



Université de Montréal

Le rôle des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 dans le guidage axonal

Par

Anteneh Argaw

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 biomédicales

Décembre, 2009

© Anteneh Argaw, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Le rôle des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 dans le guidage axonal

Présentée par :

Anteneh Argaw

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Vasile Diaconu

Président-rapporteur

Dr. Jean-François Bouchard

Directeur de recherche

Dr. Maurice Ptito

Codirecteur de recherche

Dr. Elvire Vaucher

Membre du jury

Dr. Douglas Frost

Examineur externe

Dr. Jean-François Pflieger

Représentant du Doyen de la FES

## Résumé

Au cours du développement, les axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) voyagent sur de longues distances pour établir des connexions avec leurs cellules cibles. La navigation des cônes de croissance est guidée par différentes molécules chimiotropiques présentes dans leur environnement. Les endocannabinoïdes (eCB) sont d'importants neuromodulateurs qui régulent de manière rétrograde la fonction de nombreuses synapses du cerveau. Ils agissent principalement par le biais de leurs récepteurs liés à une protéine  $G_{i/o}$  CB1 (CB1R) et CB2 (CB2R). La présence des eCBs durant le stade fœtal et la période postnatale suggère leur implication dans des événements régulant le développement du système nerveux. Cette thèse confirme l'expression des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 ainsi que l'enzyme dégradant les eCBs lors du développement embryonnaire et perinatal des CGRs et de la voie rétinothalamique *in vivo*. La manipulation pharmacologique de l'activité de CB1R et CB2R réorganise la morphologie du cône de croissance des CGRs et des neurones corticaux *in vitro*. De plus, la stimulation locale avec un agoniste de CB1R ou de CB2R modifie le comportement du cône de croissance entraînant sa répulsion. CB1R et CB2R modulent par le biais de la voie de signalisation AMPc/PKA, la mobilisation de DCC à la membrane plasmique. Par ailleurs, les résultats de cette recherche démontrent également l'implication de CB1R et CB2R dans la ségrégation des projections ipsi- et controlatérales et le développement de la voie rétinothalamique.

Mots clés :

Cône de croissance; guidage axonal; récepteurs aux cannabinoïdes; CGR; DCC; PKA; AMPc.

## Summary

Following differentiation, retinal ganglion cell (RGC) axons, tipped at their distal end by the growth cone (GC), navigate through relatively long distances in a highly directed manner in order to establish functional synapses with thalamic and superior colliculus (SC) neurons. This is achieved with the help of extracellular guidance molecules which steer RGC axon growth by regulating GC morphology by means of attractive and/or repulsive mechanisms. In the adult brain, endocannabinoids (eCBs) exert an important neuromodulatory function by acting as retrograde messengers to regulate the function of many synapses. Endocannabinoids act mainly via their  $G_{i/o}$  protein coupled receptors CB1 (CB1R) and CB2 (CB2R). Due to their presence at the fetal and early postnatal periods, it has been proposed that eCBs and their receptors might be involved in several developmental events, such as cell proliferation and migration, axon guidance and synaptogenesis. We observed that during early postnatal development, components of the eCB system are expressed along the visual pathway (the optic chiasm, the lateral geniculate nucleus and the SC). To assess the implication of the eCB system, *in vitro*, embryonic retinal explant and primary neuron cultures were treated with pharmacological agonists and inverse agonists of CB1R and CB2R. These experiments demonstrated that these cannabinoid receptors modify the GC's morphology. Most importantly, CB1R and CB2R act through the cAMP/PKA

pathway to modulate the presence of DCC at the plasma membrane. *In vivo*, CB1R and CB2R play a major role and the absence of either one of them induces a decrease in eye-specific segregation of retinal projections. These results show an implication of CB1R and CB2R during RGC growth and retinothalamic development.

Key words:

Growth cone; axon guidance; cannabinoid receptors; RGC; DCC; PKA; cAMP

## Table des matières

|  |       |
|--|-------|
| Résumé .....   | i     |
| Summary .....  | ii    |
| Table des matières.....  | iv    |
| Liste des tableaux .....   | xi    |
| Liste des figures .....  | xii   |
| Liste des sigles et des abréviations .....                               | xiv   |
| Remerciements.....   | xviii |
| CHAPITRE 1 .....   | 22    |
| 1.1 Introduction .....   | 23    |
| 1.2 Le système endocannabinoïde .....                                    | 27    |
| 1.2.1 Le récepteur aux cannabinoïdes CB1.....                            | 30    |
| 1.2.1.1 Structure .....  | 31    |
| 1.2.1.2 Distribution .....   | 33    |
| 1.2.1.3 Voie de signalisation .....                                      | 40    |
| 1.2.1.3.1 Régulation de l'adénylate cyclase.....                         | 41    |
| 1.2.1.3.2 Régulation des kinases activées par des agents mitogènes ..... | 43    |
| 1.2.1.3.3 Modulation des canaux ioniques.....                            | 46    |
| 1.2.2 Le récepteur aux cannabinoïdes CB2.....                            | 49    |
| 1.2.2.1 Structure .....  | 50    |
| 1.2.2.2 Distribution .....   | 52    |
| 1.2.2.3 Voie de signalisation .....                                      | 53    |
| 1.2.2.3.1 Régulation de l'adénylate cyclase.....                         | 54    |
| 1.2.2.3.2 Régulation des kinases activées par des agents mitogènes ..... | 54    |
| 1.2.2.3.3 Modulation d'ions calciques intracellulaires .....             | 55    |
| 1.2.2.3.4 Synthèse de céramides .....                                    | 56    |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.2.3   | Distribution des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 dans la rétine.....  | 56 |
| 1.2.4   | Le récepteur aux cannabinoïdes GPR55 .....                                    | 57 |
| 1.3     | Métabolisme des endocannabinoïdes.....  | 59 |
| 1.3.1   | Synthèse des endocannabinoïdes .....  | 59 |
| 1.3.2   | Dégradation des endocannabinoïdes .....                                       | 63 |
| 1.4     | Les ligands aux CB1R et CB2R .....  | 64 |
| 1.4.1   | Les agonistes aux CB1R et CB2R .....  | 64 |
| 1.4.1   | Les antagonistes/agonistes inverses aux CB1R et CB2R.....                     | 66 |
| 1.5     | Le système endocannabinoïde et le développement du SNC .....                  | 68 |
| 1.5.1   | Prolifération et spécification des cellules progénitrices neurales .....      | 69 |
| 1.5.2   | La neurogenèse.....   | 71 |
| 1.5.3   | La migration neuronale.....   | 72 |
| 1.5.4   | Câblage du cerveau et synaptogenèse .....                                     | 73 |
| 1.6     | Le cône de croissance et la navigation axonale.....                           | 74 |
| 1.6.1   | Structure du cône de croissance .....   | 75 |
| 1.6.2   | Le cône de croissance : un véhicule.....                                      | 77 |
| 1.6.3   | Le cône de croissance : un explorateur .....                                  | 81 |
| 1.6.3.1 | Les Rho GTPases .....   | 82 |
| 1.7     | Développement des cellules ganglionnaires de la rétine .....                  | 84 |
| 1.7.1   | Guidage axonal au niveau de la rétine .....                                   | 85 |
| 1.7.2   | L1-NCAM et la navigation intrarétinienne.....                                 | 86 |
| 1.7.3   | Le CSPG et le guidage axonal intrarétinien.....                               | 87 |
| 1.7.4   | La nétrine-1 et le nerf optique.....  | 89 |
| 1.7.5   | Le guidage axonal au chiasme optique.....                                     | 92 |
| 1.7.6   | Les éphrines et les projections rétino-topiques aux colliculi supérieurs..... | 95 |



|  |     |
|--|-----|
| 1.8 Objectifs de la recherche menée dans le cadre de cette thèse de doctorat.....  | 97  |
| CHAPITRE 2 .....   | 99  |
| 2.1 Abstract.....  | 101 |
| 2.2 Introduction .....   | 102 |
| 2.3 Material and Methods .....   | 104 |
| 2.3.1 Reagents .....   | 104 |
| 2.3.2 cAMP ELISA .....   | 105 |
| 2.3.3 Intraocular injections.....  | 105 |
| 2.3.4 Perfusion.....   | 106 |
| 2.3.5 Immunohistochemistry.....  | 106 |
| 2.3.6 Purified retinal ganglion cell culture.....  | 107 |
| 2.3.7 Immunocytochemistry.....   | 109 |
| 2.3.8 Quantification method .....  | 109 |
| 2.4 Results.....   | 110 |
| 2.4.1 Retinal cAMP levels decrease during postnatal development .....  | 111 |
| 2.4.2 Development of retinal projections .....   | 111 |
| 2.4.3 The cAMP/PKA pathway plays an essential role during retinal projection<br>development.....                                 | 112 |
| 2.4.4 cAMP acts directly on RGCs modulating the shape of their growth cones and<br>controlling the extension of their axon ..... | 113 |
| 2.5 Discussion .....   | 114 |
| 2.6 Acknowledgments .....  | 118 |
| 2.7 References .....   | 119 |
| 2.8 Figure Legends .....   | 125 |
| Figure 2.1 cAMP and retinal projection growth <i>in vivo</i> during development .....  | 125 |
| Figure 2.2 Retinal projections density .....   | 128 |
| Figure 2.3 cAMP and PKA modulate RGC projection growth .....   | 130 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 2.4 cAMP/PKA pathway and growth cone morphology .....  | 132 |
| Figure 2.5 Retinal projections in the VBN and the MGN .....   | 134 |
| CHAPITRE 3 .....  | 137 |
| 3.1 Abstract.....   | 140 |
| 3.2 Introduction .....  | 141 |
| 3.3 Materials and Methods .....   | 143 |
| 3.3.1 Reagents .....  | 144 |
| 3.3.2 Retinal explant culture.....  | 145 |
| 3.3.3 Purified retinal ganglion cell culture.....   | 146 |
| 3.3.4 Primary neuron culture .....  | 147 |
| 3.3.5 Growth cone turning assay.....  | 148 |
| 3.3.6 Immunocytochemistry.....  | 149 |
| 3.3.8 Western blot analysis .....   | 150 |
| 3.3.9 Intraocular injections.....   | 151 |
| 3.3.10 Perfusion.....   | 152 |
| 3.3.11 Immunohistochemistry.....  | 152 |
| 3.3.12 Retinogeniculate projection pattern analysis.....  | 154 |
| 3.3.13 Quantification method .....  | 155 |
| 3.4 Results.....  | 156 |
| 3.4.1 The developing visual system expresses the CB1R, FAAH and MGL .....   | 156 |
| 3.4.2 Pharmacological modulation of CB1R activity affects RGC GC morphology and turning <i>in vitro</i> .....     | 158 |
| 3.4.3 The CB1R modulates GC morphology via the cAMP/PKA pathway.....  | 160 |
| 3.4.4 The DCC receptor is required for CB1R induced reorganization of the GC ...                                  | 161 |
| 3.4.5 The CB1R plays an important role during retinal projection growth and target selection <i>in vivo</i> ..... | 163 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.5 Discussion .....  | 165 |
| 3.6 References .....  | 170 |
| 3.7 Author contributions .....  | 178 |
| 3.8 Figure legends.....   | 180 |
| Figure 3.1. Expression of the eCB system in the developing visual system. ....  | 180 |
| Figure 3.2 Pharmacological manipulation of the CB1R reorganizes the morphology of the GC and modulates axonal growth and navigation.....                  | 182 |
| Figure 3.3 The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway. ....   | 184 |
| Figure 3. 3 The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway.Figure 3.4 DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC. | 185 |
| Figure 3.4 DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC.....  | 186 |
| Figure 3.5 Pharmacological modulation of CB1R activity affects retinal projection development in vivo. ....   | 188 |
| Supp. Fig. 3.1 Expression of the CB1R and FAAH.....   | 190 |
| Supp. Fig. 3.2 CB1R activity and second-messenger cascades. ....  | 192 |
| Supp. Fig. 3.3 DCC regulates CB1R induced reorganization of the GC. ....  | 194 |
| Supp. Fig. 3.4 Intraocular injections and mechanism by which cannabinoids modulate GC steering. ....  | 196 |
| CHAPITRE 4 .....  | 198 |
| 4.1 Summary.....  | 200 |
| 4.2 Introduction .....  | 201 |
| 4.3 Materials and Methods .....   | 204 |
| 4.3.1 Products.....   | 204 |
| 4.3.2 Primary Cortical Neuron Culture .....   | 205 |
| 4.3.3 Retinal Explant Culture .....   | 206 |
| 4.3.4 Immunocytochemistry.....  | 207 |
| 4.3.5 Quantification of cAMP Immunoreactivity.....  | 208 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.6 Western Blots .....   | 208 |
| 4.3.7 Surface biotinylation.....  | 209 |
| 4.3.8 Time-lapse Microinjections .....  | 210 |
| 4.3.9 Intraocular Injections.....   | 211 |
| 4.3.10 Immunohistochemistry.....  | 212 |
| 4.4 Results.....  | 213 |
| 4.4.1 Spatio-temporal Localization of the CB2R in the Developing Visual System  | 213 |
| 4.4.2 CB2R Reorganizes GC Morphology .....  | 215 |
| 4.4.3 CB2R Modulates RGC Projection Length .....  | 216 |
| 4.4.4 CB2R Agonists Can Act as Chemotropic Factors.....   | 217 |
| 4.4.5 CB2R Induced GC Morphological Changes Require PKA Activity .....  | 218 |
| 4.4.6 Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Receptor is required for CB2R Action on<br>GC.....   | 219 |
| 4.4.7 CB2R modulates Retinal Projection Growth <i>in vivo</i> .....   | 220 |
| 4.4.8 CB2R Knockout Mice Possess Deficits in dLGN Segregation.....  | 221 |
| 4.5 Discussion .....  | 223 |
| 4.5.1 CB2R Localization in the Developing CNS.....  | 224 |
| 4.5.2 Signaling Pathway by which CB2R modulates axon guidance.....  | 224 |
| 4.5.3 How Does CB2R Act on Axon Pathfinding?.....   | 227 |
| 4.5.5 Effect on Segregation.....  | 229 |
| 4.5.6 Differences between CB1R and CB2R.....  | 230 |
| 4.6 References .....  | 232 |
| 4.7 Figure Legends .....  | 237 |
| Figure 4.1 Spatio-temporal Expression of the CB2R and eCB Metabolizing Enzyme<br>During postnatal Retinal Projection Development..... | 237 |
| Figure 4.2 CB2R Reorganizes the growth cone Morphology .....  | 239 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 4.3 CB2R Modulates Axon Length .....   | 241 |
| Figure 4.4 CB2R agonists influence growth cone behavior .....   | 243 |
| Figure 4.5 CB2R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector .....  | 245 |
| Figure 4.6 The DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB2R Induced<br>Reorganization of the GC.....   | 247 |
| Figure 4.7 CB2R Modulates RGC Projection Development In vivo.....   | 249 |
| Figure 4.8 CB2R Modulates Eye-specific Segregation in the dLGN .....  | 251 |
| Figure S-1 Expression of CB2R in primary cortical neuron cultures .....   | 253 |
| CHAPITRE 5 .....  | 255 |
| 5 Discussion générale .....   | 256 |
| 5.1 Choix du modèle expérimental.....   | 256 |
| 5.2 La voie de signalisation AMPC/PKA accélère le développement des projections<br>rétiniennes <i>in vivo</i> .....                                       | 257 |
| 5.3 Le récepteur aux cannabinoïdes CB1 module la croissance et le guidage axonal  | 260 |
| 5.4 Le récepteur aux cannabinoïdes CB2 module le développement des projections<br>.....   | 266 |
| 5.5 Redondance fonctionnelle entre CB1R et CB2R .....   | 269 |
| 5.6 Les récepteurs cannabinoïdes et le guidage axonal .....   | 270 |
| 5.7 Contribution de la recherche effectuée à l'avancement des connaissances .....   | 271 |
| 5.8 Perspectives d'avenir .....   | 272 |
| ANNEXE I .....  | 298 |
| Figure 1 Stimulation simultanée de CB1R et CB2R.....  | 298 |
| Figure 2 L'agoniste et agoniste inverse de CB1R n'exercent pas d'effets sur les<br>cônes des croissances de cultures neuronales CB1R <sup>-/-</sup> ..... | 300 |

**Liste des tableaux**

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 1. 1: Valeur des constantes d'inhibition des ligands pour CB1R et CB2R ..... | 67  |
| Table 2.1: Experimental design .....   | 136 |

## Liste des figures

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1.1 Structure du CB1R.....   | 32  |
| Figure 1.2 Distribution du CB1R dans le cerveau de la souris adulte.....  | 36  |
| Figure 1.3 Comparaison des séquences de CB1R et CB2R exprimées chez l'humain, le rat et la souris .....                                   | 51  |
| Figure 1.4 Métabolisme des endocannabinoïdes.....   | 62  |
| Figure 1.5 Structure du cône de croissance .....  | 76  |
| Figure 1.6 Progression du cône de croissance .....  | 79  |
| Figure 1.7 Les molécules de guidage régulant le développement des cellules ganglionnaires de la rétine .....                              | 92  |
| Figure 2.1 cAMP and retinal projection growth in vivo during development.   | 127 |
| Figure 2.2 Retinal projections density .....  | 129 |
| Figure 2.3 cAMP and PKA modulate RGC projection growth .....  | 131 |
| Figure 2.4 cAMP/PKA pathway and growth cone morphology.....   | 133 |
| Figure 2.5 Retinal projections in the VBN and the MGN.....  | 135 |
| Figure 3. 1 Expression of the eCB system in the developing visual system.....   | 181 |
| Figure 3.2 Pharmacological manipulation of the CB1R reorganizes the morphology of the GC and modulates axonal growth and navigation. .... | 183 |
| Figure 3. 3 The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway.....   | 185 |
| Figure 3.4 DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC.....  | 187 |
| Figure 3. 5 Pharmacological modulation of CB1R activity affects retinal projection development <i>in vivo</i> .....                       | 189 |
| Supp. Fig. 3.1 Expression of the CB1R and FAAH .....  | 191 |
| Supp. Fig. 3.2 CB1R activity and second-messenger cascades.....   | 193 |
| Supp. Fig. 3.3 DCC regulates CB1R induced reorganization of the GC. ....  | 195 |

|   |     |
|---|-----|
| Supp. Fig. 3.4 Intraocular injections and mechanism by which cannabinoids modulate GC steering.....   | 197 |
| Figure 4.1 Spatio-temporal Expression of the CB2R and eCB Metabolizing Enzyme During postnatal Retinal Projection Development.....                              | 238 |
| Figure 4.2 CB2R Reorganizes the growth cone Morphology.....   | 240 |
| Figure 4.3 CB2R Modulates Axon Length .....   | 242 |
| Figure 4.4 CB2R agonists influence growth cone behavior .....   | 244 |
| Figure 4.5 CB2R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector.....   | 246 |
| Figure 4.6 The DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB2R Induced Reorganization of the GC.....  | 248 |
| Figure 4.7 CB2R Modulates RGC Projection Development <i>In vivo</i> .....   | 250 |
| Figure 4.8 CB2R Modulates Eye-specific Segregation in the dLGN .....  | 252 |
| ANNEXE I Figure 1 Stimulation simultanée de CB1R et CB2R .....  | 299 |
| ANNEXE I Figure 2 L'agoniste et agoniste inverse de CB1R n'exercent pas d'effets sur les cônes des croissances de cultures neuronales CB1R <sup>-/-</sup> ..... | 301 |



**Liste des sigles et des abréviations**

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

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

2-AG: 2-arachidonylglycerol

AA: acides aminés

ACEA: arachidonyl-2'-chloroéthylamide

ACPA: arachidonylcyclopropylamide

ADF: actin-depolymerizing factor

AEA: arachidonoyléthanolamide

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

AON : noyau olfactif antérieur

BDNF: facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BLA : noyau amygdaloïde baso-latéral

Cb : cortex cérébral

CB1R: récepteur aux cannabinoïdes CB1

CB2R: récepteur aux cannabinoïdes CB2

CBD: cannabidiol

CCG : couches des CGRs

CCK: cholécystokinine

CCVD: canal calcique voltage-dépendant

Ce : noyau amygdaloïde central

Cg : cortex cingulaire

CGR: cellules ganglionnaires de la rétine

CNI : couche nucléaire interne

CPu : noyau caudé putamen

CS : colliculi supérieurs

DCC : « deleted in colorectal cancer »

DG : gyrus dentelé

DH : épine dorsale

DLF : funiculus dorso-latéral

eCB: endocannabinoïde

ENA/VASP: enabled / vasodilator-stimulated phosphoprotein

Ent: cortex entorhinal

EP: noyau entopédonculaire

FAAH: fatty acid amide hydrolase

GAD65: glutamic acid decarboxylase

GAP: GTPase-activating protein

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GL : couche granulaire du cervelet

GP : globus pallidus

Gr : couche granulaire du gyrus dentelé

HEK: cellules rénales embryonnaires humaines

Hi : hippocampe

HU-210: D<sup>8</sup>-THC-dimethylheptyl

IEG: gènes précoces

LI : couche laminaire I

Lli : couche laminaire interne II

Llo : couche laminaire externe II

Lm : « lacunosum molecular layer »

M1: cortex moteur primaire

MAPK: protéines kinases activées par des agents mitogènes

MGL: monoacylglycerol lipase

MGL: monoacylglycerol lipase

ML : couche synaptique du cervelet

Mo : couche synaptique du gyrus dentelé

MO : medulla oblongata

NAc : noyau accumbens

NAPE-PLD: *N*-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D

NAT: *N*-acyltransférase

NFL : neurofilament

Or: « stratum oriens »

PC : couche des cellules de Purkinje

PCR: réaction en chaîne par polymérase

PE: phosphatidyléthanolamine

PKA: protéine kinase A

Po : protubérance annulaire « pons »

Py : couche des cellules pyramidales

Ra : « stratum radiatum »

RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR

S1 : cortex somatosensoriel primaire

Shh : Sonic hedgehog

SNC: système nerveux central

SNR: substance noire

Th : thalamus

V1 : cortex visuel primaire

VMH : région ventro-médiane de l'hypothalamus

VP : pallidus ventral

## Remerciements

Ce travail n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse qui m'ont accueilli et fourni le cadre nécessaire à la réalisation de cette thèse.

J'exprime ma plus vive gratitude à Jean-François Bouchard, pour la confiance et la liberté que tu m'as accordée, pour ton encadrement durant toute la durée de cette thèse, pour ton enthousiasme contagieux pour la recherche, pour ta grande générosité sur le plan financier et ta disponibilité malgré ton travail (Toujours prêt à regarder les derniers résultats, répondre à une question de dernière minute, écrire une lettre de référence.... bref toujours disponible pour les étudiants). Je te remercie également pour avoir créé au sein de ton laboratoire une atmosphère de travail agréable et motivante.

J'adresse mes sincères remerciements à Maurice Ptito pour m'avoir conseillé une thèse en codirection avec le laboratoire de Jean-François Bouchard, pour ton esprit critique et ton optimisme, pour tes sages conseils (pas uniquement sur la recherche mais aussi sur la vie en général), ton expérience, pour ton sens de l'humour qui aide souvent à diffuser le stress

des étudiants face à une épreuve par exemple lors de mon examen prédoc. Je te remercie pour m'avoir poussé à terminer cette thèse sans m'« enliser »!

Je salue également les membres du laboratoire de Jean-François Bouchard qui m'ont apporté leur aide ou simplement contribué à créer une ambiance de travail plaisante durant les nombreuses heures de manips.

- Merci Gabriel pour ton travail acharné des deux dernières années. Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi.
- Merci Pierre pour le partage de cultures (cellulaires et générale sur la philo, l'histoire, la religion).
- Merci Nawal pour tes questions, commentaires et discussion sur mes résultats. Ce fut très enrichissant. Merci également pour ton aide précieuse en immunohisto, au confocal et durant le dernier sprint.
- Merci Sophie pour ton aide et patience. Je te remercie pour ta gestion du lab qui m'a permis de réaliser toutes ces expériences sans manquer de produits ou matériel.
- Merci à « Mr T » pour les nombreux gels

Je pense également aux membres des labos des Pr. Ptito, Pr. Casanova et Pr. Vaucher qui m'ont supporté de près ou de loin dans la réalisation de cette thèse. Merci Geneviève de m'avoir rapidement informé sur le fonctionnement des laboratoires de recherche 2<sup>ième</sup> étage. Je te remercie pour m'avoir aidé dans la réalisation de mes recherches malgré que je ne fasse pas partie de ton labo d'attache.

Je remercie les IRSC, FRSQ, l'UdeM et plus particulièrement l'école d'optométrie pour leur support financier.

Je salue l'équipe du secteur académique plus particulièrement Madame Malouin et Madame Homsy ainsi que les membres du secteur services professionnels et techniques Madame Gloin et Monsieur Latendresse pour l'aide qu'ils m'ont apporté tout au long de ma recherche.

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance envers ma famille pour m'avoir encouragé à réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier ma femme Stéphanie. Ton dévouement, ton support inconditionnel et ta patience tout au long de mon cheminement sont dignes de mention. Tu es une source inépuisable d'inspiration. Ton esprit critique ainsi que ton sens de l'observation m'ont beaucoup aidé dans ma recherche. Tu es formidable!

*À Stéphanie, Rafaelle Tsehäi et Gabrielle Cëiba*



## CHAPITRE 1

## 1.1 Introduction

Le chanvre aussi connu sous le nom latin de *cannabis sativa*, de la famille des Cannabinacées, figure parmi les plantes les plus anciennes que l'homme ait cultivées. Avant l'ère conventionnelle, le cannabis, plante dioïque, a été utilisé par plusieurs civilisations. Ainsi, c'est en Chine qu'ont été trouvés les premiers indices de son usage. Les données archéologiques et historiques mettent en évidence l'usage de la plante du cannabis il y'a plus de 4000 ans avant notre ère (Li, 1973). En effet, les fibres isolées à partir de la tige étaient utilisées dans la fabrication de cordes, de textiles et du papier. D'ailleurs, du tissu et du papier confectionnés à partir de cette plante ont été trouvés dans le tombeau de l'empereur Wu (104 – 87 av. notre ère) de la dynastie Han (Li, 1973). Durant cette même période, les graines de la plante étaient consommées comme nourriture. Jusqu'à ce jour, au Népal, les graines sont utilisées pour produire de l'huile de cuisson (Touw, 1981).

L'usage médicinal de la plante de cannabis remonte à plus de 5000 ans avant notre ère durant le règne de l'empereur Chen Nung (Hanus, 2009). L'usage pour des fins thérapeutiques du cannabis est rapporté dans le « Pen-t's'ao ching », la pharmacopée la plus ancienne au monde (Touw, 1981). Ainsi, cette plante était prescrite pour soigner la constipation, la douleur liée aux rhumatismes, des complications du système reproductif féminin et la malaria

(Touw, 1981). Encore aujourd'hui, les médecins chinois prescrivent les graines de cannabis comme laxatif pour soulager la constipation (Touw, 1981). Le cannabis était également utilisé de manière médicinale dans l'ancienne Égypte. Cet usage est clairement décrit dans le Papyrus Ebers, l'un des plus anciens et complets traités médicaux qui nous soient parvenus (Hanus, 2009).

La première mention de la consommation du cannabis comme drogue psychotrope est dans le Pen-ts'ao ching. Cependant, à l'encontre de l'usage médicinal, la consommation de cette plante comme agent psychotrope a été rarement rapportée dans les textes de l'ancienne Chine car de tels usages étaient associés au chamanisme, une religion interdite durant la dynastie Han (Zuardi, 2006). Par contre, en Inde, le cannabis était couramment employé comme médicament et drogue récréative plus de 1000 ans avant notre ère. En effet, cet usage répandu du cannabis est en partie à cause de son association avec la religion. De manière thérapeutique, la plante était utilisée notamment comme analgésique, anticonvulsivant, tranquillisant, antibiotique, anti-inflammatoire, stimulant pour l'appétit et la digestion (Touw, 1981).

Du début de l'ère chrétienne jusqu'au 18e siècle, l'usage médicinal du cannabis était courant en Inde et fut répandu vers le Moyen-Orient. Les textes musulmans font mention de cette plante comme un agent diurétique et un antifatulent. La plante a été introduite en Afrique au 15e siècle par des

commerçants arabes et aux Amériques au 16e siècle par des esclaves africains. Ainsi, elle fut, en premier, introduite au Brésil par des africains provenant de l'Angola (Zuardi, 2006). En Europe, durant cette période, le cannabis était cultivé exclusivement pour ses fibres.

Le cannabis a été officiellement introduit dans la médecine occidentale au milieu du 19e siècle par le médecin irlandais William B. O'Shaughnessy et par le psychiatre français Jacques-Joseph Moreau. Le premier est entré en contact avec la plante en Inde et le deuxième, lors de ses multiples voyages au Moyen-Orient. Les travaux d'O'Shaughnessy et Moreau sur les vertus médicinales et psychotropes de la plante ont grandement influencé la médecine occidentale (Zuardi, 2006). Entre la deuxième moitié du 19e et le début du 20e siècle, l'usage médicinal du cannabis a atteint son apogée et s'est répandu dans toute l'Europe et l'Amérique du Nord. Des laboratoires comme Merck (Allemagne), Burroughs-Wellcome (Angleterre), Bristol-Meyers Squibb (États-Unis) commercialisaient des extraits de plante de cannabis. Au début du 20e siècle, la plante était utilisée comme sédatif et analgésique, pour augmenter l'appétit et la digestion, contre le diabète, les palpitations cardiaques, l'impuissance.

L'usage du cannabis par la médecine occidentale a grandement diminué durant la première décennie du 20<sup>ième</sup> siècle à cause de la difficulté à obtenir des effets reproductibles mais aussi dû à l'apparition de médicaments

plus spécifiques et efficaces. De plus, la mise en place de nombreuses restrictions légales limitait l'usage du cannabis pour des fins thérapeutiques et expérimentales. En 1937, les États-Unis ont adopté le « Marihuana Tax Act » obligeant ainsi tout individu qui fait usage du cannabis à payer des taxes. Cette plante fut finalement retirée de la pharmacopée états-unienne en 1941 (Zuardi, 2006). À partir de 1960, l'usage du cannabis pour des fins récréatives s'est rapidement répandu chez les jeunes aux États-Unis. Ainsi, entre 1965 et 1980, le pourcentage de jeunes qui ont consommé du cannabis est passé de 5 à 68% (Zuardi, 2006). En 1964, le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), le principal constituant actif de la plante du cannabis, a été isolé par Gaoni et Mechoulam (1964). Cette découverte a grandement contribué à l'intérêt manifesté par la communauté scientifique vis-à-vis cette plante. Le nombre de publication sur le cannabis a connu une croissance fulgurante durant les dix années qui ont suivi l'identification du  $\Delta^9$ -THC. À partir du milieu des années 70, les recherches sur le cannabis ont connu un ralentissement marqué. Ce n'est qu'à partir des années 90 que la communauté scientifique a retrouvé son intérêt pour cette plante. En effet, l'identification et le clonage des récepteurs aux cannabinoïdes et l'isolation de l'anandamide, l'un des principaux cannabinoïdes endogènes (endocannabinoïdes), ont éveillé la curiosité des chercheurs. Depuis, cette plante n'a cessé de susciter l'intérêt des scientifiques. Les pages qui suivent vont traiter du système endocannabinoïde

(eCB) et des rôles fonctionnels qui lui sont attribués au cours du développement du système nerveux central (SNC).

## **1.2 Le système endocannabinoïde**

Durant plusieurs siècles, les bases biologiques et moléculaires des effets thérapeutiques et psychotropes attribués à la plante de cannabis sont restées obscures et méconnues. À la fin du 19e siècle, le premier phytocannabinoïde a été isolé à partir de l'huile rouge extrait de la plante de cannabis. La structure de la cannabinoïde a été mise en évidence dans les années 1930 et a été synthétisée pour la première fois en 1940 (Pertwee, 2006). Cette même année, un deuxième constituant, sans effet psychotrope, le cannabidiol (CBD) a été mis en évidence.

À partir de la deuxième moitié du 20e siècle, les recherches sur l'identification des éléments actifs de la plante se sont intensifiées. Ainsi, la structure du CBD a été révélée par Mechoulam et Shavo (1963). Le principal constituant psychotrope de la plante, le THC, a été identifié par chromatographie sur colonne l'année suivante par Gaoni et Mechoulam (1964). Sa structure et sa stéréochimie ont été rapportées en 1967 par la même équipe (Mechoulam and Gaoni, 1967). Il est maintenant connu que la plante de cannabis contient au moins 66 composés cannabinoïdes (Pertwee,

2006). Les études subséquentes se sont concentrées sur la pharmacologie des cannabinoïdes à cause principalement de l'usage répandu du cannabis comme drogue récréative. Ces recherches ont mis en évidence les propriétés psychotropes du  $\Delta^9$ -THC ainsi que la nature stéréosélective de la molécule. Ainsi, les effets psychotropes sont principalement causés par le (-)- $\Delta^9$ -THC qui est naturellement présent dans la plante. Tandis que son énantiomère (+)- $\Delta^9$ -THC, synthétisé en laboratoire, n'entraîne pas d'effet psychotrope (Pertwee, 2006).

La nature lipophile du THC a poussé certains chercheurs à émettre l'hypothèse que cette molécule entraînait ses effets psychotropes en perturbant de manière non spécifique la membrane cellulaire. Cette hypothèse était principalement soutenue par la capacité des cannabinoïdes à provoquer des changements des propriétés physiques des membranes artificielles contenant uniquement du cholestérol et des phospholipides. Cependant, l'influence de la structure chimique sur l'activité pharmacologique des THC psychotropes, leur nature stéréosélective et la comparaison de la puissance des effets du THC à des agonistes pour lesquels des récepteurs ont déjà été répertoriés ont amené à privilégier la thèse de la présence d'un récepteur spécifique aux cannabinoïdes. Or, le développement de nouveaux outils expérimentaux comme le cannabinoïde synthétique CP55940 lié à un radioligand ( $[^3\text{H}]$ -CP55940) a permis de détecter des sites de liaison avec haute

affinité dans les membranes du cerveau de rat (Pertwee, 2006). Le fait que CP55940 déplaçait les [<sup>3</sup>H]-CP55940 de leurs sites de liaison pour provoquer l'inhibition de l'adénylate cyclase par le biais d'une protéine G<sub>i/o</sub> et que ces données corrélaient avec les réponses *in vivo* aux effets psychotropes chez la souris a permis de supposer avec conviction que les cannabinoïdes agissaient par le biais d'un récepteur et que ce dernier était lié à une protéine G. Cette suggestion a été confirmée par le clonage, en 1990, du premier récepteur aux cannabinoïdes le CB1 (CB1R) et du second, le CB2 (CB2R) en 1993 (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993).

La découverte des récepteurs aux cannabinoïdes CB1R et CB2R a soulevé l'intérêt de la communauté scientifique pour les ligands endogènes de ces récepteurs. Subséquemment, l'arachidonoyléthanolamide (AEA), le premier eCB, a été isolé dans le cerveau de porc (Devane et al., 1992). L'AEA aussi connu sous anandamide; une contraction du mot sanskrit « ananda » qui signifie bonheur et d'amide pour sa fonction chimique, est un agoniste partiel des CB1R et CB2R. Le deuxième eCB à être identifié est le 2-arachidonyleglycerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). L'AEA et le 2-AG sont dégradés par les enzymes « fatty acid amide hydrolase (FAAH) » et « monoacylglycerol lipase (MGL) » et synthétisés par *N*-acylphosphatidyléthanolamine-hydrolyzing phospholipase D (NAPE-PLD) et diacylglycérol lipase, respectivement. Ces travaux ont ainsi permis



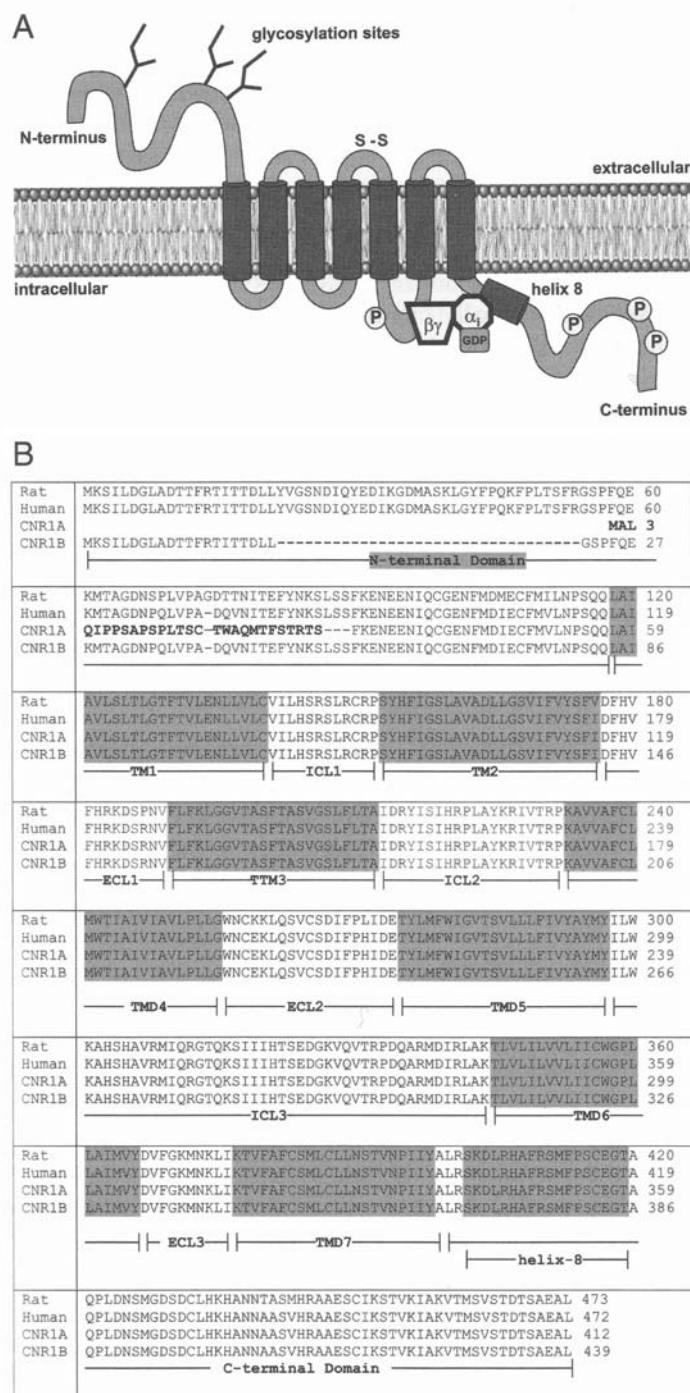
l'identification du système eCB comprenant les récepteurs (CB1R, CB2R), les eCBs (AEA et 2-AG), les enzymes de dégradation (FAAH et MGL) et les enzymes de synthèse qui demeurent encore mal connues.

### **1.2.1 Le récepteur aux cannabinoïdes CB1**

Le système eCB joue un rôle primordial dans la régulation de divers processus physiologiques fondamentaux tels l'inflammation, la cognition, le contrôle de l'alimentation et la nociception (Mackie, 2006; Mackie and Stella, 2006; Köfalvi, 2008; Cabral and Griffin-Thomas, 2009; Pertwee, 2009). Les phytocannabinoïdes, eCBs et leurs agonistes synthétiques induisent leurs effets sur les cellules par le biais d'au moins trois types de récepteurs : CB1R, CB2R et le récemment identifié GPR55 (Mackie, 2006; Ryberg et al., 2007). Parmi les récepteurs aux cannabinoïdes, le CB1R est exprimé de manière abondante dans le SNC. Celui-ci est particulièrement localisé sur des axones pré-synaptiques des neurones GABAergiques et glutamatergiques avec une plus faible concentration au niveau du corps cellulaire de ces neurones.

### 1.2.1.1 Structure

Le CB1R fait partie de la grande famille des récepteurs liés à une protéine G (GPCR), comprenant 7 domaines à passage transmembranaire (Figure 1.1A). Ce récepteur qui a été cloné pour la première fois en 1990 à partir du cerveau de rat compte plus de 473 acides aminés (AA) (Figure 1B; (Matsuda et al., 1990). La version du récepteur codée par la souris comporte également 473 AA (Chakrabarti et al., 1995) tandis que celui par l'humain compte 472 AA (Figure 1.1B; (Gerard et al., 1990). Il y'a plus de 97% de similarité dans la séquence des AA de ces trois variantes du CB1R. Par ailleurs, le CB1R exprime par rapport au CB2R une homologie au niveau de la séquence des AA de près de 68% au niveau des domaines transmembranaires et de 44% lorsqu'on considère la séquence d'AA en sa totalité (Munro et al., 1993).



**Figure 1.1. Structure du CB1R**

(Image tirée de *Cannabinoids and the Brain*, Köfalvi 2008)

### 1.2.1.2 Distribution

Le CB1R est exprimé, à des concentrations variables, dans les régions du cerveau qui corrèlent bien avec les effets observés lors de la consommation de cannabinoïdes. Toutefois, la localisation du récepteur varie en fonction de la technique expérimentale employée pour le révéler. Ainsi, les premières études ont démontré à l'aide du [<sup>3</sup>H]-CP55940 la présence d'une forte concentration de CB1R dans l'hippocampe, plus particulièrement dans la couche synaptique du gyrus dentelé et la région CA3, 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 et al., 1991; Mailleux et al., 1992). Le CB1R est modérément exprimé dans d'autres régions du proencéphale et quelques noyaux du tronc cérébral et de la moelle épinière dont le cortex cérébral (avec une plus forte concentration dans le cortex frontal et pariétal), l'amygdale, l'hypothalamus, les racines postérieures de la moelle épinière. Le thalamus et les racines antérieures de la moelle démontrent une faible concentration de CB1R (Kano et al., 2009).

À la suite du clonage du CB1R, de nombreuses études ont décrit l'expression du CB1R dans le SNC à l'aide de techniques d'hybridation *in situ*

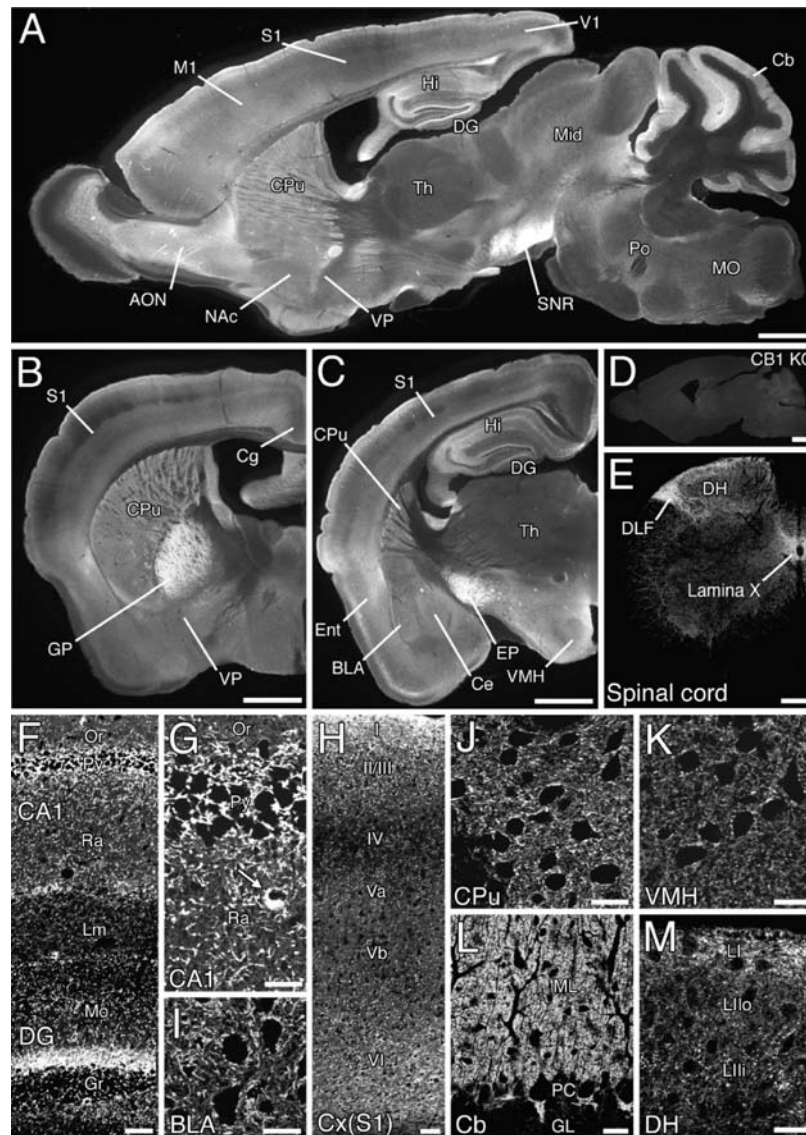
(Mailleux et al., 1992; Matsuda et al., 1993). Ces études ont mis en évidence plusieurs caractéristiques. Premièrement, malgré la présence du récepteur en forte concentration dans le système nerveux, celui-ci est localisé selon deux patrons d'expression soit uniforme ou non-uniforme dépendamment des régions du cerveau (Matsuda et al., 1993). Les marquages uniformes résultant de l'expression d'ARNm du CB1R sont particulièrement importants dans les populations de neurones du striatum, thalamus, hypothalamus, cervelet et la partie inférieure du tronc cérébral (Figure 1.2). À l'opposé, une expression non-uniforme de l'ARNm; i.e. une expression uniquement dans certains types de neurones a été observée au niveau du cortex cérébral, l'hippocampe et l'amygdale. Ainsi, dans ces régions, le CB1R est présent avec une forte concentration dans les interneurones positifs à la cholécystokinine (CCK, un neuropeptide dont les récepteurs sont largement exprimés dans le SNC), est absent des interneurones positifs à la parvalbumine (une protéine marquant les neurones GABAergiques) et est en faible concentration dans les neurones excitateurs (Matsuda et al., 1993; Tsou et al., 1999; Hohmann and Herkenham, 2000; McDonald and Mascagni, 2001; Kawamura et al., 2006).

