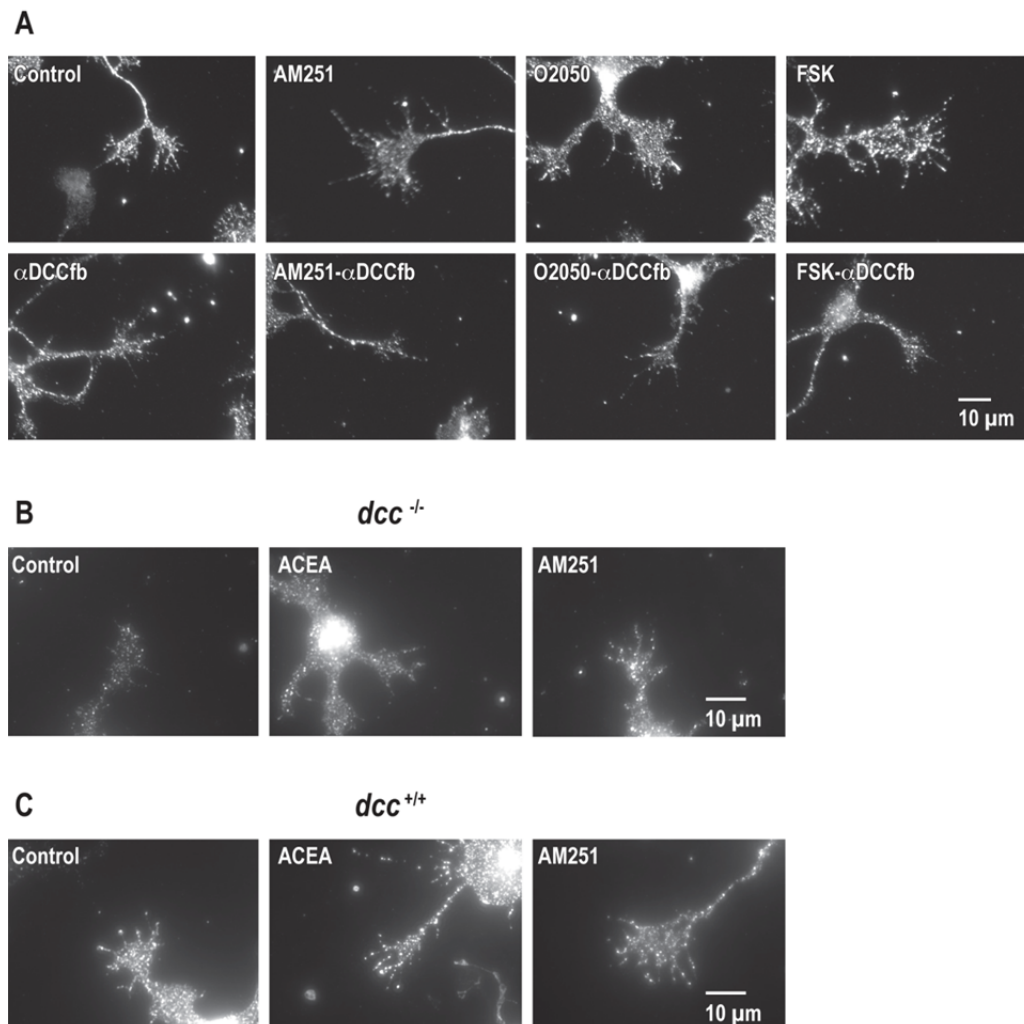


Figure 4. DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC. **A**, E14-15 mice RGC projections immunolabeled for DCC, CB1R and L1. **B** and **C**, immunocytochemical and western blot analysis of DCC expression in primary retinal neuron cultures obtained from CB1R^{-/-} mice. **D** and **E**, immunocytochemical and western blot analysis of CB1R expression in primary neuron cultures obtained from *dcc*^{-/-} mice. **F**, Total and biotinylated proteins analyzed by Western blot with antibodies directed against either DCC, β -actin, CB1R, or NCAM. For Western blots, molecular weight markers are indicated on the right side of the panel. **G** and **H**, GC surface area and filopodia number analysis of cortical neuron cultures treated with α DCCfb followed by the addition of either a CB1R inverse agonist or antagonist (AM251 or O2050, respectively) or FSK. **I-L**, GC surface area and filopodia number analysis of *dcc*^{-/-} (**I** and **K**) and *dcc*^{+/+} (**J** and **L**) primary neuron cultures treated with either ACEA, AM251, O2050 or FSK. Values are presented as mean \pm sem. * indicates a significant change compared with the AM251, O2050, or FSK in **G** and **H**, and the control group in **J** and **L**; $p < 0.05$.



