Université Pierre et Marie Curie

École doctorale Cerveau Cognition Comportement – ED 158

Institut du Fer à Moulin, équipe « Neurotransmission et développement »

Mécanismes cellulaires sous-tendant le raffinement des projections rétiniennes

Par **Ahlem ASSALI**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Patricia GASPAR

Présentée et soutenue publiquement le 24/09/2014

Devant un jury composé de

Pr Ann LOHOF	Président du jury
Dr Michael REBER	Rapporteur
Dr Fabrice ANGO	Rapporteur
Pr Evelyne SERNAGOR	Examinateur
Dr Alexandra REBSAM	Examinateur
Dr Patricia GASPAR	Directeur de thèse

Je remercie Jean-Antoine Girault de m'avoir ouvert les portes de l'institut du Fer à Moulin en transférant ma petite candidature pour un stage de licence aux différents chefs d'équipe. L'IFM a constitué pour moi un environnement extrêmement enrichissant et épanouissant, scientifiquement riche d'excellents chercheurs, de séminaires variés tout aussi intéressants les uns que les autres, mais aussi humainement et culturellement riche de personnes exceptionnelles venant du monde entier.

Je remercie infiniment Patricia Gaspar. Vous avez été la première à me donner ma chance, à me faire confiance, à croire en moi et à avoir eu l'ouverture, la tolérance et le courage nécessaires à m'accepter telle que je suis… Je vous remercie de m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master puis ma thèse dans votre laboratoire, qui a été un petit cocon où j'ai pu me développer. Je vous remercie pour la disponibilité que vous avez toujours eu pour moi, pour l'aide et le soutien précieux, scientifiques et personnels que vous m'avez toujours accordé tout le long de ma thèse. A chaque fois que j'ai franchi la porte de votre bureau, je n'ai jamais été déçue quel qu'ait été l'objet de ma visite ! Toujours prête à discuter des manips et des concepts, à résoudre mes problèmes de contrat, d'appart (encore merci au passage d'avoir été ma garante ☺), à relire et corriger mes écrits avec une rapidité et efficacité qui m'épatent à chaque fois.
Vous êtes une femme remarquable et vous avez toute ma reconnaissance, ma gratitude et mon admiration !

Je remercie aussi infiniment Alexandra Rebsam, MON encadrante et bien plus que mon encadrante. Je te suis reconnaissante pour tellement de choses ! Tu es celle qui m'a formé au quotidien aux techniques, à l'oral, à la réflexion scientifique, à l'écriture.. à tout quoi.. tu es celle qui m'a donné confiance en moi, qui par ta franchise et ton souci de mon évolution, m'a permis d'identifier mes points forts et mes points faibles. Merci pour ta confiance, pour toute l'aide que tu m'as apportée alors que tu étais encore à New-York pour préparer mon concours de l'ED, pour mon projet… pour ta super pédagogie. J'adore ta personnalité, tu es d'une sympathie hors du commun ! J'ai été plus que ravie de travailler avec toi. Nombreux sont les étudiants qui m'ont envié de t'avoir..

Je remercie Xavier Nicol pour m'avoir permis d'élargir mes horizons en m'offrant un fascinant projet de collaboration avec lui. Merci pour tout ce que tu m'as appris, en culture, en imagerie… merci pour ta gentillesse, ta disponibilité.. merci de m'avoir permis de partir en congrès à Cold Spring Harbor ☺ Merci pour toutes les super discussions scientifiques que l'on a eues.

Je remercie très très chaleureusement Aude à qui je me suis beaucoup attachée. Je te remercie ma chère Aude pour tout ce que tu es et tout ce que tu donnes autour de toi. Tu rayonnes tous les jours de bonne humeur, de joie, de séreinité, de générosité, d'altruisme, de sagesse. Merci pour toutes tes attentions (petits cadeaux, petits sucres pour mon café, petit planing pour m'aider à arriver à l'heure le matin…….), pour toutes les solutions que tu as à tous les problèmes, pour toujours trouver les mots qu'il faut, pour toujours avoir des conseils empreints de sagesse. Comme tu sais, j'aime beaucoup ta spiritualité et la si belle manière dont tu la pratiques. Mais merci aussi pour toutes tes qualités professionnelles, pour ton efficacité, ta parfaite gestion de tout ce qui concerne l'équipe, pour toutes les réponses et toute l'aide que tu m'as apportées dans mon travail. Pour toutes ces raisons, l'équipe ne serait pas ce qu'elle est sans toi, tu es un véritable et indispensable pilier et ton absence est celle qui laisse le plus grand vide dans l'équipe… Tu es incontestablement l'une des figures qui fait du labo une deuxième maison, une deuxième famille où on se sent bien ☺

Je remercie Imane en étant triste d'écrire ces lignes car elles signifient la fin de nos moments ensemble à l'IFM. Merci de m'avoir formée à la biologie moléculaire avec beaucoup de pédagogie, d'avoir gentiment répondu à toutes mes questions timides. Mais en fait la biologie moléculaire est devenue bien secondaire… car tu es devenue avec le temps une véritable amie… merci pour toutes les pauses café que j'aurais voulu interminables, pour tous les trajets IFM-Gare de Lyon à pied à différentes heures de la nuit après de longues soirées au labo à perfuser ou à couper ou à prendre des photos. Ma vie à l'institut aurait été complètement différente sans toi, bien plus fade…

Merci à ma famille et mes amies qui m'ont tant soutenue et qui m'ont tant écouté parler de ma thèse !!