Deuxièmement, le CB1R est localisé de manière préférentielle au niveau des structures pré-synaptiques. Ainsi, la distribution de l'ARNm du CB1R ne corrèle pas tout le temps avec la localisation de la protéine révélée par immunohistochimie. Par exemple, un important marquage

immunohistochimique est observé dans les faisceaux de neurones desservant le striatum et la substance noire sans toutefois la présence de l'ARNm du récepteur dans ces neurones.

Troisièmement, au niveau des éléments pré-synaptiques, le CB1R est focalisé dans les parties pérисynaptiques de l'axone que dans les parties synaptique et extrasynaptique de l'axone (Kawamura et al., 2006).

Quatrièmement, les synapses inhibitrices ont, généralement, une plus forte concentration de CB1R que les synapses excitatrices. Cette différence du niveau d'expression de CB1R entre les synapses inhibitrices et excitatrices varie d'une région à l'autre. Par exemple, le niveau de CB1R est 30 fois plus important dans les synapses inhibitrices que les synapses excitatrices de l'hippocampe (Kawamura et al., 2006; Kano et al., 2009).



**Figure 1.2. Distribution du CB1R dans le cerveau de la souris adulte.**

A-D : Tranches de cerveau parasagittale (A et D) et coronale (B et C) démontrant la distribution de CB1R. Les tissus de cerveau sauvages (A-C) et mutants (D) ont été traités à l'aide d'un anticorps dirigé contre le groupement carboxylique de CB1R de la souris. E : Marquage de CB1R au niveau de la moelle épinière. F-M: Photomicrographes démontrant la présence de CB1R dans l'hippocampe (F et G), le gyrus dentelé (F), le cortex somatosensoriel primaire (H), le noyau amygdalien (I), putamen (J), l'hypothalamus (K), le cortex du cervelet (L), et la moelle épinière (M). Échelle : 1mm (A-C et E); 200µm (D); 50µm (F et H); 20µm (G, I, J-M).

(Image tirée de Kano et al., 2009)

La distribution sous-cellulaire du CB1R a été investiguée par des techniques d'hybridation *in situ*, d'immunofluorescence et de microscopie électronique dans le cerveau du rat et de la souris adultes. Par conséquent, au niveau de l'hippocampe, l'ARNm du CB1R est exprimé avec une forte concentration par les interneurones positifs au « glutamic acid decarboxylase » (GAD65; un marqueur de neurones GABAergiques) et à la cholécystokinine (CCK) (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993; Marsicano and Lutz, 1999). Ces interneurones contiennent également la protéine qui est localisée de manière abondante au niveau des axones et des terminaisons qui entourent les neurones pyramidaux (Figure 1.2 F et G) (Katona et al., 1999). Malgré la présence en faible concentration de l'ARNm du récepteur CB1 dans les neurones pyramidaux, pendant longtemps, le CB1R n'avait pas été détecté au niveau de corps cellulaire et de l'axone. Cependant, le développement d'un anticorps contre le CB1R avec titre élevé a permis de détecter la présence du récepteur au niveau des terminaisons excitatrices (Kawamura et al., 2006). Par ailleurs, le CB1R est également exprimé par les neurones sérotonergiques de la région CA3 de l'hippocampe (Häring et al., 2007).

Au niveau du gyrus dentelé, une expression élevée de l'ARNm du récepteur CB1 est observée dans les interneurones positifs au GAD65. La majorité de ceux-ci expriment également la CCK (Marsicano and Lutz, 1999).



Conformément, la protéine CB1R est localisée au niveau des corps cellulaires et des terminaisons axonales immunomarquées pour le GABA et la CCK. L'ARNm est aussi présent dans les neurones excitateurs du gyrus dentelé. Le CB1R est quant à lui localisé au niveau des terminaisons de ces neurones de la couche synaptique (Figure 1.2 F). À l'opposé, les neurones formant la couche granulaire n'expriment pas l'ARNm ni la protéine du CB1R (Kano et al., 2009).

Le CB1R est également exprimé dans le cortex cérébral. Sa présence est importante au niveau des cortex somatosensoriel, moteur et visuel primaires (Figure 1.2 A-C). Dans ces régions, l'ARNm du récepteur est exprimé uniquement par les gros interneurons positifs à la CCK et à la calbinidin (Marsicano and Lutz, 1999). Le CB1R est ainsi localisé au niveau des terminaisons inhibitrices et des axones qui entourent les neurones pyramidaux. Récemment, il a été démontré que le CB1R et son ARNm sont exprimés par les neurones pyramidaux (Egertová and Elphick, 2000; Lafourcade et al., 2007). De plus, le CB1R et son ARNm sont exprimés de manière laminaire dans le cortex cérébral. Ainsi, l'ARNm est surtout localisé dans les neurones des couches II, III, V et VI (Matsuda et al., 1993; Marsicano and Lutz, 1999). À l'opposé de l'ARNm, l'expression laminaire de la protéine CB1R varie en fonction de la région corticale. Chez le rongeur, le CB1R est présent avec une forte concentration au niveau des couches II, III, Va et VI

dans le cortex somatosensoriel (Figure 1.2 A-C et H) et des couches II et VI dans le cortex entorhinal (Figure 1.2 C) (Tsou et al., 1998).

Au niveau de l'amygdale, l'ARNm est fortement concentré dans les interneurons du noyau basolatéral exprimant la CCK ou la calbindin. Le CB1R est localisé au niveau des terminaisons inhibitrices (Marsicano and Lutz, 1999). La concentration de CB1R est faible au niveau des neurones pyramidaux du noyau amygdaloïde basolatéral (Figure 1.2 C).

L'ARNm du CB1R est présent de manière uniforme et avec une forte concentration dans le striatum et l'hypothalamus. Les principaux interneurons à exprimer l'ARNm dans le striatum sont ceux immuno-positifs pour la GAD65. Contrairement, l'ARNm n'est pas détecté dans les interneurons immuno-positifs pour la GAD65 ou CCK de l'hypothalamus (Marsicano and Lutz, 1999). En effet, l'ARNm du CB1R est surtout présent dans les neurones hypothalamiques produisant des hormones. De plus, l'ARNm est exprimé par les neurones de l'hypothalamus impliqués dans la régularisation de la prise de nourriture (Cota et al., 2003).

Dans le cervelet, l'ARNm de CB1R est fortement exprimé dans les couches granulaires sans toutefois qu'une présence importante du récepteur soit observée (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Egertová and Elphick, 2000). Par contre, le récepteur est densément exprimé dans les cellules

Purkinje de la couche synaptique (Figure 1.2 L). Cependant, la densité du CB1R est cinq fois plus élevée dans les interneurons inhibiteurs que dans les cellules de Purkinje (Kawamura et al., 2006).

Les neurones ganglionnaires de la racine dorsale de la moelle épinière expriment également l'ARNm du récepteur CB1 (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992). Le CB1R est localisé dans la lamina I et III (Figure 1.2 E et M) (Farquhar-Smith et al., 2000).

### **1.2.1.3 Voie de signalisation**

Les agonistes classiques tels le THC, le HU210 et les non classiques comme le CP55940 ainsi que le WIN55212-2, l'AEA et le 2-AG interagissent avec le CB1R en se logeant dans le pore formé par les domaines transmembranaires (Mukhopadhyay et al., 2002). Tandis que les trois boucles intracellulaires du CB1R ainsi qu'une quatrième boucle formée par la région C-terminale participent à l'activation des protéines G (Nie and Lewis, 2001). Cette interaction entre le CB1R et la protéine  $G_{i/o\alpha}$  a été démontrée par la capacité de la toxine pertussis (PTX) à bloquer les voies de signalisation traduisant les effets des cannabinoïdes (Pertwee, 1997; Howlett et al., 2002). Par ailleurs, il également été démontré dans les cellules prétraitées avec la

PTX, le CB1R se liait à la protéine  $G_s$  (Bonhaus et al., 1998). Cependant, l'effet résultant de ce lien est considérablement plus faible que celui avec  $G_{i/o}$ .

La liaison entre le CB1R et son agoniste régule, par le biais de la protéine  $G_{i/o\alpha}$ , plusieurs voies de signalisation (Mackie, 2006). Ainsi, le CB1R module l'activité de l'adénylate cyclase, des MAP kinases (MAPK), certains canaux ioniques et la concentration d'ions calciques intracellulaires ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Demuth and Molleman, 2006). La section qui suit va porter sur l'interaction entre le CB1R et ces voies de signalisation.

#### **1.2.1.3.1 Régulation de l'adénylate cyclase**

La régulation de l'activité de l'adénylate cyclase par le CB1R a été la première voie de signalisation décrite. Ainsi, il a été démontré, à l'aide de lignées de cellules du neuroblastome, que le  $\Delta^9$ -THC causait l'inhibition de l'adénylate cyclase (Howlett and Fleming, 1984). Cette réponse est bloquée par la PTX confirmant l'interaction entre le CB1R et la protéine  $G_{i/o}$ . Cette inhibition de l'adénylate cyclase entraîne une réduction du niveau d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire et par le fait même diminue la phosphorylation de la protéine kinase A (PKA). Les cannabinoïdes ont également réduit le niveau d'AMPC des cellules CHO transfectées de CB1R exogènes et ce de manière dépendante à la PTX et au SR141716A; un agoniste

inverse du CB1R (Felder et al., 1993). Les régions du cerveau qui expriment densément le CB1R sont celles démontrant une forte inhibition de l'adénylate cyclase par les cannabinoïdes. En effet, une diminution des taux d'AMPC a été observée au niveau de tranches d'hippocampe, de striatum, de cortex cérébral et de cervelet chez le rat (Bidaut-Russell et al., 1990). Toutefois, cette inhibition de l'adénylate cyclase par les eCBs dépend de l'isoenzyme exprimé par le tissu. Ainsi, neuf variantes de l'enzyme (AC-I à AC-IX) ont été identifiées chez les mammifères (Sadana and Dessauer, 2009). L'AC-I est généralement exprimée par le cerveau et est stimulée par le  $Ca^{2+}$ /calmoduline et est inhibée par les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  et  $G_{i/o}$ . L'AC-VIII est uniquement présente dans le cerveau et est stimulée par  $Ca^{2+}$ /calmoduline. L'AC-II, IV et VII sont activées par la sous-unité  $G_{\beta\gamma}$  suggérant la présence de  $G_{s\alpha}$ . L'AC-V et VI sont localisées dans le cerveau et le cœur et sont inhibées par  $G_{i/o}$  et de faible concentration de  $Ca^{2+}$  tandis que l'AC-III est stimulée par une forte concentration de  $Ca^{2+}$ /calmoduline en présence de  $G_{s\alpha}$ . L'AC-IX est surtout exprimée par les muscles squelettiques et le cerveau et affectée uniquement par  $G_{s\alpha}$  (Patel et al., 2001). Parmi ces isoenzymes, AC-I, II, III, V, VIII et IX ont été localisées au niveau de la couche ganglionnaire de la rétine. De plus, AC-I et VIII sont exprimées au niveau du corps genouillé latéral dorsal (CGLd) et ainsi que AC-I, II et VIII au niveau des colliculi supérieurs (CS; (Nicol et al., 2006). Cette diversification de l'adénylate cyclase influence grandement la réponse

cellulaire aux cannabinoïdes. Ainsi, les isoformes I, V, VI et VIII sont inhibées tandis que les isoenzymes II, IV et VII sont activées par les cannabinoïdes (Rhee et al., 1998). Ces résultats mettent en évidence les effets opposés du CB1R sur l'activité de l'adénylate cyclase qui varient en fonction de la forme de l'enzyme et du tissu. La diversification des isoenzymes ainsi que la capacité de CB1R de se lier à une  $G_s$  et  $G_{i/o}$  permettent un contrôle plus singulier des effets des cannabinoïdes. Cet effet de CB1R sur l'adénylate cyclase et par le fait même sur le niveau d'AMPc intracellulaire influence profondément l'activité cellulaire. En effet, la voie de signalisation AMPc/PKA est responsable de la régulation de plusieurs processus physiologiques telles l'expression de gènes, la croissance cellulaire, la plasticité synaptique, l'activité de canaux ioniques dans presque tous les tissus (Sadana and Dessauer, 2009).

#### **1.2.1.3.2 Régulation des kinases activées par des agents mitogènes**

Tout comme l'AMPc/PKA, la voie de signalisation des MAPK régule plusieurs processus cellulaires dont la migration, la croissance et l'apoptose. Cette cascade mécanistique est généralement activée par des récepteurs liés à une tyrosine kinase. Par conséquent, l'activation de la protéine G intracellulaire Ras déclenche la cascade en activant la kinase sérine/thréonine Raf (MAPKKK), qui à son tour active MEK (MAPKK). MEK active par la suite

MAPK qui phosphoryle de nombreuses protéines cytoplasmiques et nucléaires.

Malgré la présence de nombreux questionnements sur la nature des messagers intracellulaires des cannabinoïdes, des études ont mis en évidence l'interaction qui existe entre le CB1R et les MAPK. Ainsi, dans les astrocytomes humains et les cellules CHO exprimant le CB1R cultivées *in vitro*, les agonistes aux cannabinoïdes HU210 et CP55940 activent la p42/44 MAPK (Mukhopadhyay et al., 2002). Cette activation est bloquée par la PTX et l'agoniste inverse du CB1R, le SR141716A. L'activation des MAPK par le THC et l'HU210 a également été observée dans des cultures primaires d'astrocytes provenant du rat et dans des lignées cellulaires de gliome C6 et de neuroblastome N18TG2 (Mukhopadhyay et al., 2002).

*In vivo*, plusieurs études ont rapporté l'activation des MAPK par les cannabinoïdes. Ainsi, le THC active de manière progressive le MAPK p42/p44 au niveau de striatum dorsal et du noyau accumbens chez le rat (Valjent et al., 2001) et dans l'hippocampe (Derkinderen et al., 2003), le striatum et le cervelet (Rubino et al., 2004) des rongeurs. De plus, le CP55940, le WIN55212-2, l'AEA et le 2-AG activent le MAPK p38 dans l'hippocampe du rat (Demuth and Molleman, 2006). Ces effets passent par le CB1R car ils sont bloqués par le SR141716A. En plus de cela, ces agents pharmacologiques n'ont pas d'effets

significatifs chez les souris dont le CB1R a été muté et rendu dysfonctionnel (Derkinderen et al., 2001).

Les mécanismes par lesquels le CB1R active les MAPK ne sont pas entièrement connus. Toutefois, les données expérimentales accumulées écartent la possibilité que le CB1R agisse par le biais de la tyrosine kinase. Présentement, deux cascades mécanistiques sont proposées pour expliquer l'interaction entre CB1R et les MAPKs. La première implique l'activation de la kinase phosphoinositol-3 (PI3K) et cette dernière agirait en phosphorylant la MAPKKK Raf -1. PI3K produirait son effet par le biais de la PKB aussi connue sous le nom d'Akt (Demuth and Molleman, 2006). Le THC et le CP55940 activent la PKB dans la lignée cellulaire d'astrocytomes U373MG (Mukhopadhyay et al., 2002). Cette activation passe par le CB1R car elle est bloquée par le SR141716A. La deuxième voie proposée implique la synthèse de céramides à partir de sphingomyélines hydrolysées et l'activation subséquente de Raf-1. Le THC stimule, par le biais du CB1R, la synthèse de céramides dans la lignée de cellules de gliome C6 (Galve-Roperh et al., 2000).

Le CB1R peut également réguler l'activité des MAPKs de manière indirecte. Ainsi, la forskoline et la 8-bromo-AMPC, un analogue de l'AMPC, inhibent l'activité basale des MAPKs mais aussi réduisent de manière significative les capacités stimulatrices de l'AEA et le 2-AG vis-à-vis les MAPKs (Melck et al., 1999). De plus, le prétraitement des tranches d'hippocampe de



rat au 8-bromo-AMPC a empêché l'activation des MAPK par l'AEA et le 2-AG (Derkinderen et al., 2003). Ces réactions sont réversibles sous l'action du H89, un inhibiteur sélectif à la PKA. Ces données suggèrent qu'une baisse du niveau d'activité de la PKA suite à une diminution du niveau d'AMPC intracellulaire peut stimuler l'activation des MAPKs par le CB1R.

La voie de signalisation MAPK entraîne l'expression des « immediate early genes (IEG) ». Ainsi, il a été démontré que le THC provoquait, dans l'hippocampe de souris, l'expression des produits des IEG comme le *krox-24* et le *c-Fos* ainsi que le facteur de croissance BDNF. Et cette augmentation d'expression est bloquée lorsque MAPK est inhibée (Derkinderen et al., 2003). Le BDNF et le *krox-24* jouent un rôle important lors de la plasticité synaptique. Par conséquent, la régulation de l'expression génique par l'activation des MAPKs est un mécanisme physiologique par lequel les cannabinoïdes influencent la plasticité synaptique.

#### **1.2.1.3.3 Modulation des canaux ioniques**

Les cannabinoïdes modulent, généralement par le biais du CB1R et par fois directement, l'activité de canaux calciques et potassiques. La régulation des canaux ioniques voltage-dépendant particulièrement les canaux calciques de type N et P/Q et les canaux potassiques Kir et A semble être le mécanisme par lequel les cannabinoïdes diminuent la libération de neurotransmetteurs

dans la fente synaptique. Ainsi, l'AEA, le CP55940 et le WIN55212-2 bloquent les canaux calciques voltage-dépendant (CCVD) de type N résultant par une baisse de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule (Mackie and Hille, 1992). Cet effet est médié par une protéine  $G_{i/o}$  car le prétraitement des neurones à l'aide de la PTX la bloque. De plus, l'AMPC n'intervient pas dans cette cascade car l'addition du 8-bromo-AMPC ne renverse pas l'inhibition des CCVD (Mackie et al., 1993).

Les CCVD de type P/Q sont également inhibés par l'AEA induisant une diminution de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette réponse passe par le CB1R lié à une protéine  $G_{i/o}$  car elle est bloquée par le SR141716A et la PTX. La baisse de courant calcique de type P/Q a été observée dans une lignée de cellules cancéreuses pituitaires AtT-20 exprimant des CB1R exogènes (Mackie et al., 1995) ainsi que dans les préparations de tranches de cortex et de cervelet de rat (Hampson et al., 1998). Par ailleurs, l'inhibition de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  varie en fonction de la concentration des cannabinoïdes. À cet égard, le WIN55212-2, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, inhibe seulement 17% du courant calcique. Une concentration de l'ordre du micromolaire accentue l'inhibition. De plus, le WIN55212-3, un stéréoisomère inactif, bloque le courant calcique à des concentrations micromolaires. Par contre, à cette concentration, l'effet est insensible au SR141716A. Par conséquent, cela ne

ne passe pas par le CB1R suggérant la possibilité d'une action directe des cannabinoïdes sur les canaux calciques (Demuth and Molleman, 2006).

La stimulation de CB1R par ses agonistes module aussi plusieurs types de canaux potassiques dont les canaux potassiques à courant entrant liés à une protéine G (GIRK) et les canaux potassiques de type A. Dans ce cas, le WIN55212-2 a entraîné un courant potassique entrant dans une lignée de cellules cancéreuses pituitaires AtT-20 (Mackie et al., 1995). Outre cette action, le WIN55212-2 et CP55940 ont inhibé la voie de signalisation glutamatergique au niveau du noyau accumbens de la souris (Robbe et al., 2001). Cette réponse s'est avérée dépendante du CB1R car elle est bloquée par le SR141716A. De plus, les ions de baryum ( $Ba^{2+}$ ), des bloqueurs de canaux potassiques, ont renversé l'inhibition causée par les agonistes du CB1R. Par conséquent, l'activation des GIRK semble être le mécanisme par lequel les cannabinoïdes inhibent la libération de neurotransmetteurs. L'inhibition de la libération de glutamate ne dépend pas de la voie de signalisation AMPc/PKA car la forskoline n'a pas eu d'effet sur les actions du CB1R. Cependant, la protéine kinase C (PKC) inhibe l'activation des GIRKs par les cannabinoïdes (Garcia et al., 1998). Celle-ci perturbe l'activation des canaux potassiques en phosphorylant le CB1R.

Par ailleurs, le WIN55212-2 a augmenté le courant potassique sortant de type A dépendant du voltage ( $I_A$ ) et diminué celui sortant de type D ( $I_D$ ) (Mu

et al., 1999). Ces réponses dépendent de la concentration de l'agoniste, du SR141716A et du PTX démontrant l'implication du CB1R. La réduction de l'AMPC/PKA causée par les cannabinoïdes est le mécanisme par lequel  $I_A$  et  $I_D$  sont affectés. Cela suppose que la phosphorylation des canaux  $K^+$  inhibe  $I_A$  tandis qu'une diminution de PKA renverse la situation. À cet égard, les inhibiteurs de la PKA miment les effets du WIN55212-2 tandis que les activateurs de PKA comme le 8-bromo-AMPC induisent l'effet contraire. Sur le plan physiologique, la régulation des canaux potassiques par les cannabinoïdes est un mécanisme par lequel la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs est bloquée au niveau des synapses GABAergiques et glutamatergiques.

### **1.2.2 Le récepteur aux cannabinoïdes CB2**

Le CB2R a été initialement révélé dans les cellules formant le système immunitaire. Or, l'apparition d'anticorps polyclonaux purifiés par affinités dirigés contre les acides aminés 1-33 et 20-33 de la partie N-terminale et de la partie C-terminale du CB2R a permis l'étude plus approfondie de son expression dans le SNC.

### 1.2.2.1 Structure

Le CB2R a été cloné à partir d'une lignée cellulaire HL-60; lignée de cellules humaines de leucémie aiguë promyélocitaire (Munro et al., 1993). Le CB2R humain est un récepteur couplé à une protéine G et comporte 360 AA (Figure 1.3). Celui-ci a été cloné chez la souris (Shire et al., 1996) et le rat (Griffin et al., 2000). L'homologie entre les séquences d'AA du CB2R et du CB1R humains est de 44%. Celle-ci augmente à 68% lorsqu'on considère uniquement les 7 domaines transmembranaires. Le niveau d'homologie est beaucoup plus important lorsqu'on compare le CB2R à travers différentes espèces. Ainsi, le CB2R exprimé chez la souris comporte 13 AA de moins dans la partie du groupement carboxyl terminal et sa séquence d'AA possède 82% d'homologie par rapport au CB2R humain (Kano et al., 2009). Le CB2R synthétisé chez le rat a 50 AA de plus que la version présente chez l'homme (Köfalvi, 2008).

```

hCB1 mksildgladttfrtittddllyvgsndiqyedikgmasklgyfpqkfp1 50
rCB1 mksildgladttfrtittddllyvgsndiqyedikgmasklgyfpqkfp1 50

hCB1 tsfrgspfqekmtagdnppqlvpa.dqvnITEfyNkSlssFkeNeeniqcg 99
rCB1 tsfrgspfqekmtagdnspvpagdttnITEfyNkSlssFkeNeeniqcg 100
hCB2 .....meecwvTEiaNgSkdgLdsN..... 20
mCB2 .....megcreTEvtNgSnggLefN..... 20
          * * * * *

          TM1
hCB1 enfmdiecfMvLnpsQqlAiAVLslt1GtftvLEN11VLcvILhSrsLRc 149
rCB1 enfmdmecfMiLnpsQqlAiAVLslt1GtftvLEN11VLcvILhSrsLRc 150
hCB2 ...pmkdyMiLsgpQktAvAVLct1lGllsaLENvaVlylILsShqLRr 66
mCB2 ...pmkeyMiLssgQqiAvAVLctlmGllsaLENmaVlylILsSrrLRr 66
          *      ** **      *      *      * *

          TM2          TM3
hCB1 rPSYhFIgSLAVAD1LgSViFvysFidFHVfHrkDSrnvFLfKlGgVTas 199
rCB1 rPSYhFIgSLAVAD1LgSViFvysFvdFHVfHrkDspnvFLfKlGgVTas 200
hCB2 KPSYlFIgSLAGAdfLaSVvFacsFvnFHVfHgvDSkavFLlKiGsVTmt 116
mCB2 KPSYlFIssLAGAdfLaSViFacnFviFHVfHgvDSnaiFLlKiGsVTmt 116
          *      *      *      *      *      *

          TM4
hCB1 FTASVGSLLTAiDRYisihRPlayYKrivTRpkAvVaFcIMwtiaivia 249
rCB1 FTASVGSLLTAiDRYisihRPlayYKrivTRpkAvVaFcIMwtiaivia 250
hCB2 FTASVGSLLTAiDRYlclryPpsYKallTRgrAlVtLgIMwvlsalvsy 166
mCB2 FTASVGSLLTAiDRYlclcyPptYKalvTRgrAlVaLcVMwvlsalisy 166
          *      *      *      *      * * * *

          TM5
hCB1 LPLlGWnCeklqsvCSdiFPPhIdetYlMfWigvtsvLllfIvYaYmyiLW 299
rCB1 LPLlGWnCkklqsvCSdiFPPIIdetYlMfWigvtsvLllfIvYaYmyiLW 300
hCB2 LPLmGwtCc..prpCselFPPIpndYlLsWllfiafLfgIiYtYghvLW 214
mCB2 LPLmGwtCc..pspCselFPPIpndYlLgWllfiafLfgIiYtYgyvLW 214
          *      *      *      *      *

hCB1 KAHsHavrmigrqtqksiihtsedgkvQVtrpdqaRmDiRLAKTLvLiL 349
rCB1 KAHsHavrmigrqtqksiihtsedgkvQVtrpdqaRmDiRLAKTLvLiL 350
hCB2 KAHqHvasl.....sghqdrQVpgmarmRldvRLAKTLgLvL 251
mCB2 KAHrHvatl.....aehqdrQVpgiarmRldvRLAKTLgLvL 251
          *      *      **      *

          TM6          TM7
hCB1 vVliICWgPllAiMvydvfgklnkliKtvFAPCSMLCLlNstVNPiIYAL 399
rCB1 vVliICWgPllAiMvydvfgkmnkliKtvFAPCSMLCLlNstVNPiIYAL 400
hCB2 aVlLiCWfPvLAlMahslattlsdqvKkaFAPCSMLCLlNSmVNPvIYAL 301
mCB2 aVlLiCWfPaLAlMghslvttsdqvKkaFAPCSMLCLlNSmVNPiIYAL 301
          *      *      *      *      *      *

hCB1 RSkdlRhafRsmfpscEgtaqPLdnsmgdsdclhkhannaasvhraaeSc 449
rCB1 RSkdlRhafRsmfpscEgtaqPLdnsmgdsdclhkhannantasmhraaeSc 450
hCB2 RSgeiRssahhclahwkkcvrgLg.....seakeeaprSs 336
mCB2 RSgeiRsaaghcligwkkylqgLG.....pegkeegprSs 336
          *      *      **      ***      *      *

hCB1 IksTvKiaKvTmsvstdtsaeal. 472
rCB1 IksTvKiaKvTmsvstdtsaeal..473
hCB2 VteTeadgKlTpwpsrdldlsc 360
mCB2 VteTeadvKtT.....347
          *      *

```

**Figure 1.3. Comparaison des séquences de CB1R et CB2R exprimées chez l'humain, le rat et la souris**

(Image tirée de Shire et al., 1996)

### 1.2.2.2 Distribution

Le CB2R est principalement exprimé par les cellules du système immunitaire. Ainsi, les études d'hybridation *in situ* et d'autoradiographies ont démontré la présence du CB2R au niveau de plusieurs organes lymphoïdes (Lynn and Herkenham, 1994; Buckley et al., 1997). L'ARNm du CB2R 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 (Howlett et al., 2002). La protéine CB2R a aussi été détectée dans plusieurs types de cellules formant le système immunitaire. Certaines régions de la rate, des nœuds lymphoïdes et des plaques de Peyer (un agrégat de tissus lymphoïdes siégeant dans l'iléum) qui contiennent une forte concentration de lymphocytes B ont démontré un haut taux de la protéine CB2R (Howlett et al., 2002). D'un autre côté, cette protéine est absente des régions renfermant des lymphocytes T.

L'expression de CB2R dans le SNC a été étudiée à l'aide de techniques de RT-PCR, d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. La concentration de ce récepteur est beaucoup plus faible que dans le système immunitaire. Malgré cela, le CB2R a été repéré principalement dans les microglies, mais est absent des astorocytes (Nunez et al., 2004). Cependant, il a été localisé, dans les astrocytes associés aux plaques amyloïdes des cerveaux de personnes ayant souffert de la maladie de l'Alzheimer (Benito et al., 2003). De plus, le

CB2R se trouve surexprimé en réponse à la douleur chronique (Beltramo et al., 2006). De récentes études ont rapporté l'expression de CB2R par les neurones peuplant les différentes régions du cerveau. Ainsi, les études immunohistochimiques ont révélé que le récepteur était présent en forte concentration au niveau des cellules Purkinje du cervelet, les cellules pyramidales de l'hippocampe. Il a également été repéré dans les tubercules olfactifs, le cortex cérébral, le striatum, noyaux thalamiques, l'amygdale, la substance noire ainsi que les colliculi inférieurs (Gong et al., 2006a; Onaivi, 2006). Cette expression était surtout concentrée au niveau du corps et des dendrites et absente des terminaisons nerveuses.

### **1.2.2.3 Voie de signalisation**

Tout comme CB1R, CB2R est un récepteur à 7 passages transmembranaires lié à une protéine G. Ce couplage permet la régulation de plusieurs effecteurs intracellulaires. L'activation des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de la protéine G entraîne le remplacement de la molécule de GTP par le GDP déclenchant par le même coup la séparation de la sous-unité  $\alpha$ GTP des sous-unités  $\beta\gamma$ . Chacune de ces sous-unités va par la suite activer différentes voies de signalisation (Gudermann et al., 1997).



De la même façon que le CB1R, le CB2R module l'activité de l'adénylate cyclase et des MAP kinases (MAPK). Cependant, contrairement au premier récepteur, le CB2R ne semble pas affecter les canaux ioniques.

#### **1.2.2.3.1 Régulation de l'adénylate cyclase**

Les cannabinoïdes inhibent l'adénylate cyclase dans les cellules CHO transfectées à l'aide d'un plasmide contenant le gène codant pour le CB2R (Bayewitch et al., 1995a). Cette inhibition varie en fonction de la concentration des cannabinoïdes et est sensible à la PTX suggérant l'implication des protéines  $G_{i/o}$ . Cet effet a également été observé dans la lignée de cellules COS transfectées de CB2R (Slipetz et al., 1995a). Le prétraitement de ces cellules avec la PTX a bloqué l'inhibition de l'adénylate cyclase causée par les cannabinoïdes. Une différence à souligner dans la régulation de la voie de signalisation AMPc/PKA est l'incapacité de CB2R de se lier à la protéine  $G_s$  et de stimuler l'accumulation d'AMPc.

#### **1.2.2.3.2 Régulation des kinases activées par des agents mitogènes**

Les cannabinoïdes activent les p42/p44 MAPK dans les cellules CHO (Bouaboula et al., 1996) et les cellules HL-60 (Kobayashi et al., 2001) exprimant le CB2R. Ce recrutement des MAPK est bloqué par SR144528, un agoniste

inverse du CB2R. De plus, la PTX inhibe l'activation des MAPK démontrant l'implication des protéines  $G_{i/o}$ . Bouaboula *et al.* (1996) ont également rapporté l'expression de *krox-24* de manière dépendante à la PKC. Par ailleurs, selon Sanchez *et al.* (2003), le traitement des cellules de la prostate humaine PC13 par le THC entraîne la stimulation de la voie de signalisation PI3K/PKB qui à son tour induit la translocation de Raf-1 vers la membrane et la phosphorylation de p42/p44 MAPK. SR144528 inhibe cet effet démontrant clairement l'implication de CB2R. Curieusement, il a été démontré que les cannabinoïdes inhibent la phosphorylation des p42/p44 MAPK au niveau des leucocytes présents au niveau de la rate (Kaplan *et al.*, 2003). Cette inhibition des MAPKs et la diminution subséquente d'interleukine-2 ont été suggérées comme le mécanisme potentiel expliquant l'immunosuppression causée par les cannabinoïdes.

#### **1.2.2.3.3 Modulation d'ions calciques intracellulaires**

La stimulation du CB2R cause une augmentation temporaire du  $[Ca^{2+}]_i$  par le biais de la PLC $\beta$  dans les cellules HL-60 et CHO exprimant le récepteur (Sugiura *et al.*, 2000; Shoemaker *et al.*, 2005). Cette hausse de  $Ca^{2+}$  libre varie en fonction de la concentration des cannabinoïdes et est bloquée lorsque les cellules sont traitées avec la PTX ou un antagoniste sélectif du CB2R. De plus, l'U7322, un inhibiteur actif de la PLC $\beta$ , bloque l'augmentation de  $Ca^{2+}$  causée par les cannabinoïdes.

#### **1.2.2.3.4 Synthèse de céramides**

L'accumulation de céramides participe à l'apoptose des gliomes enclenchée par les cannabinoïdes (Köfalvi, 2008). Le CB2R semble être impliqué. En effet, Herrera *et al.* (2006) ont démontré, à l'aide d'une lignée de cellules de leucémie humaine, que l'activation de CB2R entraîne l'apoptose. Ainsi, l'activation de CB2R a stimulé la synthèse de céramides et subséquemment déclenché la voie intrinsèque des mitochondries. L'inhibition de cette cascade de signalisation prévient l'hypopolarisation de la mitochondrie et la libération ultérieure de cytochrome C causée par les cannabinoïdes.

#### **1.2.3 Distribution des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 dans la rétine**

La présence de CB1R et CB2R au niveau de la rétine a été investiguée à l'aide de techniques d'hybridation *in situ* et de réaction en chaîne par polymérase. Ainsi, les ARNm de CB1R et de CB2R ont été détectés dans la rétine du rat (Buckley *et al.*, 1998). Cette première étude qui s'est intéressée à la localisation des deux principaux récepteurs aux cannabinoïdes a rapporté que chez le rat, l'ARNm du CB1R apparaissait dans la couche des CGRs (CCG) à

partir du quinzième jour embryonnaire (E15) et dans la couche nucléaire interne (CNI) de la rétine à E20. Buckley et al. (1998) n'ont pas détecté l'ARNm de CB2R dans la rétine de rat. Cependant, Lu et al. (2000) ont localisé l'ARNm de CB2R dans toutes les couches de la rétine de la souris adulte. Straiker et al. (1999) ont décrit, par immunohistochimie, la présence de CB1R dans la rétine des vertébrés. Ainsi, le CB1R a été détecté dans la rétine de l'homme, du singe, de la souris, du rat, du poulet, de la salamandre et du cyprin doré. Toutes ces espèces ont démontré un marquage important dans les couches plexiformes interne (CPI) et externe (CPE) ainsi que dans la CCG. Yazulla et al. (1999) ont aussi démontré la présence de CB1R dans CPI et CPE, dans les bâtonnets et les cellules amacriques. À l'encontre de Straiker et al. (1999), Yazulla et al. (1999) n'ont pas détecté la présence de CB1R dans CCG. La présence de CB1R dans les CGRs a été démontrée ultérieurement par des techniques d'autoradiographie, réaction en chaîne par polymérase et d'immunocytochimie dans des cultures purifiées de CGRs (Lalonde et al., 2006; Yazulla, 2008).

#### **1.2.4 Le récepteur aux cannabinoïdes GPR55**

Les études affirmant que le GPR55 est un nouveau récepteur aux cannabinoïdes abondent depuis quelques années (Baker et al., 2006; Brown, 2007; Pertwee, 2007). À cet égard, à partir d'une lignée de cellules HEK293

transfectées avec le GPR55, Ryberg *et al.* (2007) ont démontré que le récepteur était activé par des cannabinoïdes dont le THC, CP55940, l'AEA et le 2-AG. Étonnamment, ils ont également rapporté que le GPR55 n'est pas activé par le WIN55212-2, un agoniste aux CB1R et CB2R. De plus, l'agoniste inverse aux CB1R, l'AM251, agit en tant qu'agoniste sur ce récepteur. La similarité de la séquence d'AA de GPR55 à celle du CB1R est de 13% et est de 14,4% par rapport à celle de CB2R (Ross, 2009). L'ARNm de GPR55 a été détecté dans plusieurs régions du SNC dont le noyau caudé, le putamen, l'hippocampe, le thalamus, le cervelet, le cortex frontal et l'hypothalamus (Ryberg *et al.*, 2007; Ross, 2009). Toutefois, la concentration de GPR55 dans le cerveau est significativement moindre que celle du CB1R (Ryberg *et al.*, 2007). Le GPR55 a également été localisé dans les organes comme les glandes surrénales, le tractus gastro-intestinal et la rate (Kano *et al.*, 2009).

La pharmacologie de GPR55 est un domaine d'intense recherche. À cet égard, la capacité à augmenter la phosphorylation de ERK ou le niveau de  $[Ca^{2+}]_i$  de l'AEA et le 2-AG a été testée sur des cellules exprimant le GPR55. À des concentrations inférieures à  $10\mu M$ , aucun des deux eCBs n'a activé l'ERK ou augmenté le niveau de  $[Ca^{2+}]_i$  (Oka *et al.*, 2009). À l'inverse, en utilisant  $[^{35}S]GTP\gamma S$  comme outil de détection, Ryberg *et al.* (2007) ont rapporté l'AEA et le 2-AG comme étant des agonistes du GPR55. Outre ces résultats, Lauckner *et al.* (2008) ont observé que l'AEA augmentait par le biais de GPR55 le niveau

de  $[Ca^{2+}]_i$ . Cette même étude n'a pas rapporté une augmentation d'ions calciques causée par le 2-AG. Conséquemment, il n'y a présentement pas de consensus à savoir si AEA et 2-AG peuvent être considérés comme des ligands de GPR55 soulignant la nécessité d'études plus poussées. Par ailleurs, les voies de signalisation activées par le GPR55 demeurent obscures.

### **1.3 Métabolisme des endocannabinoïdes**

L'AEA est le premier eCB à être isolé à partir du cerveau de porc (Devane et al., 1992). Il agit comme agoniste partiel de CB1R et CB2R. Le deuxième eCB, le 2-AG, a été initialement isolé dans l'intestin canin et le cerveau de rat (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Ce dernier se trouve dans le cerveau à une concentration approchant les nanomoles par gramme de tissu tandis que l'AEA est présent à une concentration beaucoup plus faible avoisinant les picomoles par gramme de tissu (Harkany et al., 2007). À l'encontre de l'AEA, le 2-AG est un agoniste pour le CB1R et le CB2R.

#### **1.3.1 Synthèse des endocannabinoïdes**

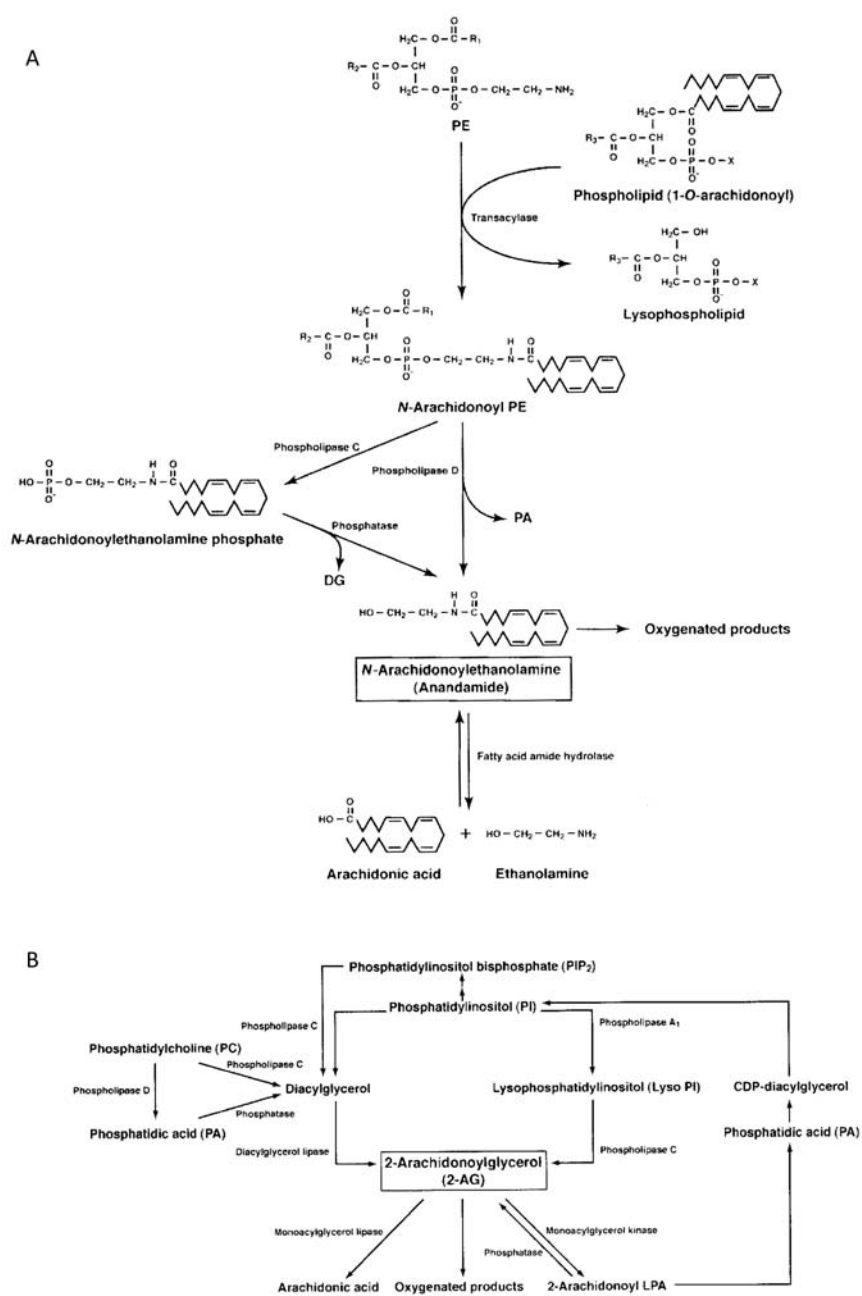
Les eCBs sont synthétisés et libérés par les neurones de manière dépendante de l'activité. Ils jouent plusieurs rôles physiologiques plus particulièrement la modulation de la libération de neurotransmetteur. La section qui suit va traiter de la synthèse et la dégradation des eCBs.

La synthèse de l'AEA a été rapportée pour la première fois par Di Marzo et al. (1994). Celui-ci a démontré que lorsque les neurones corticaux sont exposés à un haut taux de  $Ca^{2+}$  ou dépolarisés, l'AEA est synthétisé et libéré dans le milieu extracellulaire. De plus, une stimulation électrique des neurones active également la synthèse d'AEA (Di et al., 2005). Tel qu'illustré à la figure 1.4 A, la principale voie biochimique menant à la synthèse de l'AEA est composée de deux réactions enzymatiques (pour revue voir (Köfalvi, 2008)). Premièrement, le *N*-arachidonyl phosphatidylethanolamine (PE) est synthétisé à partir de phospholipides. Cette réaction est catalysée par *N*-acyltransférase (NAT). Ensuite, le *N*-arachidonyl PE est hydrolysé pour l'AEA et l'acide phosphatidique. L'enzyme responsable de cette deuxième étape est le *N*-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D (NAPE-PLD). La réaction catalysée par le NAT est l'étape limitante dans la synthèse d'AEA. De plus, son activité est élevée dans le cerveau et semble influencée par la  $Ca^{2+}$  et sa présence a été localisée dans plusieurs régions du cerveau (Kano et al., 2009). L'activité du NAPE-PLD est également élevée dans le cerveau.

Le 2-AG est synthétisé par plusieurs voies biochimiques (Figure 1.4 B). Ainsi, le 2-AG peut être formé à partir de phospholipides membranaires contenant l'acide arachidonique par le biais de la phospholipase C et la diacylglycérol lipase ou par la phospholipase  $A_1$  et phospholipase C. La première voie implique l'hydrolyse de phosphatidylinositol (PI) par la

phospholipase C pour obtenir le diacylglycérol. Ce dernier est ensuite hydrolysé par la diacylglycérol lipase pour former le 2-AG. La synthèse de 2-AG par le biais de cette voie implique la participation de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kondo et al., 1998). La deuxième voie biochimique passe par la phospholipase A1 qui hydrolyse PI en lyso-PI. Celui-ci est hydrolysé par une phospholipase C spécifique au lyso-PI pour former le 2-AG (Tsutsumi et al., 1994).





**Figure 1.4. Métabolisme des endocannabinoïdes**

Synthèse et dégradation de l'anandamide (A) et du 2-AG (B).

(Schéma tiré de *Cannabinoids and the Brain*, Köfalvi 2008)

### 1.3.2 Dégradation des endocannabinoïdes

Les eCBs sont généralement dégradés par l'hydrolyse ou l'oxydation. La première voie implique l'enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) et la monoacylglycerol lipase (MGL) qui catalysent les réactions de l'AEA et du 2-AG, respectivement (Figure 1.4). La deuxième voie est catalysée par la cyclo-oxygénase (COX) et la lipo-oxygénase (LOX) qui oxydent la partie acide arachidonique des eCBs.

La FAAH a été clonée à partir du foie de rat (Cravatt et al., 1996). La protéine FAAH exprimée par les tissus du rat, de la souris et de l'humain comporte 579 AA (Kano et al., 2009). Cette protéine est détectée dans plusieurs organes dont le cerveau. Récemment, une autre protéine FAAH a été identifiée et baptisée FAAH-2 (Wei et al., 2006). Cette dernière est présente dans plusieurs espèces animales dont les humains.

La protéine MGL exprimée par le rat, la souris et l'humain compte 303 AA (Dinh et al., 2002; Kano et al., 2009). L'ARNm de la MGL a été identifié dans le cerveau.

Les tissus des mammifères synthétisent trois types d'enzymes COX surnommées COX-1, COX-2 et COX-3. Parmi ces trois variantes, COX-1 et COX-2 oxydent de manière préférentielle la moitié acide arachidonique des

endocannabinoïdes. Les enzymes LOX sont également exprimées par les plantes et les mammifères et oxydent l'AEA et le 2-AG.