Supplementary figure 3. DCC regulates CB1R induced reorganization of the GC. A, Photomicrographs of primary neuron cultures treated with α DCCfb followed by the addition of either a CB1R inverse agonist or antagonist (AM251 or O2050, respectively) or FSK. GC photomicrographs of *dcc*^{-/-} (**B**) and *dcc*^{+/+} (**C**) primary neuron cultures treated with either ACEA or AM251.

The CB1R plays an important role during retinal projection growth and target selection *in vivo*

To assess the contribution of the eCB system during retinal projection development *in vivo*, hamsters received intraocular injections of CB1R modulators. Compared with rats and mice, hamsters have shorter gestation period. Consequently, they are born with a relatively premature nervous system (Clancy 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 either ACEA or AM251. At P5, immunohistological experiments revealed that interfering with the eCB signaling system could have detrimental effects on RGC axon development. Compared with the control group, intraocular injection of ACEA induced a significant decrease in RGC axon branch growth in the dorsal terminal nucleus (DTN) without differences in branch number (**Figure 5A-C**). AM251 increased RGC collateral length and branch number in the DTN (**Figure 5A-C**). In addition, interfering with the intrinsic ocular cannabinoid signaling with AM251 induced aberrant projections in the ipsilateral side of the SC as indicated by a robust labeling of retinal axons (**Figure 5D**).

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 et al., 1984). In the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. The implication of the CB1R during retinogeniculate development was further investigated in the dLGN in adult CB1R-deficient mice (CB1R^{-/-}) and their wild-type (CB1R^{+/+}) littermates. The area occupied by contralateral projections is larger in CB1R^{-/-} mice compared with CB1R^{+/+} mice (**Figure 5E**). The contra- and ipsilateral retinal projection images were

quantified using a multi-threshold method of analysis with MatLab software. These data indicate a significant overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of CB1R^{-/-} mice (**Figure 5F**). The segregation defects observed were not due to an uneven labeling of RGCs in the retina as the optic nerves of both eyes were similarly labeled following intraocular injection of anterograde tracers (**Supplementary Figure 4D**).