TABLE DES MATIERES

Table des matières……I

Liste des figures V

Liste des tableaux VI

Liste des abréviations VII

Préambule 1

Introduction 3

I.Description des cartes visuelles et de leur développement……4

A- La rétine 4

B- Les cibles de la rétine : le CGLd et le CS 5

C- Les cartes visuelles 7

1- Description des cartes visuelles : carte œil spécifique et carte rétinotopique……7

2- Développement des projections rétiniennes avant d'atteindre les cibles CGLd et CS……9

3- Développement de la carte œil spécifique……10

4- Développement de la carte rétinotopique et guidage axonal……11

a- Positionnement à la bonne ZT……12

b- Raffinement de la ZT……14

c- Raffinement fin des connexions rétinotopiques……15

d- Développement d'une projection rétinienne à l'échelle individuelle……15

II- Rôle de l'actvité spontanée rétinienne dans le développement des projections rétiniennes ……16

A- Vagues d'activité spontanée et corrélée dans la rétine au cours du développement des projections rétiniennes……16

B- Rôle de l'activité dans l'établissement des connexions rétine-cibles CS et CGLd……19

1- Rôle de l'activité rétinienne dans la formation de la carte œil spécifique……19

2- Rôle de l'activité dans l'établissement de la rétinotopie……23

a- Positionnement des projections rétiniennes à la bonne zone de terminaison……23
b- Raffinement de la rétinotopie……24
c- Raffinement fin des connexions rétinotopiques……25
C- Mécanismes en aval de l'activité rétinienne……26
1- Rappel sur la libération synaptique……26
2- Rôle de la transmission synaptique rétine-cible sur la ségrégation œil spécifique……30
3- Rôle de la transmission synaptique dans le raffinement de la rétinotopie……31
4- Rôle d'une signalisation rétrograde cibles-rétine dans le développement des projections rétiniennes……32
D- Mécanismes concrétisant le remaniement des projections rétiniennes……33
1- Rôle de la mort cellulaire activité-dépendante……33
2- Rôle de la glie, la microglie et de certains éléments du système immunitaire……34
E- Mécanismes de sélection des connexions au cours du développement des projections rétiniennes……36
1- Hypothèse de Hebb et plasticité synaptique……36
2- Rôle de la corrélation de l'activité dans les CGRs voisines……38
3- Instruction de la position des domaines œil spécifique……40
a- Position du domaine ipsilatéral……40
b- Rôle de la sérotonine dans le développement de la carte œil spécifique……40
III – Adénylates cyclases, signaux AMPc et compartimentation spatiale……42
A- Les adénylates cyclases……42
1- Différentes ACs……42
2- Régulation de l'activité des ACs……44
a- Régulation par le calcium……44
b- Régulation par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)……44
c- Régulation par PKA, PKC, CamK……45
3- Profil d'expression des ACs dans le système nerveux central……45

4- Rôle de l'AC1 dans le développement du SNC……..50

a- Rôle d'AC1 dans le développement du SNC……50

b- Rôle de l'AC1 dans le développement des projections rétiniennes……..51

c- L'AC1 et l'activité rétinienne……53

B- Le Concept de compartimentation de la signalisation AMPc générée par les ACs……55

1- Spécificité fonctionnelle des signaux AMPc……55

2- Composition d'un microdomaine de signalisation AMPc……57

3- Etudes de la compartimentation de la signalisation AMPc……59

4- Adressage des ACs à différents compartiments sub-cellulaires……..61

Résultats 63

I- Article 1 ..... ……64

II- Article 2 86

III - Partie 3 112

Discussion 127

I- Mécanismes activité-dépendants et raffinement des cartes visuelles……140

A- Validité du modèle Rim cDKO pour l'étude du rôle de la libération synaptique……140

B- Activité rétinienne et carte œil spécifique……...143

1- Carte œil spécifique dans le CGLd……143

2- Ségrégation ou lamination œil spécifique dans le CS ?……144

C- Libération synaptique et rétinotopie des projections controlatérales……..146

1- Raffinement de la ZT et libération synaptique……..146

2- Raffinement de la rétinotopie à fine échelle et libération synaptique……148

D- Spécificité de la topographie de la projection ipsilatérale……149

1- Organisation en amas……149

2- Restriction de la projection ipsilatérale dans le CS rostral et mort cellulaire……..150

II- Rôle des différentes ACs et compartiments cellulaires impliqués dans le développement des projections rétiniennes……154

A- Signaux AMPc et vagues spontanées rétiniennes……154

B- AC1, AC soluble et mort/survie cellulaire……155

C- Signaux AMPc et molécules de guidage……156

D- Signaux AMPc et rétinotopie……157

1- Signaux AMPc et positionnement à la bonne ZT……157

2- Signaux AMPc et raffinement de la rétinotopie……157

3- Signaux AMPc et raffinement fin……158

E – Signaux AMPc et carte œil spécifique……159

III- Modulation de la libération synaptique par différentes voies de signalisation régulées par les signaux AMPc……161

A- Signaux AMPc et libération synaptique……161

B- Signaux AMPc et système endocannabinoide……161

C- Signaux AMPc et système sérotoninergique……162

Annexe……163

Bibliographie……192

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La rétine…… 4

Figure 2 : Carte œil-spécifique et carte rétinotopique……7

Figure 3 : Dévelopment de la carte œil-spécifique……..10

Figure 4 : Localisation des projections ipsilatérales et controlatérales provenant de la rétine ventro-temporale (VT) dans le CGLd. ……11

Figure 5 : Gradients d'éphrines A / Eph dans la rétine et dans les cibles……12

Figure 6 : a. Développement de la carte rétinotopique dans le CS. b. Développement d'une projection rétinienne dans le CS et dans le CGLd……15

Figure 7 : Différentes phases de l'activité rétinienne et différentes étapes du raffinement des projections rétiniennes au cours du temps……..17

Figure 8 : Défauts de la carte œil spécifique chez une souris beta2 KO……..20

Figure 9 : Défauts de raffinement de la rétinotopie chez la souris beta2 KO dans le CS……..23

Figure 10 : Différentes étapes de la libération synaptique calcium-dépendante…….. et rôle des protéines Rim dans la libération synaptique calcium-dépendante……28

Figure 11 : Structure de Rim 1 α……..29

Figure 12 : Sélection des synapses selon le concept de Hebb.……36

Figure 13 : Phénotype de la Sourie EphB1 KO dans le CGLd…….. 40

Figure 14 : Structure de l'adénylate cyclase trans-membranaire……43

Figure 15 : Défauts de ségrégation chez la souris *brl* dans le CGLd…… 51

Figure 16: Défauts de topographie de la projection ipsilatérale chez une souris *brl* dans le CS…… 51

Figure 17 : Défauts de raffinement de la rétinotopie chez une souris AC1 KO dans le CS……52