#### **1.4 Les ligands aux CB1R et CB2R**

Les quelques décennies de recherches sur le système des cannabinoïdes ont mené à la découverte mais aussi à la synthèse de nombreux agonistes et antagonistes/agonistes inverses des principaux récepteurs CB1 et CB2. Les premiers ligands ont été synthétisés à la suite de la découverte, dans les années 60, de la structure du THC. Depuis, plusieurs molécules structurellement distantes du THC ont été synthétisées. La section qui suit traitera des principaux ligands qui modulent l'activité de CB1R et CB2R.

##### **1.4.1 Les agonistes aux CB1R et CB2R**

Les agonistes des CB1R et CB2R peuvent être classés selon leur structure en plusieurs catégories distinctes dont les cannabinoïdes classiques, non-classiques, les aminoalkylindoles et les eicosanoïdes (Howlett et al., 2002). La catégorie des cannabinoïdes classiques est composée de dérivés tricycliques-ABC de dibenzopyrane qu'on retrouve naturellement dans la plante du cannabis comme le  $\Delta^9$ -THC et  $\Delta^8$ -THC et des analogues synthétiques comme le  $\Delta^8$ -THC-diméthylheptyl (HU-210) (Howlett et al., 2002).

La deuxième classe, celle des cannabinoïdes non-classiques, est composée de molécules synthétisées dépourvues de l'anneau dihydropyrane

du THC comme le CP47497 et le CP55940, qui est le principal agoniste cannabinoïde utilisé en laboratoire (Howlett et al., 2002).

À l'encontre des catégories précédentes, la classe des aminoalkylindoles comporte des molécules qui ne sont pas structurellement dérivées du THC. Le WIN55212 est le composé le plus étudié de cette classe. Celui-ci possède une haute affinité pour CB1R et CB2R et a des effets pharmacologiques similaires au THC (Howlett et al., 2002).

Les molécules composant la classe des eicosanoïdes sont structurellement liées à l'AEA. Ainsi, on retrouve dans cette classe d'autres eCBs comme l'homo- $\gamma$ -linolénoyléthanolamide, docosatétréthanolamide, nolandin et le 2-AG (Howlett et al., 2002).

Malgré les différences structurelles et à l'exception du nolandin qui est un agoniste sélectif à CB1R, la plupart des ligands mentionnés plus haut ne démontrent pas de préférence marquée envers l'un ou l'autre récepteurs cannabinoïdes (Howlett et al., 2002; Köfalvi, 2008). La modification de la structure de l'AEA qui démontre une légère préférence au CB1R par rapport au CB2R a conduit à la synthèse d'agonistes sélectifs au CB1R (Howlett et al., 2002). Parmi ces composés on retrouve la méthanandamide, l'arachidonyl-2'-chloroéthylamide (ACEA), l'arachidonylcyclopropylamide (ACPA) et l'O-1812 (Köfalvi, 2008). Quant aux ligands sélectifs au CB2R, on retrouve

principalement le JWH133 qui fait partie de la classe des cannabinoïdes classiques et le JWH015 qui est un amionoalkylinodole (Köfalvi, 2008).

#### **1.4.1 Les antagonistes/agonistes inverses aux CB1R et CB2R**

Le SR141716A et le SR144528, deux ligands sélectifs des CB1R et CB2R, respectivement, sont des composés synthétisés par la compagnie pharmaceutique Sanofi. Ces molécules antagonisent les effets médiés par le CB1R et CB2R. Certaines études ont rapporté que ces ligands *per se* déclenchent des effets opposés à ceux causés par les agonistes aux CB1R et CB2R (Köfalvi, 2008; Kano et al., 2009). Cette notion d'agoniste inverse repose sur la capacité de CB1R et CB2R d'exhiber une activité constitutive, soit une activation sans la présence d'agonistes endogènes ou exogènes (Pertwee, 2005). Par conséquent, ces ligands se comportent en agonistes inverses en réduisant l'activité constitutive de ces récepteurs (Köfalvi, 2008). L'AM251 et l'AM281 sont deux autres agonistes inverses de CB1R tandis que l'AM630 est sélectif au CB2R (Köfalvi, 2008; Kano et al., 2009).

**Tableau 1. 1: Valeur des constantes d'inhibition des ligands pour CB1R et CB2R**

| Ligand   | Valeur K <sub>i</sub> (nM) |             |
|--|----------------------------|-------------|
|  | CB1R                       | CB2R        |
| <b>Agonistes sélectifs pour CB1R</b>                         |                            |             |
| ACEA   | 5.29                       | > 2000      |
| O1812  | 3.4                        | 3870        |
| <b>Agonistes sans sélectivité par rapport à CB1R ou CB2R</b> |                            |             |
| Δ <sup>9</sup> -THC  | 5.05 à 80.3                | 3.13 à 75.3 |
| Δ <sup>8</sup> -THC  | 44                         | 39.3        |
| AEA  | 61 à 543                   | 279 à 1940  |
| 2-AG   | 58.3                       | 145         |
| HU210  | 0.06 à 0.73                | 0.17 à 0.52 |
| CP55940  | 0.5 à 5                    | 0.69 à 2.8  |
| WIN5512-2  | 1.89 à 123                 | 0.28 à 16.2 |
| <b>Agonistes sélectifs pour CB2R</b>                         |                            |             |
| JWH015   | 383                        | 13.8        |
| JWH133   | 677                        | 3.4         |
| <b>Antagonistes/Agonistes inverses sélectifs pour CB1R</b>   |                            |             |
| AM251  | 7.49                       | 2290        |
| SR141716A  | 1.8 à 12.3                 | 514 à 13200 |
| O2050  | 2.5                        | N.D.        |
| <b>Agonistes inverses sélectifs pour CB2R</b>                |                            |             |
| AM630  | 5125                       | 31.2        |
| JTE907   | 684                        | 1.55        |
| SR144528   | 50.3 à > 10000             | 0.28 à 5.6  |

(Données tirées de Cannabinoids and the Brain, Köfalvi 2008)

### **1.5 Le système endocannabinoïde et le développement du SNC**

La découverte, au cours de la dernière décennie, de nombreux eCBs, cannabinoïdes exogènes et d'autres médiateurs lipidiques, des enzymes anaboliques et cataboliques ainsi que des récepteurs cannabinoïdes a permis une meilleure compréhension du système eCB. Dans le SNC adulte, les eCBs et le THC ciblent les récepteurs cannabinoïdes situés au niveau des neurones (Katona et al., 1999; Harkany et al., 2005) et de la glie (Fernandez-Ruiz et al., 2007a). Le recrutement des CB1R de manière préférentielle aux terminaisons pré-synaptiques des neurones excitateurs et inhibiteurs est à présent une notion bien établie. Cette localisation permet de détecter les endocannabinoïdes libérés par les neurones post-synaptiques. La libération des eCBs de manière dépendante à l'activité et leur capacité à moduler la plasticité synaptique dans plusieurs régions du cerveau ont établi leur rôle de modulateurs rétrogrades de l'activité synaptique dans le SNC adulte (Freund et al., 2003; Harkany et al., 2007; Kano et al., 2009).

L'importance de la contribution du système cannabinoïde au développement du SNC a été mis à jour à cause principalement des effets nocifs et des conséquences graves que la consommation de la marijuana par les femmes enceintes entraîne sur leurs nouveau-nés (Fried and Smith, 2001; Fried et al., 2003; Huizink and Mulder, 2006). De récentes études rapportent qu'en plus du rôle de modulateur de l'activité synaptique, le système eCB

participe au développement du SNC. Ainsi, ce système semble réguler les processus de prolifération, de migration, et spécification des cellules progénitrices neurales (Guzman et al., 2001; Galve-Roperh et al., 2006), dicter la différenciation phénotypique des neurones (Berghuis et al., 2005) et contrôler l'établissement de la communication synaptique (Bernard et al., 2005). La section qui suit va donc traiter de ces fonctions.

#### **1.5.1 Prolifération et spécification des cellules progénitrices neurales**

Durant le développement du cerveau, l'expression de plusieurs composants du système eCB comme le CB1R et le CB2R ainsi que les enzymes métaboliques coïncide avec la multiplication des cellules progénitrices et leur engagement dans les processus de diversification neuronale (Galve-Roperh et al., 2006; Harkany et al., 2007). La présence d'une signalisation eCB fonctionnelle dans les zones de prolifération neuronale du cerveau en développement suggère que ces ligands lipidiques fournissent les signaux extracellulaires nécessaires pour diriger le programme de spécification des lignées cellulaires. Il est à présent évident que les endocannabinoïdes régulent la spécification et la survie des cellules progénitrices neurales (Guzmán et al., 2002; Aguado et al., 2006).



Les cellules progénitrices neurales possèdent un système eCB fonctionnel leur permettant de synthétiser les ligands lipidiques, les CB1Rs ainsi que la FAAH (Aguado et al., 2005). Par conséquent, l'activation du CB1R au niveau des cellules souches pluripotentes entraîne la prolifération de cellules progénitrices neurales et la génération de neurosphères (Aguado et al., 2006). Ces actions sont abrogées dans les cultures de cellules dont le gène codant pour le CB1R a été muté (*Cnr1*<sup>-/-</sup>) mais augmentées dans les cultures de cellules dont le gène codant pour le FAAH a été supprimé (*faah*<sup>-/-</sup>) comportant une forte concentration d'AEA (Aguado et al., 2005).

Les eCBs régulent également la première étape de la spécification des cellules progénitrices neurales qui consiste en un engagement vers une lignée neuronale ou gliale. Ainsi, l'activation des CB1R au niveau des cellules progénitrices neurales les force à se différencier en une lignée de cellules gliales car l'analyse, *in vivo*, de cerveaux *cnr1*<sup>-/-</sup> et *faah*<sup>-/-</sup> a démontré la nécessité d'un système endocannabinoïde fonctionnel pour maintenir l'astroglionèse (Aguado et al., 2006). Collectivement, ces études suggèrent la présence d'un tonus endocannabinoïde qui module de manière active la différenciation des cellules progénitrices neurales par le biais de CB1R.

### 1.5.2 La neurogenèse

Les effets de l'activation de CB1R sur la neurogenèse demeurent contradictoires. Ainsi, la methanandamide, un analogue non-hydrolysable de l'AEA, diminue de manière significative la neurogenèse dans le gyrus dentelé chez le rat adulte (Rueda et al., 2002). À l'opposé, le HU210, un agoniste CB1R synthétique, augmente la neurogenèse dans l'hippocampe du rat adulte (Jiang et al., 2005). Par ailleurs, le SR141716 et l'AM251, des antagonistes/agonistes inverses sélectifs au CB1R, augmentent le taux de différenciation des cellules progénitrices vers des neurones (Jin et al., 2004). Ces études suggèrent que les caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de l'agoniste ainsi que le contexte physiologique dans lequel les cannabinoïdes interviennent peuvent en quelque sorte déterminer l'ampleur de la genèse des neurones par le biais de CB1R (Harkany et al., 2007). Par conséquent, le maintien d'un équilibre optimal entre le nombre de neurones et de cellules gliales qui est en soit un processus vital pour la croissance normale du cerveau s'avère être un des rôles du système endocannabinoïdes pendant le développement.

### 1.5.3 La migration neuronale

La promotion par les eCBs de la différenciation des cellules progénitrices neurales vers une lignée de cellules gliales au dépend d'une lignée neuronale soulève la question à savoir si ces ligands lipidiques régulent d'autres aspects comme la migration neuronale et la maturation morphologique, physiologique et moléculaire du neurone.

D'après de récentes études, les eCBs régulent la migration neuronale. Ainsi, Berghuis *et al.* (2005) ont démontré que l'AEA et le WIN55212-2 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 dérivé du cerveau (BDNF) (Berghuis *et al.*, 2005). Ce dernier est un facteur important régulant la migration (Fukumitsu *et al.*, 2006) et la différenciation de cette lignée de cellules progénitrices neuronales (Ventimiglia *et al.*, 1995; Horch and Katz, 2002). De plus, Song et Zhong (2000) ont rapporté que l'AEA, l'HU210 et le WIN5512-2 provoquent la migration des cellules HEK transfectées de CB1Rs exogènes. Ces données démontrent clairement le rôle permissif des endocannabinoïdes durant la migration neuronale.

#### 1.5.4 Câblage du cerveau et synaptogenèse

La maturation fonctionnelle des neurones nécessite l'établissement de points de contact appelés synapses entre les neurones. Pour ce faire, les axones de ces derniers parcourent de longues distances pour parvenir à leurs cellules cibles. D'après de récentes études, il semble que le CB1R exerce une fonction au niveau de la croissance des neurites et de la synaptogenèse. Ainsi, Berghuis *et al.* (2005) ont démontré que l'AEA inhibe la croissance des neurites dans les cultures d'interneurones GABAergiques embryonnaires. Mulder *et al.* (2008a) ont rapporté que l'AEA favorise la croissance de l'axone sans l'apparition de branches secondaires des neurones pyramidaux embryonnaires. Les résultats de ces études démontrent que les endocannabinoïdes modulent la croissance des neurones et celle-ci semble dépendre du type neuronal. Par ailleurs, le rôle chimiotropique des endocannabinoïdes a été mis en évidence par Berghuis *et al.* (2007b). Cette étude a clairement établi que l'activation du CB1R par un agoniste entraîne l'effondrement du cône de croissance et la répulsion des neurites des interneurones GABAergiques. De plus, Kim et Thayer (Kim and Thayer, 2001) ont avancé que les agonistes aux CB1R inhibent la formation de synapses dans les cultures de neurones de l'hippocampe. Les mécanismes moléculaires régulant ces actions font l'objet d'intenses recherches.

## 1.6 Le cône de croissance et la navigation axonale

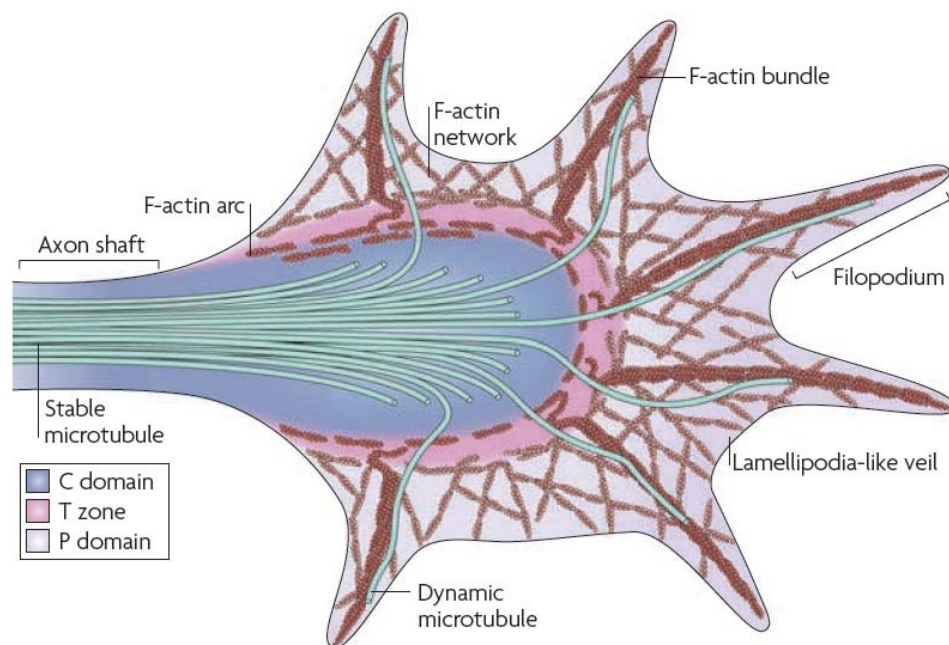
Durant le développement du système nerveux, l'axone de chaque neurone parcourt un environnement complexe pour arriver à sa destination finale. Le cône de croissance, partie distale de l'axone, est l'élément qui assure cette navigation. Celui-ci est dynamique et hautement sensible aux signaux spatiaux présents dans son environnement immédiat. Ces attributs lui permettent de naviguer et trouver sa cible avec une précision impressionnante. La présence d'une surface définie à laquelle des récepteurs du cône de croissance peuvent adhérer permet son avancement. Cette surface qui prend la fonction de « route » est caractérisée par de nombreuses molécules d'adhésion se présentant soit sur les membranes des cellules avoisinantes par exemple les protéines d'adhésion transmembranaires (CAM) ou organisée de façon condensée dans la matrice extracellulaire comme la laminine et la fibronectine (Lowery and Vactor, 2009). Par ailleurs, les molécules anti-adhésives comme les slits et les éphrines empêchent le cône de croissance d'avancer servant ainsi comme garde-fou. De plus, les molécules chimiotropiques fournissent au cône de croissance l'information directionnelle nécessaire durant la navigation. Parmi ces molécules on retrouve les molécules de guidage classiques, dont les nétrines, les slits et les sémaphorines (Dickson, 2002a), les morphogènes tels les « bone morphogenetic proteins » (BMP) et Wnt (Zou and Lyuksyutova, 2007), les

facteurs de transcriptions secrétés comme LIM et hox (Butler and Tear, 2007), les facteurs trophiques tels NGF et IGF (Sanford et al., 2008) et les neurotransmetteurs comme le glutamate (Mattson et al., 1988). Ces différentes molécules d'adhésion et de guidage ainsi que leurs récepteurs modulent la navigation du cône de croissance en activant des voies de signalisation intracellulaire. Celles-ci vont, par la suite, agir sur les différentes protéines formant le cytosquelette modifiant du coup la morphologie du cône de croissance. La section qui suit va traiter brièvement de la structure du cône de croissance et des deux fonctions principales qu'il exerce durant le guidage.

### **1.6.1 Structure du cône de croissance**

Le cône de croissance, partie distale de chaque axone en croissance, assure principalement les fonctions de véhicule et d'explorateur durant le câblage du système nerveux. Sa structure est fondamentale à ces fonctions. Ainsi, sa partie la plus distale est composée de protrusions dynamiques appelées filopodes (Figure 1.5). Ils sont les premiers à explorer l'environnement. Les filopodes sont séparés par une mince membrane appelée lamellipode. D'après l'organisation de son cytosquelette, le cône de croissance a trois régions distinctes (Figure 1.5 (Huber et al., 2003; Lowery and Vactor, 2009)). La partie périphérique (P) est composée de longs filaments

d'actine (F-actine) entrelacés qui forment les filopodes et des filaments de F-actines entrecroisés formant les lamellipodes. De plus, cette région comporte quelques microtubules pionniers le long des filaments d'actine. La partie centrale (C) est composée de faisceaux de microtubules stables en plus de nombreuses organelles, des vésicules des regroupements d'actine. La région de transition (T) se trouve entre les domaines P et C. On retrouve, dans cette partie, les structures contractiles d'actines et de myosines positionnées en demi-cercle perpendiculairement aux filaments de F-actine. La réorganisation de ces composantes du cytosquelette détermine la morphologie et la mobilité du cône de croissance.



**Figure 1.5. Structure du cône de croissance**

(Image tirée de Lowery et Vaxtor, 2009)

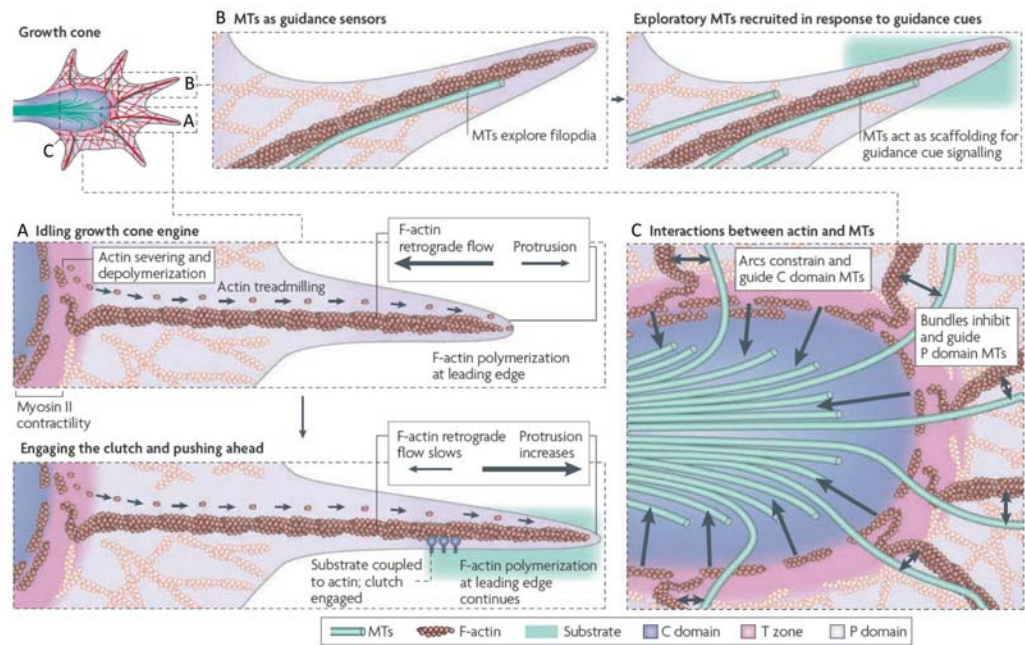
### 1.6.2 Le cône de croissance : un véhicule

Durant le développement, la progression du cône de croissance se passe en trois phases distinctes. La première phase est celle de la protrusion. Les propriétés dynamiques de l'actine jouent un rôle important dans la motilité du cône de croissance. Le flot continu de protéines F-actines de la région P vers la partie C du cône de croissance le garde immobile mais prêt à se déplacer en réponse à une instruction directionnelle (Lowery and Vactor, 2009). La contraction de la myosine II dans la partie T et la pression exercée par la polymérisation de F-actine dans la région P assurent le déplacement rétrograde de F-actine (Figure 1.6 A). La compression des filaments de F-actine au niveau de la partie T conjuguée à l'action de protéines comme l'« actin-depolymerizing factor » (ADF)/cofilin entraînent sa section. Les fragments d'actine sont par la suite recyclés et transportés en périphérie pour un autre cycle de polymérisation (Lowery and Vactor, 2009).

Selon le modèle de couplage substrat-cytosquelette proposé par Mitchison et Krischner (1988), la liaison des récepteurs du cône de croissance à un substrat adhérent extracellulaire entraîne la formation d'un complexe qui sert d'embrayage moléculaire en couplant les récepteurs et le filament de F-actine (Figure 1.6 A). Cela a pour but d'ancrer les récepteurs à la F-actine



stoppant leur flot rétrograde mais aussi permettant la protrusion du cône de croissance (Chan and Odde, 2008). En effet, les filopodes considérés comme les senseurs jouent un rôle important en établissant un contact adhésif entre le cône de croissance et le substrat durant l'exploration de l'environnement. Il a été démontré que les filopodes servent de point d'ancrage au substrat et produisent la tension nécessaire pour l'avancement du cône de croissance (Heidemann et al., 1990; Chan and Odde, 2008). Les filopodes ne sont pas essentiels pour le déplacement du cône de croissance (Bentley and Toroian-Raymond, 1986) toutefois, ils demeurent nécessaires pour sa navigation normale (Dwivedy et al., 2007). À la suite de l'ancrage du cône de croissance au substrat, une importante réorganisation locale de l'actine est initiée. Le flot rétrograde est ralenti, les faisceaux de F-actines se trouvant entre le site d'ancrage et la région C disparaissent, les arcs de F-actine s'orientent vers le site d'ancrage, la tension exercée par l'actine-myosine augmente entraînant l'engorgement du cône de croissance pendant que la région C avance (Lowery and Vactor, 2009).



**Figure 1.6. Progression du cône de croissance**

(Image tirée de Lowery et Vaxtor, 2009)

Les actines ne sont pas les seules composantes qui assurent la navigation du cône de croissance. En effet, les microtubules jouent également un rôle important. Ainsi, ceux situés dans le domaine P agissent comme senseurs tandis que ceux du domaine C gouvernent la navigation du cône de croissance. Avant la protrusion du cône de croissance, des filaments de microtubules explorent individuellement de manière dynamique le domaine P (Figure 1.6 B). La présence d'un signal de guidage augmente le nombre de microtubules explorateurs qui interagissent avec le site d'ancrage (Lee and Suter,

2008). Par ailleurs, durant la phase d'engorgement, des faisceaux de filaments stables de microtubules avancent pour occuper l'espace créé par la nouvelle croissance du cône. Parallèlement, une nouvelle section d'axone est consolidée renforçant davantage la direction axonale. D'ailleurs, l'inhibition de la fonction dynamique des microtubules empêche le cône de croissance de tourner en réponse à une molécule de guidage (Buck and Zheng, 2002).

Une interaction entre les structures d'actines et microtubules est nécessaire pour assurer une navigation normale et adéquate du cône de croissance. Pour ce faire, les deux principaux points d'interactions entre les microtubules et les actines sont au niveau des régions P et C du cône de croissance (Lowery and Vactor, 2009). Dans la périphérie, le couplage et la disjonction entre les microtubules et les filaments d'actine affectent la dynamique des microtubules. Lorsque ces derniers sont ancrés aux filaments d'actines, leur capacité d'explorer le domaine P est inhibée. À l'inverse, le découplage permet une inspection plus fréquente du cône de croissance par les microtubules dynamiques augmentant ainsi la sensibilité aux molécules de guidage (Lee and Suter, 2008). Dans la région C, les arcs d'actine facilitent l'entrée des microtubules dans le cône de croissance durant son engorgement (Figure 1.6 C). L'interruption des arcs d'actine empêche la consolidation des microtubules durant la croissance des axones (Schaefer et al., 2008).

### **1.6.3 Le cône de croissance : un explorateur**

La machinerie cytosquelettique du cône de croissance, décrite plus haut, assure la progression de ce dernier dans son environnement. Or, le processus par lequel les cônes de croissances naviguent dans l'espace à la recherche de leur neurone cible est complexe et requiert plus qu'un simple mouvement vers l'avant. En effet, le guidage axonal est un processus dynamique qui fait appel à la capacité exploratrice du cône de croissance. Ainsi, ce dernier avance, tourne, s'arrête ou se rétracte en fonction des nombreuses molécules de guidage présentes dans son milieu immédiat. Pour ce faire, le cône de croissance requiert un système capable de traduire de multiples indices de navigation de manière simultanée et d'intégrer différentes voies de signalisation pour modifier localement la dynamique de la machinerie cytosquelettique. Les mécanismes moléculaires de ces processus ne sont pas entièrement démystifiés. Cependant, de nombreux travaux ont décrit plusieurs voies de signalisation chacune recrutée par une molécule de guidage particulière. Ainsi, le cône de croissance comporte de nombreuses molécules de transduction qui servent de lien entre la molécule de guidage et la machinerie cytosquelettique. Parmi ces molécules, on retrouve les kinases, phosphatases, ions calciques et les protéines Rho de la famille des GTPases (Lowery and Vactor, 2009). En effet, plusieurs études ont démontré que ces protéines contrôlaient la machinerie cytosquelettique en aval de la plupart des

récepteurs des différentes molécules de guidage (Govek et al., 2005; Koh, 2006).

#### **1.6.3.1 Les Rho GTPases**

La famille des protéines Rho GTPases comprend Rho (RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoT), Rac (Rac1, Rac2 et Rac3), Cdc42, TC10, TCL, Wrch1, Chp/Wrch2, RhoG, RhoH/TTF et Rnd (Rnd1, Rnd2, and Rnd3/RhoE) (Govek et al., 2005). Ces molécules de faible poids moléculaire relient l'information de navigation découlant de l'activation d'un récepteur à la machinerie cytosquelettique de manière à augmenter la polymérisation de l'actine pour la protrusion de filopodes ou favoriser le désassemblage du filament d'actine et entraîner la rétraction (Koh, 2006). L'activité de ces protéines est régulée par les « guanine nucleotide exchange factors (GEF) » et les « GTPase-activating proteins (GAPs) » (Huber et al., 2003), les GEFs activent les Rho GTPases tandis que les GAPs les inhibent. Ainsi, durant la navigation du cône de croissance, la partie cytoplasmique d'un récepteur activé recrute un ou plusieurs régulateurs de Rho GTPases ayant pour conséquence, par exemple, l'activation de Rho A et l'inhibition de CDC42 et RAC1 qui entraînent l'effondrement du cône de croissance (Huber et al., 2003; Lowery and Vactor, 2009). Les voies de signalisation des Rho GTPases sont complexes à cause des

nombreux agencements possibles des GEFs, GAPs et GTPases. Les mammifères comportent plus de 70 GEFs et 80 GAPs (Lowery and Vactor, 2009). Par ailleurs, plusieurs GTPases avec des effets opposés peuvent être activés par la même molécule de guidage ajoutant ainsi une autre dimension de complexité à ces interactions. Une piste envisagée pour concilier la diversité de ces molécules ainsi que l'activation de plusieurs GTPases antagonistes est la localisation spatiale de ces protéines et la compartimentalisation de leurs régulateurs (Lowery and Vactor, 2009). Ainsi, la même GTPase pourrait être régulée par différents GEFs ou GAPs selon les sites dans le cône de croissance.

Au niveau cytosquelettique, les Rho GTPases régulent plusieurs protéines qui agissent directement sur le cycle d'actine tel l'assemblage de F-actine, le flux rétrograde de F-actine vers la région C et le désassemblage du filament d'actine dans la région T. La polymérisation de l'actine est contrôlée par les protéines de nucléarisation d'actine « actin related protein (Arp)2/3 complex » et les facteurs de polymérisation de F-actine « enabled / vasodilator-stimulated phosphoprotein (ENA/VASP) ». RAC1 et CDC42 agissent directement sur le complexe Arp2/3 pour réguler la nucléation et le branchement de F-actine en se liant au filament existant. L'inhibition d'Arp2/3 dans les neurones bloque la protrusion de filopodes et lamellipodes (Lowery and Vactor, 2009). Les protéines ENA/VASP favorisent l'élongation du filament de F-actine en antagonisant les « capping proteins » (qui inhibent l'élongation

de F-actine) et en recrutant des unités d'actines vers le domaine P pour la polymérisation. Les protéines en aval de RhoA régulent le cytosquelette en agissant sur le flot rétrograde et le désassemblage du filament de F-actine dans la région T. Ainsi ROCK, un des effecteurs de RhoA, phosphoryle plusieurs protéines dont « myosin light chain kinase (MLCK) » et « LIM domain kinase (LIMK) » (Huber et al., 2003). La phosphorylation de MLCK induit l'activation de la myosine II qui se lie au filament de F-actine pour causer une contraction actomyosine et entraîner un flot rétrograde (Lowery and Vactor, 2009).

### **1.7 Développement des cellules ganglionnaires de la rétine**

L'œil est un organe sensoriel indispensable pour le traitement de l'information visuelle. Chez la plupart des vertébrés, celui-ci se développe de manière bilatérale. Les parties majeures du tissu oculaire tel que l'iris, la rétine, le nerf optique et l'épithélium pigmenté prennent naissance du neuroderme dans le développement embryonnaire (Inatani, 2005). La rétine neurale est le principal récepteur de stimuli visuels. Elle se développe à partir de la vésicule optique qui est une invagination de la paroi du diencephale (Stuermer and Bastmeyer, 2000). Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) sont les cellules qui connectent la rétine au cerveau. Leur axone navigue sur des distances relativement longues pour établir des connexions

synaptiques avec leurs cellules cibles. Cette navigation est ponctuée de plusieurs relais où l'axone doit prendre une décision quant au trajet à emprunter afin de rejoindre les régions cibles, dont le corps genouillé latéral (CGL) et les colliculi supérieurs (CS), et former un réseau fonctionnel. Les étapes majeures marquant le développement de ces projections sont les suivantes: croître vers le disque optique, sortir du disque et entrer dans le nerf optique, se diriger du côté controlatéral ou ipsilatéral au niveau du chiasma optique et finalement, établir une connexion avec la cible appropriée (Inatani, 2005). La navigation des CGRs est régulée par différentes molécules de guidage. Les pages qui suivent décriront de manière très sommaire le rôle des principales molécules de guidage impliquées à travers chaque étape.

### **1.7.1 Guidage axonal au niveau de la rétine**

Les différents types de cellules neuronales formant la rétine des vertébrés, les CGRs, les interneurones (cellules amacrines, horizontales) les bipolaires, les deux types de photorécepteurs (les cônes et les bâtonnets) ainsi qu'un type de cellule gliale (les cellules de Müller) émanent des cellules souches multipotentes (Isenmann et al., 2003). Ces cellules sont organisées en plusieurs couches distinctes et les CGR occupent la couche la plus interne faisant face à la membrane basale, qui est la partie de la rétine en contact avec



le corps vitré. Durant la différenciation et la prolifération cellulaire, le processus de genèse de CGRs se répand de manière concentrique du centre vers la périphérie de la rétine. Lors du développement, les cônes de croissance des CGRs se dirigent vers le corps vitré tandis que les dendrites croissent en direction opposée. La croissance du cône de croissance vers les couches externes de la rétine (direction opposée au corps vitré) semble être inhibée par les corps cellulaires des cellules de Müller. Curieusement, ces corps cellulaires n'inhibent pas la croissance des dendrites. La partie distale des cellules de Müller semble par contre favoriser la croissance axonale (Stuermer and Bastmeyer, 2000). Par conséquent, en fonction des propriétés répulsives et attractives des composantes des cellules de Müller, les cônes de croissance des CGRs se fraient un chemin, entre leur corps cellulaire et la membrane basale, vers le disque optique.

### **1.7.2 L1-NCAM et la navigation intrarétinienne**

Les CGRs au centre de la rétine sont les premières à envoyer leur axone vers le disque optique. Les axones des CGRs nouvellement générés, plus précisément en périphérie de la rétine, naviguent vers le disque, fasciculés aux axones des CGRs créés antérieurement (Inatani, 2005). La fasciculation des axones est réalisée par l'intermédiaire de molécules d'adhérence cellulaire

telle que L1. L1 est une protéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines qui est exprimée abondamment dans le nerf optique durant la navigation des CGRs (Inatani, 2005). Cette protéine interagit en formant un lien homogène ou hétérogène avec d'autres molécules telles que la TAG-1,  $\beta$ 1-intégrine, contactine, molécule d'adhérence neurale (NCAM) et CSPG, issue de la croissance axonale (Inatani, 2005). L'inhibition de L1, à l'aide d'un anticorps, perturbe le guidage axonal vers le disque optique. Cependant, une étude menée sur des souris mutantes pour le gène L1 n'a rapporté aucune anomalie significative (Demyanenko and Maness, 2003a). NCAM et L1 interagissent avec le récepteur du facteur de croissance de fibroblaste (FGFR), un récepteur de la famille tyrosine kinase, par latéralisation au niveau de la membrane plasmique. Le FGFR est exprimé par les CGR. L'inhibition de FGFR ou de certaines étapes de sa voie de signalisation pousse les axones CGR vers la périphérie de la rétine au lieu d'un parcours vers le disque optique (Brittis et al., 1996).

### **1.7.3 Le CSPG et le guidage axonal intrarétinien**

La membrane basale qui couvre la partie interne de la rétine est formée de collagène associé à d'autres protéines de la matrice extracellulaire (MEC) telle que la laminine, l'« heparan-sulfate proteoglycans » (HSPG), le

« chondroïtine-sulfate proteoglycans » (CSPG) ainsi que d'autres protéines. La laminine, molécule avec des propriétés facilitant la croissance, est l'une des protéines les plus répandues de la MEC (McKerracher et al., 1996). L'action de la laminine est exercée par l'intermédiaire de ses récepteurs de la famille des intégrines. *In vitro*, l'inhibition de l'intégrine à l'aide d'un anticorps arrête la croissance axonale sur la laminine. *In vivo*, les CGRs exprimant une forme mutante de  $\beta$ -intégrine projettent peu d'axones comparés à ceux exprimant une forme non mutée, toutefois, les axones qui croissent naviguent empruntant le parcours approprié jusqu'aux cellules cibles (Lilienbaum et al., 1995). Ceci démontre que malgré un effet non négligeable sur la croissance, la laminine ne semble pas une molécule indispensable pour le guidage vers le disque optique.

Le CSPG est une molécule chimio-répulsive sécrétée dans la MEC. Il s'attache à la surface des cellules environnantes. Sa concentration est élevée de manière concentrique dans les zones périphériques de la rétine (Stuermer and Bastmeyer, 2000). Les axones des CGR, qui naissent en périphérie, confrontés à de fortes concentrations de CSPG orientent leurs cônes de croissance vers une région comportant de faibles taux de CSPG, région centrale de la rétine, se dirigeant par le fait même vers le disque optique. L'inhibition de CSPG par la chondroïtinase ABC dans la rétine embryonnaire entraîne des aberrations au niveau de la navigation des axones CGR (Brittis et

al., 1992). Toutefois, à la lumière des données existantes, il n'a pas encore été montré de manière sûre que le CSPG soit le régulateur principal du guidage axonal intrarétinien entraînant les axones vers le disque optique.

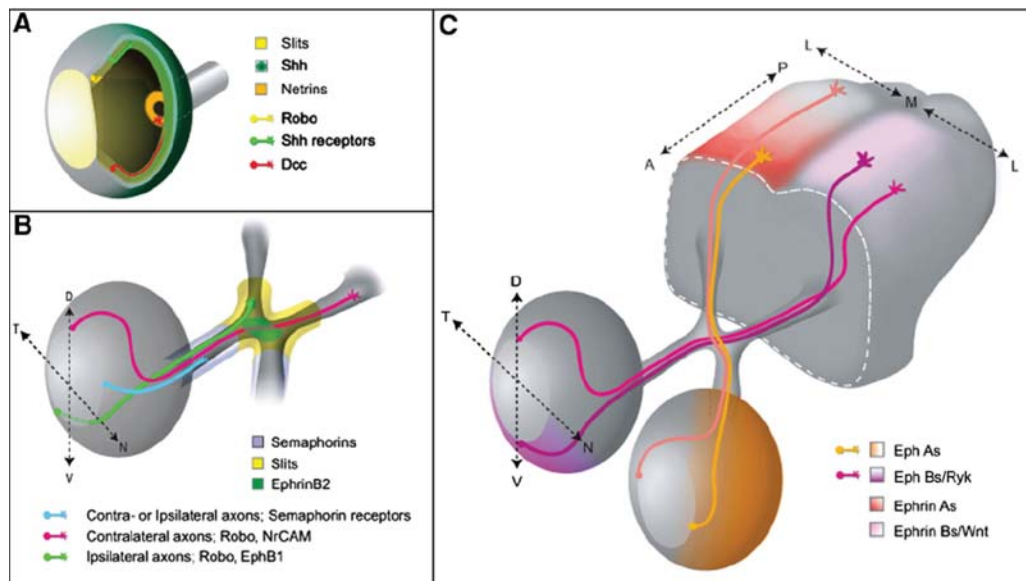
D'autres molécules semblent également impliquées dans le guidage intrarétinien des axones. Récemment, une nouvelle fonction a été attribuée à la protéine Sonic hedgehog (Shh), soit celle d'une molécule impliquée dans le guidage axonal. Au niveau de la rétine, Dakubo et al. (2003) rapportent chez la souris ayant une mutation conditionnelle de Shh (*shh<sup>-c</sup>*), une navigation défectueuse des CGRs similaire à celle observée chez la souris mutante pour la nétrine 1. Comparées aux souris sauvages, les CGRs sont déroutées de leur parcours vers le disque optique. De celles qui parvenaient au disque optique, certaines ne réussissaient pas à rejoindre le nerf optique. Dakubo et al. (2003) indiquent que cette défaillance de navigation des CGRs de *shh<sup>-c</sup>* résulte, potentiellement, de l'absence de cellules exprimant Ntn1/Pax-2 au niveau du disque optique.

#### **1.7.4 La nétrine-1 et le nerf optique**

La nétrine-1 est une molécule chimiotropique sécrétée et ancrée à la MEC (Kennedy et al., 1994a). Durant le développement, la nétrine-1 est exprimée par les cellules gliales se trouvant à l'embouchure de disque optique.

Tandis que les axones de CGRs expriment Deleted in Colorectal Cancer (DCC), un récepteur de nétrine-1 (Deiner et al., 1997b). Ces derniers ont démontré, à l'aide d'explants de rétines, que la nétrine-1 favorisait la croissance et que le blocage de DCC à l'aide d'un anticorps inhibait cette croissance. De plus, ces chercheurs ont rapporté qu'une mutation du gène nétrine-1 causait une hypoplasie du nerf optique sans toutefois affecter le guidage axonal intrarétinien. Autrement dit, chez ces souris mutantes pour nétrine-1, les axones des CGRs parviennent au centre de la rétine mais ne réussissant pas à sortir du disque optique, réorientent leur croissance vers d'autres régions. Par ailleurs, les axones comportant une mutation du gène *dcc* affichent le même type d'aberrations de navigation que les souris déficientes de nétrine-1 (Deiner et al., 1997b). Les mécanismes exacts par lesquels le cône de croissance quitte le disque et dévie de sa trajectoire pour entrer dans le nerf optique ne sont pas entièrement connus. Cependant, il semble que la nétrine-1 exerce, en se liant à DCC, un effet d'attraction sur les cônes de croissance (Figure 1.7 A). Cette liaison nétrine1-DCC entraîne une augmentation du taux AMPc intracellulaire et entraîne par le fait même une attraction (Ming et al., 1997). Lorsque cette augmentation est contrecarrée, *in vitro*, le cône s'éloigne de la source de nétrine-1 (de la Torre et al., 1997). De plus, il a été rapporté que la laminine renversait le comportement du cône de croissance face à la nétrine-1 en prévenant l'augmentation d'AMPc intracellulaire (Stuermer and

Bastmeyer, 2000). La laminine est exprimée surtout du côté du corps vitré près de la tête du nerf optique, lieu de sortie du disque optique où les axones réorientent leur cône croissance vers le nerf optique. Tandis que la nétrine-1 est principalement exprimée au niveau de la tête du nerf optique. Höpker et al. (1999) proposent que la laminine module de manière locale (via le taux d'AMPC) l'interaction Nétrine-1-DCC résultant par l'expulsion du cône de croissance de la rétine et sa croissance éventuelle dans le nerf optique (Höpker et al., 1999). Cependant, il est aussi probable que le comportement du cône soit régulé par un mécanisme impliquant le recrutement d'autres récepteurs de nétrine-1 comme UNC5 qui est également exprimé par les CGRs (Stuermer and Bastmeyer, 2000).



**Figure 1.7. Les molécules de guidage régulant le développement des cellules ganglionnaires de la rétine**

(Image tirée d'Erskine et Herrera, 2007)

### 1.7.5 Le guidage axonal au chiasme optique

Chez le mammifère, lorsque les axones des CGRs arrivent au chiasme optique, ils empruntent deux trajectoires; soit ils traversent la ligne médiane et croisent du côté controlatéral ou ils dévient leur trajectoire pour naviguer de manière ipsilatérale (Figure 1.7 B). Par contre, chez les vertébrés non mammaliens, la vaste majorité des CGRs projettent du côté controlatéral. Les éphrines et leurs récepteurs Eph sont des facteurs qui régulent la croissance axonale. Chez les animaux possédant une vision binoculaire, l'éphrine-B est exprimée de manière abondante au niveau du chiasme optique. Chez le

xénope au stade têtard, possédant une vision monoculaire, les CGRs projettent leur axone du côté controlatéral au niveau du chiasme. Cependant durant le processus de métamorphose pour devenir un crapaud muni d'une vision binoculaire, une partie des CGRs orientent leur axone du côté ipsilatéral. Par le fait même, l'expression d'éphrine-B au chiasma optique est observée exclusivement durant leur métamorphose. De plus, l'expression ectopique d'éphrine-B dans le chiasme du têtard, ultérieur au stade de métamorphose, entraîne la croissance de projections ipsilatérales de manière précoce (Inatani, 2005). Chez la souris, éphrine-B est exprimée au chiasme optique après le 14<sup>ième</sup> jour du stade embryonnaire au moment où les projections ipsilatérales apparaissent (Williams et al., 2003b). Lorsque l'éphrine-B est ajoutée à une culture d'explants de rétine, seulement les axones de CGRs provenant de la partie ventro-temporale de la rétine stoppent leur croissance pendant que les axones des CGRs émanant des autres parties de la rétine continuent leur croissance (Williams et al., 2003b). De plus, les souris comportant une mutation du gène EphB1, le récepteur d'éphrine-B exprimé exclusivement sur les axones CGR ipsilatéraux, les axones des CGRs de la partie ventro-latérale de la rétine dévient de leur trajectoire habituelle et se projettent du côté controlatéral (Williams et al., 2003b). Ces observations démontrent que durant le développement, l'interaction entre l'éphrine-B et le récepteur EphB1 à la surface des axones émanant de la partie ventro-latérale de la rétine



engendre la répulsion de ces axones vers le côté ipsilatéral au chiasme optique.

Récemment, la participation de Shh au guidage des axones au niveau du chiasme optique a été découverte (Charron and Tessier-Lavigne, 2005). Chez la souris mutante pour le gène *Pax2* (*Pax2*<sup>-/-</sup>), le développement du chiasme optique est compromis et les axones des CGRs ne traversent pas la ligne médiane. Chez la souris sauvage, durant le développement, l'expression de Shh est réprimée dans le chiasme lors de la navigation des CGRs vers cette région. Curieusement, chez la souris *Pax2*<sup>-/-</sup>, l'expression de Shh est maintenue de manière ectopique le long de la ligne médiane (Torres et al., 1996). Ainsi, ces observations suggèrent que l'expression soutenue de Shh empêche les CGRs de traverser du côté controlatéral. Cette hypothèse a été vérifiée par les travaux de Trousse et al. (2001) qui rapportent que l'expression ectopique de Shh au niveau de la partie ventrale de la ligne médiane interfère avec la croissance des CRGs et les empêche de traverser celle-ci. Les mécanismes moléculaires par lesquels Shh exerce son effet chimiotropique demeurent peu connus.