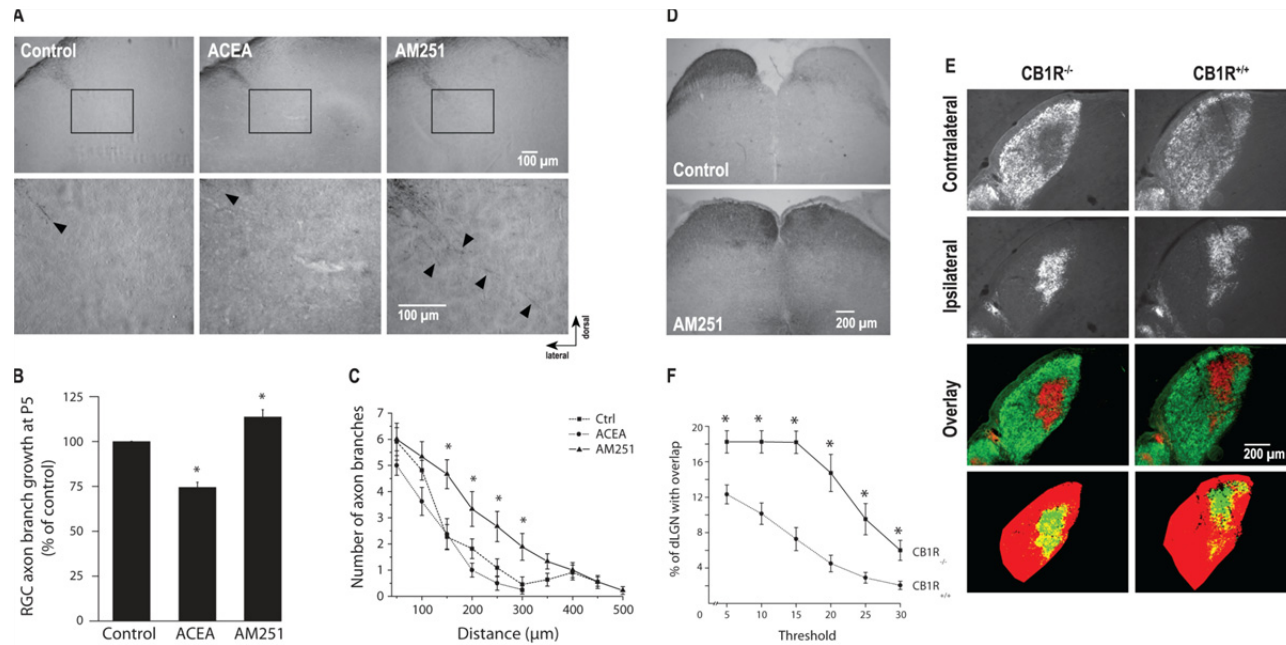
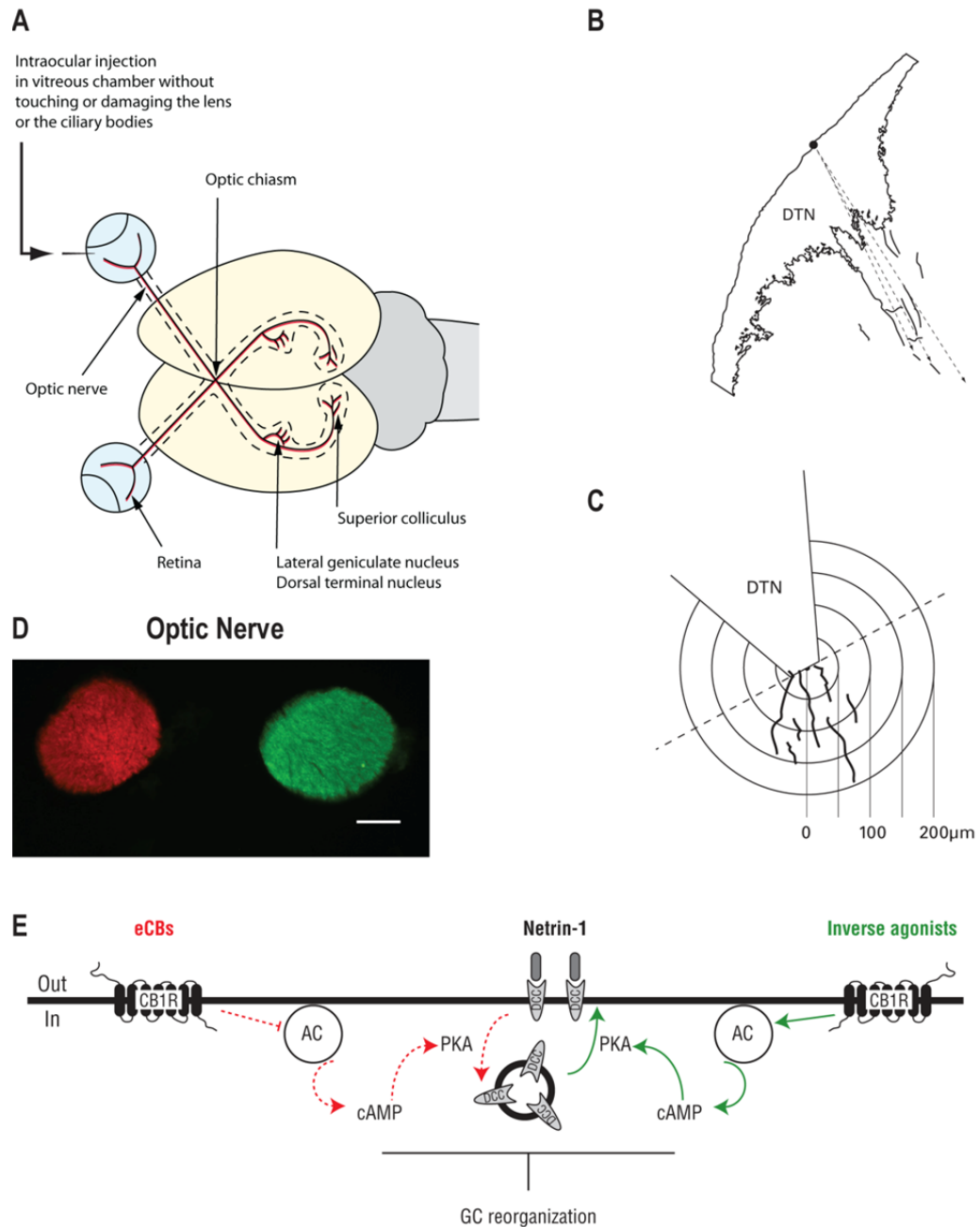