Figure 18 : Microdomaines de signalisation AMPc…… 56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différentes adénylates cyclases……..47

Tableau 2 : Récapitulatif des phénotypes dans le système visuel…… 129

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Adénylate Cyclase

ACh : Acétyl-Choline

AKAP : PKA-anchoring proteins

AMPc : Adenosine MonoPhosphate Cyclique

AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ATP : Adénosine TriPhosphate

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

BP : Binding Protein

brl : barrelless

Cam : Calmoduline

CamK : Calmodulin-dependent protein Kinase

CB : CannaBinoid receptor

CCTL : Canaux Calciques de Type L

ChR2 : ChannelRhodopsin2

CGLd : Corp Genouillé Latéral dorsal

CGR: Cellule Ganglionnaire de la Rétine

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CS : Colliculus Supérieur

CREB : cAMP response element-binding protein

CTD : Dépression à Court Terme

DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma

Epac : Exchange protein directly activated by cAMP

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

GABA : γ-Aminobutyric acid

GMPc : Guanosin MonoPhosphate cyclique

GTP : Guanosin TriphosPhate

E : Jour Embryonnaire

Eph : Ephrin receptor

KI : Knock-In

KO : Knock-Out

LTD : Dépression à Long Terme

LTP : Potentiation à Long Terme

MAOA : MonoAmine Oxidases A

MEGF : Multiple EGF-like-domains

mEPSC : Miniature Excitatory PostSynaptic Current

MERTK : MER proto-oncogene Tyrosine Kinase

MyBP-C : Myosin binding protein-Cs

Nr-CAM : Neuronal Cell Adhesion Molecule

Munc : Mammalian UNCoordinated

NMDA : N-methyl-D-aspartate

P : Jour Post-natal

PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

PDE : PhosPhodiEstérases

PGE : Prostaglandine E

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLB : PhosPholamBan

Rho : Ras homologue gene family

RIM : Rab3 Interacting Molecules

RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G

Ryk : Related to receptor tyrosine Kinase

RyR : Ryanodine receptors

SERT : Transporteur de la sérotonine

SGS : Stratum Griseum Superficiale

SNC : Système Nerveux Central

SO : Stratum Opticum

SON : Synthétase de l'Oxide Nitrique

SNAP : Synaptosomal-associated protein

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor

TGF : Transforming growth factor

TM : Trans-Membranaire

TTX : Tétrodotoxine

TrKB : Tyrosine-related Kinase B

TnI : Troponine I

VT : Ventro-temporal

ZN : Zinc Finger

ZT : Zone de Terminaison

PREAMBULE

Pendant ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes qui sous-tendent le raffinement des connexions neuronales au cours du développement en utilisant le système visuel.

Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) envoient des projections au thalamus visuel et au colliculus supérieur. Initialement, les connexions qu'elles établissent avec les cibles sont imprécises, puis elles se raffinent de manière activité-dépendante. En effet, la rétine présente une activité spontanée avant le début de la vision et cette activité est importante. L'activité neuronale peut agir via des signalisations intra-cellulaires dépendantes du calcium ou via la libération synaptique. Dans un premier projet de thèse, j'ai cherché à déterminer si la libération synaptique de la rétine à ses cibles était importante pour le raffinement des projections. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article 1.

L'AMPc, un second messager intra-cellulaire, et son enzyme de synthèse, l'adénylate cyclase 1 (AC1) sont exprimés par les CGRs et sont impliqués dans le raffinement des projections rétiniennes. Bien que les autres isoformes d'AC exprimées par les CGRs synthétisent le même second messager, elles ne participent pas à cette fonction de raffinement. Les signaux AMPc générés par les différentes AC régulent donc des voies de signalisation distinctes mais le code utilisé pour attribuer les signaux AMPc à la voie de signalisation approppriée est inconnu. L'hypothèse pour expliquer cette spécificité fonctionnelle est l'existence d'une compartimentation spatiale des signalisations AMPc sous forme de microdomaines cellulaires qui contiendraient les régulateurs et effecteurs spécifiques d'une voie donnée ainsi que des enzymes de dégradation des signaux AMPc pour limiter leur diffusion. Dans un deuxième projet, j'ai cherché à identifier un microdomaine AMPc impliqué dans le raffinement des cartes visuelles. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article 2 et dans une troisième partie de résultats.

L'introduction de ma thèse est dédiée d'abord à la description du système visuel et de son développement, ensuite aux mécanismes activité-dépendant impliqués dans le raffinement des projections rétiniennes et enfin au concept de compartimentation spatiale des signaux AMPc nécessaire à leur spécificité fonctionnelle.

Les mécanismes dépendants de l'activité spontanée rétinienne sont aussi pésentés dans une revue en annexe qui a été soumise à Seminars in Developmental and Cell Biology.

Une discussion générale de mes résultats de thèse est présentée dans une dernière partie.

INTRODUCTION

I- Description des cartes visuelles et de leur développement

Le système visuel est composé de la rétine et de ses projections dans les cibles du système nerveux central (SNC). Il constitue un excellent modèle pour étudier les mécanismes qui sous-tendent l'établissement des connexions neurales au cours du développement du cerveau. En effet, les connexions de la rétine à ses cibles dans le cerveau sont très précises, bien décrites et facilement visualisables, il est donc facile d'évaluer les effets d'une pertubation donnée sur les circuits visuels.

Le système visuel est étudié en recherche chez de nombreuses espèces. Nous allons ici nous focaliser principalement sur le système visuel de la souris et du rat, en citant parfois des études réalisées chez d'autres espèces si nécessaire.