### 1.7.6 Les éphrines et les projections rétinotopiques aux colliculi supérieurs

Les CGRs projettent leur axone vers le CS de manière rétinotopique, ainsi des CGRs voisines interagissent avec des neurones situés à des sites voisins de leurs structures cibles. Conséquemment, il se forme une représentation point par point tant au niveau de la rétine que le CS. Les axones de CGRs qui émanent de la partie temporale de la rétine aboutissent dans la partie antérieure du CS, pendant que les CGRs de la partie nasale de la rétine envoient leur axone dans la partie postérieure du CS (Dakubo et al., 2003). De même, les CGRs de la partie ventrale de la rétine projettent leurs axones dans la partie dorsale du CS tandis que les axones émanant de la partie dorsale se dirigent vers dans la partie ventrale du CS (Dakubo et al., 2003). Ainsi, des expériences *in vitro* ont démontré que les axones d'explants provenant de la partie temporale de la rétine étaient repoussés par des explants de la partie postérieure du CS mais croissaient sur des membranes provenant de la partie antérieure du CS (Inatani, 2005). La rétinotopie des projections est régulée par les éphrines et leurs récepteurs Eph qui sont des molécules chimiorépulsives. En effet, ces molécules sont exprimées selon un gradient de concentration dans la rétine et les CS (Figure 1.7 C). Le guidage des axones CGR provenant de l'axe nasal-temporal semble être régulé par l'expression graduelle, avec une forte concentration dans la partie temporale, du récepteur EphA3. Parallèlement, dans les CS, les éphrines-A2 et -A5 sont

exprimées avec une faible concentration dans la partie antérieure et augmentant de manière graduée dans la partie postérieure (Inatani, 2005). Les éphrines-A2 et -A5 repoussent les axones provenant de la partie temporale de la rétine. Les souris portant une double mutation des gènes éphrines-A2 et -A5 affichent, malgré un développement anatomique normal des CS, une perturbation des projections rétinotopiques où on observe des axones provenant de la partie temporale de la rétine dans la section postérieure du CS (Feldheim et al., 2000).

Le guidage des axones qui émanent de l'axe ventro-dorsal est influencé par l'interaction des éphrines-B et leurs récepteurs EphB. L'Éphrine-B1 est exprimée selon un gradient de concentration augmentant de la partie ventrale vers la partie dorsale du CS. Parallèlement, le récepteur EphB est exprimé de façon graduelle avec une forte concentration au niveau de la partie ventrale de la rétine (Inatani, 2005). Malgré l'effet répulsif des éphrines, l'éphrine-B1 semble attirer les axones des CGRs puisque les axones exprimant la plus forte concentration d'EphB (de la partie ventrale de la rétine) naviguent vers la partie du CS avec la plus haute concentration d'éphrine-B1, soit la zone dorsale du CS. Les souris mutantes pour les gènes Eph-B2 et B3 démontrent des axones aberrants innervant la partie ventrale du CS (Inatani, 2005).

Le guidage des axones CGR est un processus complexe comportant plusieurs déterminants. Durant la navigation, le comportement des cônes de

croissance est régulé par différentes molécules de guidage exprimées par les CGRs, le disque optique, le nerf optique, le chiasme optique et les CS. L'interaction entre les molécules de guidage et leurs récepteurs entraîne l'attraction ou la répulsion du cône de croissance de manière à former des projections rétinitopiques entre la rétine et les CS.

### **1.8 Objectifs de la recherche menée dans le cadre de cette thèse de doctorat**

Le principal objectif de cette thèse de doctorat était d'identifier le rôle du système eCBs et plus particulièrement des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 durant le développement des projections des CGRs et des neurones corticaux. Par le biais de plusieurs techniques dont la pharmacologie, la biologie moléculaire, la microscopie en temps réel et confocale, l'immunohisto- et cytochimie, notre but était de caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels CB1R et CB2R modulent le guidage axonal. Ainsi, la première étude avait pour objectif principal de déterminer à l'aide de modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro*, l'importance de la voie de signalisation de l'AMPc/PKA. L'objectif secondaire concernait la mise au point des outils nécessaires pour l'étude de CB1R et CB2R. Une fois l'approche expérimentale ainsi que les méthodes de saisie et d'analyse de données mises en place, les deuxième et troisième études devaient :

- caractériser la présence de CB1R et CB2R dans le système neurovisuel.
- investiguer les effets d'une manipulation pharmacologique de CB1R et CB2R sur la morphologie et le comportement du cône de croissance.
- identifier les mécanismes moléculaires impliqués en aval de CB1R et CB2R.
- déterminer, *in vivo*, le rôle de ces deux récepteurs dans la croissance des projections de CGRs et formation de la voie rétinothalamique.

## CHAPITRE 2

**Protein Kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development****Anteneh Argaw<sup>1, 2</sup>, Gabriel Duff<sup>3</sup>, Denis Boire<sup>4</sup>, Maurice Ptito<sup>2</sup> and Jean-François Bouchard<sup>2,3</sup>**

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

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

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

<sup>4</sup>Department of Chemistry-Biology, University of Quebec in Trois-Rivières, Trois-Rivières, Quebec, Canada, G9A 5H7

Abbreviated title: PKA and RGC axon development

**Corresponding Author**

Jean-François Bouchard

School of Optometry

3744 Jean-Brillant Street

University of Montreal

Quebec, Canada, H3T 1P1

Phone: (514) 343-6111 ext. 4083

Fax: (514) 343-2382

## 2.1 Abstract

During development, retinal ganglion cells (RGCs) extend their axons toward their thalamic and mesencephalic targets. Their navigation is largely directed by guidance cues present in their environment. Since cAMP is an important second messenger that mediates the neural response to guidance molecules and its intracellular levels seem to decrease significantly following birth, we tested whether modulation of the cAMP/Protein Kinase A (PKA) pathway would affect the normal development of RGC axons. At postnatal day 1, hamsters received a unilateral intraocular injection of either 0.9% saline solution, 12mM of the membrane-permeable cAMP analogue (dibutyryl cAMP; db-cAMP), or 10 $\mu$ M of the PKA inhibitor KT5720. Intraocular elevation of cAMP significantly accelerated RGC axonal growth while inhibition of PKA activity decreased it. Moreover, when highly purified RGC cultures were treated with forskolin (an activator of adenylate cyclase) or cAMP analogues (db-cAMP and Sp-cAMP), neurite length, growth cone (GC) surface area and GC filopodia number were significantly increased. This indicates that intraocular elevation of cAMP acts directly on RGCs. Since these effects were prevented by PKA inhibitors demonstrates that cAMP also exerts its action via the PKA pathway. Taken together, these results suggest that the cAMP/PKA cascade is essential for the normal development of retinothalamic projections. Keywords: cAMP, retinal ganglion cell, PKA, development, growth cone



## 2.2 Introduction

Following differentiation, RGCs extend their axons to form functional connections with their target cells in the thalamus and the superior colliculus (SC). These axons, tipped at their distal end by the GC, navigate through relatively long distances in a highly directed manner in order to establish functional synapses with thalamic and SC neurons. This is achieved with the help of extracellular guidance molecules which steer RGC axon growth by regulating GC morphology by means of attractive and/or repulsive mechanisms. Consequently, upon binding of a guidance molecule to its receptor, it relays its signal to intracellular second messengers which modulate the GC's response accordingly (Huber et al., 2003). The cyclic nucleotide cAMP is a key intracellular second messenger that plays an essential role in numerous neuronal functions such as cell survival, axon regeneration, and GC behaviour to guidance cues. For example, elevated intracellular cAMP levels enhance the survival rate of CNS neurons (Meyer-Franke et al., 1995; Hanson et al., 1998; Hu et al., 2007). Various mechanisms have been proposed to explain this phenomenon. In RGCs, an increase in survival rate is attributed in part by cAMPs' ability to facilitate the cells' responsiveness to trophic factors (Meyer-Franke et al., 1998b). cAMP's role in axon regeneration is well documented (Spencer and Filbin, 2004; Teng and Tang, 2006). Furthermore, treatment of injured neurons with a cocktail of trophic factors and cell

permeable analogs of cAMP induces elevated numbers of regenerating axons, even promoting their re-growth through inhibitory environment (Cui et al., 2003; Lu et al., 2004; Rodger et al., 2005; Hu et al., 2007). In addition, *in vitro* development of dissociated and highly purified dorsal root ganglion cells (DRGs) and RGCs depend upon endogenous cAMP levels (Cai et al., 2001). cAMP also regulates neurite growth by influencing GC behaviour to guidance cues. This is supported by the fact that manipulating the cAMP signalling pathway can alter the response of the GC to a given guidance molecule (Song and Poo, 1999; Bouchard et al., 2004a; Nicol et al., 2007).

Despite a large body of evidence describing the role played by cAMP and its downstream effector, PKA, in cell survival and axon regeneration, their role during development *in vivo* remains unknown. The aims of the present study are to determine how the cAMP/PKA pathway modulates neonatal development of RGCs, and to test the hypothesis that modification of retinal cAMP levels will alter retinal axon growth. Our results demonstrate that *in vivo* retinal cAMP levels decrease abruptly following birth. We also show for the first time that an increase in endogenous cAMP levels during development accelerates physiological projection growth by directly acting on RGCs and modulating the cAMP/PKA pathway.

## 2.3 Material 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. The distribution of the animals in the different experimental groups appears in table 1.

### 2.3.1 Reagents

Bovine serum albumin (BSA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), dibutyryl cAMP (db-cAMP), DNase, forskolin (FSK), Hoechst 33258, insulin, KT5720, laminin, poly-D-lysine, progesterone, putrescine, pyruvate, Rp-cAMP, selenium, Sp-cAMP, apo-Transferrin, triiodothyronine, and trypsin were purchased from Sigma (Oakville, ON). B27, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), foetal bovine serum (FBS), glutamine, Neurobasal media 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 (Indianapolis, IN). Primary antibodies rabbit-anti-mouse-macrophage and mouse-anti-Thy-1.2 monoclonal IgM ( $\mu$  chain specific) were obtained from Accurate Chemical (Wesbury, NY), and rabbit-anti-GAP-43 was from Chemicon International (Temecula, CA). Secondary antibodies goat anti-rabbit IgG (H+L) and goat anti-mouse IgM ( $\mu$

chain specific) were from Jackson Immuno (West Grove, PA), and Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Alexa 488 and Alexa 546) 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). cAMP Parameter Assay Kit (KGE002) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

### **2.3.2 cAMP ELISA**

Total retinal cAMP levels were quantified using a cAMP Parameter Assay Kit. The right and left retina were dissected on ice, weighed, frozen and kept at -80°C for further processing. Tissues were homogenised in a lysis buffer included in the kit and cAMP levels were measured in triplicate according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as pmol/µg of wet tissue.

### **2.3.3 Intraocular injections**

Syrian golden hamsters (Charles River, St-Constant, QC) were used for intraocular injections. These mammals are born with a premature nervous system (Clancy et al., 2001). Twenty four hours following birth, at postnatal

day 1 (P1), hamsters received a unilateral injection of 2  $\mu$ l solution of CTb, a highly sensitive anterograde tracer, with either 0.9% saline solution, 12mM of the membrane-permeable cAMP analogue db-cAMP or 10 $\mu$ M of the PKA inhibitor KT5720. Briefly, under an operating microscope, a small incision was made in the eyelids to access to the right eye. The injections were administered using a glass micropipette attached to a 10 $\mu$ l Hamilton syringe. The micropipette was carefully inserted into the vitreous at an angle to avoid damage to the lens. Following the injection, the eyelids were closed with surgical glue (Vetbond; 3M, St-Paul, MN).

#### **2.3.4 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.

#### **2.3.5 Immunohistochemistry**

Transported CTb was visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described (Angelucci et al., 1996; Matteau et al., 2003). Briefly, 40  $\mu$ m thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 20 min. They were then rinsed and

incubated in 0.1 M glycine in PBS for 30 min, followed by an overnight incubation (4°C) in PBS containing 4% NDS, 2.5% BSA, and 1% Triton X-100. Sections were subsequently rinsed and immersed for 48 h at room temperature in a solution containing goat anti-CTb diluted 1:4000 in PBS with 2% NDS, 2.5% BSA, and 2% Triton X-100. 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the DAB solution for 2–4 min. Sections were finally washed five times (1 min each) with PBS, mounted on gelatine-chrome alum-subbed slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylenes, and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA).

### **2.3.6 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). In short, to remove macrophages, the retinal suspension was incubated at room temperature in petri dishes coated with affinity-purified goat anti-rabbit IgG (H+L). The nonadherent cells were then transferred to a petri dish that had been coated with affinity purified goat anti-mouse IgM (µ chain specific) followed by anti-Thy-1.2 monoclonal IgM. The adherent RGCs were first released enzymatically by incubating them in a 0.125% trypsin solution at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> followed by manually pipetting an enzyme inhibitor solution (30% FBS in Neurobasal) along the surface of the dish.

Purified RGCs were plated on poly-D-lysine (10 µg/ml) and laminin (5 µg/ml) coated glass coverslips (number 0 Deckgläser; Carolina Biological, 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% CO<sub>2</sub>. All experiments on purified RGCs were performed 36-40 hours following plating.

### **2.3.7 Immunocytochemistry**

RGC 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 2 hr at room temperature. Cells were then incubated overnight at 4°C in blocking solution containing anti-GAP-43 (1:1000). The following day, cells were washed and labelled with Alexa 488 secondary antibody and Hoechst 33258, and the coverslips were mounted with Geltol (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

### **2.3.8 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). Axon branch growth was quantified on consecutive photomicrographs of coronal slices of brain tissue



comprising the lateral terminal nucleus (LTN) and the dorsal terminal nucleus (DTN). On each photomicrograph, the distance between the lateral border of the nucleus of interest and the tips of the longest axon branches were measured (Figure 1B and B'). 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 density was quantified on consecutive photomicrographs comprising the LTN and DTN using an adaptation of the Sholl technique (Sholl, 1953b) (Figure 2A and A'). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Sheffe's *post hoc* test (Systat).

## 2.4 Results

The objective of the present study was to investigate the implication of the cAMP/PKA pathway in axon guidance during RGC development. First, we examined the effects of modulating retinal cAMP levels *in vivo* on RGC projections development during the first neonatal week. Then, using highly purified RGC culture, we investigated the direct action of cAMP on RGCs by stimulating the cAMP-dependent-PKA.

#### **2.4.1 Retinal cAMP levels decrease during postnatal development**

Compared with rats and mice, hamsters have shorter gestation period. Consequently, they are born with a relatively premature nervous system (Clancy et al., 2001). In hamsters, cAMP concentration in the retina decreases significantly during the first week of neonatal development. In comparison with P0 retinae, cAMP levels at P3 decrease by more than half. Retinal cAMP concentration reaches its lowest level at P9 which corresponds to an 85% reduction compared with P0 retinae (Figure 1A). These results support previously reported observations in isolated DRGs and RGCs (Cai et al., 2001).

#### **2.4.2 Development of retinal projections**

During development, 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 (lateral geniculate nucleus -LGN and lateral posterior -LP) and midbrain (SC) targets in the appropriate hemisphere. In hamsters, by P3, virtually all RGCs have reached their targets (Bhide and Frost, 1991b; Clancy et al., 2001). Consequently, the intraocular injection of an anterograde tracer would intensely label the LGN, LP and SC thus making difficult the evaluation of RGC axon collateral growth at P5. To circumvent this problem, we chose to investigate RGC branch growth in the accessory visual pathway composed of LTN and DTN (Figure 1B and D). Visual projections to these nuclei are sparse,

well defined and easy to visualise. They are involved in mediating visuomotor reflexes underlying the generation of optokinetic nystagmus (Ling et al., 1998; Bai et al., 2001). During the first postnatal week, retinal axon branches grow in distinct phases. Between P3 and P7, RGCs projecting collaterals in the LTN and the DTN slow their development (Figure 1C and E). The decrease in their length between P3 and P7 is statistically significant. By the second postnatal week, RGC collaterals resume their growth, and at P12, the branch length is comparable with the P3 group (Figure 1C and E). Retinal axon collaterals in the LTN and DTN decrease in number as they grow medially further away from the optic tract.

#### **2.4.3 The cAMP/PKA pathway plays an essential role during retinal projection development**

A single monocular injection of db-cAMP at P1 results in a significant increase in retinal collateral length. Compared with the untreated P5 aged group, the db-cAMP group (P5) shows a significant increase in RGC axon collateral length in the LTN and the DTN (Figure 1B and D respectively, and F). Furthermore, an increase in retinal cAMP levels accelerates retinofugal axon collateral development in the P5 (cAMP-treated) group with branch length similar to untreated P9 and P12 groups (Figure 1C and E, respectively). Collateral branches in the LTN and the DTN project medially from the optic tract located on the lateral edges of the thalamus. db-cAMP treated groups

show a higher axon branch density at various distance points along the medio-lateral axis (Figure 2A, B and C). This demonstrates that increasing cAMP levels accelerates the normal development of RGC projections. Conversely, blocking basal PKA activity via intraocular injection of KT5720 slows down RGC development by diminishing branch growth and density in the LTN and DTN (Figure 1F and 2D, respectively). Moreover, increasing intraocular db-cAMP does not increase the transitory aberrant projections observed in the thalamic somatosensory nuclei (ventrobasal nucleus-VBN; figure 5A) (Frost, 1984; Langdon and Frost, 1991) neither does it induce aberrant projections in the auditory thalamic nuclei (medial geniculate nucleus -MGN) reported in rewired hamsters (Bhide and Frost, 1999; Frost et al., 2000; Ptito et al., 2001) (Figure 5B).

#### **2.4.4 cAMP acts directly on RGCs modulating the shape of their growth cones and controlling the extension of their axon**

The retina is a complex neural tissue composed of several cell types assembled in precise functional architecture (Rapaport et al., 2004). Most of these cells, intrinsically or in response to a stimulus, express different factors which influence their development (Isenmann et al., 2003; Amato et al., 2004). An important question in understanding the mechanisms that underlie the increase in thalamic projection growth following an intraocular injection is whether cAMP acts directly on RGCs. To address this question, we treated

cultures of highly purified RGCs with various pharmacologic agents known to modulate the cAMP/PKA pathway. Treating these cultures with activators of this pathway (FSK and Sp-cAMP) significantly increases neurite growth (Figure 3A and B). Furthermore, exposing RGC cultures to pharmacological agents that increase intracellular cAMP levels (FSK) and to PKA activators (db-cAMP and Sp-cAMP), augments significantly GC surface area and filopodia number at the GC (Figure 4A, B, and C). The cAMP induced increases in length, GC surface area and filopodia number are blocked when RGCs are treated with a combination of cAMP increasing agents and PKA-selective pharmacological inhibitors (KT5720, H89, Rp-cAMP; figures 3B, 4B, and C). Furthermore, adding exclusively PKA-inhibitors to the RGC culture media diminishes significantly neurite growth and modifies GC morphology (Figures 3A and B, 4A, B, and C). These results confirm our hypothesis suggesting that cAMP acts directly on RGCs by modulating the morphology of the GC and by regulating the axon extension.

## **2.5 Discussion**

The present study demonstrates that retinal cAMP levels decrease during early postnatal development. Interestingly, increasing retinal concentration with a single intraocular injection of db-cAMP accelerates RGC

growth by activating directly PKA in RGCs. Conversely, inhibition of PKA slows RGC axon branch development in the thalamus (LTN and DTN).

cAMP is an important second messenger for axon growth (Meyer-Franke et al., 1995; Meyer-Franke et al., 1998b; Bouchard et al., 2004a) and segregation of retinofugal projections in an eye-specific manner (Stellwagen et al., 1999; Ravary et al., 2003; Nicol et al., 2006). Here we report, for the first time, a rapid decline in endogenous retinal cAMP levels *in vivo* in hamsters during the first postnatal week. These results are in agreement with a previous *in vitro* study that reported a significant decrease in endogenous levels of the cyclic nucleotide cAMP in purified rat DRGs and RGCs (Cai et al., 2001). However, our data appear to be in contradiction with a recent study showing a non significant decrease in adenylate cyclase gene (AC1) expression in the retina during the first week following birth (Nicol et al., 2006). Since the latter authors did not systematically monitor retinal cAMP levels during postnatal retinal development, it is difficult to evaluate the magnitude of the cAMP production decline resulting from a slight decrease in AC1 gene expression. It is also possible that the postnatal decrease in cAMP levels is due to a reduction in AC activity.

cAMP also appears to be an important mediator in promoting axon growth during regeneration. Several studies have reported that increasing endogenous cAMP levels with injections of pharmacological agents promotes

axon regeneration (Qiu et al., 2002; Monsul et al., 2004b), and also potentiates growth factor induced axon regeneration (Cui et al., 2003; Lu et al., 2004). Furthermore, these studies indicate that cAMP acts by directly activating PKA. In the present study, we were interested in investigating the effects of a variation in retinal cAMP levels on RGC growth during neonatal development *in vivo*. Our results clearly demonstrate that intraocular cAMP levels modulate normal axon growth during postnatal development and does not induce aberrant axon growth since there was no significant increase in RGC axon branch density in the VBN and the MGN. Although the magnitude of the increase in collateral length is significant, it did not match the 7-fold increase in length observed in isolated embryonic RGC cultures. Our data however are in agreement with the developmental loss in intrinsic axonal growth capability documented in a previous study (Goldberg et al., 2002). Moreover, the fact that the treated P5 group had similar characteristics in terms of axon branch length and density in LTN and DTN to the untreated P9 and P12 groups suggests that cAMP accelerates RGC collateral development. On the other hand, inhibition of basal PKA activity decreased natural RGC axonal growth confirming therefore the physiological importance played by the cAMP/PKA pathway during development.

Elevated intraocular db-cAMP levels could exercise its effects by several mechanisms. It could influence surrounding cells to secrete growth factors

which will subsequently affect RGC growth and/or directly act on RGCs. In the present study, we have used the cell culture techniques developed by Barres et al. (1988) and Meyer-Franke et al. (1995) that allowed for highly purified RGCs and various pharmacological agents known to modulate PKA activity in order to demonstrate that cAMP acts directly on RGCs. Similar to our results obtained *in vivo*, modulation of the cAMP/PKA pathway in RGC cultures *in vitro* induced RGC neurite growth, GC surface area and filopodia number at the GC. These results confirm that increasing intraocular cAMP levels acts in part by directly activating RGCs. Inhibition of basal PKA activity induces the reverse effect and supports the role played by the cAMP/PKA pathway during RGC axon extension.

In conclusion, numerous studies have shown that cAMP play an essential role during GC pathfinding in the developing CNS *in vitro*. The data presented here demonstrate that retinal cAMP concentrations diminish significantly following birth. More importantly, we show, for the first time *in vivo*, that maintaining a high level of intravitreal cAMP levels in mammals born with a premature nervous system promotes RGC axon branch development by directly activating the cAMP/PKA pathway in RGCs. These data confirm the pivotal role played by cAMP during the establishment of the retinothalamic pathway. Consequently, this could potentially be an interesting mechanism by which pathological conditions in premature newborns could be corrected.



## **2.6 Acknowledgments**

This work is supported by a grant to J-F.B. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). A.A. is supported by a doctoral research award from E.A. Baker Foundation and The Institute of Neuroscience, Mental Health and Addiction (INMHA) of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). G.D. is supported by a fellowship from the Réseau Santé-Vision (FRSQ). M.P. holds the Harland Sanders Chair for Visual Science. J-F.B. is a scholar of Rx&D-CIHR Health Research Foundation. The authors are indebted to Marc Dufresne and Denis Latendresse for their excellent technical assistance.

## 2.7 References

Amato, M.A., Boy, S., Perron, M., 2004. Hedgehog signaling in vertebrate eye development: a growing puzzle. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61, 899-910.

Angelucci, A., Clasca, F., Sur, M., 1996. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *Journal of Neuroscience Methods* 65, 101-112.

Bai, W., Meguro, R., Kaiya, T., Norita, M., 2001. Postnatal development of the retinal projection to the nucleus of the. *Arch Histol Cytol* 64, 69-79.

Barres, B.A., Silverstein, B.E., Corey, D.P., Chun, L.L., 1988. Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1, 791-803.

Bhide, P.G., Frost, D.O., 1991. Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J. Neurosci.* 11, 485-504.

Bhide, P.G., Frost, D.O., 1999. Intrinsic determinants of retinal axon collateralization and arborization. *J Comp Neurol* 411, 119-129.

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.

Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B.S., Filbin, M.T., 2001. Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate. *J. Neurosci.* 21, 4731-4739.

Clancy, B., Darlington, R.B., Finlay, B.L., 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105, 7-17.

Cui, Q., Yip, H.K., Zhao, R.C., So, K.F., Harvey, A.R., 2003. Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 22, 49-61.

Frost, D., 1984. Axonal growth and target selection during development: retinal projections to the ventrobasal complex and other "nonvisual" structures in neonatal Syrian hamsters. *J Comp Neurol.* 230, 576-592.

Frost, D.O., Boire, D., Gingras, G., Ptito, M., 2000. Surgically created neural pathways mediate visual pattern discrimination. *PNAS* 97, 11068-11073.

Goldberg, J.L., Klassen, M.P., Hua, Y., Barres, B.A., 2002. Amacrine-Signaled Loss of Intrinsic Axon Growth Ability by Retinal Ganglion Cells. *Science* 296, 1860-1864.

Hanson, M.G., Jr., Shen, S., Wiemelt, A.P., McMorris, F.A., Barres, B.A., 1998. Cyclic AMP Elevation Is Sufficient to Promote the Survival of Spinal Motor Neurons In Vitro. *J. Neurosci.* 18, 7361-7371.

Hu, Y., Cui, Q., Harvey, A.R., 2007. Interactive effects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34, 88-98.

Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., Cloutier, J.-F., 2003. SIGNALING AT THE GROWTH CONE: Ligand-Receptor Complexes and the Control of Axon Growth and Guidance. *Annual Review of Neuroscience* 26, 509-563.

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.

Langdon, R., Frost, D., 1991. Transient retinal axon collaterals to visual and somatosensory thalamus in neonatal hamsters. *J Comp Neurol.* 310, 200-214.

Ling, C., Schneider, G.E., Jhaveri, S., 1998. Target-specific morphology of retinal axon arbors in the adult hamster. *Vis Neurosci* 15, 559-579.

Lu, P., Yang, H., Jones, L.L., Filbin, M.T., Tuszynski, M.H., 2004. Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. *J Neurosci* 24, 6402-6409.

Matteau, I., Boire, D., Ptito, M., 2003. Retinal projections in the cat: a cholera toxin B subunit study. *Vis Neurosci*. 20, 481-493.

Meyer-Franke, A., Kaplan, M.R., Pfrieger, F.W., Barres, B.A., 1995. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15, 805-819.

Meyer-Franke, A., Wilkinson, G.A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson, J.M.G., Reichardt, L.F., Barres, B.A., 1998. Depolarization and cAMP Elevation Rapidly Recruit TrkB to the Plasma Membrane of CNS Neurons. *Neuron* 21, 681-693.

Monsul, N.T., Geisendorfer, A.R., Han, P.J., Banik, R., Pease, M.E., Skolasky, J., Richard L., Hoffman, P.N., 2004. Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve. *Experimental Neurology* 186, 124-133.

Nicol, X., Bennis, M., Ishikawa, Y., Chan, G.C.K., Reperant, J., Storm, D.R., Gaspar, P., 2006. Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections. *European Journal of Neuroscience* 24, 3401-3414.

Nicol, X., Voyatzis, S., Muzerelle, A., Narboux-Neme, N., Sudhof, T.C., Miles, R., Gaspar, P., 2007. cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nat Neurosci* 10, 340-347.

Ptito, M., Giguere, J., Boire, D., Frost, D., Casanova, C., 2001. When the auditory cortex turns visual. *Prog Brain Res* 134, 447-458.

Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P.N., Bregman, B.S., Filbin, M.T., 2002. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34, 895-903.

Rapaport, D., Wong, L., Wood, E., Yasumura, D., LaVail, M., 2004. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474, 304-324.

Ravary, A., Muzerelle, A., Herve, D., Pascoli, V., Ba-Charvet, K.N., Girault, J.-A., Welker, E., Gaspar, P., 2003. Adenylate Cyclase 1 as a Key Actor in the Refinement of Retinal Projection Maps. *J. Neurosci.* 23, 2228-2238.

Rodger, J., Goto, H., Cui, Q., Chen, P.B., Harvey, A.R., 2005. cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish. *Molecular and Cellular Neuroscience* 30, 452-464.

Sholl, D.A., 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.* 87, 387-406.

Song, H.-j., Poo, M.-m., 1999. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Current Opinion in Neurobiology* 9, 355-363.

Spencer, T., Filbin, M.T., 2004. A role for cAMP in regeneration of the adult mammalian CNS. *J Anatomy* 204, 49-55.

Stellwagen, D., Shatz, C.J., Feller, M.B., 1999. Dynamics of Retinal Waves Are Controlled by Cyclic AMP. *J Neurosci* 19, 673.

Teng, F.Y.H., Tang, B.L., 2006. Axonal regeneration in adult CNS neurons - signaling molecules and pathways. *Journal of Neurochemistry* 96, 1501-1508.

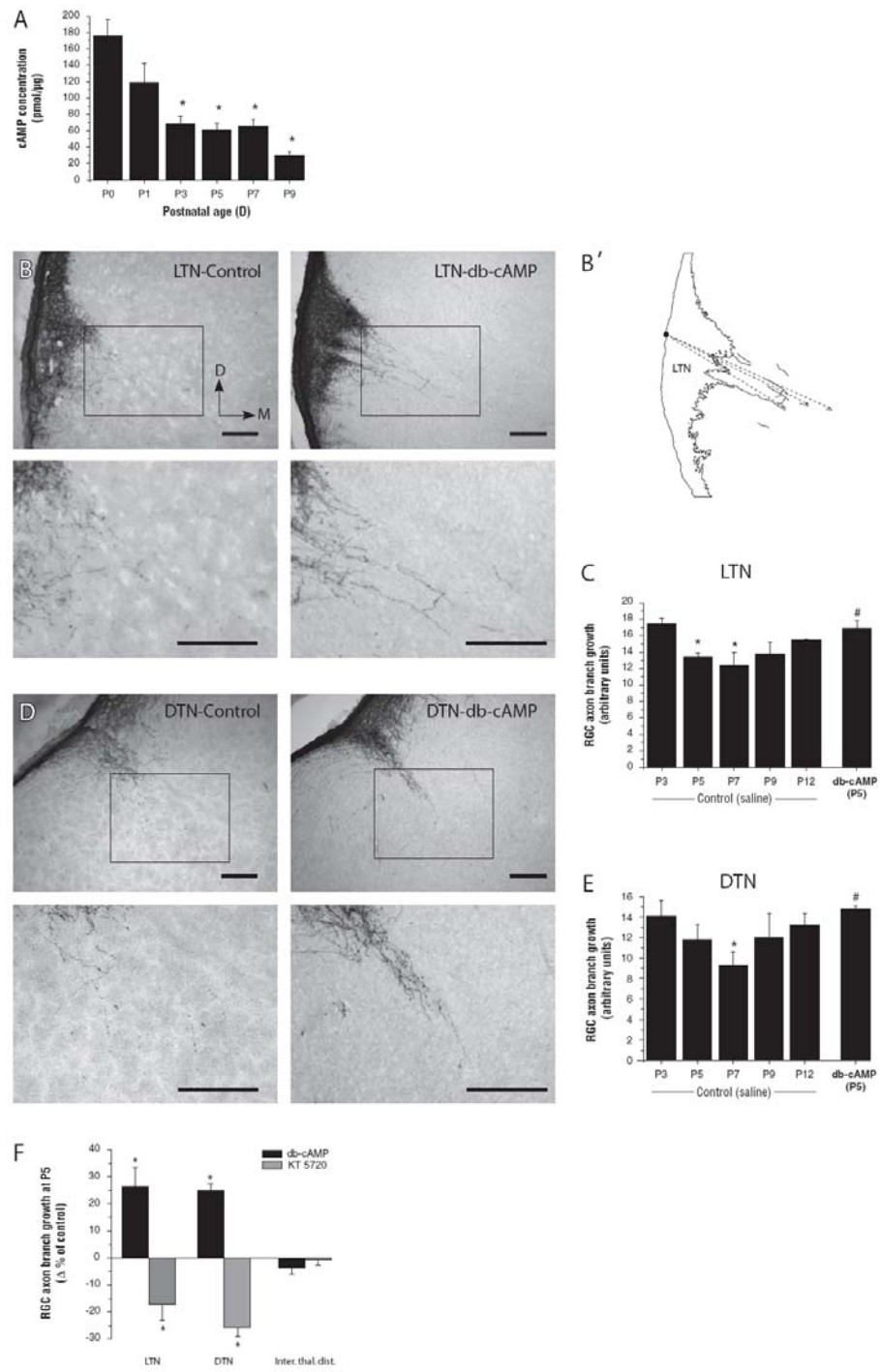
## 2.8 Figure Legends

### Figure 2.1 cAMP and retinal projection growth *in vivo* during development

**A.** In hamsters, during the first week of development, cAMP concentration in the retina decreases significantly with age (six retinae per time-point). (\*  $p < 0.001$ ). **B and D.** During normal development, RGCs send their projections towards the lateral terminal nucleus (LTN), and the dorsal terminal nucleus (DTN). Upper panel: photomicrographs show P5 retinal projections in LTN (B) and DTN (D) in control and db-cAMP treated groups. Retinal projections are shown at higher magnification (2X) in the lower panel. **B'**. An illustration of the LTN and retinal projection branches pointing towards the medial part of the thalamus. Arrowed dotted lines indicate the distance between the lateral border of the thalamus and the tip of the farthest projections. **C and E.** Retinal axon branches in LTN (C) and DTN (E) of control (saline) groups (P3 to P12) slow their development between P5 and P7 before resuming normal growth (\*  $p < 0.05$ ). Note that db-cAMP treated animals are comparable to P9 and P12 but significantly different from P5 controls (<sup>#</sup> $p < 0.05$ ). RGC axon branch growth was quantified by measuring the distance between the lateral border of the nucleus of interest and the tip of the longest axon branches. The latter were normalized to the interthalamic distance (distance between the right and



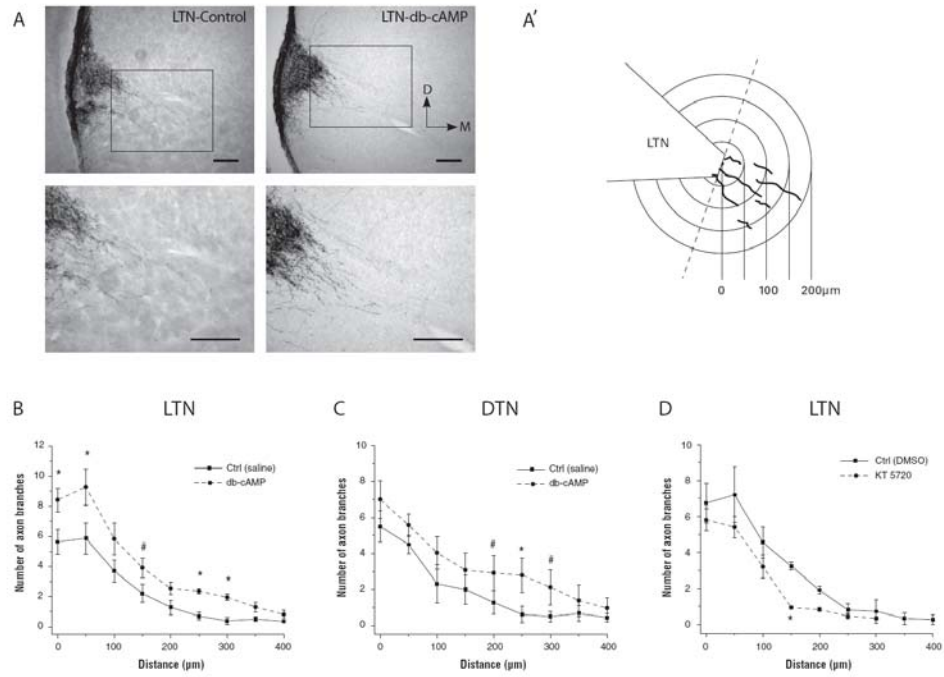
left lateral borders of the thalamus). **F.** At P5, compared with the control group, the db-cAMP treated group increased retinal axon branch length in LTN and DTN. A decrease in branch length was induced by KT5720, PKA inhibitor. (\*  $p < 0.005$ ). Orientation pointers indicate the dorsal and medial parts of the thalamus. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2.1** cAMP and retinal projection growth in vivo during development

**Figure 2.2 Retinal projections density**

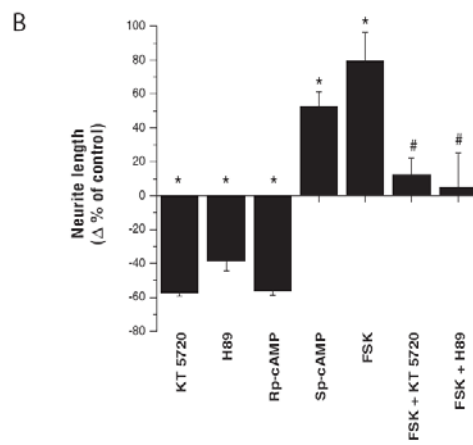
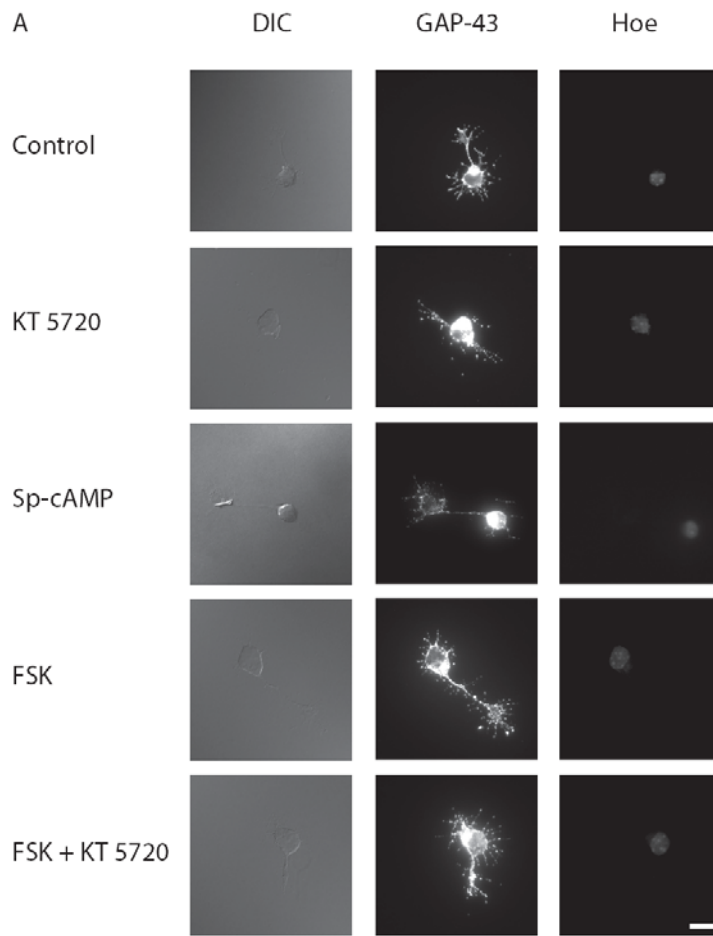
**A-D.** Evaluation of retinal branch density using Sholl's technique in LTN and DTN. **A.** Photomicrographs showing retinal-LTN projections in control and db-cAMP treated groups. Retinal projections are shown at higher magnification (2X) in the lower panel. Note that the retinal projections are more numerous in the treated group. Orientation pointers indicate the dorsal and medial parts of the thalamus. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . **A'** An illustration of the method used to quantify the number of retinal axon branches. **B** and **C.** The number of axon branches diminishes along the medio-lateral axis in LTN and DTN. **D.** KT5720 diminished axonal branches in LTN. \* and # indicate significant changes compared with the P5 control group ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively).



**Figure 2.2** Retinal projections density

**Figure 2.3 cAMP and PKA modulate RGC projection growth**

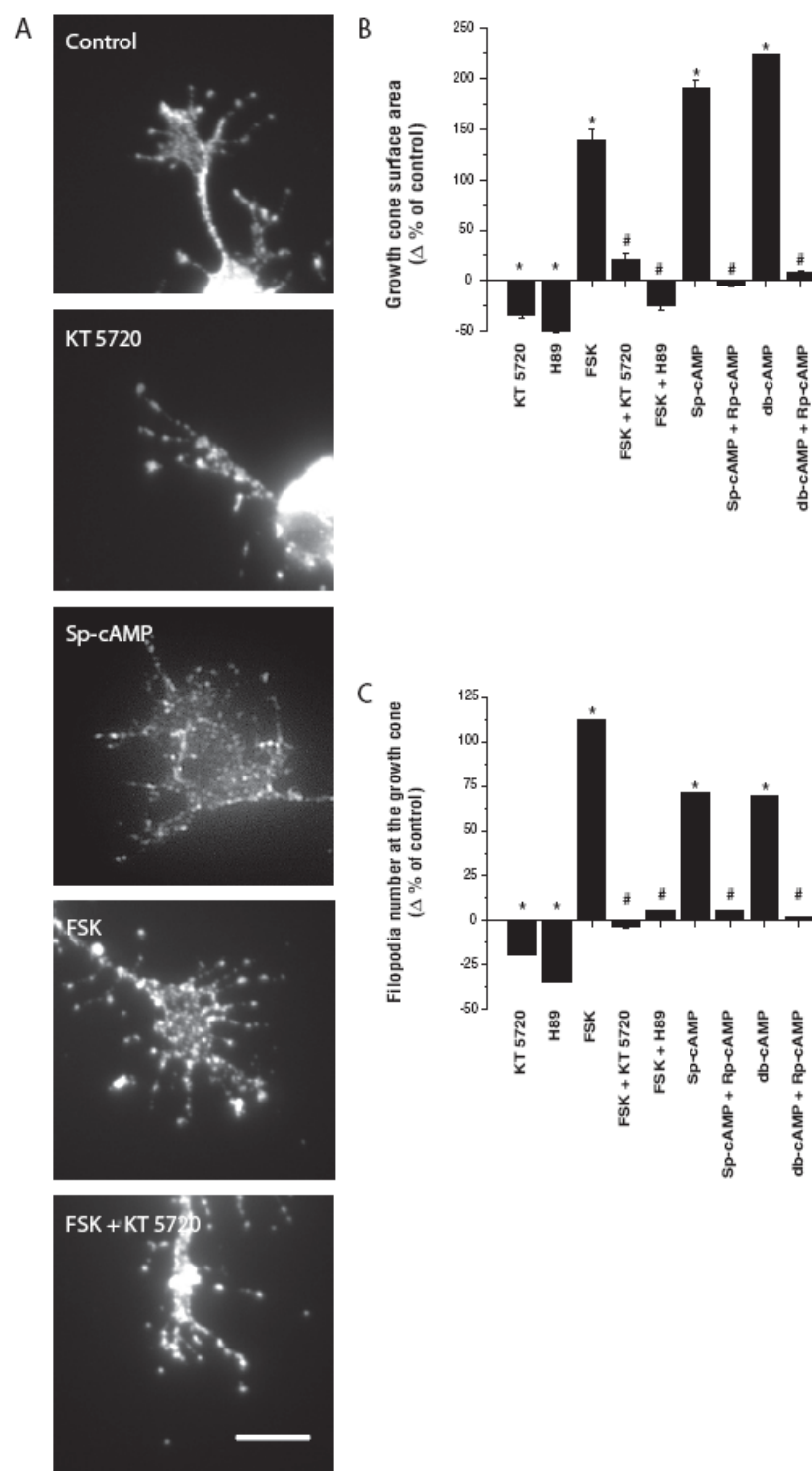
**A.** Cultures of highly purified RGCs were treated with pharmacological modulators of the cAMP/PKA pathway 36 hours after plating. **B.** When RGCs were treated with cAMP/PKA pathway activators (FSK and Sp-cAMP), neurite length significantly increased. This increase was blocked with PKA inhibitors (KT 5720 and H89). Blocking basal PKA activity induced a significant decrease in neurite growth. \* indicates a significant change compared with the control group and # with the FSK group ( $p < 0.001$ ). Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2.3** cAMP and PKA modulate RGC projection growth

**Figure 2.4 cAMP/PKA pathway and growth cone morphology**

**A.** Photomicrographs of control, FSK, KT 5720 and FSK + KT 5720 treated RGC growth cones (GCs). **B.** Pharmacological activation of the cAMP/PKA pathway (FSK, Sp-cAMP and db-cAMP) significantly increases GC surface. This increase was blocked by PKA inhibitors (KT 5720, H89 and Rp-cAMP). Blocking basal PKA activity with KT 5720 or H89 decreased GC surface area. \* indicates a significant change compared with the control group and # with FSK, Sp-cAMP, or db-cAMP treated groups ( $p < 0.001$ ). **C.** Activation of the cAMP/PKA pathway (FSK, Sp-cAMP and db-cAMP) increases the number of filopodia at the GC. PKA inhibitors (KT 5720, H89 and Rp-cAMP) prevented this effect. Deactivating basal PKA activity using KT 5720 or H89 induced a significant decrease in filopodia number at the GC. \* indicates a significant change compared with the control group and # with FSK, Sp-cAMP, or db-cAMP treated groups ( $p < 0.001$ ). Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

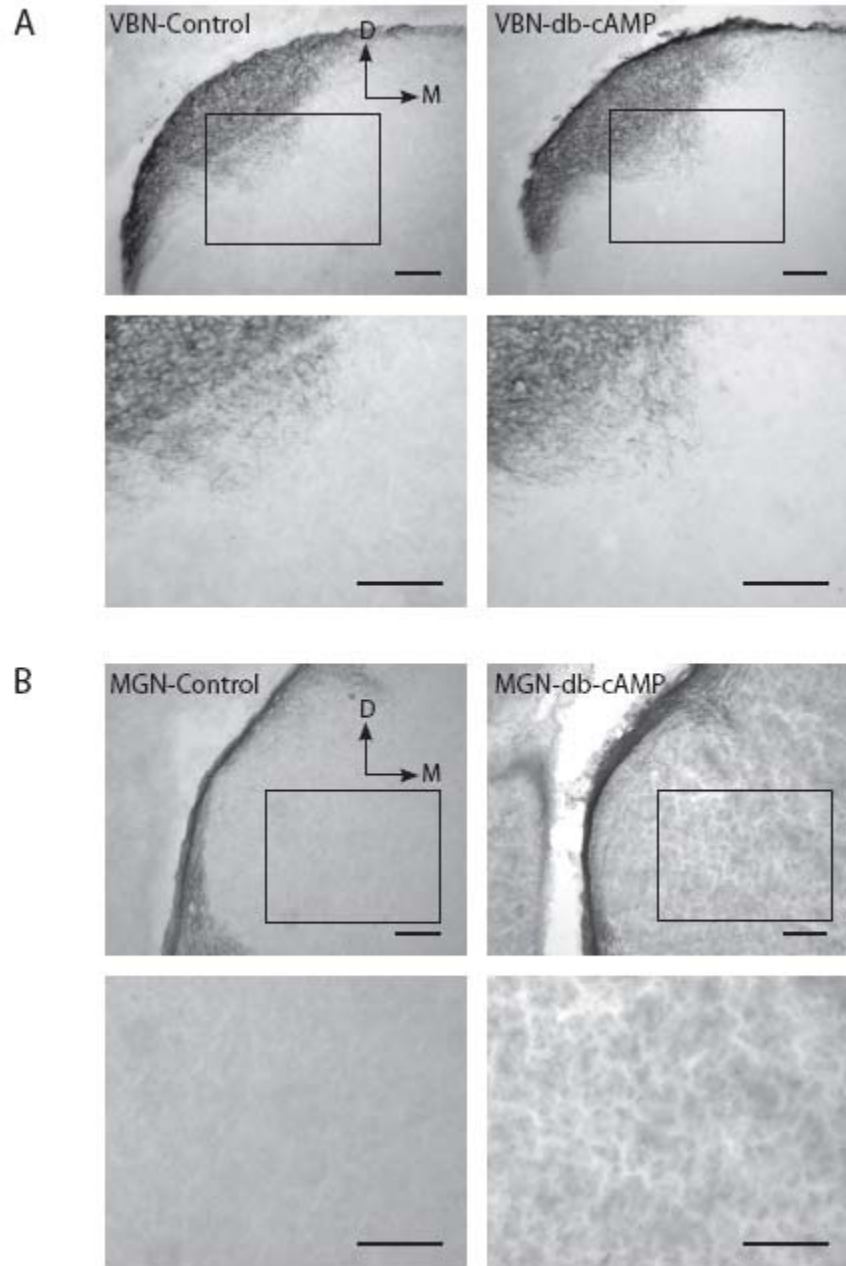


**Figure 2.4** cAMP/PKA pathway and growth cone morphology



**Figure 2.5 Retinal projections in the VBN and the MGN**

Increase in intraocular cAMP levels does not induce aberrant axon growth. **A.** During normal development, RGCs send transient projections towards the VBN. Upper panel: photomicrographs show P5 retinal projections in VBN in control and db-cAMP treated groups. Transient projections are shown at higher magnification (2X) in the lower panel. **B.** Photomicrographs showing P5 retinal projections in MGN in control and db-cAMP treated groups. The MGN is shown at higher magnification (2X) in the lower panel. No differences were observed in both structures for the two groups. Orientation pointers indicate the dorsal and medial parts of the thalamus. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2.5** Retinal projections in the VBN and the MGN

**Table 2.1: Experimental design**

|                          |                  | Number of hamsters per age group |    |    |    |    |     |
|--------------------------|------------------|----------------------------------|----|----|----|----|-----|
|                          |                  | P0                               | P3 | P5 | P7 | P9 | P12 |
| Experimental conditions  |                  |                                  |    |    |    |    |     |
| ELISA*                   |                  | 3                                | 3  | 3  | 3  | 3  |     |
| Normal Growth (Saline)** |                  |                                  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3   |
| Intraocular injections** | Control - Saline |                                  |    | 5  |    |    |     |
|                          | db-cAMP          |                                  |    | 5  |    |    |     |
|                          | KT 5720          |                                  |    | 5  |    |    |     |

\* n = 6 retinae per age group

\*\* 4-8 consecutive coronal slices per animal.