Figure 5. Pharmacological modulation of CB1R activity modulates retinal projection development *in vivo*. **A**, Photomicrographs of P5 retinal projections in the dorsal terminal nucleus (DTN) in the control, ACEA and AM251 groups. Lower panel shows higher magnification of retinal projections. **B** and **C**, Quantification of retinal projection development in the DTN; axon collateral growth (**B**) and collateral branch number (**C**) of treated groups compared with the control group. **D**, Photomicrographs of retinal projections in the SC in the control and AM251 treated groups. **E**, Retinogeniculate projection patterns visualized following CTb conjugated to Alexa -546 (CTb-546; red) and CTb-488 (green) injections into left and right eyes of CB1R^{-/-} and CB1R^{+/+} adult mice. **F**, Quantification of the percentage of the dLGN receiving overlapping inputs in CB1R^{-/-} and CB1R^{+/+} adult mice. Data are presented as means ± sem. * indicates a significant change compared with the control group in **C** ($p < 0.05$) and the CB1R^{+/+} group in **F** ($p < 0,005$).



Supplementary figure 4 Intraocular injections and mechanism by which cannabinoids modulate GC steering. **A**, Schema illustrating vitreal injection and CB1R, FAAH and MGL expression analysis sites during retinal projection development. **B** and **C**, Illustrations of the methods used to quantify retinal projection branches length (**B**) and the number of retinal axon branches (**C**) in the DTN. Arrowed dotted lines indicate the distance between the lateral border of the thalamus and the tip of the farthest projections (**B**). **D**, Photomicrographs of optic nerves following vitreal injections of CTb-546 and CTb-488 in to the left and right eye, respectively. **E**, A model illustrating the

interactions between the CB1R and DCC during axon navigation. Antagonizing the CB1R increases intracellular cAMP levels, triggering a PKA-dependent translocation of DCC to the plasma membrane and resulting in GC expansion, whereas CB1R agonists induce the opposite resulting in GC collapse.

Discussion

Previously, studies have reported by *in situ* hybridization and immunohistochemistry the presence of the CB1R in the outer and inner plexiform layers, inner nuclear and the ganglion cell layers of the retina (Buckley et al., 1998; Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Yazulla, 2008). Our observations further these studies by showing, for the first time, the presence of the CB1R and the eCB synthesizing (NAPE-PLD and DAGL α) and degrading (FAAH and MGL) enzymes in retinal projection axons and GCs (**Figure 1A**). In accordance with previous reports, we have observed the presence of the CB1R in RGCs and cortical neurons (**Figure 1B-D** and **Supplementary Figure 1B**) (Lalonde et al., 2006; Vitalis et al., 2008; Keimpema et al., 2010; Wu et al., 2010). Furthermore, our findings showed that, *in vivo*, expression of CB1R, NAPE-PLD, DAGL α , FAAH, and MGL is spatially and temporally synchronized with the development of RGC projections (**Supplementary Figure 1C**). These findings demonstrate the presence of the eCB system in the developing neuro-visual system and strongly suggest its implication in retinal axon guidance and the establishment of functional retinothalamic and retino-collicular pathways.