A- La rétine

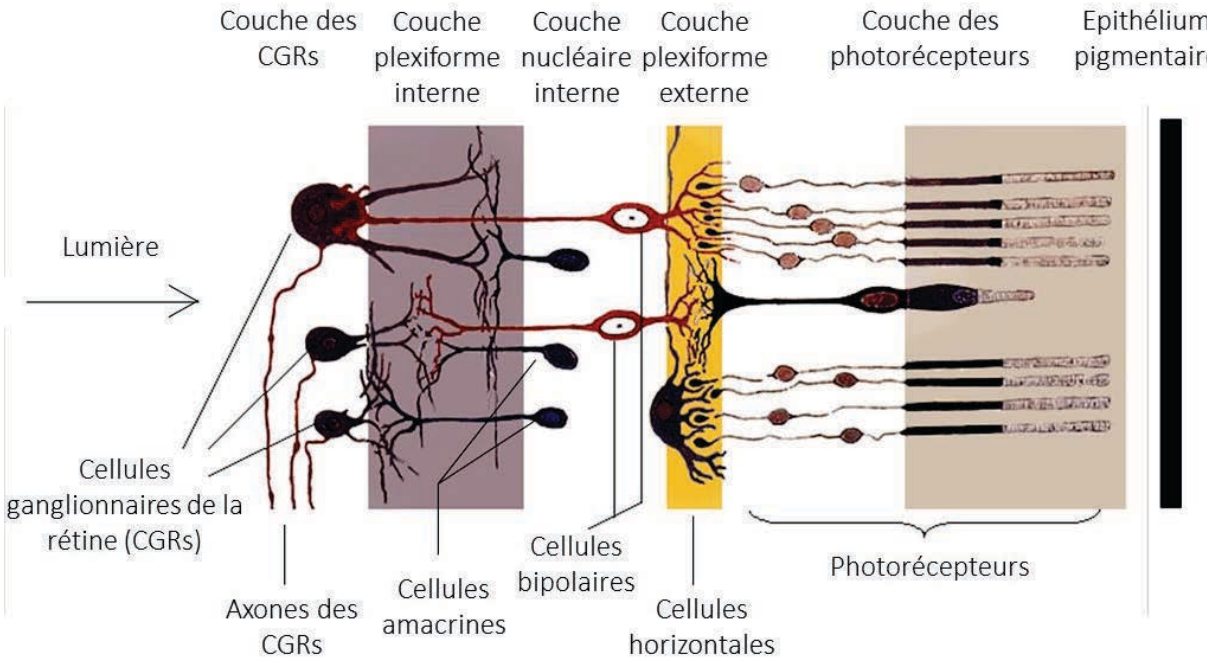


Figure 1 : La rétine. Elle est composée de couches. La couche la plus externe, apposée à l'épithélium pigmentaire, contient les photorécepteurs ; la couche plexiforme externe contient les contacts synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules horizontales ; la couche nucléaire interne contient les corps cellulaires des cellules bipolaires et amacrines ; la couche plexiforme interne contient les contacts synaptiques entre les bipolaires et les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) ainsi que les contacts entre les amacrines et les CGRs ; la couche la plus interne contient les corps cellulaires des CGRs et leurs axones qui projettent vers le cerveau.

La rétine est composée de 3 couches celllulaires contenant les différents types de cellules de la rétine et de 2 couches plexiformes contenant les contacts synaptiques entre les cellules de la rétine. Les 2 couches plexiformes sont intercalées entre les couches cellulaires (Figure 1). La couche la plus externe de la rétine contient les photorécepteurs ; la couche nucléaire interne contient des interneurones : les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les cellules amacrines ; la couche la plus interne de la rétine contient les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). Les photorécepteurs sont les cellules photosensibles de la rétine qui permettent de convertir la lumière en signal chimique ; il existe 2 types de photorécepteurs, les cônes qui permettent la vision des couleurs et les batonnets qui permettent la vision nocturne. Les photorécepteurs sont connectés aux cellules bipolaires qui elles, sont connectées aux CGRs. Les CGRs sont ensuite les seules cellules de la rétine qui projettent dans le cerveau et qui transmettent les informations aux cibles centrales. Les cellules horizontales et les cellules amacrines sont des interneurones qui modulent l'activité des photorécepteurs et des CGRs respectivement.

Il existe plus de 20 sous-types différents de CGRs (Higenell et al., 2012) qui permettent de transmettre au cerveau différentes caractéristiques des informations relatives à l'environnement visuel : les contours, le mouvement, la couleur… Les différents sous-types de CGRs présentent une morphologie différente (Fertuzinhos et al., 2014). Ainsi, les CGRs sont classées selon leur fonction, leur morphologie et leurs propriétés électrophysiologiques (par exemple selon qu'elles soient dépolarisées (CGR ON) ou hyperpolarisées (CGR OFF) par la lumière). Ici, nous diviserons les CGRs en 2 populations, les CGRs ipsilatérales qui projettent dans le même hémisphère que leur œil d'origine et les CGRs controlatérales qui projettent dans l'autre hémisphère, du côté opposé à leur œil d'origine.

B- Les cibles de la rétine : le CGLd et le CS

Les différentes CGRs projettent dans plus de 20 régions du cerveau (dont le noyau suprachiasmatique, le prétectum, le CGL ventral ; (Higenell et al., 2012) mais leurs 2

cibles principales sont le colliculus supérieur (CS) et le thalamus visuel ou corps genouillé latéral dorsal (CGLd). Chez la souris, la majorité des CGRs projettent dans les 2 cibles : l'axone d'une CGR se sépare en 2 branches, l'une innervant le CGLd et l'autre innervant le CS (Dhande et al., 2011). Chez le rat adulte, environ 75% des CGRs ipsilatérales projettent à la fois dans le CS et le CGLd, 12% seulement dans le CGLd et 11% seulement dans le CS (Hofbauer and Drager, 1985; Yamadori et al., 1989; Ahmed et al., 1996)

Le CS visuel est plutôt impliqué dans la reconnaissance, la localisation et la réponse à de nouveaux stimuli ainsi que dans le contrôle du mouvement de la tête et des yeux (Sefton et al, 2004). Le CS est composé de 7 couches : les couches superficielles reçoivent des afférences visuelles de la rétine mais aussi du cortex, les couches intermédiaires et profondes reçoivent des afférences auditives et somatosensorielles du cortex et tronc cérébral entre autres (Drager and Hubel, 1975, 1976). Les afférences du cortex commencent à arboriser dans le CS seulement après P7 (Lopez-Medina et al., 1989) et leur raffinement a lieu à la fin de la deuxième semaine post-natale (Thong and Dreher, 1986; Lopez-Medina et al., 1989; Binns and Salt, 1997). Le CS envoie des projections au thalamus, au pont, au tronc cérébral et à la moelle épinière (Drager and Hubel, 1975, 1976; Westby et al., 1990).