### CHAPITRE 3

Journal Section: Development/Plasticity/Repair

**Cannabinoid-mediated axon guidance requires Deleted in Colorectal Cancer (DCC)**

Abbreviated title: CB1R and RGC axon guidance

Anteneh Argaw<sup>1, 2</sup>, Gabriel Duff<sup>2, 3</sup>, Nicolas Tea<sup>2</sup>, Nawal Zabouri<sup>2, 4</sup>, Beat Lutz<sup>5</sup>, Maurice Ptito<sup>2</sup> and Jean-François Bouchard<sup>2, 3</sup>

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

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

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

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

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

Corresponding author:

Jean-François Bouchard

School of Optometry, University of Montreal

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

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1

Phone: (514) 343-6111 ext. 4083

Fax: (514) 343-2382

Number of figures: 5

Supplemental material: 4 supplemental figures

Number of pages: 38

Number of words for Abstract: 115

Number of words for Introduction: 488

Number of words for Discussion: 872

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

## Acknowledgments

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

### **3.1 Abstract**

Endocannabinoids (eCBs) are retrograde neurotransmitters that modulate the function of many synapses. The presence of eCBs, their CB1 receptor (CB1R) and metabolizing enzymes, at the fetal and early postnatal periods, have been linked to developmental events such as cell proliferation, differentiation and migration, axon guidance and synaptogenesis. In the present study, we demonstrate the presence of a functional eCB system in the developing visual system and the role played by CB1R during axon growth and retinothalamic development. Most importantly, we report that the DCC receptor is required for the CB1R-induced reorganization of the growth cone. Overall, these findings establish for the first time the mechanism by which eCBs influence axon guidance and nervous system development.

### 3.2 Introduction

Anandamide and 2-arachidonylglycerol are the main eCBs present in the adult mammalian brain. They act as retrograde messengers modulating synaptic activities in many brain regions (Kano et al., 2009). Endocannabinoid actions are primarily mediated by the CB1, CB2 and the recently identified GPR55 receptors (Ryberg et al., 2007; Mackie, 2008). The CB1R is the most abundant cannabinoid receptor in the adult brain and is expressed at high levels in the cortex, basal ganglia, hippocampus and cerebellum (Tsou et al., 1998; Mackie, 2005). The effects of eCBs on ocular tissues have been reported by numerous physiological and biochemical studies (Gawienowski et al., 1982; Matsuda et al., 1997; Chien et al., 2003; Yazulla, 2008). It is well known that eCBs reduce intraocular pressure while smoking marijuana induces scleral vasodilation resulting in what is commonly known as red eyes (Yazulla, 2008). Furthermore, growing evidence suggest the implication of retinal eCBs for some of the visual effects of ingesting  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol; the active component of the marijuana plant *Cannabis sativa* (Yazulla, 2008). Recent studies implicate the eCB system, including its receptors, endogenous ligands and metabolizing enzymes, in a wide variety of developmental events such as cell proliferation and migration, and axon guidance during central nervous system (CNS) maturation (Berghuis et al., 2005; Berghuis et al., 2007b; Harkany et al., 2008b; Harkany et al., 2008a; Mulder et al., 2008a; Watson et



al., 2008). In particular, the CB1R has been reported to regulate pyramidal cell specification, GABAergic interneuron development and cortical neuron growth (Berghuis et al., 2007b; Mulder et al., 2008a; Vitalis et al., 2008a). These studies clearly demonstrate the presence of the CB1R during embryonic development in the hippocampus and the cerebral cortex and that pharmacological manipulation of its activity affects axonal development. However, the mechanisms by which eCBs influence axon guidance and brain wiring remain to be elucidated.

During development, 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.

We used the rodent neuro-visual system and primary cortical neuron cultures to demonstrate the mechanism by which eCBs influence axon guidance and brain wiring. We found that the developing visual system expresses the CB1R and the eCB degrading enzymes fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoglyceride lipase (MGL). Furthermore, pharmacological manipulation of the CB1R activity affects (RGC) growth and retinothalamic development. Importantly, we observed that the DCC receptor is necessary for CB1R-induced reorganization of the GC.

### **3.3 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 and *dcc* transgenic mice were obtained from Beat Lutz (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Germany) and Robert Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) laboratories, respectively. All surgical procedures were carried out under deep general anesthesia using either hypothermia (pups < P4) or isoflurane.

### 3.3.1 Reagents

Bovine serum albumin (BSA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), dibutyryl cAMP (db-cAMP), DNase, forskolin (FSK), Hoechst 33258, insulin, KT5720, laminin, monoclonal anti- $\beta$ -actin, monoclonal anti-MAP Kinase (Diphosphorylated Erk-1&2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, pyruvate, selenium, apo-Transferrin, triiodothyronine, trypsin 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 ( $\mu$  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).  $\alpha$ 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 ( $\mu$  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).

### **3.3.2 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% CO<sub>2</sub>. Explants were treated for 15 hours at DIV0 for projections analysis or 1 hour at DIV1 for growth cone analysis. Photomicrographs 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 9).

### **3.3.3 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 ( $\mu$  chain specific) followed by anti-Thy-1.2 monoclonal IgM. The adherent RGCs were first released enzymatically by incubating them in a 0.125% trypsin solution at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> followed by manually pipetting an enzyme inhibitor solution (30% FBS in Neurobasal) along the surface of the dish.

Purified RGCs were plated on poly-D-lysine (10  $\mu$ g/ml) and laminin (5  $\mu$ g/ml) coated glass coverslips (number 0 Deckgläser; Carolina Biological, Burlington, NC) in 24-well plates. RGCs were cultured in 600  $\mu$ l of serum-free medium modified from Bottenstein and Sato (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  $\mu$ g/ml), and FSK (10  $\mu$ M). RGCs were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. All experiments on purified RGCs were performed 36-40 hours following plating.

#### **3.3.4 Primary neuron culture**

Staged pregnant CD1 mice 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), a CB1R inverse agonist (300 nM AM251), adenylylate cyclase activator (10 µM FSK), PKA inhibitors (200 nM KT5720 and 2 µM H89) for 60 min for GC morphology or 15 min for cAMP and PKA immunoreactivities. In another set of experiments, neurons were treated for 15 min. with DCC function blocking antibody ( $\alpha$ DCCfb; 3.5 µg/ml), followed by 1 hour stimulation with AM251, O2050 or FSK.

### **3.3.5 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% CO<sub>2</sub> with a Live Cell chamber (Neve Bioscience) throughout the whole experiment. A gradient was created using a micro-

injector (Picoplus, Harvard Apparatus). The diameter of the tips of the glass microelectrodes used to eject the pharmacological agents were  $< 3 \mu\text{m}$  and the tip was positioned at  $\approx 45^\circ$  and  $\approx 100 \mu\text{m}$  away from the GC of interest.

### **3.3.6 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 2 hr at room temperature. Neurons were then incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  in blocking solution containing anti-GAP-43 (1:1000) for GC morphology analysis, anti-cAMP (1:1000), anti-CB1R (1:1000), anti-FAAH (1:100), anti-MGL (1:500), anti-NFL (1:1000), anti- $\beta$ -actin (1:500). The following day, cells were washed and labeled with Alexa secondary antibodies (488 and 546) and Hoechst 33258, and the coverslips were mounted with Immu-Mount (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

### **3.3.7 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  $\mu$ M FSK, 200 nM KT5720 + AM251, 2  $\mu$ 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 (Pierce), 5 ml per plate at 0.5 mg/ml in PBS at 4°C for 30 min (Bouchard et al., 2004a), 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 (Pierce) and analyzed by Western blot.

### **3.3.8 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 (Barker and Shooter, 1994b). Primary antibodies were used at following concentrations: anti-CB1R (1:1000), anti-GAP43 (1:4000), anti- $\beta$ -actin (1:5000), anti-AKT (1:1000), anti-p-AKT (1:1000), anti-ERK1/2 (1:5000), anti-p-ERK1/2 (1:2000), anti-S6 (1:2000) and anti-p-S6

(1:2000). Results were visualized using chemiluminescence (Perkin Elmer, Montreal, QC).

### 3.3.9 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 an immature nervous system (Clancy et al., 2001). Twenty four hours following birth, at postnatal day 1 (P1), anesthetized hamsters received a unilateral injection of 2  $\mu$ l solution of CTb, a highly sensitive anterograde tracer, with either 0.9% saline solution, 300  $\mu$ M of the CB1R agonist ACEA or 300  $\mu$ 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  $\mu$ l Hamilton syringe. The micropipette was carefully inserted into the vitreous at an angle to avoid damage to the lens. Following the injection, the eyelids were closed with surgical glue (Vetbond; 3M, St-Paul, MN).

### **3.3.10 Perfusion**

At P5, four days postinjection, anesthetized 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.

### **3.3.11 Immunohistochemistry**

The presence of the eCB system during early postnatal development was investigated by immunohistochemistry. The neuro-visual pathway was previously labeled with CTb-FITC to facilitate the localization of retinal projections and their thalamic and midbrain targets. Coronal sections of tissue comprising the optic chiasm, the dLGN and SC were incubated in 70% ethanol for 5 min. They were then rinsed and incubated in 0.1 M glycine in PBS for 30 min, followed by a 1 h incubation in blocking solution (0.1M PBS, 5% NDS and 1% Triton). The sections were then incubated for 48 h at room temperature in the blocking solution containing rabbit anti-CB1R (1:300) or rabbit anti-FAAH (1:200). Subsequently, sections were rinsed and immersed in a blocking solution for 30 min. Sections were then incubated in the blocking solution containing donkey anti-rabbit (555) secondary antibody for 1 h. Sections were

then rinsed and mounted with Immu-Mount. Photomicrographs were taken using a Leica TCS SP2 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Exton, PA). Images were captured in the Alexa fluo 555/546 and Alexa fluo 488/FITC channels, pseudo-colored, merged and exported using Leica LCS software (version 2.61). The pictures were taken sequentially to ensure no 'Bleed-through' between channels.

The effects of intraocular injection of CB1R agonist, inverse agonist and antagonist were visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described (Argaw et al., 2008b). Briefly, 40  $\mu\text{m}$  thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  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, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in PBS for 5 min. The peroxidase was visualized by adding 0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the DAB solution for 2–4 min. Sections were finally washed five times (1 min each) with PBS, mounted on gelatine-chrome alum-subbed slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylenes, and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA).

### 3.3.12 Retinogeniculate projection pattern analysis

For eye specific segregation studies in the dLGN, CB1R<sup>-/-</sup> and CB1R<sup>+/+</sup> adult mice were injected with the B fragment of the cholera toxin (CTb) conjugated to Alexa -546 (CTb-546; red) into the left eye and CTb-488 (green) into the right eye (1.5 – 2 µl; 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 µm 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 software (The Mathworks, Nattick, MA) 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, 2004b; Bjartmar et al., 2006; Stevens et al., 2007b). 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 9).

### **3.3.13 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, 1953b). 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 9).

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 9).

### **3.4 Results**

#### **3.4.1 The developing visual system expresses the CB1R, FAAH and MGL**

To explore the involvement of the eCB system during retinal axon guidance, we first examined the spatio-temporal expression of the CB1R and the eCB degrading enzymes, FAAH and MGL. Furthermore, these components of the eCB system were investigated in the thalamic and midbrain regions

receiving retinal inputs. During early postnatal development, CB1R and FAAH are expressed in the retina (Zabouri et al., 2007), optic chiasm, dLGN and SC (**Figure 1**, and **Supplementary Figure 1 B-F**). At the optic chiasm, CB1R are found in retinal projection axons where they co-localize with the CTb-FITC (B fragment of cholera toxin, administered by intraocular injection to label retinal projections prior to immunohistological experiments, **Figure 1A**). CB1R and FAAH are expressed in the dLGN and the SC throughout the first week of postnatal development (**Figure 1B and C and Supplementary Figure 1E and F**). Their loci change as the neurons forming these nuclei mature. Accordingly, in the dLGN, at P5, the CB1Rs are concentrated in the cell body and their expression diminishes by the end of the first postnatal week, as noted by the lower level of signal in the cell body (**Figure 1B and Supplementary Figure 1E**). By comparison, FAAH expression increased by P9 (**Figure 1B and Supplementary Figure 1E**). In the SC, CB1Rs are localized in neurites and cell bodies and their expression in neurites diminishes during the first week of postnatal development (**Figure 1C and Supplementary Figure 1F**). By contrast, FAAH is less expressed by the cell bodies during early postnatal development (**Figure 1C and Supplementary Figure 1F**). Overall, we observed that during the first week of postnatal development, CB1R and FAAH are expressed along the visual pathway. Specificity of the CB1R and FAAH antibodies was verified



by immuno-labeling retina from CB1R<sup>-/-</sup> and FAAH<sup>-/-</sup> mice. Results are shown in **Supplementary Figure 1A**.

To test more directly whether components of the eCB system are expressed in retinal projection axons and growth cones, E14-E15 mice retinas were dissected and cultured. The CB1R, FAAH and MGL are expressed in retinal projection axons as indicated by the co-localization of their immunoreactivities with NFL labeling (**Figure 1D**). The CB1R and the eCBs degrading enzymes were located in retinal projection GCs and filopodia (**Figure 1D**). Furthermore, the CB1R is present not only in purified cultures of RGCs but also in primary cultures of cortical neurons (**Figure 1E** and **F**, respectively) and continued to be expressed for several days *in vitro* (DIV) as shown by western blot analysis (**Figure 1G** and **Supplementary Figure 1G**). Taken together, these results indicate that the CB1R, FAAH and MGL expressions are spatially and temporally coordinated with the development of RGCs and cortical neurons.

### **3.4.2 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. When primary retinal and

cortical neuron cultures were treated with ACEA, a CB1R agonist, GC surface area and number of filopodia diminished significantly (**Figure 2A-F**). In contrast, application of AM251, a CB1R inverse agonist, to the cultures significantly increased GC surface and filopodia number in RGCs and cortical neurons (**Figure 2A-F**). As expected, forskolin increased retinal projection and cortical neuron GC surface area and filopodia number (**Figure 2A-C, E and F**). To test the effects of CB1R signaling on axon growth, retinal explants were treated overnight with either 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**). 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 in 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., 2007b).

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

Endocannabinoids and their CB1Rs have a diverse range of signal transduction mechanisms. Upon activation, CB1 receptors recruit distinct second-messenger cascades translating into numerous downstream kinase interactions including the Raf-1/ERK1/2 (Derkinderen et al., 2003), and PI3K/Akt (Sánchez et al., 2003; Ozaita et al., 2007) signaling pathways. The implication of these signaling cascades was tested by western blot analysis. In addition, we also investigated the implication of the cell growth regulating signaling pathway mTOR/S6K (Jaworski and Sheng, 2006; Puighermanal et al., 2009a) following CB1R stimulation. Interestingly, in primary neuron cultures, stimulation of the CB1R did not induce changes in ERK1/2, Akt or S6 phosphorylation levels (**Figure 3A**). To confirm the validity of these observations, the experiments were repeated for different stimulation times without any discernible activation of these pathways (**Supplementary Figure 2A and B**). 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 2C and D**). Since it is well documented that the stimulation of CB1Rs and subsequent activation of  $G_{i/o\alpha}$  inhibits adenylate cyclase (Köfalvi, 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 3B** and **C**). Furthermore, PKA phosphorylation was much lower following ACEA stimulation while the opposite was true after AM251 application as indicated by western blot analysis (**Figure 3D**). 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 3E-G**) while ACEA reversed FSK-induced GC surface and filopodia increases (**Figure 3E-G**). These data demonstrate that CB1R activation modulates GC morphology via the cAMP/PKA pathway.

#### **3.4.4 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., 2004a; Moore and Kennedy, 2006; Bouchard et al., 2008). Our results show that the cAMP/PKA pathway functions as a downstream effector for eCBs during GC guidance. Since CB1R

and DCC are expressed in developing neurons, it is reasonable to investigate the potential interaction between these two receptors. As previously reported, immunoreactivities for DCC show that this receptor is expressed in primary cortical neurons (Bouchard et al., 2008) and retinal projection axons and GCs (Deiner et al., 1997b) (**Figure 4A**). 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 surfaces following the treatments was visualized by western blot analysis (**Figure 4B**). Interestingly, CB1R antagonist and inverse agonist significantly increased the amount of DCC at the plasma membrane (**Figure 4B**). FSK also augmented the presence of DCC at the neuronal surface. To verify whether 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 analysis, inhibition of PKA abolished AM251 and FSK induced increases in DCC at the plasma membrane (**Figure 4B**) demonstrating that DCC mobilization is downstream of PKA signalling. To determine whether DCC is required for CB1R induced reorganization of the GC's morphology, primary neuron cultures were exposed to DCC function blocking antibody ( $\alpha$ DCCfb) for 15 min before the addition of CB1R modulators.  $\alpha$ DCCfb blocked AM251 and O2050 induced GC

area and filopodia number increases (**Figure 4C** and **D**, respectively and **Supplementary Figure 3A**). These effects were also observed for FSK (**Figure 4C** and **D**). 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 4E, G** 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 4F, H** 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**).

#### **3.4.5 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, 1991b). 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 affects RGC axon development. Indeed, intraocular injection of ACEA induced a significant decrease in RGC axon branch growth in the dorsal terminal nucleus (DTN) without any significant difference 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 neurons in the dLGN. These projections spread throughout the dLGN sharing common terminal space. During postnatal development, an eye-specific segregation occurs (Godement et al., 1984). In the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. The implication of the CB1R during retinogeniculate

development was further investigated in the dLGN in adult CB1R-deficient mice (CB1R<sup>-/-</sup>) and their wild-type (CB1R<sup>+/+</sup>) littermates. The area occupied by contralateral projections was larger in CB1R<sup>-/-</sup> mice compared with CB1R<sup>+/+</sup> mice (**Figure 5E**). The contra- and ipsilateral retinal projection images were quantified using a multi-threshold method of analysis with MatLab software (The Mathworks, Nattick, MA). These data indicate a significant overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of CB1R<sup>-/-</sup> mice (**Figure 5F**). The segregation defects observed were not due to an uneven labeling of RGCs in the retina since the optic nerves of both eyes were similarly labeled following intraocular injections of anterograde tracers (**Supplementary Figure 4D**).

### 3.5 Discussion

Our findings show that, *in vivo*, the CB1R and FAAH expressions' are spatially and temporally synchronized with the development of RGC projections and their target cells in the dLGN and SC (**Figure 1A-C** and **Supplementary Figure 1 B-F**). 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 the presence of the CB1R and FAAH in nuclei that are critical for the formation of a functional visual pathway. Consequently, these results suggest the implication of the eCBs system during retinothalamic and retino-collicular development. In accordance with previous reports, our data demonstrate the presence of the CB1R, in RGCs and in cortical neurons *in vitro* (**Figure 1E-G** and **Supplementary Figure 1G**) (Lalonde et al., 2006; Vitalis et al., 2008a). Furthermore, it also shows that FAAH and MGL are expressed by retinal projection axons and GCs. These findings strongly suggest the presence of a functional eCB system in the developing neuro-visual system.

We found that pharmacological activation or blockade of the CB1R activity modulates RGC and cortical neuron GCs' morphology (**Figure 2A-F**). Accordingly, CB1R agonist collapsed 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., 2007b). Additionally, our data indicate that the CB1R negatively regulates retinal projection growth (**Figure 2G** and **H**). This is in accordance with a recently published study using transfected hippocampal neurons (Vitalis et al., 2008a). On the other hand, 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., 2003a; Mulder et al., 2008a). Although our present understanding of the eCBs system does not permit a conciliatory explanation for these opposing results, our findings coupled with those previously reported clearly demonstrate the modulatory role played by the CB1R during neurite development. Additionally, our results clearly demonstrate that the CB1R activity at the GC affects 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., 2007b). Furthermore, the presence of the CB1R, FAAH and MGL in retinal axons and GCs (**Figure 1D**) and the CB1R-induced retinal GC steering (**Figure 2I-L**) suggest that these neurons use target-derived eCBs as directional cues for GC steering decisions. These findings challenge the rationale 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). This divergence might be explained in part by the difference in the tissues studied by Mulder *et al.* (2008) and our study. Nevertheless, these findings highlight the intricate mechanism by which the eCB system modulates the development of various neuron populations.

Our data indicate that the CB1R utilises the cAMP/PKA pathway as second-messenger for downstream signaling to regulate GC morphology

**(Figure 3B-G)**. 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.* (2009) showed that CB1Rs expressed on GABAergic interneurons transiently modulate the mTOR/S6K pathway. Despite various experimental conditions, we were unable to reproduce these observations in our cultures of glutamatergic neurons (**Figure 3A** and **Supplementary Figure 2**). Most importantly, our findings show that the CB1R reorganizes the GC morphology through DCC, a receptor for netrin-1. Firstly, our data show that CB1R activity influences the level of DCC at the plasma membrane. Accordingly, blocking the constitutive CB1R activity enhanced the level of DCC at the plasma membrane in a PKA-dependent manner (**Figure 4B**). Secondly, our results demonstrate that for the CB1R-induced GC reorganization requires the presence of a functional DCC at the GC (**Figure 4E-H** and **Supplementary Figure 3**). The functional implication of these findings is that the eCB system modulates axon guidance and brain wiring through its receptors by modulating the GC's behavior to guidance cues present in its microenvironment (please refer to the working model **Supplementary Figure 4E**). For example, 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.

*In vivo*, our data show that pharmacological and genetic interference with the CB1R activity profoundly affect 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 the mechanism by which the eCB system modulates retinothalamic development and nervous system wiring and offers a potential mechanism by which parental exposure to CB1R agonists like  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, the major psychoactive constituent in cannabis, affects brain wiring and CNS development in the offspring.

### 3.6 References

- Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F (2008) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Experimental Neurology* 211:494-502.
- 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* 13:203-215.
- 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. *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* 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. *Journal of Neurochemistry* 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.
- Chien FY, Wang RF, Mittag TW, Podos SM (2003) Effect of WIN 55212-2, a cannabinoid receptor agonist, on aqueous humor dynamics in monkeys. *Arch Ophthalmol* 121:87-90.
- 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.
- Gawienowski A, Chatterjee D, Anderson P, Epstein D, Grant W (1982) Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on monoamine oxidase activity in bovine eye tissues, in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22:482-485.

- 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.
- Harkany T, Mackie K, Doherty P (2008a) Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Current Opinion in Neurobiology* 18:338-345.
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J (2008b) 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.
- Isenmann S, Kretz A, Cellierino 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.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol Rev* 89:309-380.



- Köfalvi A (2008) *Cannabinoids and the Brain*. New York, NY: Springer.
- 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 (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous. *Handb Exp Pharmacol* 168:299-325.
- Mackie K (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286:S60-S65.
- Matsuda S, Kanemitsu N, Nakamura A, Mimura Y, Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S (1997) Metabolism of Anandamide, an Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, in Porcine Ocular Tissues. *Experimental Eye Research* 64:707-711.
- 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.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:8760-8765.

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.

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* advance online publication.

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.

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.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14565-14570.

Torborg CL, Feller MB (2004) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *Journal of Neuroscience Methods* 135:17-26.

- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.
- Vitalis T, Jeanne L, Anne S, Alexandre R, Christophe L, Zsolt L (2008) The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 28:1705-1718.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 38:89-97.
- 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.
- 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. *The Journal of Comparative Neurology* 415:80-90.

Zabouri N, Bouchard J-F, Casanova C (2007) Expression of the endocannabinoid receptor CB1 and the FAAH enzyme during retinal development in the rat. In: 37th annual meeting of The Society for Neuroscience annual meeting, p 461.423/F439. San Diego, CA: Society for Neuroscience.

### **3.7 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, analyzed 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 analyzed imaging data. N.T. performed the western blot analysis. N.Z. performed the immunohistochemistry experiments and the confocal photomicrographs. B.L. kindly provided the CB1R transgenic mouse developed by his research team. B.L. and M.P. contributed to the preparation of the manuscript. J.F.B. designed and supervised the project, performed the

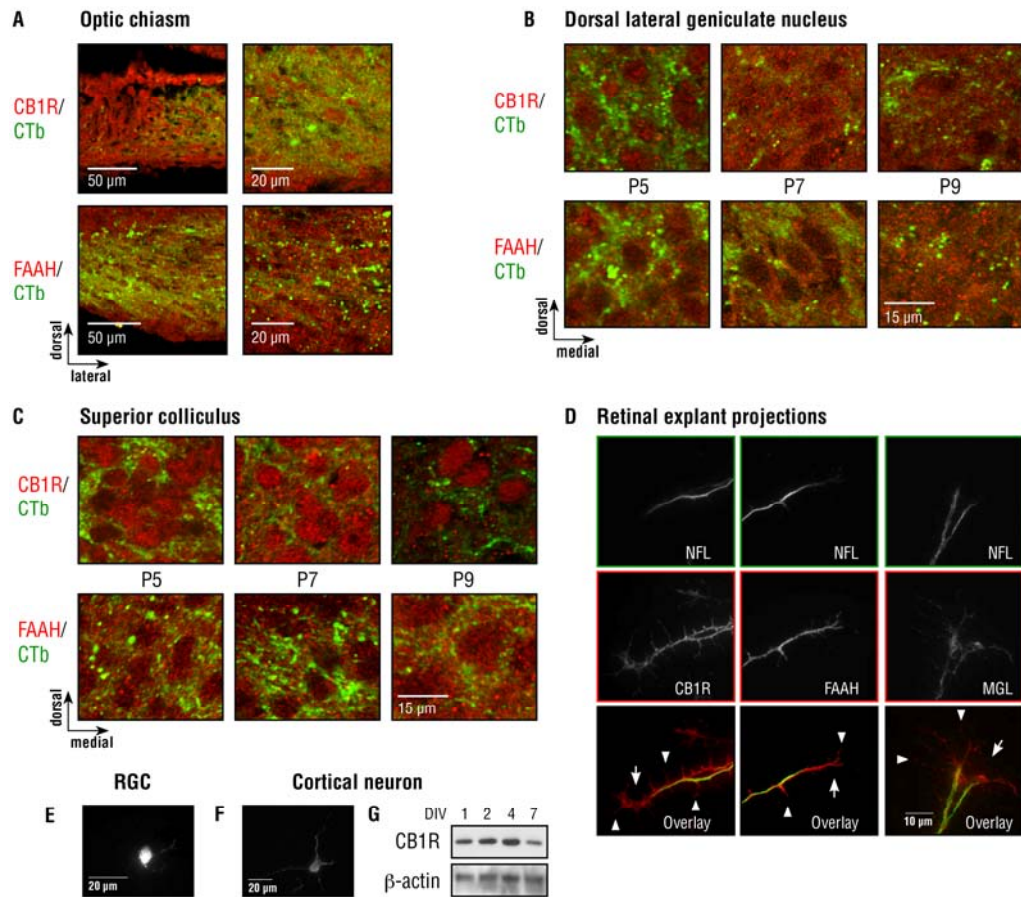
biotinylation experiments and contributed to the preparation of this manuscript.

### 3.8 Figure legends

#### Figure 3.1. Expression of the eCB system in the developing visual system.

**A-C**, Photomicrographs of coronal sections of CTb-FITC labeled retinal projections at the optic chiasm (**A**), dLGN (**B**), and SC (**C**) immunostained for CB1R or FAAH. Their expressions are spatially and temporally coordinated with the development of retinal ganglion cells and their thalamic (dLGN) and midbrain (SC) targets. At P1, hamsters received a unilateral intraocular injection of CTb-FITC, to mark retinal projections. **D**, Retinal ganglion cell projections from E14-15 mice retinal explants cultured for 1DIV and immunolabeled for CB1R, FAAH, MGL, and NFL. Arrows indicate the GC and arrowheads show axonal and GC filopodia. **E** and **F**, A retinal ganglion cell and a primary cortical neuron immunostained for CB1R. **G**, Western blot analysis of CB1R expression in primary cortical neuron cultures at different DIVs.

Figure 1



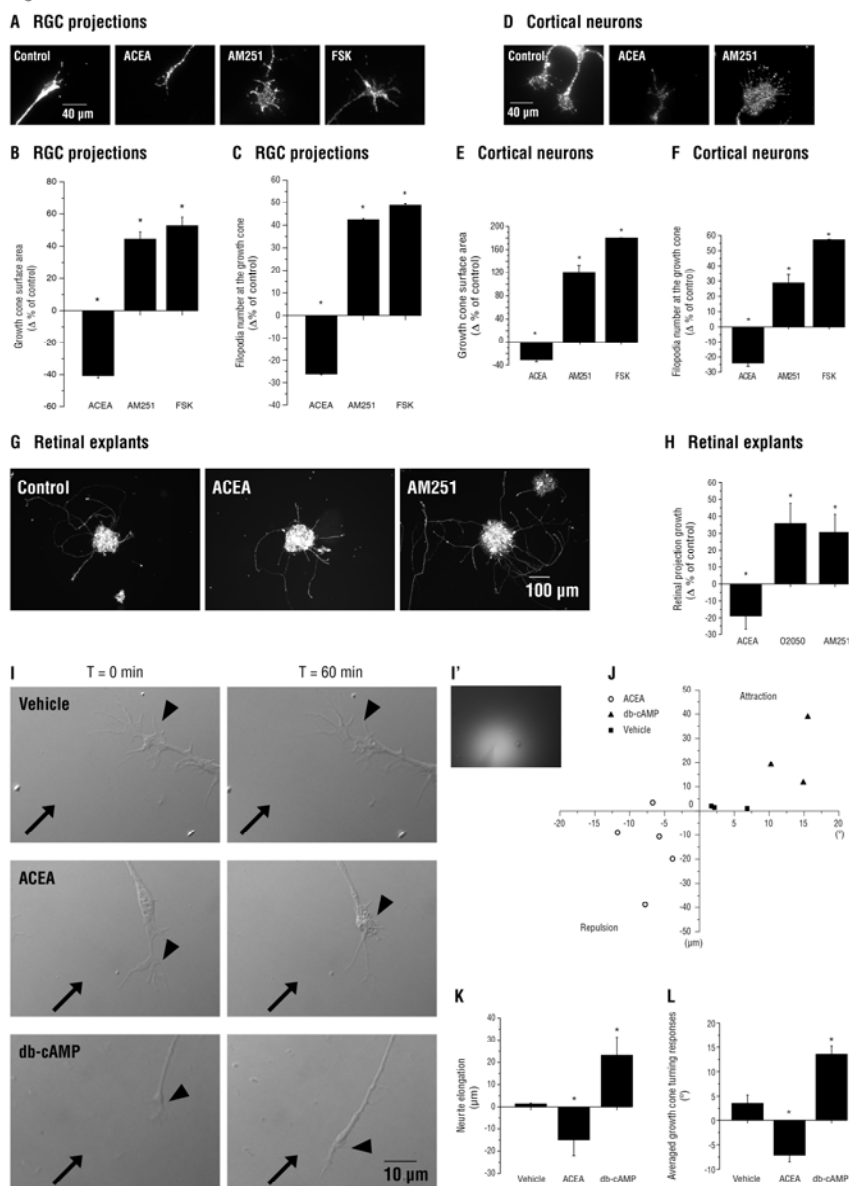
**Figure 3. 1** Expression of the eCB system in the developing visual system.



**Figure 3.2 Pharmacological manipulation 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), 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 overnight with ACEA or AM251. **H**, Quantification of retinal projection growth subsequent to treatments with CB1R agonist or inverse agonist. **I**, Photomicrographs of RGC projection GCs taken at  $t = 0$  min and 60 min. during GC turning assay experiments. Arrows indicate the direction of the microgradient while arrowheads show the neurite stimulated. **I'**, Representative photomicrograph of the microgradient created during drug stimulation. **J**, Scatter plot analysis of GC behavior as a result of CB1R agonist, db-cAMP or vehicle application. **K** 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;  $p < 0.05$  (**B**, **H**, **K** and **L**),  $p < 0.01$  (**C**, **E** and **F**).

Figure 2

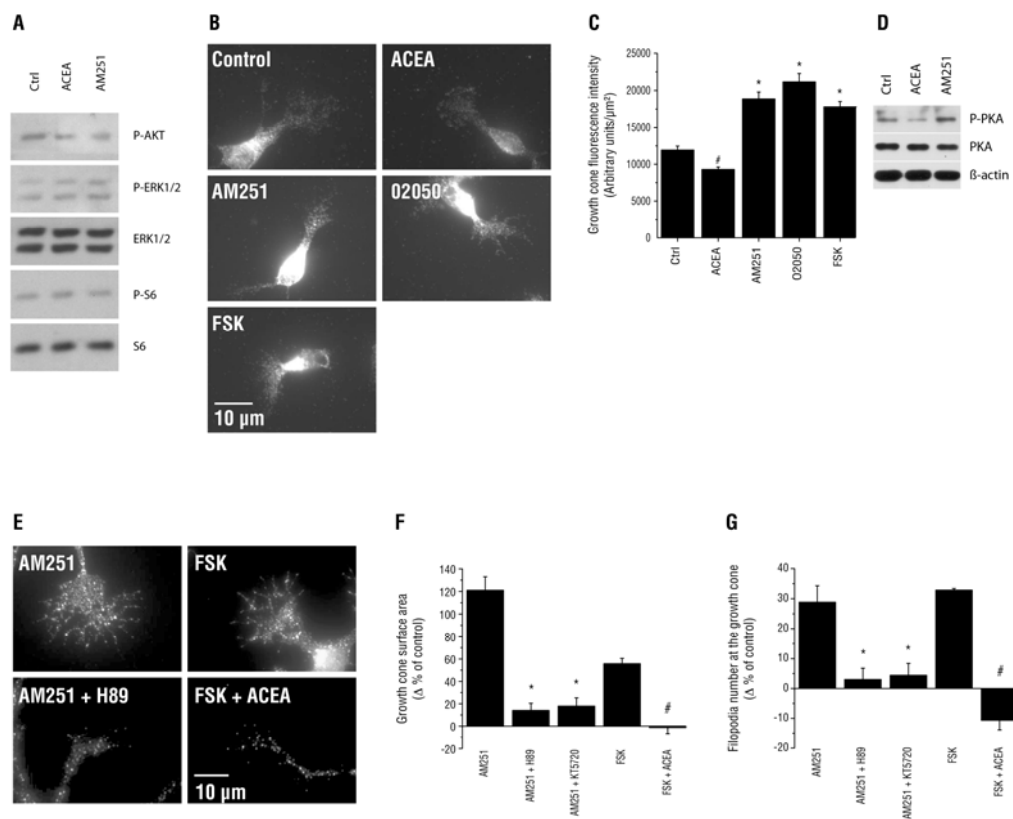


**Figure 3.2** Pharmacological manipulation of the CB1R reorganizes the morphology of the GC and modulates axonal growth and navigation.

**Figure 3.3 The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway.**

**A**, Western blot analysis of downstream kinases previously suggested to modulate eCB action. **B**, Photomicrographs of cortical neuron cultures immunolabeled for cAMP following 15 min stimulation with ACEA, AM251, O2050, or FSK. **C**, 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. **D**, Western analysis of PKA phosphorylation following ACEA or AM251 stimulation. **E**, Photomicrographs of GCs treated with CB1R inverse agonist and agonist, FSK and PKA inhibitors. **F** and **G**, GC surface area and filopodia analysis subsequent to the addition of a CB1R inverse agonist and simultaneous inhibition of PKA or the activation of PKA and the addition of a CB1R agonist. Values are presented as mean  $\pm$  sem. \* indicates a significant change compared with the AM251 group and # with the FSK group ( $p < 0.0001$ ).

Figure 3



**Figure 3. 3** The CB1R modulates growth cone morphology through the cAMP/PKA pathway.

**Figure 3.4 DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC.**

**A**, E14-15 mice RGC projections immunolabeled for DCC and L1. **B**, Total and biotinylated proteins analyzed by Western blot with antibodies directed against either DCC,  $\beta$ -actin, CB1R, or NCAM. **C** and **D**, GC surface area and filopodia number analysis of cortical neuron cultures treated with  $\alpha$ DCCfb followed by the addition of either a CB1R inverse agonist or antagonist (AM251 or O2050, respectively) or FSK. **E-H**, GC surface area and filopodia number analysis of *dcc*<sup>-/-</sup> (**E** and **G**) and *dcc*<sup>+/+</sup> (**F** and **H**) 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 **C** and **D**, and the control group in **F** and **H**;  $p < 0.05$ .

Figure 4

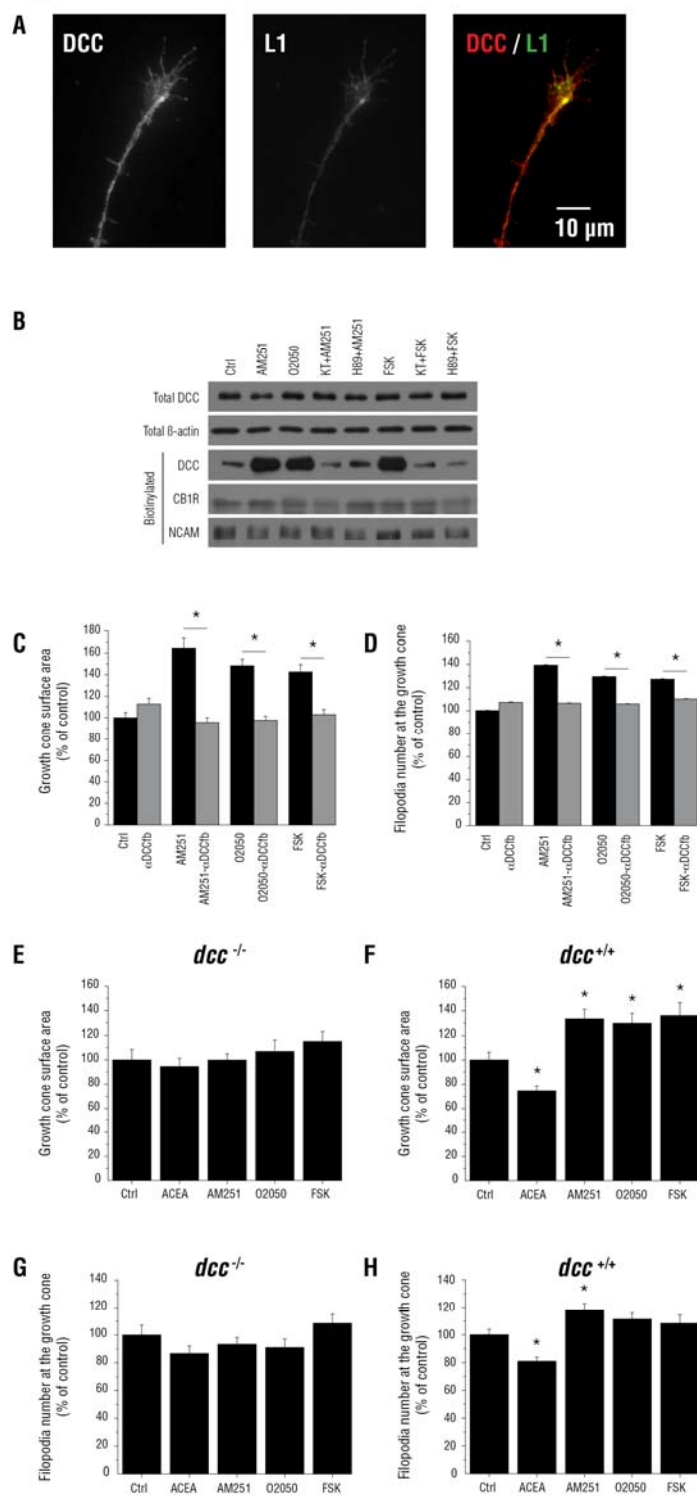
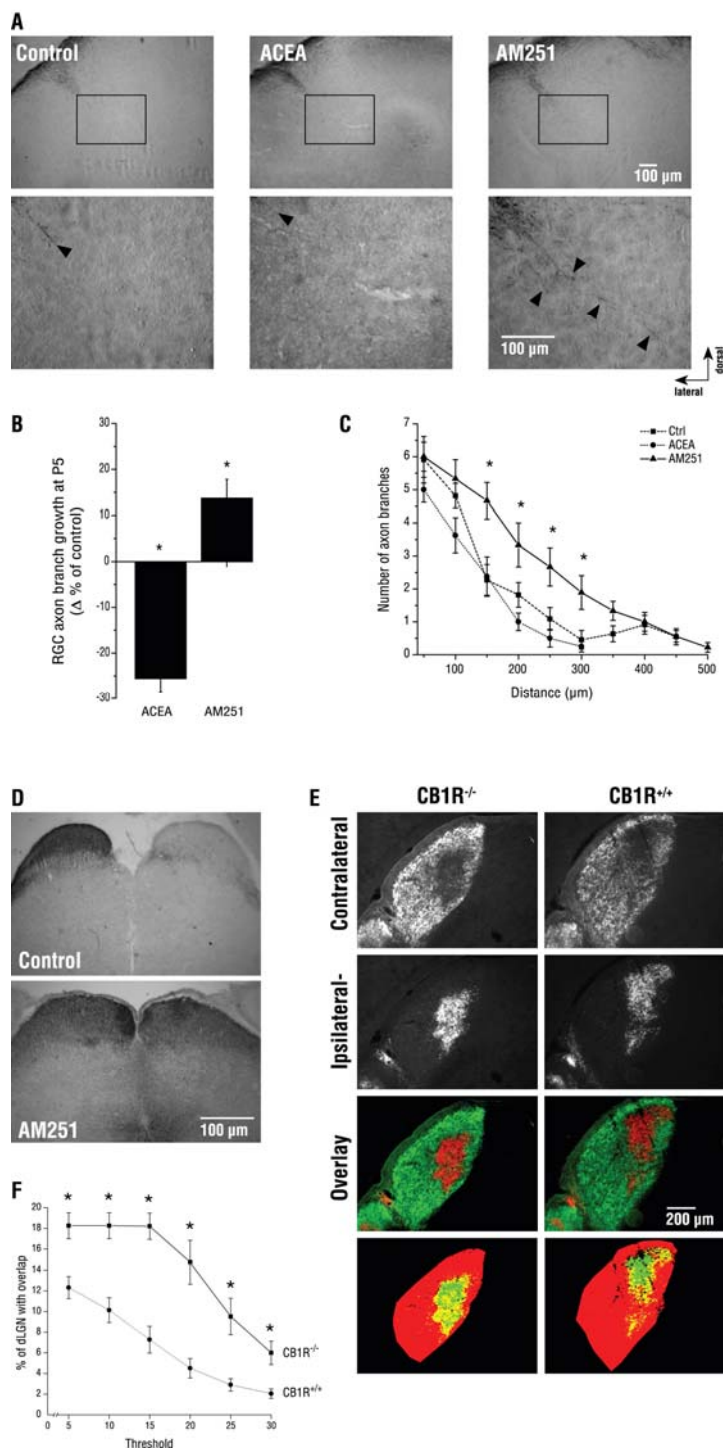


Figure 3.4 DCC is necessary for CB1R induced reorganization of the GC.