We found that pharmacological activation or blockade of the CB1R activity modulates GC morphology of RGCs and cortical neurons (**Figure 2A-F**). Accordingly, CB1R agonist induced the collapse of the GC, while the CB1R antagonist or inverse agonist expanded its surface area and filopodia number of these glutamatergic neurons. These data correlate with a previous study that showed CB1R agonist (WIN55,212-2)-induced GC collapse in GABAergic interneurons of the hippocampus (Berghuis et al., 2007). Additionally, our data indicate that the CB1R negatively regulates retinal projection growth (**Figure 2G** and **H**). This is in accordance with a published study using hippocampal pyramidal neurons in which the CB1R expression was augmented by transfection (Vitalis et al., 2008). Conversely, our data are at odds with prior studies which reported that the CB1R positively regulates

neurite development of cortical and cerebellar neurons (Williams et al., 2003; Mulder et al., 2008). At this point, our present understanding of the eCBs system does not permit a conciliatory explanation for these discrepant results. Additionally, our results clearly demonstrate that the CB1R activity at the GC modulates retinal axon navigation (**Figure 2I-L**). These results complement previously reported observations where CB1R agonist treatment induced GABAergic GC collapse and retraction (Berghuis et al., 2007). Furthermore, the presence of the CB1R and the eCB synthesizing (NAPE-PLD and DAGL α) and degrading (FAAH and MGL) enzymes in retinal axons and GCs (**Figure 1A**) and the CB1R-induced retinal GC steering (**Figure 2I-L**) suggest that these neurons may use target-derived as well as cell-autonomous eCBs as directional cues for GC steering decisions. These findings is in accordance with the rational that eCB-controlled axonal growth in glutamatergic cells being primarily a cell-autonomous mechanism, while GABAergic neurons using target-derived cues for directional navigation proposed by Mulder et al. (2008). The divergence in the mechanism used by glutamatergic and GABAergic neurons could in part be explained by the cell type-dependent regulation of eCBs. Indeed, Walker et al. (2010) reported that DAGL α expression diminishes dramatically once the neural stem cells differentiate in GABAergic phenotype. Furthermore, the recent work by Kempema et al. (2010) showed the importance of the spatial and temporal expression of MGL, whereby axonal pathfinding is regulated. Furthermore, these findings highlight the intricate mechanism by which the eCB system modulates the development of various neuron populations.

Previously, Berghuis et al. (2007) reported CB1R agonist-induced ERK1/2 phosphorylation in cultured interneurons while Oziata et al. (2007) documented the regulation of the PI3K/AKT by cannabinoids. Recently, Puighermanal et al. (Puighermanal et al., 2009) showed that, in adult, CB1R expressed on GABAergic interneurons transiently modulated the mTOR/S6K pathway. Despite various experimental conditions, we were unable to obtain

similar results in our cultures of primary cortical glutamatergic neurons (**Figure 3A and B** and **Supplementary Figure 2**). Intriguingly, however, our findings showed that CB1R reorganizes GC morphology through DCC, a receptor for netrin-1. Firstly, CB1R and DCC are expressed at the GC, and functional deletion of DCC does not affect the expression of CB1R as indicated by immunocytochemistry and western blot analysis (**Figure 4A-E**). Secondly, CB1R activity influences the level of DCC present at the plasma membrane. Accordingly, blocking the constitutive CB1R activity, using the inverse agonist AM251, enhanced the level of DCC at the plasma membrane in a PKA-dependent manner (**Figure 4F**). Thirdly, the CB1R-induced GC reorganization requires the presence of a functional DCC at the GC (**Figure 4G-L** and **Supplementary Figure 3**). The functional implication of these findings is that the eCB system modulates axon guidance through CB1R by modulating GC's behavior to guidance cues present in its microenvironment (please refer to the working model **Supplementary Figure 4E**). Since eCBs are lipophilic compounds and are rapidly metabolized following their synthesis (Willoughby et al., 1997), it is very unlikely that they establish long-range concentration gradients similar to "classical" guidance molecules such as netrin. However, based on the results obtained in the present study, eCBs play, via CB1R, a modulatory role in axon guidance by modifying the response of GC toward a source of netrin. For instance, in spite the presence of netrin-1, an attractive guidance molecule, eCBs could induce retraction in part by downregulating the level of DCC at the plasma membrane. Furthermore, Berghuis et al. (2007) showed that CB1R induces growth cone collapse by activating RhoA, while Moore et al. (2008) provided evidence that RhoA inhibits DCC-dependent axon outgrowth to netrin. Thus, we believe that CB1R-induced GC collapsing response observed in the present study is mediated by GTPases. Further studies are needed to unravel these mechanisms in details.