Le CGLd projette dans la couche IV du cortex visuel et constitue ainsi un relais pour le traitement des informations visuelles et la vision consciente. Outre les afférences excitatrices provenant de la rétine, le CGLd reçoit des afférences glutamatergiques provenant de neurones de la couche VI du cortex, ainsi que des afférences cholinergiques provenant du tronc cérébral (Erisir et al., 1997b; Erisir et al., 1997a). Le CGLd reçoit aussi des afférences inhibitrices médiées par le GABA. Ces afférences inhibitrices proviennent d'interneurones locaux, du noyau réticulaire thalamique et du prétectum (Ohara et al., 1980; Montero and Scott, 1981; Arcelli et al., 1997). Ainsi chez la souris adulte, le CGLd contient seulement 11 à 13% de synapses rétino-thalamiques, 16 à 19% de synapses GABAergiques et 62 à 66% de synapses cortico-thalamiques (Bickford et al., 2010).

Le développement des synapses dans le CGLd chez la souris a été étudié et décrit au moyen d'enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de CGLd contenant aussi le tractus optique (Mooney et al., 1996; Jaubert-Miazza et al., 2005; Bickford et al.,

2010). Jusqu'au jour postnatal 7 (P7) dans le CGLd, des synapses fonctionnelles sont présentes mais immatures. Pendant les deux premières semaines postnatales, la majorité des afférences qui contrôle l'activité des cellules du CGLd provient de la rétine (Mooney et al., 1996). Les cellules du cortex visuel situées dans la couche VI innervent le CGLd seulement à la fin de la deuxième semaine postnatale (Jacobs et al., 2007). A P14, les différentes synapses inhibitrices sont présentes, fonctionnelles et matures. A P14 aussi, les synapses cortico-thalamiques sont présentes, fonctionnelles et matures.

C- Les cartes visuelles

1- Description des cartes visuelles : carte œil spécifique et carte rétinotopique

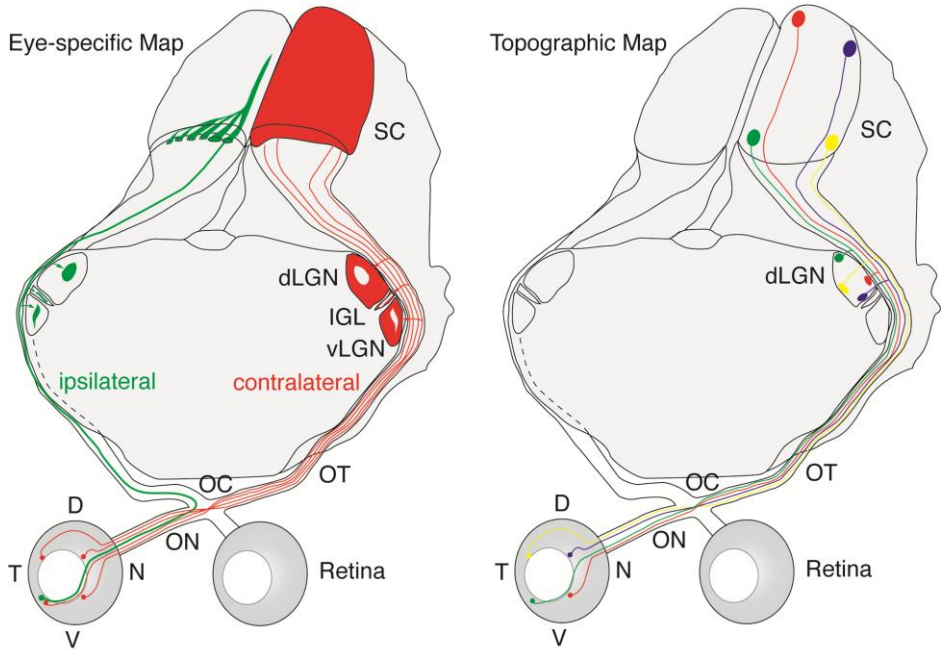


Figure 2 : Carte œil-spécifique (à gauche) et carte rétinotopique (à droite).
Les projections ipsilatérales et controlatérales sont ségrégées dans leurs cibles (ségrégation œil-spécifique) et occupent des domaines particuliers (domaines œil-spécifiques). Les projections controlatérales (rouge) occupent entièrement le corps genouillé latéral dorsal (CGLd) excepté la zone occupée par les projections ipsilatérales (vert). Les projections controlatérales occupent la couche superficielle (stratum griseum superficiale) du colliculus supérieur (CS) tandis que les projections ipsilatérales occupent une couche plus profonde (stratum opticum) ; les projections ipsilatérales y forment des amas tout le long de l'axe médio-latéral du CS antérieur puis plus caudalement, elles sont restreintes à un amas dans le CS médial uniquement.
Les CGRs voisines dans la rétine connectent des cellules voisines dans les cibles. Les projections provenant de la rétine temporale occupent le CGLd médio-dorsal et le CS antérieur tandis que les projections provenant de la rétine nasale occupent le CGLd ventro-latéral et le CS postérieur.

Les projections de la rétine dans leurs cibles, le CGLd et le CS, dessinent deux cartes visuelles : une carte œil spécifique et une carte rétinotopique (Figure 2). Chez le rat et la souris, les cibles de la rétine situées dans chaque hémisphère du cerveau reçoivent des projections provenant des deux yeux. Les projections provenant de chaque oeil sont ségrégées et forment ainsi des domaines œil-spécifique. La carte rétinotopique quant à elle, correspond au fait que des cellules voisines dans la rétine connectent des cellules voisines dans leurs cibles, le CGLd et le CS. La carte œil spécifique est essentielle à la vision binoculaire et la carte rétinotopique est importante pour une représentation spatiale cohérente de l'environnement.