**Figure 3.5 Pharmacological modulation of CB1R activity affects 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<sup>-/-</sup> and CB1R<sup>+/+</sup> adult mice. **F**, Quantification of the percentage of the dLGN receiving overlapping inputs in CB1R<sup>-/-</sup> and CB1R<sup>+/+</sup> adult mice. Data are presented as means ± sem. \* indicates a significant change compared with the control group in **B** and **C** ( $p < 0.05$ ) and the CB1R<sup>+/+</sup> group in **F** ( $p < 0.005$ ).

Figure 5



**Figure 3. 5 Pharmacological modulation of CB1R activity affects retinal projection development *in vivo*.**

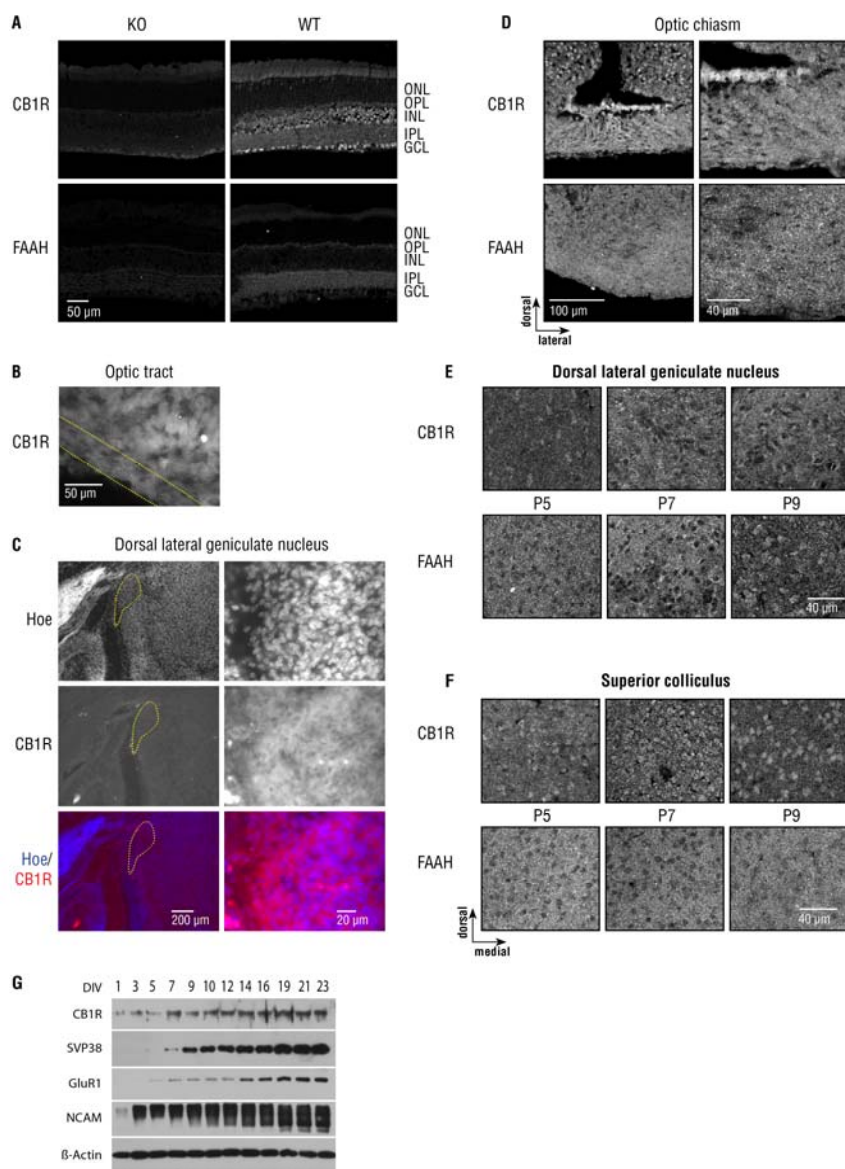


### 3.9 Supplementary figure legends

#### Supp. Fig. 3.1 Expression of the CB1R and FAAH.

**A**, Photomicrographs of retinal tissues from CB1R<sup>-/-</sup> and FAAH<sup>-/-</sup> mice and matched wild type animals showing CB1R and FAAH antibody specificity. **B** and **C**, Coronal sections of P0 brain immunolabelled for CB1R at the optic tract (**B**) and the dLGN (**C**). The dotted area delineates the optic tract (**A**) and the dLGN (**B**). **D-F**, Photomicrographs of coronal sections showing CB1R and FAAH expressions at the optic chiasm (**D**), dLGN (**E**) and SC (**F**) during the early postnatal development. **G**, Western blot analysis of CB1R expression in primary neuron cultures at several DIVs. ONL, Outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, Inner nuclear layer; IPL, Inner plexiform layer; GCL, Ganglion cell layer.

Supplementary Figure 1

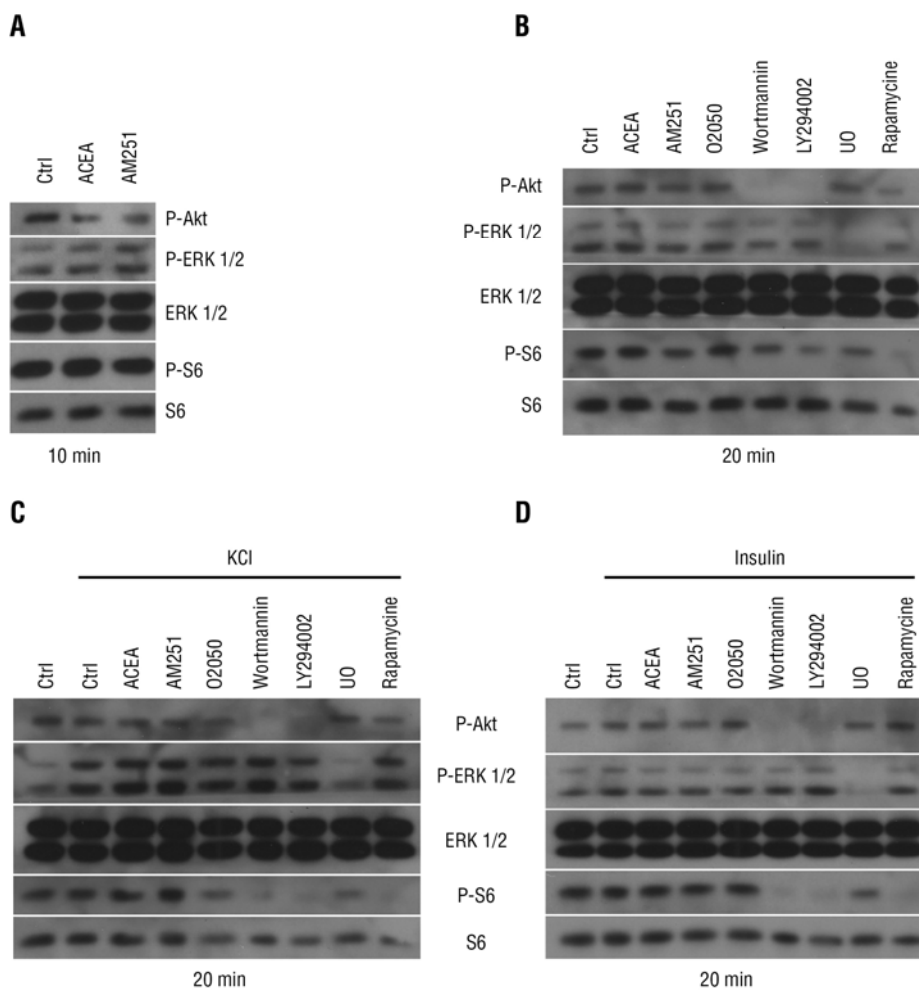


Supp. Fig. 3. 1 Expression of the CB1R and FAAH

**Supp. Fig. 3.2 CB1R activity and second-messenger cascades.**

Agonist, inverse agonist and antagonist did not activate the PI3K, ERK1/2 or mTOR pathways following 10 min (A) and 20 min (B) treatments. CB1R stimulation following KCl induced depolarisation (C) or insulin treatment (D) failed to recruit PI3K, ERK1/2 or mTOR second messenger cascades.

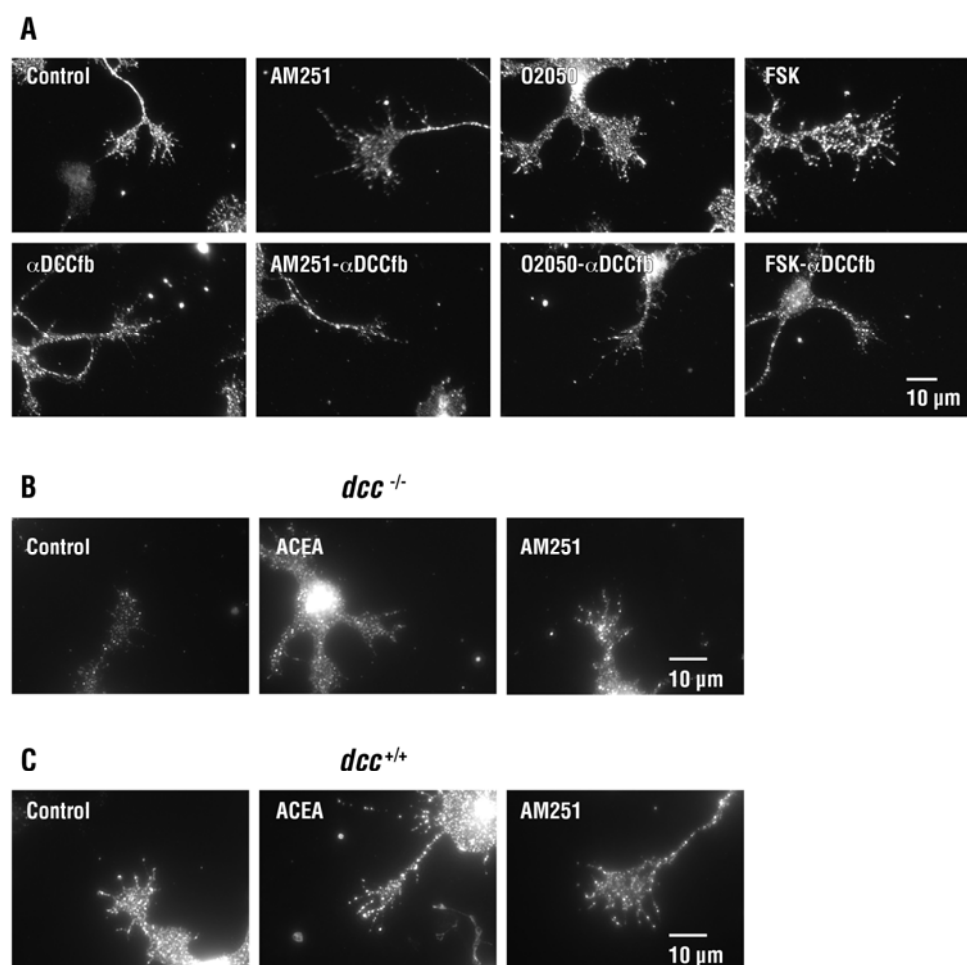
## Supplementary Figure 2

**Supp. Fig. 3. 2** CB1R activity and second-messenger cascades.

**Supp. Fig. 3.3 DCC regulates CB1R induced reorganization of the GC.**

**A**, Photomicrographs of primary neuron cultures treated with  $\alpha$ DCCfb followed by the addition of either a CB1R inverse agonist or antagonist (AM251 or O2050, respectively) or FSK. GC photomicrographs of *dcc*<sup>-/-</sup> (**B**) and *dcc*<sup>+/+</sup> (**C**) primary neuron cultures treated with either ACEA or AM251.

## Supplementary Figure 3

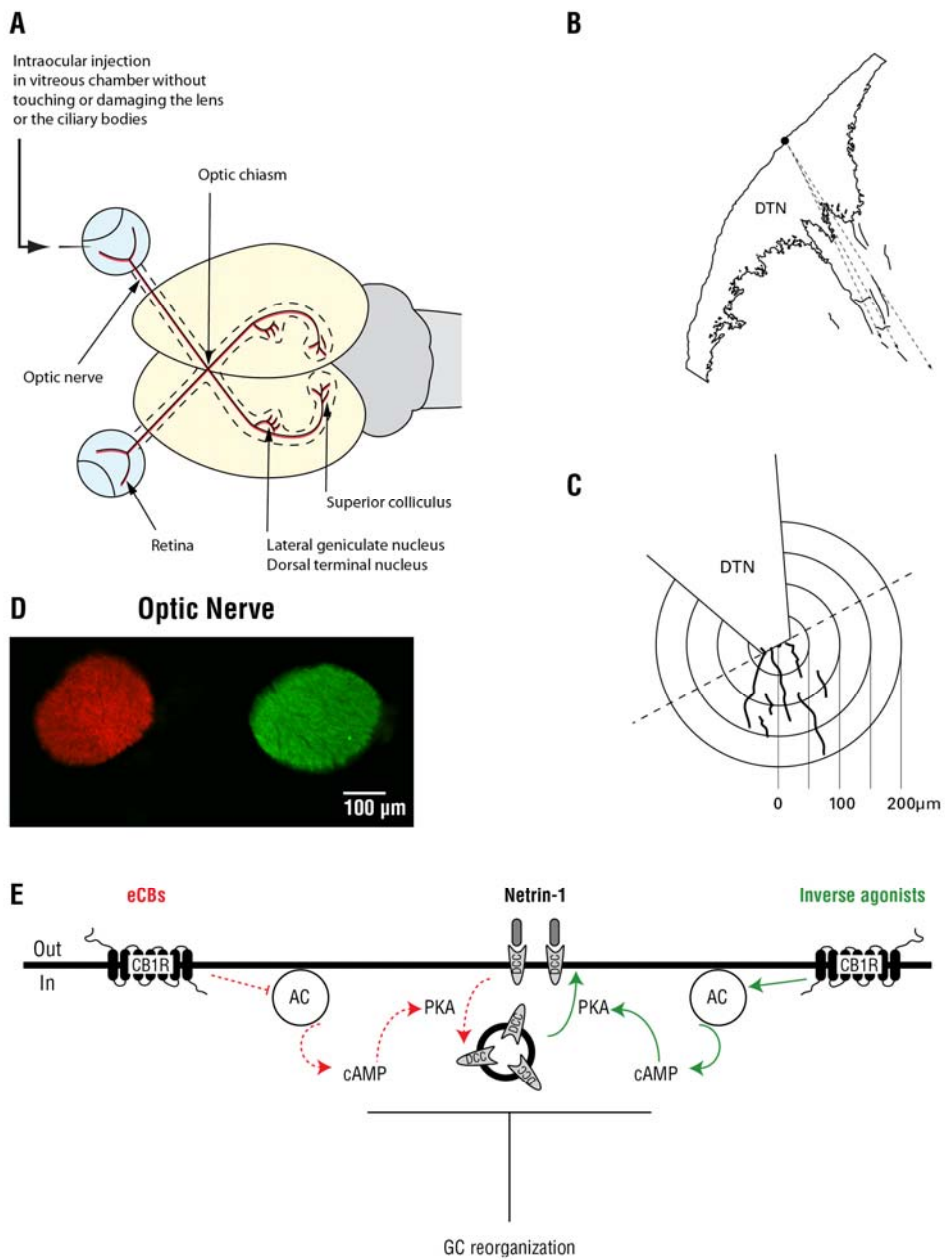


**Supp. Fig. 3. 3** DCC regulates CB1R induced reorganization of the GC.

**Supp. Fig. 3.4 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.

## Supplementary Figure 4



**Supp. Fig. 3. 4** Intraocular injections and mechanism by which cannabinoids modulate GC steering.



## CHAPITRE 4

**Cannabinoid receptor CB2R influences axon guidance via Deleted in Colorectal Cancer (DCC)**

Gabriel Duff<sup>1,2</sup>, Anteneh Argaw<sup>1,3</sup>, Jean-François Bouchard<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

<sup>3</sup>Department of Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3T 1J4

Corresponding author:

Jean-François Bouchard

School of Optometry, University of Montreal

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

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1P1

Phone: (514) 343-6111 ext. 4083

Fax: (514) 343-2382

#### 4.1 Summary

Navigation of retinal projections towards their visual targets is regulated by guidance molecules and growth cone transduction mechanisms. Here, we show that cannabinoid receptor 2 (CB2R) is widely expressed throughout the optical pathway during the development of the retinothalamic system. Both the number of filopodia and the surface area of the growth cone (GC) are modulated by CB2R activity in a PKA-dependant manner. Furthermore, Deleted in Colorectal Cancer (DCC), a receptor for the guidance molecule netrin-1, is required for CB2R induced morphological changes of the GC. CB2R agonists induce GC chemorepulsion and conversely, treatments with CB2R inverse agonists increase retinal explants projections length. These effects are specific to CB2R as no change was recorded in transgenic mouse where the gene coding for the CB2R was altered (CB2R<sup>-/-</sup>). In vivo, a single intraocular injection of CB2R inverse agonist, AM630, increases retinal projection branch length and aberrant projections were also observed in some animals. Moreover, in CB2R<sup>-/-</sup> mice, we report defects in eye-specific segregation of retinal projections in the dLGN in CB2R<sup>-/-</sup> mice. These findings highlight the modulatory role of endocannabinoids and their CB2Rs during the formation of the retinothalamic system.

Author Keywords: CB2R, DCC, growth cone, axon guidance

## 4.2 Introduction

The endogenous cannabinoid system consists of endocannabinoids (eCBs), their synthetic and degrading enzymes, and the cannabinoid receptors (Salzet, 2000). These receptors are 7 transmembrane domain proteins coupled to a heterotrimeric G protein. The type 1 (CB1R) and type 2 (CB2R) are the principal receptors that have been characterized (Howlett et al., 2002). The CB2R was first cloned in mammals by Shire et al. (1996). It is pertussis toxin sensitive, indicating the coupling to a  $G_{i/o}$  protein (Howlett, 1995). Its principal signaling pathway is through inhibition of adenylate cyclase (AC), which leads to a reduction of cAMP production (Felder et al., 1995). cAMP is a second messenger known to cause various changes in proteins activity including PKA and MAPK (Walsh et al., 1968; Frodin et al., 1994). CB2R presence has been reported during development using different *in vivo* and *in vitro* techniques, in several neuronal cell types from various species. In particular, CB2Rs are expressed in cultured mouse cerebellar granule cells and cerebellum sections (Skaper et al., 1996) as well as in rat cultured dorsal root ganglia neurons and neuronal progenitors (Ross et al., 2001; Palazuelos et al., 2006). Moreover, the presence of CB2R in adult mammalian central nervous system (CNS) has been reported in brainstem, cerebella and hippocampal pyramidal neurons (Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006b; Onaivi et al., 2006b). CB2R is also extensively expressed in peripheral and immune tissues (Klein et al., 2003).

However, currently, there is no evidence of its expression in developing visual system.

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

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

Goncalves et al., 2008), no emphasis has been put on the role played by the CB2R on axon guidance during CNS development.

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

During the development of the visual system, RGCs axons navigate from the retina to their thalamic and midbrain targets. RGC axons steer towards the optic chiasm (OC) where the majority of axons decussate to reach the contralateral side while a small percentage remain ipsilaterally. When axons reach their main visual targets, namely the dorsal lateral geniculate

nucleus (dLGN) and superior colliculus (SC), they stop their navigation to form synaptic connections (Erskine and Herrera, 2007). As eCBs levels greatly vary in the brain during the development (Berrendero et al., 1999) and that we report CB2R presence in developing CNS, it is plausible to speculate that eCBs, via their CB2R, could affect axonal navigation.

### **4.3 Materials and Methods**

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

#### **4.3.1 Products**

Anti-GAPDH antibody, Bovine serum albumin (BSA), ciliary neurotrophic factor (CNTF), dibutyryl cAMP (db-cAMP), DNase, dextran-FITC, forskolin (FSK), hoechst 33258, insulin, KT5720, laminin, monoclonal anti- $\beta$ -actin, monoclonal anti-MAP Kinase (Diphosphorylated Erk-1&2), poly-D-lysine, progesterone, putrescine, selenium, apotransferrin, triiodo-thyronine, and trypsin were all purchased from Sigma (Oakville, ON). B27, dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), foetal bovine serum (FBS), glutamine, N2, neurobasal media, penicillin-streptomycin, S-MEM and sodium pyruvate were

bought from Invitrogen Canada (Burlington, ON). Anti-NCAM, anti-neurofilament-L, anti-pPKA C and anti-PKA C- $\alpha$  antibodies were from Cell Signaling Tech (Beverly, MA). Normal donkey serum (NDS) and normal goat serum (NGS) were from Jackson Immuno (West Grove, PA). Shandon immu-mount was bought from Thermo Scientific (Pittsburgh, PA). AM630, JTE907, JWH015, JWH133 were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MI). Primary antibodies GAP-43 and cAMP were from Chemicon International (Temecula, CA). Anti-DCC<sub>FB</sub> AF5, H89, LNAC, LY294002, rapamycin and wortmannin were purchased from EMD (La Jolla, CA). Primary antibody against L1 and alexa fluor conjugated secondary antibodies (Alexa-350, Alexa-488 and Alexa-546) were obtained from Invitrogen. Avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit and donkey anti-goat biotinylated secondary antibody were from Vector Labs (Burlingame, CA). The B fragment of the cholera toxin (CTb) and goat anti-CTb were from List Biological Laboratories (Campbell, CA). Anti-CB2R and anti-MGL were purchased from Cayman (Ann Arbor, Michigan). Another anti-CB2R was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

#### **4.3.2 Primary Cortical Neuron Culture**

Staged pregnant CD1 mice were obtained from Charles Rivers (St-Constant, Qc). E14-15 mouse embryo cortices were isolated surgically and transferred in a vial containing 2ml S-MEM at 37°C supplemented with 2.5%



trypsin and 2mg/ml DNase for 15 minutes. The pellet was then transferred into 10ml S-MEM with cold 10% FBS and briefly centrifuged. The pellet was again transferred in 2ml S-MEM with 10% FBS and triturated 3 or 4 times. The supernatant was removed and inserted into 10 ml Neurobasal medium. Dissociated cells were counted and cultured in 24 well plates on 12mm poly-D-lysine treated glass coverslips (20µg/ml; 50 000 cells/well). Cells were cultured for 2 days *in vitro* (DIV2) in neurobasal medium containing 1% B-27, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 0.25% N2 and 0.5mM glutamine for GC analysis. Wells were treated with either CB2R agonists (300nM JWH133 or JWH015), CB2R inverse agonists (300nM AM630 or JTE907), adenylyl cyclase activator (10µM FSK), PKA inhibitors (200nM KT5720 or 2µM H89) or DCC function blocking (3.5µg/ml anti-DCC<sub>FB</sub> AF5) for 1 hour for GC morphology experiments or for 15 minutes for cAMP immunocytochemistry.

#### **4.3.3 Retinal Explant Culture**

E14-15 mouse embryos retinas were isolated and dissected in small segments in ice cold DPBS and cultivated in 24 well plates on 12mm poly-D-lysine (20µg/ml) and laminin (5µg/ml) treated glass coverslips. Explants were cultured in Neurobasal supplemented with 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 5µg/ml LNAC, 1% B27, 40ng/ml selenium, 16µg/ml putrescine, 0.04ng/ml triiodo-thyronine, 100µg/ml transferrin, 60ng/ml progesterone,

100µg/ml BSA, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 10 ng/ml ciliary neurotrophic factor (CNTF), 5 µg/ml insulin, and 10 µM FSK. Explants were treated for 15 hours at DIV0 (1 hour following plating) for projection analysis or for 1 hour at DIV1 for GC analysis assay. Photomicrographs for projection analysis were taken using an Olympus BX51WI microscope (Olympus Canada, Markham, ON) with a 10X objective lens and analyzed using Image Pro Plus 5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD). The total length of axon bundles was quantified and expressed as mean±SEM. Statistical significance of differences between means was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test (Systat).

#### **4.3.4 Immunocytochemistry**

Plates were put on ice, washed with ice cold PBS (pH 7.4) and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes. Primary neuron and retinal explants cultures were blocked in 2% NGS and 2% BSA in PBS during 30 minutes at room temperature. Antibodies were added overnight in a blocking solution at the following concentrations : anti-GAP-43 1:1000, anti-CB2Rsc 1:100, anti-CB2Rcayman 1:500, anti-MGL 1:500, anti-L1 1:500, anti-cAMP 1:1000, anti-β-actin 1:1000 et anti-NFL 1:500. Wells were washed with PBST, incubated with secondary antibodies Alexa-350, 488 or 546 for 2 hours at

room temperature. Nuclei were labeled with Hoechst 33258 and coverslips were mounted with Immu-mount (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

#### **4.3.5 Quantification of cAMP Immunoreactivity**

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

#### **4.3.6 Western Blots**

Dissociated primary cortical neurons were cultured for 2 DIV at a density of approximately 250 000 cells/dish in 35mm poly-D-lysine coated dish. After 10 minutes treatment with CB2R agonists (300nM JWH133 or JWH015), CB2R inverse agonists (300nM AM630 or JTE907), adenylylase activator (10 $\mu$ M FSK), neurons were washed once with ice-cold PBS and lysed

with Laemmli sample buffer (Barker and Shooter, 1994a). Samples were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis on 8% gels. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membrane (BioTrace NT, Pall Corporation, Pensacola, FL) and blocked for 2 h by incubation in 5% non-fat dry milk in TBST (TBS containing 0.1% Tween 20) or in 2% bovine serum albumin (BSA) in TBST. Western blot analysis was performed using anti-CB2Rcayman 1:1000, anti- $\beta$ -actin 1:5000, anti-GAPDH 1:20000, anti-pPKA 1:1000, anti-PKA<sub>TOTAL</sub> 1:1000 overnight at 4°C. After 2 h of incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), bands were visualized using the Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus kit (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Immunoreactivity was imaged with a ScanJet 5300C (Hewlett Packard Canada, Mississauga, ON, Canada).

#### **4.3.7 Surface biotinylation.**

E14-15 commissural neurons were plated and cultured for 2 d at a density of 2,000,000 cells per 100 mm PDL-coated tissue culture dish. On day 2, cells were treated with CB2R inverse agonists (300nM AM630 or JTE907), AM630 and PKA inhibitors (200nM KT5720 or 2 $\mu$ M H89), adenylylate cyclase activator (10 $\mu$ M FSK), or vehicle for 15 min. Cells were then washed with ice-cold PBS containing 0.1 mM calcium chloride and 1 mM magnesium chloride,

pH 7.4, to halt protein trafficking (Meyer-Franke et al., 1998a). Surface biotinylation was performed by adding EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin, 5 ml per plate at 0.5 mg/ml in PBS at 4°C for 30 min, removed, and the reaction was quenched by the addition of 5ml of 10mM ice-cold glycine in PBS at 4°C for two 10 min periods. Subsequently, cells were washed twice with 5 ml of ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer. Biotinylated proteins were precipitated with streptavidin–agarose and analyzed by Western blot.

#### **4.3.8 Time-lapse Microinjections**

Retinal explants were cultured in borosilicate chambered coverglass (Lab-Tek; Rochester, NY). At DIV1, chambers were installed in a Live Cell chamber (5% CO<sub>2</sub>, 37<sup>0</sup>C) (Neue Bioscience, Camp Hill, PA) attached to an inverted Olympus IX71 microscope. Glass micropipettes with an orifice of less than 3µm diameter were mounted on Burleigh PCS 5000 Series micromanipulator (Life Sciences, Mississauga, ON), and positioned at ≈ 45° and ≈ 100µm away from the growth cone of interest. Drugs were injected with a Pico Plus injector (Havard Apparatus - Model 702213) at 0.05 µl/min for 30 minutes for dbcAMP group and 60 minutes for other groups. The injection caused a concentration gradient which was visualized with immunofluorescent dextran-FITC (Figure 4E), indicating that the drugs reached the GC.



phosphate-buffered saline followed by 4% paraformaldehyde in PBS. The brains were removed, postfixed overnight at 4 °C, cryoprotected by infiltration of buffered sucrose, flash frozen and kept at -80 °C until further processing.

#### **4.3.10 Immunohistochemistry**

CTb was visualized by immunohistochemistry according to a protocol previously described (Argaw et al., 2008a). Briefly, 40µm thick coronal sections of tissue were incubated in 90% methanol and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 20 min. After several washes, they were incubated in 0.1 M glycine solution for 30 min, and then blocked overnight at 4 °C. Sections were subsequently rinsed and immersed for 48 h at room temperature in a solution containing goat 1:4000 anti-CTb diluted in blocking solution. Afterwards, sections were rinsed and incubated 1 h in a biotinylated donkey secondary antibody directed against goat diluted in blocking solution (1:200). Tissue was rinsed and subsequently processed using an avidin-biotin-peroxidase complex ABC Kit (1:100) for 1 h, in the dark and at room temperature. Sections were then rinsed and preincubated in 3,39-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in PBS for 5 min. The peroxidase was visualized by adding 0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the DAB solution for 5-10 min. Sections were finally washed five times with PBS, mounted on gelatine-chrome alum-subbed slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and coverslipped with Depex (EMS, Hatfield, PA).

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

#### **4.4 Results**

##### **4.4.1 Spatio-temporal Localization of the CB2R in the Developing Visual**

##### **System**

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



Subsequently, cryoprotected brains harvested at P5, P7, or P9 were sliced and immunostained for CB2R. The primary CB2R antibody from Cayman Chemical that we used has previously been utilized to observe the *in vivo* distribution of the receptor in adult rat brain (Gong et al., 2006b). In the developing visual system, CB2R was present at the OC, the dLGN and the SC at all ages investigated (Figure 1A-G). The antibody appears to be specific to CB2R, as *cnr2*<sup>-/-</sup> mouse retina tissues, in contrast to *cnr2*<sup>+/+</sup>, lacked its presence as indicated by a greatly decreased signal (Figure 1H-I).

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

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

#### **4.4.2 CB2R Reorganizes GC Morphology**

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

present on the GC, while inverse agonists increased it (Figure 2C and F). These results demonstrate that the CB2R influences GC morphology.

#### 4.4.3 CB2R Modulates RGC Projection Length

To assess whether CB2R could affect axonal growth, E14-15 mouse retinal explant cultures were exposed to CB2R agonists or inverse agonists for 15 hours at DIV0 (Figure 3A). To quantify bundles length, explants were fixed and stained with a primary antibody directed against GAP43. Retinal projection growth was evaluated as the total bundle length normalized with explant surface area. Treatment with CB2R agonists (JWH015 or JWH133) reduced total projection length of the explants whereas addition of CB2R inverse agonists (AM630 or JTE907) increased it (Figure 3B). Retinal fibers emerging from the explants were labeled with L1 antibody to ensure that all the projections quantified were RGC axons since they are the only neurons that express this protein in the mouse retina (Demyanenko and Maness, 2003b). These results demonstrate that CB2R has the ability to influence RGCs fibers extension. To ascertain that these effects were CB2R specific, we performed the same experiments using *cnr2*<sup>-/-</sup> mice. In contrary to retinal explant cultures obtained from *cnr2*<sup>+/+</sup> mice, cultures from *cnr2*<sup>-/-</sup> mice did not demonstrate significant changes in projection length following CB2R agonist

and inverse agonist treatment (Figure 3C). This indicates that these pharmacological agents were selective for the CB2R and that this receptor modulates retinal projection growth *in vitro*.

#### 4.4.4 CB2R Agonists Can Act as Chemotropic Factors

*In vitro*, it has been shown that CB1R can mediate GABAergic interneurons GC repulsion (Berghuis et al., 2007a). Recently, we demonstrated that CB1R also modulates GC turning in RGCs (Argaw et al. submitted to J. Neurosci). Therefore we were interested to evaluate whether CB2R agonists could produce a similar effect and could act as chemotropic signaling molecule guiding mammalian RGCs axons. Time-lapse differential interference contrast (DIC) images of GC were acquired every 30 seconds for a 60 minute period (Figure 4A). The vehicle (EtOH) was tested and did not affect the GC behaviour. The injection created a drug gradient which was visualized with immunofluorescent dextran-FITC (Figure 4E), in order to ensure that the drugs reached the GC. Neurite projections length and angle responses to each drug are presented in Figure 4B-D. GC collapse was followed by neurite retraction after injection of CB2R agonists (JWH015 or JWH133) (Figure 4C). Angle was also negatively changed after agonist treatment (Figure 4D). To determine if increasing cAMP levels could produce an attractive response, the GCs were

subjected to a gradient of db-cAMP. Under this condition, GCs turned and elongated towards the source of db-cAMP (Figure 4B-D). These results show that CB2R activation can modify axons growth and steering, and that its endogenous ligands can act as chemorepulsive modulators for RGC GCs.

#### **4.4.5 CB2R Induced GC Morphological Changes Require PKA Activity**

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

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

#### **4.4.6 Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Receptor is required for CB2R Action on GC**

The cAMP/PKA pathway has been suggested to influence the GC's sensitivity to netrin-1 (Ming et al., 1997). Several studies have reported that activation of PKA increases netrin-dependent recruitment of DCC to the plasma membrane (Bouchard et al., 2004b; Moore and Kennedy, 2006; Bouchard et al., 2008). DCC is widely expressed in RGCs (Deiner et al., 1997a) and cortical neurons (Bouchard et al., 2008) during development. Here, we report its presence in cultured retinal explant projections (Figure 1A-C). Since CB2R and DCC are expressed in developing neurons, using pharmacological and genetic approaches, we investigated the potential interaction between these two receptors. First, we examined the effect of perturbing DCC function on CB2R evoked GC remodeling. Adding DCC function blocking antibody ( $\alpha$ DCC<sub>fb</sub>) 15 minutes prior to pharmacological treatment blocked the CB2R inverse agonists AM630 and JTE907 induced increases in GC surface area and filopodia number (Figure 6D, E and F). Secondly, CB2R agonists or inverse

agonists did not provoke any significant changes in GC area and filopodia number in neurons obtained from *dcc*<sup>-/-</sup> mice which is contrary to their effects observed in neuron culture derived from *dcc*<sup>+/+</sup> mice (Figure 6G-K). Furthermore, we report that DCC plasma membrane levels were also modified after CB2R activation. Biotinylation results show that DCC fraction to membrane decreased following agonist stimulation and contrarily, it increased subsequent to inverse agonist stimulation (Figure 6L). Taken together, these results demonstrate that the presence of functional receptors DCC is required for CB2R induced reorganization of the GC.

#### **4.4.7 CB2R modulates Retinal Projection Growth *in vivo***

Recent studies on chick embryos have shown that inhibiting CB1R affects axonal growth (Watson, Chambers et al. 2008). Recently, we observed that the CB1R can modulate retinal projections *in vivo* (Argaw et al, submitted to Science). In addition, retinal cAMP elevation was shown to increase retinal collaterals length in the LTN (Argaw, Duff et al. 2008). To assess the contribution of the CB2R pathway during retinal projection development *in vivo*, hamsters received intraocular injections of CB2R modulators. Compared with rats and mice, hamsters have shorter gestation period. Consequently, they are born with a relatively premature nervous system (Clancy, Darlington

et al. 2001). At birth (postnatal day 0, P0), RGC axons have not all reached their thalamic and midbrain targets. By P3, virtually all RGC axons have reached their targets (Bhide and Frost 1991). To take advantage of this opportunity, within 24 hours following birth, hamsters received a unilateral intraocular injection of AM630 or JWH133. Our data show that collateral projection length at the LTN was significantly higher in the group treated with a CB2R inverse agonist when compared with the untreated group (Figure 7A-C). JWH133 group projection length did not differ significantly from control group. However, axon density analysis showed a decrease in branch length. Axon collateral density was also evaluated and branch density was increased in the AM630-treated group (Figure 7D). In addition, interfering with the intrinsic ocular cannabinoid signaling with AM630 induced aberrant projections in the ipsilateral side of the SC as indicated by a robust labeling of retinal axons (Figure 7E).

#### **4.4.8 CB2R Knockout Mice Possess Deficits in dLGN Segregation**

During perinatal development, RGCs from both eyes send axons which connect to multiple target cells in the dLGN. These projections spread throughout the dLGN sharing common terminal space. During postnatal development, an eye-specific segregation occurs (Godement et al., 1984). In



the adult rodent, RGC axons occupy distinct eye-dependent non-overlapping regions of the dLGN. The implication of the CB2R during retinogeniculate development was further investigated in the dLGN in adult CB2R-deficient mice (*cnr2*<sup>-/-</sup>) and their wild-type (*cnr2*<sup>+/+</sup>) littermates. Adult *cnr2*<sup>+/+</sup> and *cnr2*<sup>-/-</sup> mice received a bilateral intra-ocular injection of CTb-Alexa488 in left and of CTb-Alexa546 in right eyes, respectively. The area occupied by contralateral projections is larger in *cnr2*<sup>-/-</sup> mice compared with *cnr2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 8A-F). The contra- and ipsilateral retinal projection images were quantified using a multi-threshold method of analysis with MatLab software (Torborg and Feller, 2004a; Stevens et al., 2007a). These data indicate a significant overlap between contralateral and ipsilateral RGC projections in the dLGN of *cnr2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 8G-I). These observations confirm the essential role played by the CB2R during the retinogeniculate development.

#### 4.5 Discussion

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

#### **4.5.1 CB2R Localization in the Developing CNS**

CB2R expression has been detected by immunoreactivity in adult mammal brain (Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006b; Onaivi et al., 2006b). Although the receptor was also localized in developing neural progenitors and dorsal root ganglia (Ross et al., 2001; Palazuelos et al., 2006), its expression in RGCs and along the visual tract remained unknown until now. Here, we show that primary RGC and cortical neuron cultures express CB2R and endocannabinoids degrading enzyme MGL. In fact, the receptor is present on axonal projections, GCs and GC filopodia *in vitro*. Moreover, CB2R was localized at several important points in the visual system: the OC, dLGN and SC. CB2Rs are present both in a spatial and timely manner where they could influence extensive axonal navigation.

#### **4.5.2 Signaling Pathway by which CB2R modulates axon guidance**

CB2R effects on GC morphology were demonstrated in retinal projections and primary cortical neurons. Both bath application and microgradient stimulation studies showed its action on the GC. CB1R agonists, like CB2R agonists, provoked chemorepulsive effect and collapse of the axonal growth cone (Berghuis et al., 2007; Argaw, submitted to J Neurosci). Moreover, CB2R is able to modulate length of retinal axons for both short and

longer stimulation periods showing its capacity to influence axonal growth rate. These results are in conformity with the ones that were observed recently for CB1R (Argaw et al, submitted to Science) and with those already published in the literature for the CB1R (Berghuis et al., 2007a; Vitalis et al., 2008b; Watson et al., 2008).

In a search for the mechanism underlying CB2R effect on GC morphology and axonal growth, we examined CB2R known signaling pathway through AC modulation (Felder et al., 1995). Our study shows that CB2R acts by modulating intracellular cAMP concentrations, which directly influence PKA activity. These results are in contradiction with a recent study reporting that an anandamide stimulation of CB1R induced MAPK activation in GABAergic neurons (Berghuis et al., 2007a). This could in part be explained by the fact that as opposed to Berghuis et al. (2007), we performed our experiments on RGC using CB2R agonists and inverse agonists, and that different receptors can activate different signaling pathways. Cell developmental stage can also determine the activation pathway for a given phenomenon (Vogt Weisenhorn et al., 2001a).

Increased cAMP levels in GC led to surface area and filopodia number increase in RGCs (Argaw et al., 2008a). Addition of CB2R inverse agonists to the neurons produced the same effect and increased GC cAMP levels. This effect correlates with previous studies reporting CB2R-dependent modulation

of AC activity (Bayewitch et al., 1995b; Slipetz et al., 1995b). Furthermore, we showed that the CB2R modulates the cAMP/PKA pathway and this signaling pathway is essential to the GC remodeling. This sets PKA as an important downstream determinant for CB2R-induced GC reorganization.

DCC is also required for CB2R-induced GC morphology alterations. In fact, in the presence of an antibody which blocks DCC function, CB2R agonists or inverse agonists induced no changes in GC morphology. Furthermore, in DCC knockout mice, absence of a functional DCC blocks CB2R effects on the GC. Earlier reports showed that PKA potentiated the mobilization of DCC to the cell surface (Bouchard et al., 2004b; Bouchard et al., 2008). We have confirmed that elevation of PKA activity induces DCC receptor translocation to the plasma membrane through biotinylation analysis. Our results indicate that CB2R, which modulates cAMP levels, regulates growth cone expansion via a PKA-dependant mechanism. Variation of PKA activity will modulate the presence of DCC receptors at the GC surface and will induce GC morphological changes (Bouchard et al., 2004b; Bouchard et al., 2008). Similar mechanism was observed with CB1R (Argaw et al, submitted to Science).

The principal study that elucidated CB1R mechanism in axon guidance proposes that CB1R stimulation activates RhoA in GABAergic interneurons (Berghuis et al., 2007a). Spatially restricted activation of RhoA in the collapsing growth cone is associated with filopodial retraction and growth

cone repulsion in response to chemical and electrical extracellular cues (Wahl et al., 2000; Hu et al., 2001; Yuan et al., 2003; Rajnicek et al., 2006) through the activation of the serine-threonine kinase Rho kinase (ROCK) and subsequent phosphorylation of myosin light chains (Amano et al., 1996; Rajnicek et al., 2006). Recently, Moore et al (Moore et al., 2008) demonstrate that RhoA inhibition recruits DCC to the plasma membrane. Therefore, CB1R agonists increasing RhoA activity may decrease the presence of DCC at the membrane and induce GC collapse. Conversely, CB1R inverse agonists or antagonists will decrease the activity of RhoA pathway and promote axon growth via the translocation of DCC to the membrane.

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

#### **4.5.3 How Does CB2R Act on Axon Pathfinding?**

CB1R agonist induces neurite retraction in neuroblast cells (Zhou and Song, 2001) and chemorepulsive effect in GABAergic (Berghuis et al., 2007a)

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

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

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

#### 4.5.5 Effect on Segregation

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



#### 4.5.6 Differences between CB1R and CB2R

CB1R and CB2R both seem to be expressed in a similar pattern throughout the visual pathway with mostly analog actions and appear to be overlapping during the guidance process (Argaw, submitted to J Neurosci). Even though both cannabinoid receptors produce a chemorepulsive response *in vitro*, we noticed some different effects during *in vivo* studies. There was an increased number of abnormal ipsilateral labeling occurrences after a unilateral injection of inverse agonist for CB1R. Although we cannot put aside the animal maturations level as a possible cause of this difference, it seem possible that CB1R agonist could influence more selectively some specific RGC subtype and suggest that both receptors may not be expressed homogeneously across RGCs (Volgyi et al., 2008). Another observation that reinforces this hypothesis is the fact that intraocular injection of agonist for CB1R or CB2R did not produce the same effect on the DTN and LTN collateral projections, each receptor having a bigger effect in one nucleus in particular. This hypothesis is further supported by the fact that db-cAMP, a cAMP analog, could increase projection length in both thalamic nuclei (Argaw et al., 2008a).

This study is the first to identify CB2R potential implication in guidance phenomenon, and the signaling pathway that mediates the effect of this

receptor effects. Altogether, the present study identifies the mechanism by which the eCB system via the CB2R modulates retinothalamic development and nervous system wiring.

#### 4.6 References

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

- Cui, Q., H. K. Yip, et al. (2003). "Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons." Mol Cell Neurosci **22**(1): 49-61.
- Deiner, M. S., T. E. Kennedy, et al. (1997). "Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia." Neuron **19**(3): 575-89.
- Demyanenko, G. P. and P. F. Maness (2003). "The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons." J Neurosci **23**(2): 530-8.
- Dickson, B. J. (2002). "Molecular mechanisms of axon guidance." Science **298**(5600): 1959-64.
- Ellerbroek, S. M., K. Wennerberg, et al. (2003). "Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo." J Biol Chem **278**(21): 19023-31.
- Erskine, L. and E. Herrera (2007). "The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance." Dev Biol **308**(1): 1-14.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Mol Pharmacol **48**(3): 443-50.
- Fernandez-Ruiz, J., J. Romero, et al. (2007). "Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?" Trends Pharmacol Sci **28**(1): 39-45.
- Forget, M. A., R. R. Desrosiers, et al. (2002). "Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes." Biochem J **361**(Pt 2): 243-54.
- Frodin, M., P. Peraldi, et al. (1994). "Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells." J Biol Chem **269**(8): 6207-14.
- Godement, P., J. Salaun, et al. (1984). "Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse." J Comp Neurol **230**(4): 552-75.
- Goncalves, M. B., P. Suetterlin, et al. (2008). "A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner." Mol Cell Neurosci **38**(4): 526-36.
- Gong, J. P., E. S. Onaivi, et al. (2006). "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain." Brain Res **1071**(1): 10-23.
- Howlett, A. C. (1995). "Pharmacology of cannabinoid receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 607-34.