In vivo, our data show that pharmacological and genetic interference with the CB1R activity profoundly affects retinal projection development and target selection. Accordingly, pharmacological manipulation of ocular eCB signaling affects retinal projection growth and navigation (**Figure 5A-D**). Furthermore, the important role played by the eCB system during RGC axon guidance and target selection is demonstrated by the relative lack of eye-specific segregation of retinal projections in CB1R-deficient adult mice (**Figure 5E and F**). Altogether, the present study identifies a mechanism by which the eCB system modulates retinothalamic development and offers a potential mechanism by which parental exposure to CB1R agonists such as Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the major psychoactive constituent in Cannabis, affects CNS development, with detrimental effects in the offspring.

References

- Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F (2008) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Exp Neurol* 211:494-502.
- Argaw A, Duff G, Tea N, Ptito M, Bouchard J-F (2009) The endocannabinoid system modulates axon guidance and target selection during development. In: 39th annual meeting of The Society for Neuroscience annual meeting, p 129.128/B129 Chicago, IL: Society for Neuroscience.
- Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL (1988) Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1:791-803.
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19115-19120.
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007) Hardwiring the Brain: Endocannabinoids Shape Neuronal Connectivity. *Science* 316:1212-1216.
- Bhide PG, Frost DO (1991) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J Neurosci* 11:485-504.
- Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Renteria RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS (2006) Neuronal Pentraxins Mediate Synaptic Refinement in the Developing Visual System. *J Neurosci* 26:6269-6281.

- Bottenstein J, Sato G (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci* 76:514-517.
- Bouchard J-F, Horn KE, Stroh T, Kennedy TE (2008) Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *J Neurochem* 107:398-417.
- Bouchard J-F, Moore S, Tritsch N, Roux P, Shekarabi M, Barker P, Kennedy T (2004) Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an Intracellular Pool: A Novel Mechanism Regulating Commissural Axon Extension. *J Neurosci* 24:3040-3050.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82:1131-1149.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7-17.
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997) Netrin-1 and DCC Mediate Axon Guidance Locally at the Optic Disc: Loss of Function Leads to Optic Nerve Hypoplasia. *Neuron* 19:575-589.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol J-C, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault J-A (2003) Regulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase by Cannabinoids in Hippocampus. *J Neurosci* 23:2371-2382.
- Ebrahim SH, Gfroerer J (2003) Pregnancy-related substance use in the United States during 1996-1998. *Obstet Gynecol* 101:374-379.
- Fazeli A, Dickinson S, Hermiston M, Tighe R, Steen R, Small C, Stoeckli E, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson R, Gordon J, Tessier-Lavigne M, Weinberg R (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc). *Nature* 386:796-804.

- Godement P, Salaun J, Imbert M (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol* 230:552-575.
- Hanus LO (2009) Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Medicinal Research Reviews* 29:213-271.
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J (2008) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286:S84-S90.
- Inatani M (2005) Molecular mechanisms of optic axon guidance. *Naturwissenschaften* 92:549-561.
- Irving AJ, McDonald NA, Harkany T (2008) CB1 Cannabinoid Receptors : Molecular biology, second messenger coupling and polarized trafficking in neurons. In: *Cannabinoids and the Brain* (Köfalvi A, ed), pp 59-73. New York, NY: Springer.
- Isenmann S, Kretz A, Cellerino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 22:483-543.
- Jaworski J, Sheng M (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Molecular Neurobiology* 34:205-219.
- Jutras-Aswad D, DiNieri JA, Harkany T, Hurd YL (2009) Neurobiological consequences of maternal cannabis on human fetal development and its neuropsychiatric outcome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259:395-412.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol Rev* 89:309-380.
- Keimpema E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G, Yanagawa Y, Watanabe M, Mackie K, Harkany T (2010) Differential Subcellular Recruitment of Monoacylglycerol Lipase Generates Spatial Specificity of 2-Arachidonoyl Glycerol Signaling during Axonal Pathfinding. *J Neurosci* 30:13992-14007.