Concernant la carte œil spécifique (Figure 2, schéma de gauche), dans le CGLd, les projections ipsilatérales et controlatérales sont ségrégées. La projection ipsilatérale forme un amas au centre du CGLd. Elle est entourée de la projection controlatérale qui occupe tout le reste du CGLd. Dans le CS, la projection controlatérale occupe la couche superficielle du CS ou stratum griseum superficiale (SGS) tandis que la projection ipsilatérale occupe une couche plus profonde du CS, le stratum opticum (SO), situé juste en dessous du SGS. Il y a donc une lamination dans le CS, avec des projections ipsilatérales et controlatérales qui occupent des couches différentes. La projection ipsilatérale forme des amas tout le long de l'axe médio-latéral au niveau du CS rostral et plus caudalement au niveau du CS, elle est restreinte au niveau très médial du CS.
Le fait que la projection ipsilatérale n'occupe qu'une petite partie du CGLd et du CS vient du fait que chez la souris, les CGRs projetant ipsilatéralement représentent seulement 3 à 5 % des CGRs totales (Petros et al., 2008). Les CGRs projetant ipsilatéralement sont localisées dans le croissant ventro-temporal (VT) de la rétine contrairement aux CGRs projetant controlatéralement qui occupent toute la rétine, y compris le croissant VT (Figure 2).
Concernant la carte rétinotopique (Figure 2, schéma de droite), dans le CGLd, l'axe naso-temporal de la rétine projette sur l'axe ventro-latéral – dorso-médial du CGLd et l'axe dorso-ventral de la rétine projette sur l'axe ventro-médial – dorso-latéral du CGLd. Dans le CS, l'axe temporo-nasal de la rétine projette sur l'axe rostro-caudal du CS et l'axe dorso-ventral de la rétine projette sur l'axe latéro-médial du CS (Pfeiffenberger et al., 2006).

2- Développement des projections rétiniennes avant d'atteindre les cibles CGLd et CS

L'ensemble des types cellulaires de la rétine est généré par des cellules multipotentes localisées le long de l'épithélium pigmentaire rétinien. Les CGRs ipsilatérales sont générées du jour embryonnaire 11 (E11) à E16 et les CGRs controlatérales de E11 à E19 (Marquardt and Gruss, 2002).

Au cours du développment, les axones rétiniens poussent et sont maintenus à la surface interne de la rétine au moyen de molécules répulsives présentes à la périphérie de la rétine. Au niveau du disque optique, les axones rétiniens quittent l'œil en réponse à une molécule de guidage, la nétrine-1 (Hopker et al., 1999). Ils forment ensuite le nerf optique et atteignent le chiasma optique entre E12 et P0. A ce niveau, les axones controlatéraux croisent la ligne médiane et continuent leur croissance dans l'autre hémisphère tandis que les axones ipsilatéraux restent dans le même hémisphère. Les axones ipsilatéraux expriment le récepteur EphB1 qui, en réponse à l'éphrine B2 exprimée au niveau du chiasma optique, leur permet d'être repoussé et de ne pas croiser la ligne médiane ; les axones controlatéraux n'expriment pas EphB1. Le facteur de transcription spécifique des cellules ipsilatérales qui induit l'expression d'EphB1 est Zic2 (Herrera et al., 2003; Garcia-Frigola et al., 2008; Lee et al., 2008). La délétion d'EphB1 dans les cellules ipsilatérales entraine leur projection du côté controlatéral (Williams et al., 2003). Les axones controlatéraux n'expriment pas EphB1 et croisent donc la ligne médiane. Ils expriment la molécule d'adhésion Nr-CAM, qui pourrait être impliquée dans le croisement au chiasma optique des projections controlatérales. Les projections ipsilatérales n'expriment pas Nr-CAM et le blocage de cette molécule entraine une augmentation du nombre de CGRs qui projettent ipsilatéralement (Williams et al., 2006). Une autre molécule impliquée dans le croisement au chiasma optique est Islet-2 (Pak et al., 2004). Après le chiasma optique, les axones forment le tractus optique qui contient des axones provenant des deux yeux. Les axones controlatéraux atteignent et innervent le CGLd et le CS à partir de E16, tandis que les axones ipsilatéraux atteignent et innervent le CGLd et le CS seulement à partir de P0 (Godement et al., 1984).

3- Développement de la carte œil spécifique

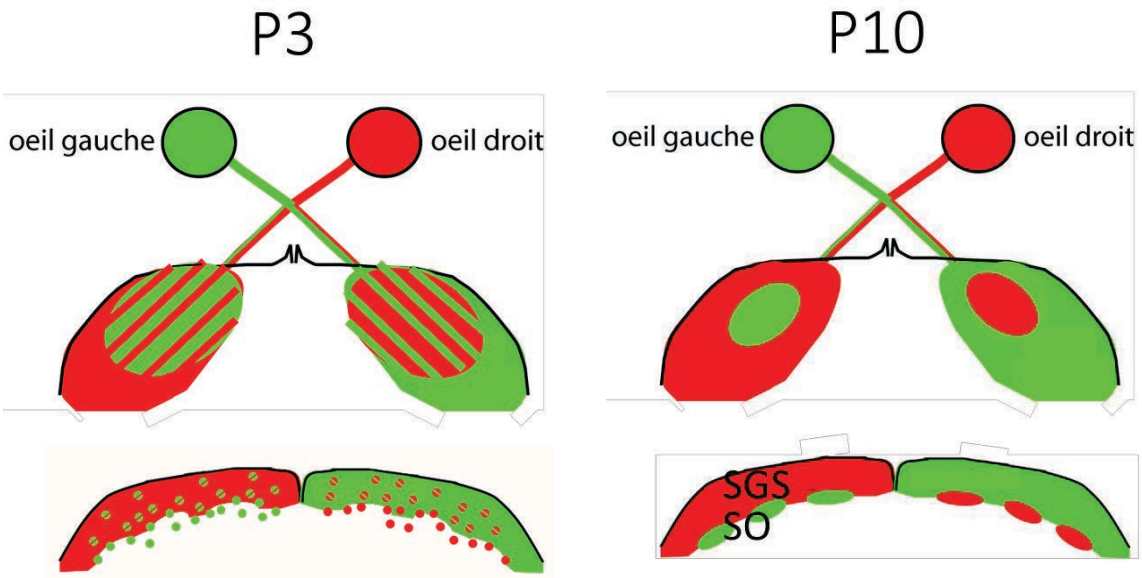


Figure 3 : Développement de la carte œil-spécifique (X. Nicol).