- Howlett, A. C., F. Barth, et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.
- Hu, H., T. F. Marton, et al. (2001). "Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling." Neuron **32**(1): 39-51.
- Keino-Masu, K., M. Masu, et al. (1996). "Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor." Cell **87**(2): 175-185.
- Kennedy, T. E., T. Serafini, et al. (1994). "Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord." Cell **78**(3): 425-35.
- Klein, T. W., C. Newton, et al. (2003). "The cannabinoid system and immune modulation." J Leukoc Biol **74**(4): 486-96.
- Lang, P., F. Gesbert, et al. (1996). "Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes." EMBO J **15**(3): 510-9.
- Meyer-Franke, A., G. A. Wilkinson, et al. (1998). "Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons." Neuron **21**(4): 681-93.
- Ming, G.-l., H.-j. Song, et al. (1997). "cAMP-Dependent Growth Cone Guidance by Netrin-1." Neuron **19**(6): 1225-1235.
- Molina-Holgado, F., A. Rubio-Araiz, et al. (2007). "CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation." Eur J Neurosci **25**(3): 629-34.
- Monsul, N. T., A. R. Geisendorfer, et al. (2004). "Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve." Exp Neurol **186**(2): 124-33.
- Moore, S. W., J. P. Correia, et al. (2008). "Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1." Development **135**(17): 2855-64.
- Moore, S. W. and T. E. Kennedy (2006). "Protein Kinase A Regulates the Sensitivity of Spinal Commissural Axon Turning to Netrin-1 But Does Not Switch between Chemoattraction and Chemorepulsion." J. Neurosci. **26**(9): 2419-2423.
- Mulder, J., T. Aguado, et al. (2008). "Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(25): 8760-5.
- Onaivi, E. S., H. Ishiguro, et al. (2006). "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." Ann N Y Acad Sci **1074**: 514-36.

- Palazuelos, J., T. Aguado, et al. (2006). "Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation." Faseb J **20**(13): 2405-7.
- Penn, A. A., P. A. Riquelme, et al. (1998). "Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity." Science **279**(5359): 2108-12.
- Qiao, J., F. Huang, et al. (2003). "PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L972-80.
- Rajnicek, A. M., L. E. Foubister, et al. (2006). "Temporally and spatially coordinated roles for Rho, Rac, Cdc42 and their effectors in growth cone guidance by a physiological electric field." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1723-35.
- Ross, R. A., A. A. Coutts, et al. (2001). "Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception." Neuropharmacology **40**(2): 221-32.
- Salzet, M. (2000). "Invertebrate molecular neuroimmune processes." Brain Res Brain Res Rev **34**(1-2): 69-79.
- Shekarabi, M., S. W. Moore, et al. (2005). "Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion." J Neurosci **25**(12): 3132-41.
- Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." J Anat **87**(4): 387-406.
- Skaper, S. D., A. Buriani, et al. (1996). "The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3984-9.
- Slipetz, D. M., G. P. O'Neill, et al. (1995). "Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase." Mol Pharmacol **48**(2): 352-61.
- Stella, N., P. Schweitzer, et al. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." Nature **388**(6644): 773-8.
- Stevens, B., N. J. Allen, et al. (2007). "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." Cell **131**(6): 1164-78.
- Sugiura, T., T. Kodaka, et al. (1996). "2-Arachidonoylglycerol, a Putative Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, Induces Rapid, Transient Elevation of Intracellular Free Ca<sup>2+</sup> in Neuroblastoma × Glioma Hybrid NG108-15 Cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **229**(1): 58-64.
- Torborg, C. L. and M. B. Feller (2004). "Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns." J Neurosci Methods **135**(1-2): 17-26.

- Van Sickle, M. D., M. Duncan, et al. (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." Science **310**(5746): 329-32.
- Vitalis, T., J. Laine, et al. (2008). "The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro." Eur J Neurosci **28**(9): 1705-18.
- Vogt Weisenhorn, D. M., L. J. Roback, et al. (2001). "Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage." Exp Neurol **169**(1): 44-55.
- Volgyi, B., S. Chheda, et al. (2008). "Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina." J Comp Neurol **512**(5): 664-687.
- Wahl, S., H. Barth, et al. (2000). "Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase." J Cell Biol **149**(2): 263-70.
- Walsh, D. A., J. P. Perkins, et al. (1968). "An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle." J Biol Chem **243**(13): 3763-5.
- Watson, S., D. Chambers, et al. (2008). "The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation." Molecular and Cellular Neuroscience **38**(1): 89-97.
- Yuan, X. B., M. Jin, et al. (2003). "Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance." Nat Cell Biol **5**(1): 38-45.
- Zhou, D. and Z. H. Song (2001). "CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells." J Neurosci Res **65**(4): 346-53.

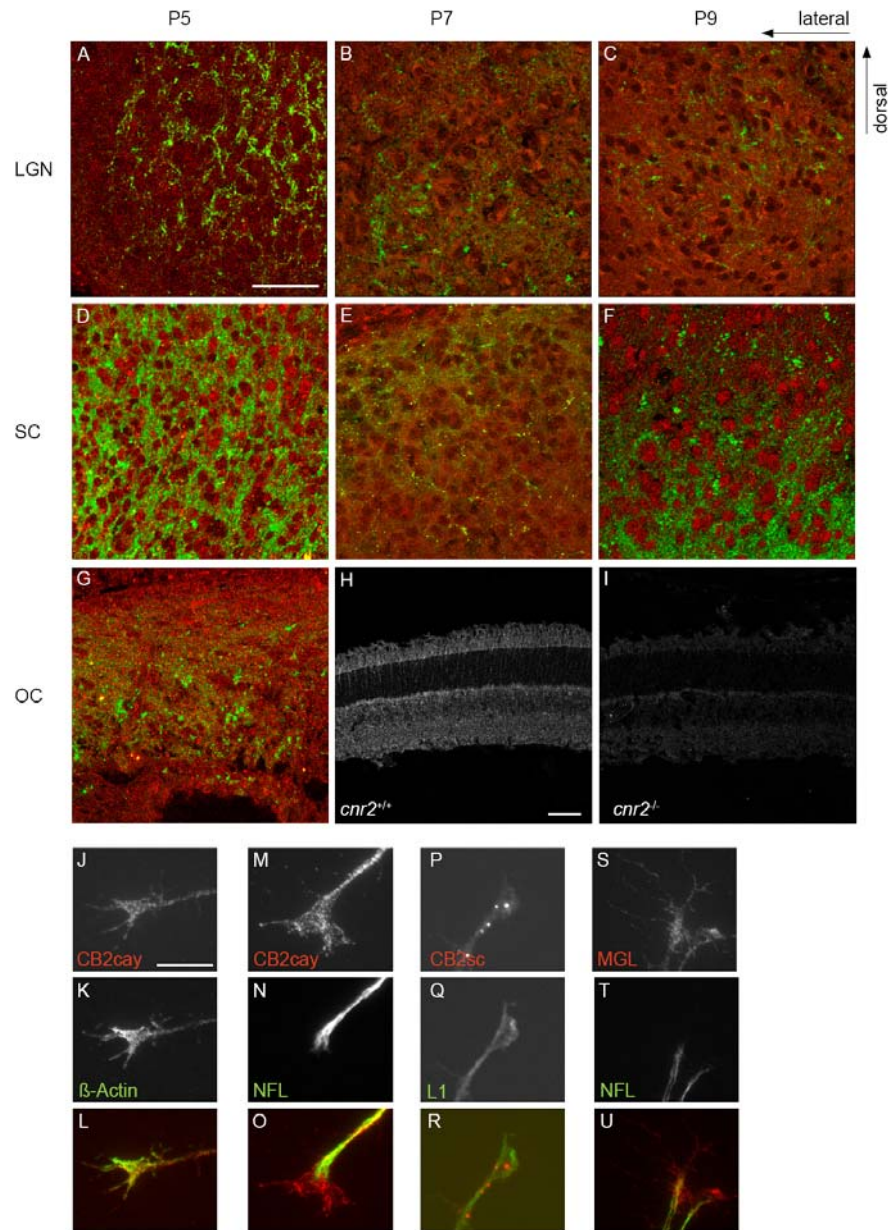
#### 4.7 Figure Legends

##### **Figure 4.1 Spatio-temporal Expression of the CB2R and eCB Metabolizing Enzyme During postnatal Retinal Projection Development**

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



Figure 1



**Figure 4.1** Spatio-temporal Expression of the CB2R and eCB Metabolizing Enzyme During postnatal Retinal Projection Development

**Figure 4.2 CB2R Reorganizes the growth cone Morphology**

Retinal explants **(A)** and dissociated cortical neurons **(D)** were grown 1 and 2 days *in vitro*, respectively. GCs were exposed for 1 hour to 300 nM JWH015, 300 nM JWH133, 300 nM AM630, 300 nM JTE907 or 10  $\mu$ M FSK. Following treatment, neurons were fixed and immunolabeled for GAP-43. Addition of FSK and CB2R inverse agonists (AM630, JTE907) increased GC surface area **(B and E)** and filopodia number **(C and F)** while the opposite effects was observed following CB2R agonists (JWH015 and JWH133) (mean  $\pm$  SEM; n = 374 to 714 per condition). Scale bar, 5  $\mu$ m (A); 20  $\mu$ m (D). \*P<0.05

Figure 2

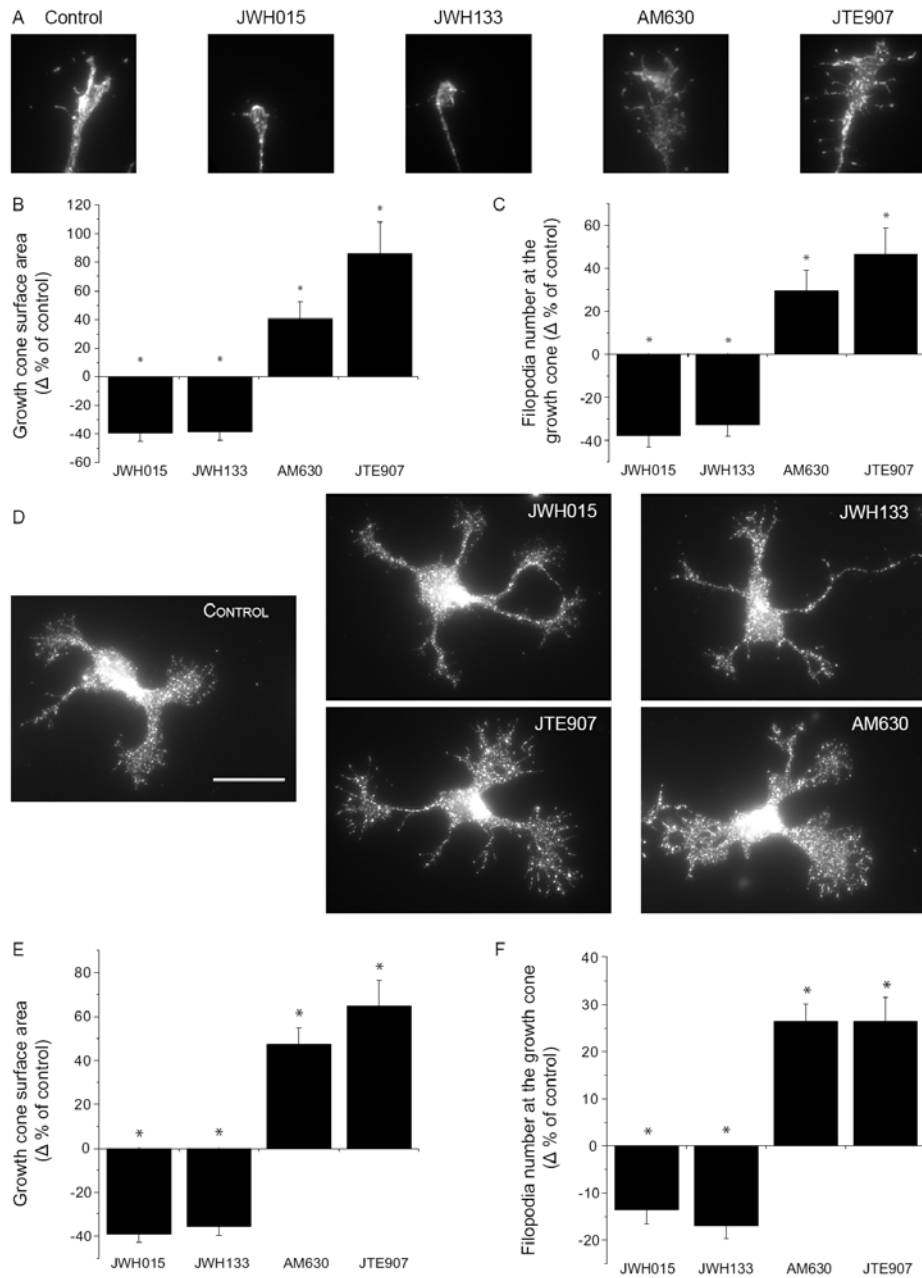
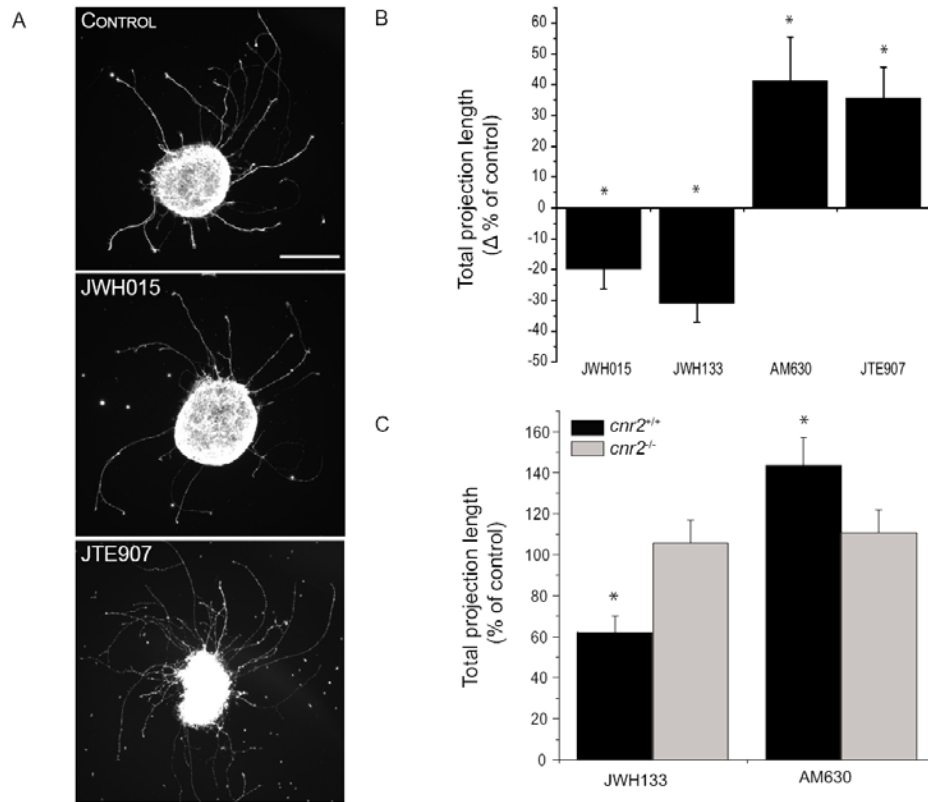


Figure 4.2 CB2R Reorganizes the growth cone Morphology

**Figure 4.3 CB2R Modulates Axon Length**

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

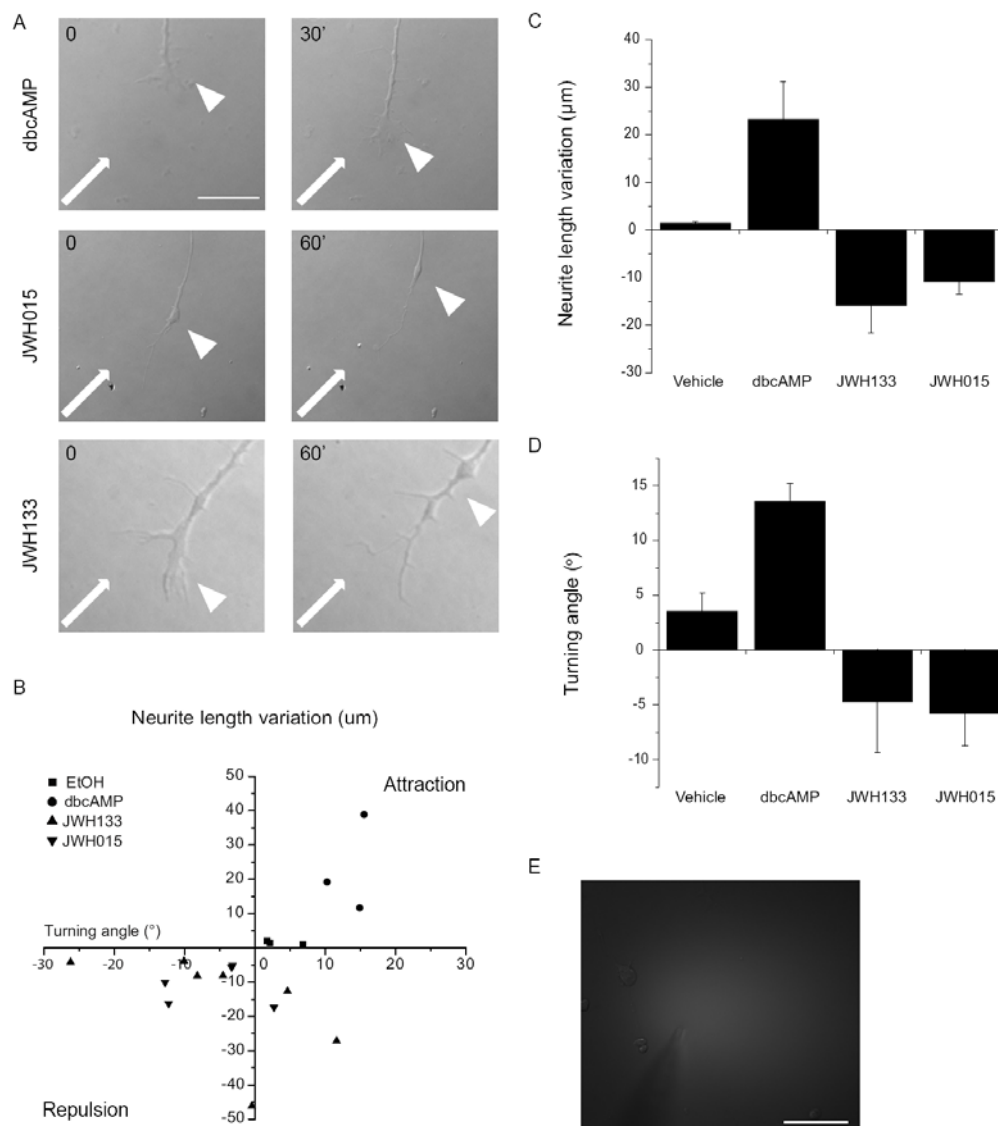
Figure 3

**Figure 4.3** CB2R Modulates Axon Length

**Figure 4.4 CB2R agonists influence growth cone behavior**

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

Figure 4



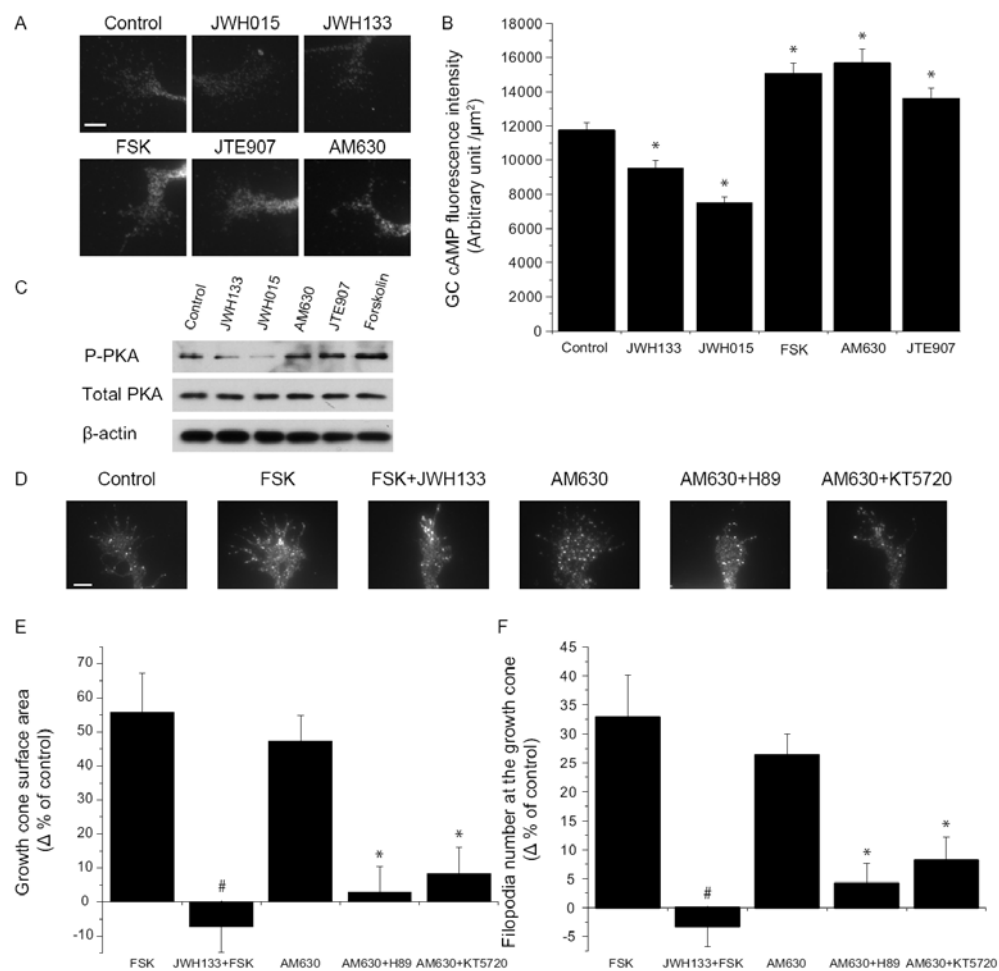
**Figure 4.4** CB2R agonists influence growth cone behavior

**Figure 4.5 CB2R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector**

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



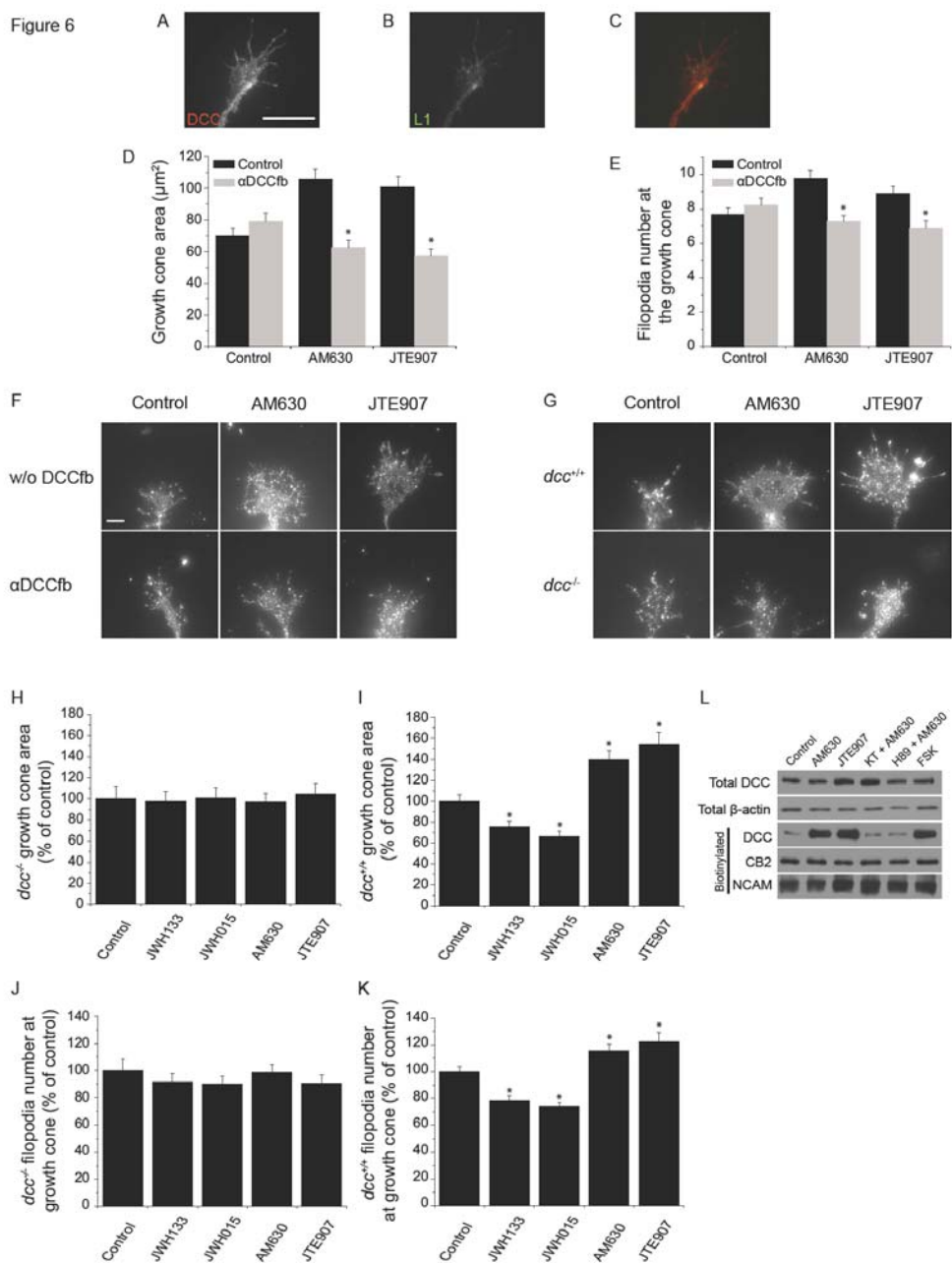
Figure 5

**Figure 4.5** CB2R Recruits the cAMP/PKA Pathway as a Downstream Effector

## Figure 4.6 The DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB2R

### Induced Reorganization of the GC

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

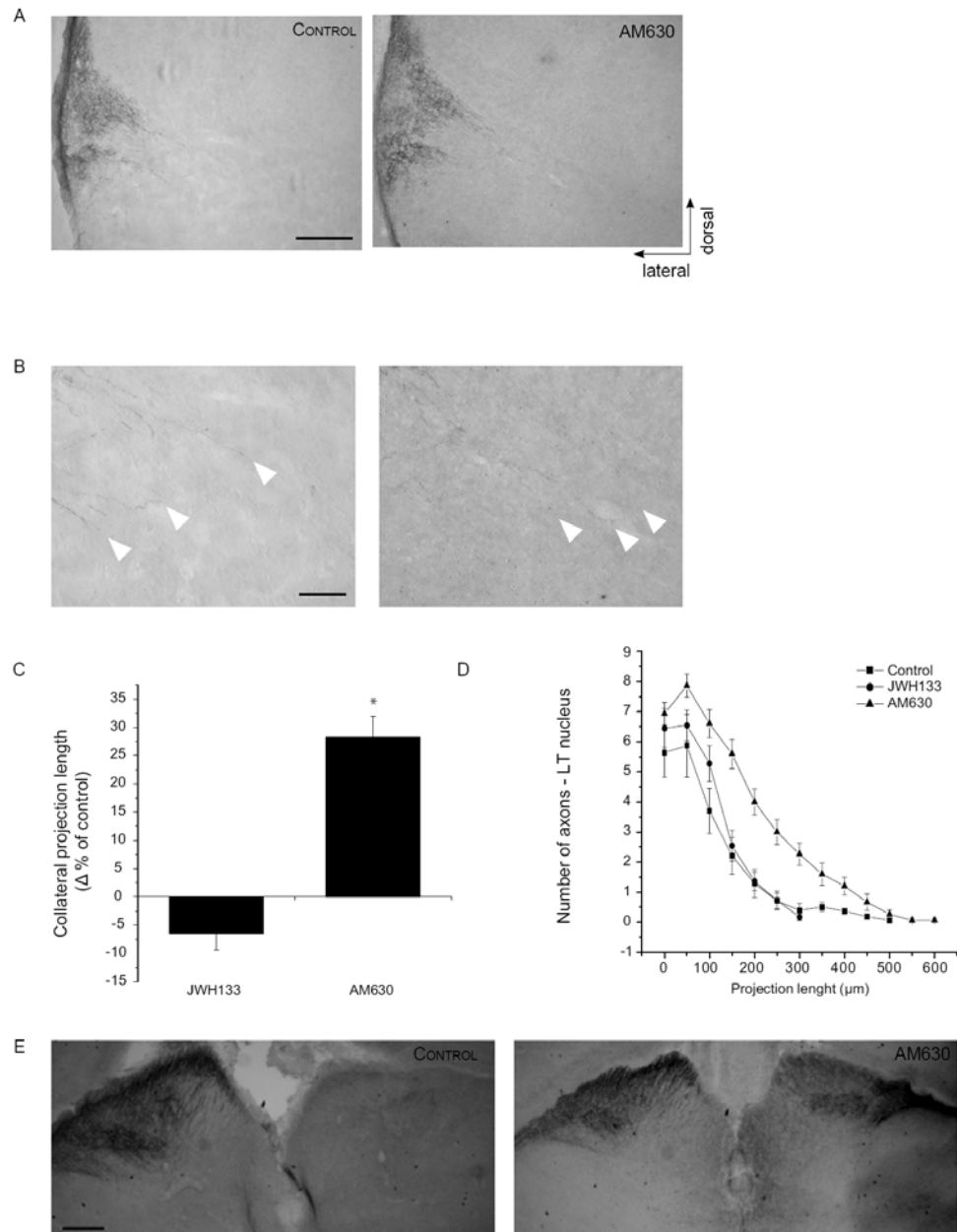


**Figure 4.6** The DCC Receptor is Required Downstream of PKA for CB2R Induced Reorganization of the GC

**Figure 4.7 CB2R Modulates RGC Projection Development In vivo**

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

Figure 7

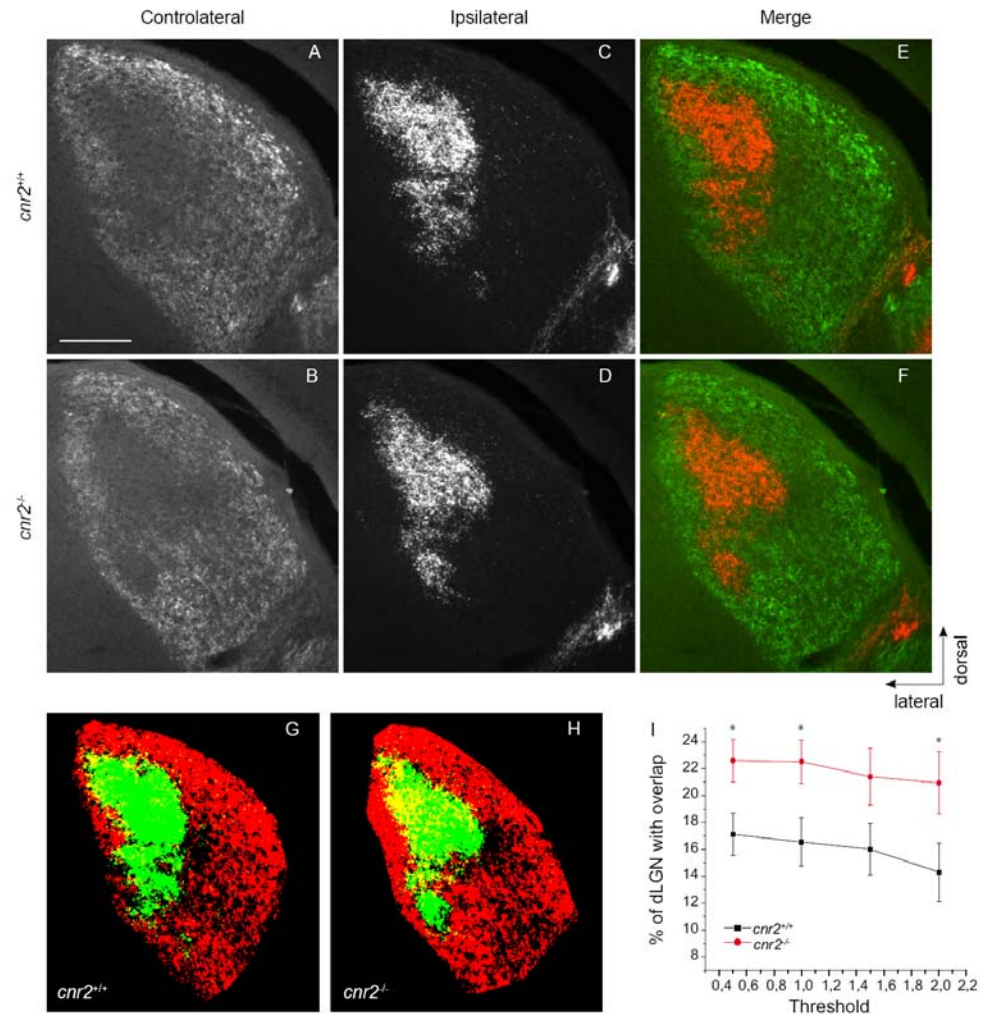


**Figure 4.7** CB2R Modulates RGC Projection Development *In vivo*

**Figure 4.8 CB2R Modulates Eye-specific Segregation in the dLGN**

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

Figure 8



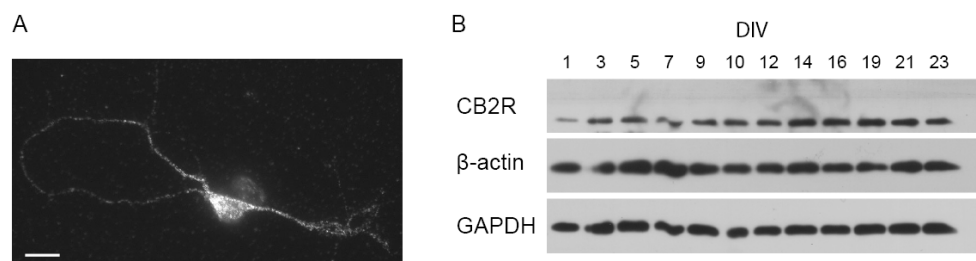
**Figure 4.8** CB2R Modulates Eye-specific Segregation in the dLGN

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

Photomicrograph of DIV2 primary cortical neuron immunolabeled for CB2R  
**(A)**. Primary cortical neurons were cultured for various numbers of days *in vitro* and cell extracts were equalized for total protein content. Western blot shows temporal protein expression of CB2R,  $\beta$ -actin and GAPDH **(B)**. Scale bar: 10  $\mu$ m (A)



Figure S-1

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

## CHAPITRE 5

## **5 Discussion générale**

Le principal objectif de cette thèse de doctorat était d'identifier le rôle des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 durant le guidage axonal. La recherche effectuée dans le cadre de cette thèse a permis de constater la présence de CB1R, CB2R ainsi que les enzymes de dégradations des eCB FAAH et MGL durant le développement embryonnaire et postnatal. Ces récepteurs aux cannabinoïdes modulent la morphologie et du cône de croissance et s'avèrent des modulateurs négatifs de guidage axonal. Leur action est dépendant de la PKA et de DCC.

### **5.1 Choix du modèle expérimental**

Nous avons choisi d'effectuer nos études sur le système visuel pour plusieurs raisons. Premièrement, la rétine ainsi que les CGRs font partie du SNC. Ainsi, le nerf optique est fréquemment utilisé comme modèle dans les études se concentrant sur la régénération du SNC (Cui et al., 2003; Watanabe et al., 2003; Monsul et al., 2004b; Rodger et al., 2005). Deuxièmement, ce système offre une facilité d'accès pour les manipulations pharmacologiques par le biais d'injections intraoculaires. Troisièmement, l'organisation des projections rétinothalamiques permet l'étude des mécanismes moléculaires régulant l'élagage des branches aberrantes, la ségrégation des axones CGRs et

l'élimination de synapses (Torborg and Feller, 2004b; Bjartmar et al., 2006; Stevens et al., 2007b).

## **5.2 La voie de signalisation AMPc/PKA accélère le développement des projections rétiniennes *in vivo***

L'AMPc est un messager intracellulaire qui joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de plusieurs processus physiologiques des neurones dont la libération de neurotransmetteurs, la transcription de gènes, la plasticité synaptique et la modulation du comportement du cône de croissance face à des molécules de guidage (Dudai, 1987; Meyer-Franke et al., 1995; Ming et al., 1997; Waltereit and Weller, 2003; Gabellini, 2004). Durant le développement, la rétine est balayée de manière sporadique par des ondes de potentiels d'action. Ces activités spontanées semblent avoir une influence sur le patron des connexions que les CGRs établissent avec leurs cibles au niveau du thalamus et des CS (Firth et al., 2005; Feller, 2009). L'importance de l'AMPc pour le développement des projections rétinothalamiques et l'établissement d'une rétinotopie a été soulignée par plusieurs études. Ainsi, Stellwagen et al. (1999) ont démontré que le niveau d'AMPc intracellulaire avait une grande influence sur l'activité spontanée rétinienne. En effet, lorsque le niveau d'AMPc est élevé, la taille, la vitesse et la fréquence des ondes sont augmentées (Stellwagen et al., 1999). Cette même équipe a par la suite

démontré que l'activité rétinienne régule le développement des projections rétinothalamiques (Stellwagen and Shatz, 2002). Ainsi, l'élévation de l'activité rétinienne de manière unilatérale par le biais d'injection intraoculaire d'AMPC, augmente la superficie occupée par les projections CGRs dans le CGL comparativement à l'œil non traité. De plus, une oscillation plutôt qu'une augmentation maintenue du niveau d'AMPC est nécessaire pour l'élagage des branches aberrantes. Notamment, la fluctuation de l'AMPC dans le cône de croissance le rend sensible à l'éphrine-A5 résultant par la rétraction des branches aberrantes (Nicol et al., 2007).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré l'implication de cette molécule dans la survie et la régénération des neurones (Spencer and Filbin, 2004; Rodger et al., 2005; Filbin, 2006; Teng and Tang, 2006). Or, le rôle que la voie de signalisation AMPC/ PKA joue durant la croissance des projections neuronales du SNC *in vivo* n'a pas été étudié. Ainsi la première étude se concentre sur l'importance de cette voie de signalisation dans la croissance des projections des CGRs. En effet, nous avons, en premier lieu, vérifié les niveaux d'AMPC rétinien au cours du développement périnatal. Ainsi, la concentration d'AMPC rétinien diminue de manière significative durant la première semaine de développement postnatal. Ces données supportent les observations de Cai et al. (2001) faites dans les cultures de cellules ganglionnaires de l'épine dorsale et les CGRs.

Cai et al. (2001) ont suggéré que la diminution du niveau d'AMPC intraneuronal comme étant l'une des raisons expliquant l'incapacité du SNC à se régénérer à l'âge adulte. Afin de vérifier si le maintien d'un haut taux d'AMPC rétinien modulerait la croissance des projections rétiniennes, des hamsters ont reçu une injection de db-AMPC, un analogue de l'AMPC perméable à la membrane cellulaire, dans les 24 heures suivant leur naissance. À P5, cette injection a favorisé la croissance des projections rétiniennes dans les noyaux visuels thalamiques. À l'inverse, l'inhibition de la PKA a ralenti la croissance des projections. La rétine est composée de différents types cellulaires formant un réseau fonctionnel. Ces cellules expriment des facteurs de croissance qui influencent sur le développement. Afin de savoir si la croissance observée à la suite d'injections intraoculaires résulte d'une action directe du db-AMPC sur les CGRs, des cultures de CGRs hautement purifiées ont été traitées à l'aide de plusieurs agents pharmacologiques modulant la voie de signalisation AMPC/PKA. Ainsi, l'activation de cette voie a augmenté la croissance des neurites, l'aire et le nombre de filopodes du cône de croissance des CGRs *in vitro*. Ces résultats démontrent que le niveau d'AMPC diminue durant le développement postnatal et que son élévation accélère le développement des projections des CGRs. Ces observations complètent les études qui ont démontré la promotion de la croissance axonale *in vitro* (Meyer-Franke et al., 1995; Meyer-Franke et al., 1998b; Bouchard et al.,

2004a). Par conséquent, le maintien d'une concentration élevée d'AMPc rétinien favorise la croissance des projections rétiniennes et en agissant en partie directement sur les CGRs.

### **5.3 Le récepteur aux cannabinoïdes CB1 module la croissance et le guidage axonal**

Le CB1R est exprimé par la rétine et certaines régions visuelles du cerveau. Ainsi, entre P0 et P9, le CB1R est présent au niveau de plusieurs couches cellulaires de la rétine dont la CCG, au niveau des projections des CGRs, du chiasme optique, du CGL et du CS du hamster. De plus, la FAAH est également exprimée dans la rétine et les noyaux visuels thalamiques et le CS. Ces données complètent les résultats rapportés dans la littérature qui démontrent la présence de CB1R dans la rétine du rongeur (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Yazulla, 2008). *Ex vivo*, le CB1R est exprimé par les cultures d'explants de rétines embryonnaires. Ce récepteur a notamment été localisé au niveau de l'axone, du cône de croissance et des filopodes des projections de CGRs. De plus, les cultures de cellules ganglionnaires hautement purifiées ainsi que les neurones corticaux embryonnaires expriment le CB1R pendant plusieurs jours *in vitro*. Les enzymes de dégradation des eCBs FAAH et MGL sont également présents au niveau de

l'axone, du cône de croissance et des filopodes des projections d'explants de rétines en cultures.

La présence des composantes du système eCB dans un espace spatio-temporel concordant avec la croissance des projections et l'établissement de connexions entre neurones suggère l'implication de CB1R dans le guidage axonal et la maturation du système visuel. Cette hypothèse a été vérifiée, *in vitro*, sur des cultures d'explants de rétines et de neurones corticaux embryonnaires. Ainsi, la modulation de l'activité de CB1R par le biais d'agoniste, antagoniste et agoniste inverse module la morphologie du cône de croissance des CGR et des neurones corticaux. La stimulation de CB1R avec un agoniste a diminué la surface et le nombre de filopodes du cône de croissance. À l'inverse, l'agoniste inverse a augmenté ces deux paramètres de la morphologie du cône de croissance. Ces données démontrent clairement l'effet de l'activation de CB1R sur la morphologie du cône de croissance. Or, durant le guidage axonal, le cône de croissance adapte constamment sa navigation en fonction d'indices présents dans son environnement immédiat. Cela soulève la question à savoir si une stimulation locale de CB1R influencerait le comportement du cône de croissance. Cette question a été examinée à l'aide de la technique de « growth cone turning assay » où une micropipette de verre située à 100  $\mu\text{m}$  d'un cône de croissance crée un gradient de la substance injectée. Ainsi, l'agoniste de CB1R a causé



l'effondrement et la rétraction du cône de croissance démontrant ainsi l'effet répulsif des eCB sur les axones des CGRs. Ces résultats abondent dans le même sens que ceux d'une étude récemment publiée démontrant l'effet répulsif des eCB sur les interneurons GABAergiques de l'hippocampe (Berghuis et al., 2007b). Afin de vérifier si le CB1R module la croissance axonale, des cultures d'explants de rétine ont été stimulées pendant plusieurs heures avec un agoniste, un agoniste inverse de CB1R. L'agoniste a ralenti la croissance tandis que l'agoniste inverse a favorisé la croissance des projections rétiniennes. Ces résultats confirment l'étude de Vitalis et al. (2008a) qui a rapporté l'effet négatif de CB1R sur la croissance des projections *in vitro*. À l'inverse, Williams et al. (2003a) et Mulder et al. (2008a) ont rapporté que le CB1R favorisait la croissance et la fasciculation des axones. Les connaissances actuelles du rôle joué par le système eCB durant le développement du SNC ne permettent pas de concilier ces résultats contradictoires. Toutefois, toutes ces études incluant le nôtre soulignent l'implication de CB1R dans la croissance et la navigation des neurones.

Lorsqu'activé, le CB1R agit par le biais de plusieurs voies de signalisation pour moduler la plasticité synaptique (Köfalvi, 2008). Ainsi, le CB1R agit sur l'activité de plusieurs protéines, dont l'adénylate cyclase (Howlett and Fleming, 1984), les kinases ERK (Derkinderen et al., 2003), PI3K (Ozaita et al., 2007) et mTOR (Puighermanal et al., 2009b). Cependant, les

mécanismes moléculaires par lesquels CB1R module la morphologie du cône de croissance et le guidage axonal demeurent inconnus. Récemment, Berghuis et al. (2007b) ont démontré que l'activation de CB1R par un agoniste augmentait la phosphorylation d'ERK 1/2 au niveau du cône de croissance des interneurons GABAergiques. Par conséquent, l'activation, par CB1R, des voies de signalisation intracellulaire AMPc/PKA, MAPK, PI3K et mTOR ont été évaluées dans cette thèse. Les niveaux de phosphorylation d'ERK1/2, Akt et S6 n'ont pas été altérés par la modulation pharmacologique du CB1R. De plus, ces voies de signalisation n'ont guère été recrutées dans un système préstimulé avec du KCl ou de l'insuline. Par contre, la manipulation de l'activité du CB1R a modulé l'activité de la voie AMPc/PKA. Ainsi, l'agoniste du CB1R a diminué le niveau d'AMPc du cône de croissance et la phosphorylation de la PKA tandis que l'agoniste inverse a induit les effets contraires. De plus, l'inhibition de la PKA a renversé l'augmentation de la surface et du nombre de filopodes du cône de croissance causé par l'agoniste inverse du CB1R. Plusieurs raisons peuvent expliquer la divergence des résultats entre l'étude de Berghuis et al. (2007b) et le nôtre. Premièrement, les populations de neurones utilisées par les deux études sont différentes. Berghuis et al. (2007b) ont remarqué une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 dans les cultures d'interneurones GABAergiques de l'hippocampe tandis que notre étude a rapporté le recrutement de la voie d'AMPc/PKA dans les cultures de neurones

glutamatergiques. Deuxièmement, le contexte cellulaire et le stade développemental du neurone peuvent également influencer sur le recrutement des voies de signalisation intracellulaires (Vogt Weisenhorn et al., 2001b; Harkany et al., 2007). Troisièmement, l'activation des messagers secondaires peut également dépendre de la dimérisation, homo- ou hétérodimère, de CB1R (Kano et al., 2009).