- Lalonde M, Jollimore C, Stevens K, Barnes S, Kelly M (2006) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* Oct 6;: 12:1160-1166.
- Mackie K (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286:S60-S65.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530-534.
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15:805-819.
- Ming G-l, Song H-j, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo M-m (1997) cAMP-Dependent Growth Cone Guidance by Netrin-1. *Neuron* 19:1225-1235.
- Moore SW, Kennedy TE (2006) Protein Kinase A Regulates the Sensitivity of Spinal Commissural Axon Turning to Netrin-1 But Does Not Switch between Chemoattraction and Chemorepulsion. *J Neurosci* 26:2419-2423.
- Moore SW, Correia JP, Lai Wing Sun K, Pool M, Fournier AE, Kennedy TE (2008) Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1. *Development* 135:2855-2864.
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzman M, Lu H-C, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8760-8765.
- Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A (2001) Quantitative Comparison of Anti-Fading Mounting Media for Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Histochem Cytochem* 49:305-312.

- Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R (2007) Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *Journal of Neurochemistry* 102:1105-1114.
- Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*:1-51.
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12:1152-1158.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092-1101.
- SAMHSA (2008) Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National Findings. In: NSDUH (H-34 NS, ed). Rockville, MD: DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.
- Sánchez MG, Ruiz-Llorente L, Sánchez AM, Díaz-Laviada I (2003) Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB1 and CB2 cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cellular Signalling* 15:851-859.
- Sanford SD, Gatlin JC, Hökfelt T, Pfenninger KH (2008) Growth cone responses to growth and chemotropic factors. *European Journal of Neuroscience* 28:268-278.
- Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G (1999) Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina:

- Localization and function of an endogenous signaling system. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14565-14570.
- Torborg CL, Feller MB (2004) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. J Neurosci Methods 135:17-26.
- Vitalis T, Lainé J, Simon A, Roland A, Leterrier C, Lenkei Z (2008) The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth *in vitro*. Eur J Neurosci 28:1705-1718.
- Walker DJ, Suetterlin P, Reisenberg M, Williams G, Doherty P (2010) Down-regulation of diacylglycerol lipase-alpha during neural stem cell differentiation: Identification of elements that regulate transcription. J Neurosci Research 88:735-745.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. Mol Cell Neurosci 38:89-97.
- Williams E-J, Walsh FS, Doherty P (2003) The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. J Cell Biol 160:481-486.
- Willoughby KA, Moore SF, Martin BR, Ellis EF (1997) The Biodisposition and Metabolism of Anandamide in Mice. J Pharmacol Exp Ther 282:243-247.
- Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K, Lutz B, Mackie K, Lu HC (2010) Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. Eur J Neurosci 32:693-706.
- Yazulla S (2008) Endocannabinoids in the retina: From marijuana to neuroprotection. Progress in Retinal and Eye Research 27:501-526.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG (1999) Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. J Comp Neurol 415:80-90.

Author contributions

A.A. designed the project, performed the retinal explants and primary neuron cultures, the growth cone turning assay, the intraocular injections, the immunohisto- and immunocytochemistry experiments, analysed imaging data, performed the statistical analysis and prepared the manuscript. G.D. performed the retinal explants and primary neuron cultures, the growth cone turning assay, the immunohisto- and immunocytochemistry experiments and analysed imaging data. N.Z. and B.C. executed the immunohistochemical experiments. H.C and N.C. realized and analyzed additional immunocytochemistry experiments. N.T. performed the western blot analysis. B.L. kindly provided the CB1R transgenic mouse developed by his research team and contributed to the preparation of the manuscript. M.P. and J.F.B. designed and supervised the project, performed the biotinylation experiments and contributed to the preparation of this manuscript.