Ici, les cibles sont présentées en coupes coronales (CGLd en haut et CS en bas). A P3 (à gauche), les projections ipsilatérales et controlatérales se chevauchent. Dans le CGLd, la projection controlatérale occupe tout le CGLd et la projection ipsilatérale occupe toute la moitié dorsale du CGLd. Dans le CS, la projection ipsilatérale est présente de manière ectopique dans le SGS. Puis entre P3 et P10, ils se ségrègent pour former des domaines œil-spécifiques bien distincts à P10 (à droite). A P3, la projection ipsilatérale est diffuse puis elle s'organise en amas le long de l'axe médio-latéral dans le CS rostral.

A P3-4, les projections controlatérales occupent tout le CGLd y compris le territoire ipsilatéral ; les projections ipsilatérales et controlatérales sont ainsi entremêlées (Figure 3). Puis, au cours de la première semaine postnatale, les projections ipsilatérales et controlatérales ségrègent pour former deux territoires bien distincts à P10 (Figure 3). A cet âge, la projection controlatérale provenant du croissant VT de la rétine occupe un territoire très dorsal au niveau du CGLd tandis que la projection ipsilatérale occupe un territoire juste en-dessous un peu plus ventral (Figure 4). A P8, il a été montré par des enregistrements électrophysiologiques qu'une cellule thalamique donnée reçoit encore des afférences provenant des deux yeux tandis qu'à P19, une cellule thalamique donnée reçoit des afférences seulement d'un des deux yeux (Jaubert-Miazza et al., 2005). Ainsi à P19, la ségrégation oeil spécifique est complètement terminée. Cette ségrégation

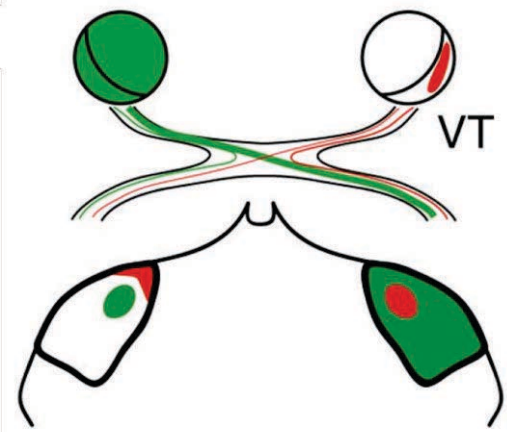


Figure 4 : Localisation des projections ipsilatérales et controlatérales provenant de la rétine ventro-temporale (VT) dans le CGLd (Rebsam et al, 2009).

implique une étape de sélection des synapses : maintien des synapses correctement positionnées et élimination des synapses mal positionnées.

Dans le CS, à P3-4, la projection controlatérale est superficielle dans le SGS et la projection ipsilatérale est non seulement localisée dans le SO mais aussi dans le SGS avant de se rétracter de ce territoire pour se localiser uniquement dans le SO (Godement et al., 1984; Wu et al., 2000) Figure 3). De plus, initialement la projection ipsilatérale est diffuse avant de s'organiser en amas le long de l'axe médio-latéral au niveau du CS rostral et en un amas restreint au CS médial au niveau du CS caudal (Figure 2). Le chevauchement des projections ipsilatérales et controlatérales au cours du développement dans le CS semble moins fort que celui observé dans le CGLd. Aucune donnée n'existe encore quant au fait de savoir si initialement, une cellule colliculaire reçoit des afférences des deux yeux avant de recevoir des afférences provenant seulement d'un des 2 yeux (Furman et al., 2013). Donc, l'implication d'une étape d'élimination de synapses au cours du processus de lamination dans le CS n'est pas tout à fait clair.

4- Développement de la carte rétinotopique et guidage axonal

Le développement de la carte rétinotopique chez la souris est étudiée surtout dans le CS où elle est organisée en 2 dimensions dans l'espace ; elle est moins étudiée dans le CGLd car elle y est organisée en 3 dimensions ce qui la rend plus difficile à analyser.
L'établissement de la rétinotopie a lieu en trois étapes : une étape de guidage axonal qui permet de positionner les projections rétiniennes à la bonne zone de terminaison (ZT) au sein des cibles, ensuite une étape de raffinement de la ZT et enfin une étape de raffinement fin des connexions rétinotopiques.

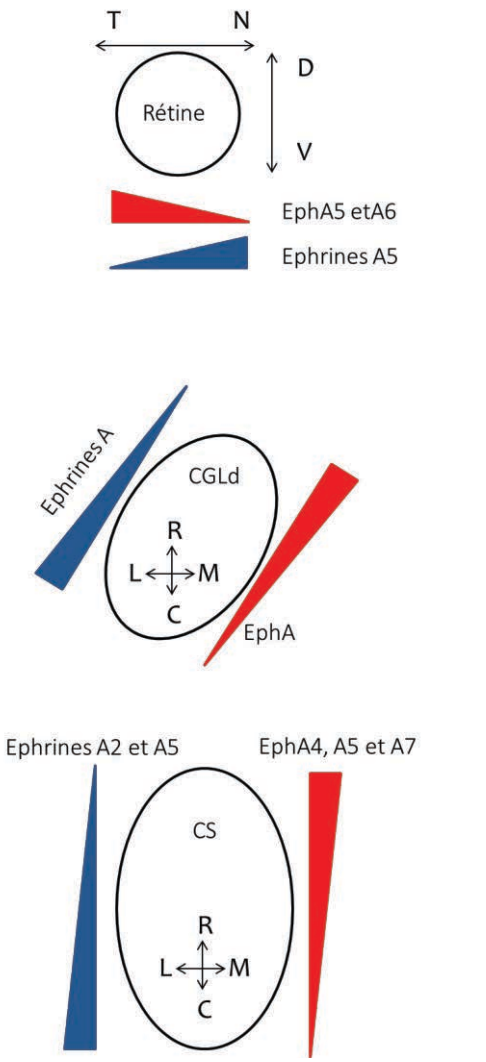


Figure 5 : Gradients d'éphrines A / Eph A dans la rétine et dans les cibles, corps genouillé latéral dorsal (CGLd) et colliculus supérieur (CS) ; d'après Pfeiffenberger et al, 2005 et Pfeiffenberger et al, 2006.