Cette étude a mis en évidence un nouveau mécanisme par lequel CB1R module la morphologie du cône de croissance. Ainsi, d'après nos résultats, la réorganisation du cône de croissance résultant de la modulation pharmacologique de CB1R passe par DCC, récepteur à la nétrine. En effet, l'agoniste inverse de CB1R augmente la translocation de DCC vers la membrane plasmique de manière dépendante à la PKA. L'inhibition de DCC à l'aide d'un anticorps bloquant sa fonction annule également l'effet de l'agoniste inverse de CB1R sur l'aire et le nombre de filopodes du cône de croissance. Ces observations sont confirmés par des résultats obtenus à partir de cultures neuronales isolées de souris dont le gène *dcc* a été muté (*dcc*<sup>-/-</sup>) et les souches sauvages *dcc*<sup>+/+</sup>. L'agoniste et agoniste inverse de CB1R n'ont pas causé la réorganisation du cône de croissance dans les cultures neuronales *dcc*<sup>-/-</sup>. À l'inverse, dans les cultures *dcc*<sup>+/+</sup>, l'agoniste de CB1R a diminué l'aire du cône de croissance tandis que l'agoniste inverse l'a augmenté. Ces données

démontrent clairement la réorganisation morphologique du cône de croissance enclenché par CB1R passe par DCC.

*In vivo*, la perturbation du système eCB oculaire affecte le développement des projections rétiniennes. En effet, l'injection intraoculaire d'un agoniste de CB1R a ralenti le développement des projections rétiniennes. Contrairement, l'agoniste inverse a favorisé la croissance des projections et a aussi entraîné des branches aberrantes dans le CS. De plus, nos données démontrent que l'absence de CB1R affecte le développement des projections rétinothalamiques notamment la ségrégation des projections. Ainsi, les projections rétiniennes des deux yeux de souris adultes dont le CB1R a été muté (CB1R<sup>-/-</sup>) sont relativement moins ségréguées au niveau du CGL comparativement aux projections des souris de la souche sauvage (CB1R<sup>+/+</sup>). Par conséquent, le niveau de chevauchements des projections ipsi-et controlatérales est supérieur dans le CGN des CB1R<sup>-/-</sup>. Globalement, les données de cette étude démontrent clairement le rôle de CB1R dans la croissance et le guidage axonal ainsi que le mécanisme par lequel celui-ci agit.

#### **5.4 Le récepteur aux cannabinoïdes CB2 module le développement des projections**

Le CB1R et le CB2R sont les principaux récepteurs aux eCB. Le CB2R a initialement été identifié dans le système immunitaire. Subséquemment, son expression dans le cerveau a été rapportée. Sa concentration dans le SNC est cependant largement inférieure à celle de CB1R. La troisième étude de cette thèse s'est intéressée à l'expression de CB2R par le système neurovisuel et au rôle qu'il joue dans le développement des projections rétiniennes. Les données de cette étude démontrent l'expression de CB2R par plusieurs régions importantes de la voie rétino-thalamique et -colliculaire. Ainsi, le CB2R a été localisé au niveau du chiasme, du CGL et du CS lors de la première semaine de développement postnatal. De plus, ce récepteur est aussi exprimé dans la rétine de la souris. Ces données appuient les quelques études qui ont rapporté la présence de CB2R dans le SNC (Lu et al., 2000; Gong et al., 2006a; Onaivi et al., 2006a). *In vitro*, CB2R est exprimé au niveau des axones, des filopodes et du cône de croissance des cultures d'explants de rétine embryonnaires. La spécificité de l'anticorps dirigé contre CB2R est démontrée par l'absence de signal dans la rétine de la souris CB2R<sup>-/-</sup>. Ainsi, la présence de ce récepteur durant le stade embryonnaire et périnatal des projections suggère son implication dans le guidage axonal des CGRs et le développement des projections rétinothalamiques.

L'activation pharmacologique de CB2R module la morphologie du cône de croissance *in vitro*. Ainsi, les agonistes du CB2R diminuent l'aire du cône de croissance et le nombre de filopodes des cultures d'explants de rétine et de neurones corticales. Contrairement, les agonistes inverses augmentent ces paramètres. De plus, la stimulation sur de longues heures des cultures d'explants de rétine avec un agoniste de CB2R a réduit la longueur des projections rétiniennes tandis que l'agoniste inverse l'a augmentée. Par ailleurs, la capacité de CB2R de moduler le comportement du cône de croissance a été testée à l'aide de la technique de « growth cone turning assay ». Or, les agonistes de CB2R ont causé l'effondrement et la rétraction du cône de croissance rappelant le rôle répulsif de CB1R (voir chapitre 3 et (Berghuis et al., 2007b)).

Le CB2R agit comme le CB1R en recrutant la voie de signalisation AMPc/PKA. Ainsi, l'activation de CB2R avec son agoniste a baissé les taux d'AMPc du cône de croissance. Contrairement, l'agoniste inverse a augmenté la concentration d'AMPc. De plus, le niveau de phosphorylation de la PKA est également réduit par l'agoniste et est accru par l'agoniste inverse de CB2R. L'inhibition de la PKA et l'activation simultanée de CB2R avec un agoniste inverse renversent l'effet de ce dernier sur le cône de croissance. Ces données démontrent clairement que, similairement au CB1R, la réorganisation du cône de croissance induite par CB2R passe par la voie de signalisation AMPc/PKA.

D'autre part, la présence de DCC est nécessaire pour la réorganisation de la morphologie du cône de croissance enclenché par l'activation de CB2R. Ainsi, lorsque la fonction de DCC est bloquée à l'aide d'un anticorps ou lorsque le gène codant pour ce récepteur est muté, la stimulation de CB2R n'entraîne pas l'augmentation de la surface et du nombre de filopodes du cône de croissance rapporté plus haut. De plus, l'activation de CB2R par un agoniste inverse mobilise davantage DCC à la membrane plasmique.

*In vivo*, l'injection intraoculaire de modulateur de CB2R affecte le développement des projections des CGRs. L'agoniste de CB2R a ralenti la croissance des projections dans le LTN tandis que l'agoniste inverse l'a augmenté. De plus, l'injection de l'agoniste inverse a induit des projections aberrantes au niveau des CS. L'implication de CB2R dans l'élagage des projections rétiniennes a été étudiée au niveau de CGL. Ainsi, le niveau de chevauchement entre les projections rétiniennes de l'œil ipsi- et controlatérale est plus importante chez la souris adulte dont le gène pour le CB2R a été muté. Ce chevauchement des projections démontre que les projections rétiniennes des deux yeux sont relativement moins ségréguées en l'absence de CB2R fonctionnel. De façon générale, les données de cette étude démontrent l'implication du CB2R lors du développement des projections rétinothalamiques.

### 5.5 Redondance fonctionnelle entre CB1R et CB2R

Les études sur CB1R et CB2R ont démontré leurs implications dans le développement et le guidage des projections rétiniennes. La modulation pharmacologique de l'activité de ces deux principaux récepteurs cannabinoïdes module la morphologie et le comportement du cône de croissance. Étonnamment, ils agissent par le biais de la voie de signalisation intracellulaire AMPc/PKA et la présence de DCC est nécessaire. La stimulation simultanée de CB1R et CB2R résulte par des effets additifs au niveau de l'aire du cône de croissance, *in vitro* (voir Figure ANNEXE I). Une explication potentielle à ces observations serait que les différents agents pharmacologiques utilisés agiraient de manière non sélective sur l'un ou l'autre de ces récepteurs. Or, la spécificité des agents pharmacologique a été testée à l'aide de cultures de neurones provenant de souris CB1R<sup>-/-</sup> (voir ANNEXE I Figure 2) et CB2R<sup>-/-</sup> (voir Figure 4.3). Ainsi, l'agoniste et agoniste inverse du CB1R ne modulent pas la morphologie du cône de croissance des cultures de neurones CB1R<sup>-/-</sup> (voir Figure ANNEXE II). Similairement, l'agoniste et agonistes inverses du CB2R n'ont pas d'effets sur les cultures neuronales de CB2R<sup>-/-</sup>. Par conséquent, les données des deux études suggèrent la présence d'une certaine redondance fonctionnelle entre CB1R et CB2R lors du développement.



## 5.6 Les récepteurs cannabinoïdes et le guidage axonal

Les résultats présentés dans cette thèse soulèvent une question légitime à savoir si CB1R et CB2R et leurs ligands forment un système de guidage axonal classique tel que les nétrines, les éphrines, etc. L'une des caractéristiques de ces molécules de guidage est leur capacité à former un gradient de concentration sur une distance relativement longue. Or, les eCBs sont des molécules liposolubles synthétisés sur demande. De plus, ces derniers sont rapidement dégradés empêchant ainsi la formation d'un gradient de concentration.

Les molécules de guidages classiques affectent de manière directe le comportement du cône de croissance et le câblage du cerveau. La suppression de l'une de ces molécules induit des erreurs de navigation assez remarquable. Par exemple, la suppression de nétrine-1 cause des aberrations qui se traduisent par une incapacité des axones des CGRs d'entrer dans le nerf optique (Deiner et al., 1997b). Cela ne semble pas être le cas pour les eCBs. Mis à part des changements subtils au niveau du chevauchement des projections ipsi- et contralatérales, la suppression de CB1R ou CB2R ne semble pas avoir causé de graves erreurs de guidage. Cependant, cela reste à être confirmé par une souche de souris portant une double mutation de CB1R et CB2R. Par ailleurs, la réorganisation de la morphologie du cône de croissance induite par CB1R et CB2R nécessite la présence de DCC. Ces évidences

suggèrent que le système eCB joue plutôt un rôle de modulateur de guidage. Ainsi, ce système servirait à moduler finement la réponse du cône de croissance face à différentes molécules de guidage. En revanche, les eCB pourraient être synthétisés localement pour prévenir la croissance de branches aberrantes malgré la présence, dans l'environnement immédiat, des molécules permissives.

### **5.7 Contribution de la recherche effectuée à l'avancement des connaissances**

Les recherches qui ont mené à la réalisation de cette thèse ont contribué à l'avancement des connaissances. En effet, les études sur CB1R et CB2R démontrent pour la première fois la présence d'un système eCB fonctionnel lors du développement du SNC. Ainsi, ces études rapportent le rôle modulateur de CB1R et CB2R dans le guidage axonal lors du développement des CGR et des neurones corticaux et aussi leur implication dans le raffinement et la ségrégation des projections ipsi- et contralatérales. Les études démontrent également le mécanisme par lequel CB1R et CB2R réorganisent la morphologie du cône de croissance.

## 5.8 Perspectives d'avenir

Étant parmi les premières études rapportant l'implication de CB1R et CB2R sur le développement du système neurovisuel, elles soulèvent plusieurs questions ouvrant ainsi plusieurs avenues futures tant au niveau de la recherche fondamentale que la recherche appliquée.

En recherche fondamentale, il faudrait pour mieux cerner le rôle du système eCB dans le développement du SNC et le guidage axonal. Pour ce faire, les études menées plus haut pourraient être répétées sur des souches de souris double mutante pour CB1R et CB2R. Ainsi, ces études permettraient de mieux comprendre la contribution de ces deux récepteurs et du système eCB dans la ségrégation des projections rétiniennes ipsi- et controlatérales. De plus, les études présentées ici ont utilisé des modèles de souris portant une délétion généralisée du gène pour CB1R ou CB2R. Or, pour mieux évaluer la contribution du système eCB des CGRs dans leur développement, il faudrait étudier des souches de souris portant des mutations conditionnelles des récepteurs cannabinoïdes au niveau des CGRs.

Une question sur laquelle il faut se pencher est à savoir si le haut taux de chevauchement entre les projections ipsi- et controlatérales observé au niveau du CGL affecte les projections thalamocorticales. En revanche, il serait intéressant d'investiguer si l'absence de CB1R, CB2R ou CB1R et CB2R cause

des anomalies anatomiques et fonctionnelles au niveau du cortex visuel. Ces expériences peuvent être effectuées à l'aide de technique d'imagerie optique.

Sur le plan moléculaire, il serait aussi important de savoir si le système eCB module la réponse de cône de croissance uniquement à la nétrine ou également à d'autres molécules de guidage. Cette hypothèse peut être vérifiée pour les éphrines, et les slits deux molécules impliquées dans le développement des CGRs.

Par ailleurs, les eCBs semblent moduler l'apoptose (Maccarrone and Finazzi-Agro, 2003), la neuroinflammation et des affectations neurodégénératives (Centonze et al., 2007). D'ailleurs, une récente étude démontre le rôle neuroprotecteur des eCBs par le biais du CB2R (Viscomi et al., 2009). Malgré ces études, le rôle et les mécanismes moléculaires par lesquels les eCBs interviennent lors de pathologies affectant le SNC demeurent inconnus. Par conséquent, il serait intéressant d'investiguer l'implication de CB1R et CB2R lors des affectations pathologiques du SNC. Plus précisément, en utilisant le système neurovisuel comme modèle, l'expression des récepteurs CB1 et CB2 à la suite d'une lésion du nerf optique ainsi que les effets de la modulation pharmacologique des récepteurs aux eCBs sur la régénération du nerf optique pourraient être examinés.

En conclusion, cette thèse présente les premières données sur l'implication de CB1R et CB2R dans le guidage et le développement des projections rétinothalamiques. Le mécanisme par lequel ces deux récepteurs cannabinoïdes modulent la morphologie du cône de croissance est également démontré. Toutefois, plusieurs questions demeurent sans réponse comme par exemple l'effet des cannabinoïdes sur l'activité spontanée rétinienne ou les répercussions fonctionnelles résultant de l'absence d'une activité du système des eCBs. Par conséquent, des études supplémentaires s'imposent pour une meilleure compréhension de ce système et une application potentielle de ces connaissances pour remédier les affectations du SNC.

## Références

- 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*:05-3995fje.
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I (2006) The Endocannabinoid System Promotes Astroglial Differentiation by Acting on Neural Progenitor Cells. *J Neurosci* 26:1551-1561.
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271:20246-20249.
- Amato MA, Boy S, Perron M (2004) Hedgehog signaling in vertebrate eye development: a growing puzzle. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61:899-910.
- Angelucci A, Clasca F, Sur M (1996) Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *Journal of Neuroscience Methods* 65:101-112.
- Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard JF (2008a) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Exp Neurol* 211:494-502.
- Argaw A, Duff G, Boire D, Ptito M, Bouchard J-F (2008b) Protein kinase A modulates retinal ganglion cell growth during development. *Experimental Neurology* 211:494-502.
- Bai W, Meguro R, Kaiya T, Norita M (2001) Postnatal development of the retinal projection to the nucleus of the optic tract and accessory optic nuclei in the hooded rat. *Arch Histol Cytol* 64:69-79.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 27:1-4.
- Barker PA, Shooter EM (1994a) Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13:203-215.
- Barker PA, Shooter EM (1994b) Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13:203-215.
- 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.

- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z (1995a) The peripheral cannabinoid receptor: adenylyl cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Letters* 375:143-147.
- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z (1995b) The peripheral cannabinoid receptor: adenylyl cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett* 375:143-147.
- Beltramo M, Bernardini N, Bertorelli R, Campanella M, Nicolussi E, Fredduzzi S, Reggiani A (2006) CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *European Journal of Neuroscience* 23:1530-1538.
- Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J (2003) Cannabinoid CB2 Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase Are Selectively Overexpressed in Neuritic Plaque-Associated Glia in Alzheimer's Disease Brains. *J Neurosci* 23:11136-11141.
- Bentley D, Toroian-Raymond A (1986) Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature* 323:712-715.
- 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 (2007a) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316:1212-1216.
- 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 (2007b) Hardwiring the Brain: Endocannabinoids Shape Neuronal Connectivity. *Science* 316:1212-1216.
- 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* 102:9388-9393.
- 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* 33:181-191.

- Bhide PG, Frost DO (1991a) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J Neurosci* 11:485-504.
- Bhide PG, Frost DO (1991b) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J Neurosci* 11:485-504.
- Bhide PG, Frost DO (1999) Intrinsic determinants of retinal axon collateralization and arborization. *J Comp Neurol* 411:119-129.
- Bidaut-Russell M, Devane WA, Howlett AC (1990) Cannabinoid Receptors and Modulation of Cyclic AMP Accumulation in the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 55:21-26.
- 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.
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR (1998) Dual Activation and Inhibition of Adenylyl Cyclase by Cannabinoid Receptor Agonists: Evidence for Agonist-Specific Trafficking of Intracellular Responses. *J Pharmacol Exp Ther* 287:884-888.
- Bottenstein J, Sato G (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci* 76:514-517.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Fur G, Casellas P (1996) Signaling Pathway Associated with Stimulation of CB2 Peripheral Cannabinoid Receptor. *European Journal of Biochemistry* 237:704-711.
- Bouchard J-F, Horn KE, Stroh T, Kennedy TE (2008) Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *Journal of Neurochemistry* 107:398-417.
- Bouchard J-F, Moore S, Tritsch N, Roux P, Shekarabi M, Barker P, Kennedy T (2004a) 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.
- Bouchard JF, Moore SW, Tritsch NX, Roux PP, Shekarabi M, Barker PA, Kennedy TE (2004b) 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.
- Bovolenta P (2005) Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *J Neurobiol* 64:405-416.



- Brittis P, Canning D, Silver J (1992) Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science* 255:733-736.
- Brittis P, Silver J, Walsh F, Doherty P (1996) Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly. *Mol Cell Neurosci* 8:120-128.
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology* 152:567-575.
- Buck KB, Zheng JQ (2002) Growth Cone Turning Induced by Direct Local Modification of Microtubule Dynamics. *J Neurosci* 22:9358-9367.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey É (1997) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82:1131-1149.
- 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.
- Butler SJ, Tear G (2007) Getting axons onto the right path: the role of transcription factors in axon guidance. *Development* 134:439-448.
- Cabral GA, Griffin-Thomas L (2009) Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11:e3.
- Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT (2001) Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate. *J Neurosci* 21:4731-4739.
- Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65:999-1007.
- Centonze D, Finazzi-Agro A, Bernardi G, Maccarrone M (2007) The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* 28:180-187.
- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* 5:385-388.
- Chan CE, Odde DJ (2008) Traction Dynamics of Filopodia on Compliant Substrates. *Science* 322:1687-1691.
- Chapman B (2000) Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus. *Science* 287:2479-2482.
- Charron F, Tessier-Lavigne M (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132:2251-2262.

- Chien FY, Wang RF, Mittag TW, Podos SM (2003) Effect of WIN 55212-2, a cannabinoid receptor agonist, on aqueous humor dynamics in monkeys. *Arch Ophthalmol* 121:87-90.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7-17.
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423-431.
- 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.
- Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR (2003) Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 22:49-61.
- Dakubo GD, Wang YP, Mazerolle C, Campsall K, McMahon AP, Wallace VA (2003) Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development* 130:2967-2980.
- de la Torre J, Hopker V, Ming G, Poo M, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A, Holt C (1997) Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* 19:1211-1224.
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997a) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19:575-589.
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997b) Netrin-1 and DCC Mediate Axon Guidance Locally at the Optic Disc: Loss of Function Leads to Optic Nerve Hypoplasia. *Neuron* 19:575-589.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sciences* 78:549-563.
- Demyanenko GP, Maness PF (2003a) The L1 Cell Adhesion Molecule Is Essential for Topographic Mapping of Retinal Axons. *J Neurosci* 23:530-538.
- Demyanenko GP, Maness PF (2003b) The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons. *J Neurosci* 23:530-538.
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault J-A (2001) Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 77:957-960.

- 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.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-691.
- Di S, Boudaba C, Popescu IR, Weng F-J, Harris C, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG (2005) Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *The Journal Of Physiology* 569:751-760.
- Dickson BJ (2002a) Molecular Mechanisms of Axon Guidance. *Science* 298:1959-1964.
- Dickson BJ (2002b) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298:1959-1964.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:10819-10824.
- Dudai Y (1987) The Camp Cascade in the Nervous System: Molecular Sites of Action and Possible Relevance To Neuronal Plasticity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 22:221-281.
- Dwivedy A, Gertler FB, Miller J, Holt CE, Lebrand C (2007) Ena/VASP function in retinal axons is required for terminal arborization but not pathway navigation. *Development* 134:2137-2146.
- Egertová M, Elphick MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB<sub>1</sub>. *The Journal of Comparative Neurology* 422:159-171.
- Ellerbroek SM, Wennerberg K, Burridge K (2003) Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem* 278:19023-19031.
- Erskine L, Herrera E (2007) The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Developmental biology* 308:1-14.
- Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice ASC, Elphick MR (2000) Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptor Expression in Rat Spinal Cord. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15:510-521.

- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA (1993) Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7656-7660.
- 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. *Mol Pharmacol* 48:443-450.
- Feldheim D, Kim Y, Bergemann A, Frisen J, Barbacid M, Flanagan J (2000 ) Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25:563-574.
- Feller M (2009) Retinal waves are likely to instruct the formation of eye-specific retinogeniculate projections. *Neural Development* 4:24.
- Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M (2007a) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends in Pharmacological Sciences* 28:39-45.
- Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M (2007b) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci* 28:39-45.
- Filbin MT (2006) How inflammation promotes regeneration. *Nat Neurosci* 9:715-717.
- Firth SI, Wang C-T, Feller MB (2005) Retinal waves: mechanisms and function in visual system development. *Cell Calcium* 37:425-432.
- Forget MA, Desrosiers RR, Gingras D, Beliveau R (2002) Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem J* 361:243-254.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Fried PA, Smith AM (2001) A literature review of the consequences of prenatal marihuana exposure: An emerging theme of a deficiency in aspects of executive function. *Neurotoxicology and Teratology* 23:1-11.
- Fried PA, Watkinson B, Gray R (2003) Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. *Neurotoxicology and Teratology* 25:427-436.
- Frodin M, Peraldi P, Van Obberghen E (1994) Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* 269:6207-6214.
- Frost D (1984) Axonal growth and target selection during development: retinal projections to the ventrobasal complex and other "nonvisual" structures in neonatal Syrian hamsters. *J Comp Neurol* 230:576-592.

- Frost DO, Boire D, Gingras G, Ptito M (2000) Surgically created neural pathways mediate visual pattern discrimination. *PNAS* 97:11068-11073.
- Fukumitsu H, Ohtsuka M, Murai R, Nakamura H, Itoh K, Furukawa S (2006) Brain-Derived Neurotrophic Factor Participates in Determination of Neuronal Laminar Fate in the Developing Mouse Cerebral Cortex. *J Neurosci* 26:13218-13230.
- Gabellini N (2004) Transcriptional regulation by cAMP and Ca<sup>2+</sup> links the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger 3 to memory and sensory pathways. *Molecular Neurobiology* 30:91-116.
- 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.
- Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, del Pulgar TG, Izquierdo M, Guzman M (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 6:313-319.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* 86:1646-1647.
- Garcia DE, Brown S, Hille B, Mackie K (1998) Protein Kinase C Disrupts Cannabinoid Actions by Phosphorylation of the CB1 Cannabinoid Receptor. *J Neurosci* 18:2834-2841.
- Gawienowski A, Chatterjee D, Anderson P, Epstein D, Grant W (1982) Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on monoamine oxidase activity in bovine eye tissues, in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22:482-485.
- Gerard C, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1990) Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucl Acids Res* 18:7142-.
- 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.
- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002) Amacrine-Signaled Loss of Intrinsic Axon Growth Ability by Retinal Ganglion Cells. *Science* 296:1860-1864.
- 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.
- Gong J-P, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu Q-R, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006a) Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research* 1071:10-23.

- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006b) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research* 1071:10-23.
- Govek E-E, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME (2000) Cloning and Pharmacological Characterization of the Rat CB2 Cannabinoid Receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 292:886-894.
- Gudermann T, Schoneberg T, Schultz G (1997) FUNCTIONAL AND STRUCTURAL COMPLEXITY OF SIGNAL TRANSDUCTION VIA G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. *Annual Review of Neuroscience* 20:399-427.
- Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I (2001) Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J Mol Med* 78:613-625.
- Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacology & Therapeutics* 95:175-184.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE (1998) Dual Effects of Anandamide on NMDA Receptor-Mediated Responses and Neurotransmission. *Journal of Neurochemistry* 70:671-676.
- Hanson MG, Jr., Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA (1998) Cyclic AMP Elevation Is Sufficient to Promote the Survival of Spinal Motor Neurons In Vitro. *J Neurosci* 18:7361-7371.
- Hanus LO (2009) Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Medicinal Research Reviews* 29:213-271.
- Häring M, Marsicano G, Lutz B, Monory K (2007) Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience* 146:1212-1219.
- Harkany T, Mackie K, Doherty P (2008a) Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Current Opinion in Neurobiology* 18:338-345.
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J (2008b) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286:S84-S90.
- Harkany T, Guzman M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends in Pharmacological Sciences* 28:83-92.
- Harkany T, Dobszay MB, Cayetanot F, Hartig W, Siegemund T, Aujard F, Mackie K (2005) Redistribution of CB1 cannabinoid receptors during evolution of cholinergic basal forebrain territories and their cortical projection areas: A comparison between the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*, primates) and rat. *Neuroscience* 135:595-609.

- Heidemann S, Lamoureux P, Buxbaum R (1990) Growth cone behavior and production of traction force. *J Cell Biol* 111:1949-1957.
- Herkenham M, Lynn A, Johnson M, Melvin L, de Costa B, Rice K (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563-583.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1932-1936.
- Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, Velasco G (2006) The CB2 cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation of the mitochondrial intrinsic pathway. *Experimental Cell Research* 312:2121-2131.
- Hohmann AG, Herkenham M (2000) Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37:71-80.
- Höpker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M-m, Holt C (1999) Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401:69-73.
- Horch HW, Katz LC (2002) BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* 5:1177-1184.
- Howlett A, Fleming R (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26:532-538.
- Howlett AC (1995) Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 35:607-634.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* 54:161-202.
- Hu H, Marton TF, Goodman CS (2001) Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron* 32:39-51.
- Hu Y, Cui Q, Harvey AR (2007) Interactive effects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34:88-98.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier J-F (2003) SIGNALING AT THE GROWTH CONE: Ligand-Receptor Complexes and the Control of Axon Growth and Guidance. *Annual Review of Neuroscience* 26:509-563.
- Huizink AC, Mulder EJH (2006) Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 30:24-41.

- Inatani M (2005) Molecular mechanisms of optic axon guidance. *Naturwissenschaften* 92:549-561.
- 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.
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji S-P, Bai G, Zhang X (2005) Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *The Journal of Clinical Investigation* 115:3104-3116.
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA (2004) Defective Adult Neurogenesis in CB1 Cannabinoid Receptor Knockout Mice. *Mol Pharmacol* 66:204-208.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol Rev* 89:309-380.
- Kaplan BLF, Rockwell CE, Kaminski NE (2003) Evidence for Cannabinoid Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms of Action in Leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 306:1077-1085.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release from Axon Terminals of Specific Hippocampal Interneurons. *J Neurosci* 19:4544-4558.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum. *J Neurosci* 26:2991-3001.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SSY, Culotti JG, Tessier-Lavigne M (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. *Cell* 87:175-185.
- Kennedy T, Serafini T, de la Torre J, Tessier-Lavigne M (1994a) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994b) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Kim D, Thayer SA (2001) Cannabinoids Inhibit the Formation of New Synapses between Hippocampal Neurons in Culture. *J Neurosci* 21:146RC-.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H (2003) The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 74:486-496.



- Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugiura T (2001) Activation by 2-Arachidonoylglycerol, an Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, of p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase in HL-60 Cells. *J Biochem* 129:665-669.
- Köfalvi A (2008) *Cannabinoids and the Brain*. New York, NY: Springer.
- Koh CG (2006) Rho GTPases and Their Regulators in Neuronal Functions and Development. *Neurosignals* 15:228-237.
- Kondo S, Kondo H, Nakane S, Kodaka T, Tokumura A, Waku K, Sugiura T (1998) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Letters* 429:152-156.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ (2007) Molecular Components and Functions of the Endocannabinoid System in Mouse Prefrontal Cortex. *PLoS ONE* 2:e709.
- 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.
- Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* 15:510-519.
- Langdon R, Frost D (1991) Transient retinal axon collaterals to visual and somatosensory thalamus in neonatal hamsters. *J Comp Neurol* 310:200-214.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen H-Y, Lu H-C, Hille B, Mackie K (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:2699-2704.
- Lee AC, Suter DM (2008) Quantitative analysis of microtubule dynamics during adhesion-mediated growth cone guidance. *Developmental Neurobiology* 68:1363-1377.
- Li H-L (1973) An archaeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany* 28:437-448.
- Lilienbaum A, Reszka A, Horwitz A, Holt C (1995) Chimeric integrins expressed in retinal ganglion cells impair process. *Mol Cell Neurosci* 6:139-152.
- Ling C, Schneider GE, Jhaveri S (1998) Target-specific morphology of retinal axon arbors in the adult hamster. *Vis Neurosci* 15:559-579.
- Lowery LA, Vactor DV (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:332-343.

- Lu P, Yang H, Jones LL, Filbin MT, Tuszynski MH (2004) Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. *J Neurosci* 24:6402-6409.
- Lu Q, Straiker A, Lu Q, Maguire G (2000) Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci* 17:91-95.
- Lynn A, Herkenham M (1994) Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1612-1623.
- Maccarrone M, Finazzi-Agro A (2003) The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death Differentiation* 10:946-955.
- Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous. *Handb Exp Pharmacol* 168:299-325.
- Mackie K (2006) CANNABINOID RECEPTORS AS THERAPEUTIC TARGETS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 46:101-122.
- Mackie K (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286:S60-S65.
- Mackie K, Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3825-3829.
- Mackie K, Stella N (2006) Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 8:E298-306.
- Mackie K, Devane W, Hille B (1993) Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 44:498-503.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (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* 15:6552-6561.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: A comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655-668.
- 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* 143:200-204.
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *European Journal of Neuroscience* 11:4213-4225.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327:535-550.

- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- Matsuda S, Kanemitsu N, Nakamura A, Mimura Y, Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S (1997) Metabolism of Anandamide, an Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, in Porcine Ocular Tissues. *Experimental Eye Research* 64:707-711.
- Matteau I, Boire D, Ptito M (2003) Retinal projections in the cat: a cholera toxin B subunit study. *Vis Neurosci* 20:481-493.
- Mattson M, Dou P, Kater S (1988) Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 8:2087-2100.
- McDonald AJ, Mascagni F (2001) Localization of the CB1 type cannabinoid receptor in the rat basolateral amygdala: high concentrations in a subpopulation of cholecystinin-containing interneurons. *Neuroscience* 107:641-652.
- McKerracher L, Chamoux M, Arregui C (1996) Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Mol Neurobiol* 12:95-116.
- Mechoulam R, Shvo Y (1963) The structure of Cannabidiol. *Tetrahedron* 19:2073-2078.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1967) The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Letters* 8:1109-1111.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90.
- Melck D, Rueda D, Galve-Roperh I, De Petrocellis L, Guzmán M, Di Marzo V (1999) Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Letters* 463:235-240.
- 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.
- Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998a) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
- Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson JMG, Reichardt LF, Barres BA (1998b) Depolarization and cAMP Elevation Rapidly Recruit TrkB to the Plasma Membrane of CNS Neurons. *Neuron* 21:681-693.

- 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.
- Mitchison T, Kirschner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-772.
- Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arevalo-Martin A, Gomez-Torres O, Molina-Holgado E (2007) CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci* 25:629-634.
- Monsul NT, Geisendorfer AR, Han PJ, Banik R, Pease ME, Skolasky RL, Jr., Hoffman PN (2004a) Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve. *Exp Neurol* 186:124-133.
- Monsul NT, Geisendorfer AR, Han PJ, Banik R, Pease ME, Skolasky J, Richard L., Hoffman PN (2004b) Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve. *Experimental Neurology* 186:124-133.
- 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.
- Mu J, Zhuang S-y, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA (1999) Cannabinoid Receptors Differentially Modulate Potassium A and D Currents in Hippocampal Neurons in Culture. *J Pharmacol Exp Ther* 291:893-902.
- Mukhopadhyay S, Shim J-Y, Assi A-A, Norford D, Howlett AC (2002) CB1 cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chemistry and Physics of Lipids* 121:91-109.
- 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 (2008a) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:8760-8765.
- 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 (2008b) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8760-8765.

- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.
- Nicol X, Bennis M, Ishikawa Y, Chan GCK, Reperant J, Storm DR, Gaspar P (2006) Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections. *European Journal of Neuroscience* 24:3401-3414.
- Nicol X, Voyatzis S, Muzerelle A, Narboux-Neme N, Sudhof TC, Miles R, Gaspar P (2007) cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nat Neurosci* 10:340-347.
- Nie J, Lewis DL (2001) The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate G protein coupling. *Neuroscience* 107:161-167.
- Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J (2004) Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: An immunohistochemical study. *Synapse* 53:208-213.
- Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T (2009) 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: A Possible Natural Ligand for GPR55. *J Biochem* 145:13-20.
- Onaivi ES (2006) Neuropsychobiological Evidence for the Functional Presence and Expression of Cannabinoid CB<sub>2</sub> Receptors in the Brain. *Neuropsychobiology* 54:231-246.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong J-P, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu Q-R, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR (2006a) Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB<sub>2</sub> Receptors in Brain. *Ann NY Acad Sci* 1074:514-536.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR (2006b) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1074:514-536.
- 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.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzman M, Galve-Roperh I (2006) Non-psychoactive CB<sub>2</sub> cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *Faseb J* 20:2405-2407.
- Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269:13-25.

- Penn AA, Riquelme PA, Feller MB, Shatz CJ (1998) Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science* 279:2108-2112.
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74:129-180.
- Pertwee RG (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sciences* 76:1307-1324.
- Pertwee RG (2006) Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology* 147:S163-S171.
- Pertwee RG (2007) GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 152:984-986.
- Pertwee RG (2009) Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *British Journal of Pharmacology* 156:397-411.
- Ptito M, Giguere J, Boire D, Frost D, Casanova C (2001) When the auditory cortex turns visual. *Prog Brain Res* 134:447-458.
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009a) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* advance online publication.
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009b) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12:1152-1158.
- Qiao J, Huang F, Lum H (2003) PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L972-980.
- Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT (2002) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34:895-903.
- Rajnicek AM, Foubister LE, McCaig CD (2006) Temporally and spatially coordinated roles for Rho, Rac, Cdc42 and their effectors in growth cone guidance by a physiological electric field. *J Cell Sci* 119:1723-1735.
- Rapaport D, Wong L, Wood E, Yasumura D, LaVail M (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474:304-324.
- Ravary A, Muzerelle A, Herve D, Pascoli V, Ba-Charvet KN, Girault J-A, Welker E, Gaspar P (2003) Adenylate Cyclase 1 as a Key Actor in the Refinement of Retinal Projection Maps. *J Neurosci* 23:2228-2238.
- Rhee M-H, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R (1998) Cannabinoid Receptor Activation Differentially Regulates the Various Adenylyl Cyclase Isozymes. *Journal of Neurochemistry* 71:1525-1534.
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ (2001) Localization and Mechanisms of Action of Cannabinoid Receptors at the

- Glutamatergic Synapses of the Mouse Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 21:109-116.
- Rodger J, Goto H, Cui Q, Chen PB, Harvey AR (2005) cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish. *Molecular and Cellular Neuroscience* 30:452-464.
- Ross RA (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends in Pharmacological Sciences* 30:156-163.
- Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, MacEwan DJ, Scott RH (2001) Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40:221-232.
- Rubino T, Forlani G, Viganò D, Zippel R, Parolaro D (2004) Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol treatment. *Molecular and Cellular Neuroscience* 25:355-362.
- Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I (2002) The Endocannabinoid Anandamide Inhibits Neuronal Progenitor Cell Differentiation through Attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK Pathway. *J Biol Chem* 277:46645-46650.
- 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.
- Sadana R, Dessauer CW (2009) Physiological Roles for G Protein-Regulated Adenylyl Cyclase Isoforms: Insights from Knockout and Overexpression Studies. *Neurosignals* 17:5-22.
- Salzet M (2000) Invertebrate molecular neuroimmune processes. *Brain Res Brain Res Rev* 34:69-79.
- 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.
- Schaefer AW, Schoonderwoert VT, Ji L, Mederios N, Danuser G, Forscher P (2008) Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth. *Dev Cell* 15:146-162.
- Shekarabi M, Moore SW, Tritsch NX, Morris SJ, Bouchard JF, Kennedy TE (2005) Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* 25:3132-3141.

- Shire D, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Oustric D, Pessègue B, Bonnin-Cabanne O, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1996) Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1307:132-136.
- Shoemaker JL, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL (2005) Agonist-Directed Trafficking of Response by Endocannabinoids Acting at CB2 Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 315:828-838.
- Sholl DA (1953a) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406.
- Sholl DA (1953b) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A (1996) The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3984-3989.
- Slipetz D, O'Neill G, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters K (1995a) Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 48:352-361.
- Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters KM (1995b) Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 48:352-361.
- Song H-j, Poo M-m (1999) Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Current Opinion in Neurobiology* 9:355-363.
- Song Z-H, Zhong M (2000) CB1 Cannabinoid Receptor-Mediated Cell Migration. *J Pharmacol Exp Ther* 294:204-209.
- Spencer T, Filbin MT (2004) A role for cAMP in regeneration of the adult mammalian CNS. *J Anatomy* 204:49-55.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388:773-778.
- Stellwagen D, Shatz C (2002) An Instructive Role for Retinal Waves in the Development of Retinogeniculate Connectivity. *Neuron* 33:357-367.
- Stellwagen D, Shatz CJ, Feller MB (1999) Dynamics of Retinal Waves Are Controlled by Cyclic AMP. *J Neurosci* 19:673.
- 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 SW, Barres BA (2007a) The classical



- complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- 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 (2007b) 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14565-14570.
- Stuermer CA, Bastmeyer M (2000) The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog Neurobiol* 62:197-214.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97.
- Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A, Waku K (1996) 2-Arachidonoylglycerol, a Putative Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, Induces Rapid, Transient Elevation of Intracellular Free Ca<sup>2+</sup> in Neuroblastoma × Glioma Hybrid NG108-15 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229:58-64.
- Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H, Waku K (2000) Evidence That 2-Arachidonoylglycerol but Not N-Palmitoylethanolamine or Anandamide Is the Physiological Ligand for the Cannabinoid CB2 Receptor. COMPARISON OF THE AGONISTIC ACTIVITIES OF VARIOUS CANNABINOID RECEPTOR LIGANDS IN HL-60 CELLS. *J Biol Chem* 275:605-612.
- Teng FYH, Tang BL (2006) Axonal regeneration in adult CNS neurons - signaling molecules and pathways. *Journal of Neurochemistry* 96:1501-1508.
- Torborg CL, Feller MB (2004a) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *J Neurosci Methods* 135:17-26.
- Torborg CL, Feller MB (2004b) Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. *Journal of Neuroscience Methods* 135:17-26.
- Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P (1996) Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122:3381-3391.
- Touw M (1981) The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs* 13:23-34.

- Trousse F, Marti E, Gruss P, Torres M, Bovolenta P (2001) Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 128:3927-3936.
- Tsou K, Mackie K, Sañudo-Peña MC, Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 93:969-975.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.
- Tsutsumi T, Kobayashi T, Ueda H, Yamauchi E, Watanabe S, Okuyama H (1994) Lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes. *Neurochem Res* 19:399-406.
- Valjent E, Pagès C, Rogard M, Besson M-J, Maldonado R, Caboche J (2001)  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation *in vivo* depends on dopaminergic transmission. *European Journal of Neuroscience* 14:342-352.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332.
- Ventimiglia R, Mather PE, Jones BE, Lindsay RM (1995) The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons *in vitro*. *Eur J Neurosci* 7:213-222.
- Viscomi MT, Oddi S, Latini L, Pasquariello N, Florenzano F, Bernardi G, Molinari M, Maccarrone M (2009) Selective CB2 Receptor Agonism Protects Central Neurons from Remote Axotomy-Induced Apoptosis through the PI3K/Akt Pathway. *J Neurosci* 29:4564-4570.
- Vitalis T, Jeanne L, Anne S, Alexandre R, Christophe L, Zsolt L (2008a) The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 28:1705-1718.
- Vitalis T, Laine J, Simon A, Roland A, Letierrier C, Lenkei Z (2008b) 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.
- Vogt Weisenhorn DM, Roback LJ, Kwon JH, Wainer BH (2001a) Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage. *Exp Neurol* 169:44-55.

- Vogt Weisenhorn DM, Roback LJ, Kwon JH, Wainer BH (2001b) Coupling of cAMP/PKA and MAPK Signaling in Neuronal Cells Is Dependent on Developmental Stage. *Experimental Neurology* 169:44-55.
- Volgyi B, Chheda S, Bloomfield SA (2008) Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol* 512:664-687.
- Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK (2000) Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* 149:263-270.
- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243:3763-3765.
- Waltereit R, Weller M (2003) Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology* 27:99-106.
- Watanabe M, Tokita Y, Kato M, Fukuda Y (2003) Intravitreal injections of neurotrophic factors and forskolin enhance survival and axonal regeneration of axotomized [beta] ganglion cells in cat retina. *Neuroscience* 116:733-742.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 38:89-97.
- Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF (2006) A Second Fatty Acid Amide Hydrolase with Variable Distribution among Placental Mammals. *J Biol Chem* 281:36569-36578.
- Williams E-J, Walsh FS, Doherty P (2003a) The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 160:481-486.
- Williams S, Mann F, Erskine L, Sakurai T, Wei S, Rossi D, Gale N, Holt C, Mason C, Henkemeyer M (2003b) Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* 39:919-935.
- 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. *The Journal of Comparative Neurology* 415:80-90.
- Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nature cell biology* 5:38-45.
- Zabouri N, Bouchard J-F, Casanova C (2007) Expression of the endocannabinoid receptor CB1 and the FAAH enzyme during retinal development in the rat. In: 37th annual meeting of The Society for

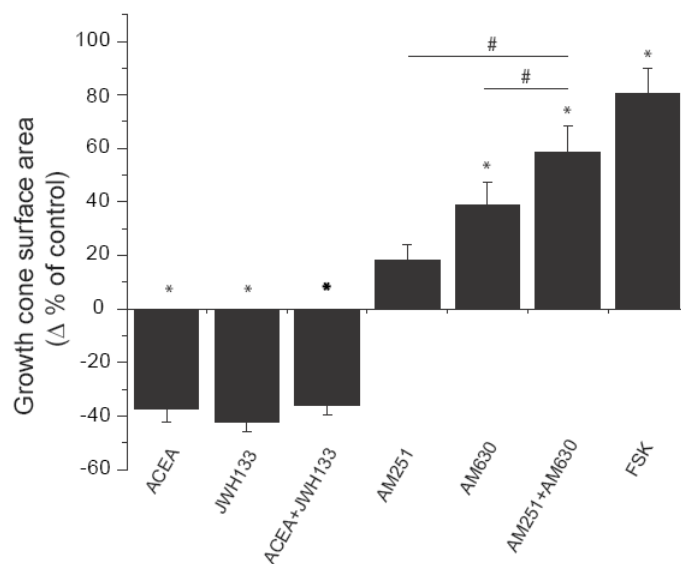
Neuroscience annual meeting, p 461.423/F439. San Diego, CA: Society for Neuroscience.

- Zhou D, Song ZH (2001) CB1 cannabinoid receptor-mediated neurite remodeling in mouse neuroblastoma N1E-115 cells. *Journal of neuroscience research* 65:346-353.
- Zou Y, Lyuksyutova AI (2007) Morphogens as conserved axon guidance cues. *Current Opinion in Neurobiology* 17:22-28.
- Zuardi A (2006) History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr* 28:153-157.

## ANNEXE I

### Figure 1 Stimulation simultanée de CB1R et CB2R

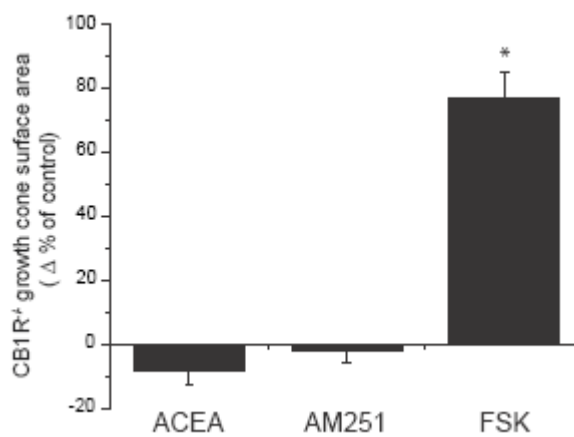
La stimulation pharmacologique simultanée de CB1R et CB2R entraîne un effet additif sur l'aire du cône de croissance *in vitro*. \*et # indiquent des différences significatives par rapport au groupe témoin et agoniste inverse de CB1R ou CB2R, respectivement.  $P < 0,05$ .



**ANNEXE I Figure 1** Stimulation simultanée de CB1R et CB2R

**Figure 2 L'agoniste et agoniste inverse de CB1R n'exercent pas d'effets sur les cônes des croissances de cultures neuronales CB1R<sup>-/-</sup>**

L'agoniste et agoniste inverse de CB1R n'influence pas la morphologie du cône de croissance de cultures de neurones provenant de souris CB1R<sup>-/-</sup>. \* indique une différence significative par rapport au groupe témoin.  $p < 0,05$



**ANNEXE I Figure 2** L'agoniste et agoniste inverse de CB1R n'exercent pas d'effets sur les cônes des croissances de cultures neuronales CB1R<sup>-/-</sup>