Le CGLd est représenté en coupe coronale et le CS est representé aplati en entier en vue dorsale.

T : temporal ; N : nasal ; V : ventral ; D : dorsal ; R : rostral ; C : caudal ; L : latéral ; M : médial.

a- Positionnement à la bonne ZT

Initialement, les projections rétiniennes sont éxubérantes au sein des cibles, elles se rétractent ensuite pour occuper leur zone de terminaison (ZT) finale en réponse à des molécules de guidage (Simon and O'Leary, 1992 ; Suetterlin et al., 2012; Triplett and Feldheim, 2012) ; Figure 6).

Des gradients d'éphrines A, molécules répulsives, et de leurs récepteurs tyrosine kinase EphA sont exprimés dans la rétine notamment au niveau des terminaisons axonales des CGRs ainsi que dans les cibles, CGLd et CS (Figure 5). Chez la souris, les éphrines A2 et A5 sont présentes en gradient rostro-caudal croissant dans le CS. Dans la rétine, trois récepteurs Eph-A sont exprimés : EphA4 est exprimé de manière uniforme, et EphA5 et A6 sont exprimés en gradient naso-temporal croissant (Feldheim et al., 1998). Comme les éphrines A se lient aux récepteurs EphA (Feldheim et al., 1998), cette distribution suggère que les axones des CGRs temporales riches en récepteurs EphA sont plus sensibles que les axones nasaux à l'effet répulsif du CS caudal exprimant fortement les éphrines A. Ainsi les axones temporaux sont exclus de la partie caudale du CS, contrairement aux axones nasaux. Les éphrines A2, A5 et A3 dans une moindre mesure sont également exprimées en

gradient dans le CGLd à l'arrivée des axones rétiniens (E16-P0) (Feldheim et al., 1998; Pfeiffenberger et al., 2005). La délétion des gènes codant pour les ephrines A2/A3/A5 ou pour les récepteurs EphA5 entraine des défauts de la carte rétinotopique avec présence de plusieurs ZT ectopiques dans les cibles au lieu d'une seule ZT correcte observée chez les contrôles (Frisen et al., 1998; Feldheim et al., 2000; Feldheim et al., 2004; Pfeiffenberger et al., 2006; Haustead et al., 2008) ; Tableau 2).

Ce modèle simple où les axones rétiniens expriment les Eph et les cellules du CS les éphrines, et où la reconnaissance récepteur-ligand induit la répulsion, a été complété par la suite. En effet, chez la souris, l'éphrine A5 est aussi exprimée dans la rétine et peut y jouer le rôle de récepteur (Figure 5, (Suetterlin et al., 2012; Triplett and Feldheim, 2012)) ; son expression suit un gradient croissant temporo-nasal. De plus, chez la souris, les EphA4, A5, et A7 sont aussi exprimés en gradient décroissant rostro-caudal dans le CS et peuvent y jouer le rôle de ligand (Figure 5, (Suetterlin et al., 2012; Triplett and Feldheim, 2012)). La délétion d'EphA7 chez la souris (exprimé en gradient dans le CS mais pas dans la rétine) entraine la formation d'arborisations ectopiques : les axones nasaux forment deux zones d'arborisation, une dans la partie caudale du CS et une autre dans la partie rostrale (Rashid et al., 2005). Ainsi, il existe une signalisation bi-directionnelle rétine-cible du couple éphrine-Eph, importante pour positionner les projections rétiniennes au niveau de leur ZT correcte selon l'axe rostro-caudal du CS, et pour établir la carte rétinotopique avec des CGRs voisines dans la rétine qui connectent des cellules cibles voisines.

Une autre subtilité de cette signalisation est qu'en fait, ce n'est pas le niveau absolu d'expression des récepteurs EphA, et donc le niveau d'activation de la signalisation de ces récepteurs, qui est crucial pour le positionnement des axones rétiniens dans leurs cibles. C'est le niveau relatif (comparé aux autres CGR) qui est important. La génération d'une souris transgénique exprimant EphA3 sous contrôle du promoteur de Islet2 (Isl2) a permis d'aboutir à cette conclusion (Brown et al., 2000). En effet, Isl2 est exprimé dans environ 50% des CGRs, et les CGRs l'exprimant sont réparties uniformément dans la rétine (sans préférence temporale ou nasale). Ainsi, en plus des EphA exprimés dans une rétine sauvage, ces souris knock-in (KI) expriment EphA3 dans la moitié des CGR, ce qui crée deux gradients d'expression des EphA dans la rétine : un gradient avec des niveaux bas d'EphA, constitué par les CGRs n'exprimant que les EphA sauvages, et un gradient avec des niveaux élevés d'EphA, constitué par les CGRs KI. Ces deux populations de CGRs

établissent des projections organisées en deux cartes dans le CS : une carte rostrale pour les axones des CGRs KI, et une carte caudale formée par les axones des CGR sauvages. Ainsi, des axones possédant beaucoup d'EphA sont capables d'arboriser dans une partie plus rostrale du CS comparé à leur zone d'arborisation chez les souris sauvages (axones nasaux de la carte rostrale, arborisant normalement dans la partie caudale du CS) ; et des axones exprimant les EphA à un niveau anormalement élevé sont capables d'arboriser à un niveau assez central du CS sur l'axe rostro-caudal (axones temporaux des CGR KI).
Concernant les mécanismes de transduction, suite à sa liaison à l'éphrine, le récepteur tyrosine kinase Eph initie des cascades de signalisation intra-cellulaire qui impliquent principalement deux familles de GTPases : Rho et Ras. La famille Rho a des effets sur le cytosquelette d'actine et Ras est importante pour la régulation de l'adhésion via les intégrines.

Les éphrines B et leurs récepteurs Eph B ainsi que la signalisation Wnt/ryk sont importants pour établir la topographie des projections rétiniennes selon l'axe médio-latéral du CS. Ces molécules sont aussi exprimées en gradients dans la rétine et dans le CS. La perturbation de l'expression de ces molécules entraine des défauts de topographie avec présence de ZT ectopiques latérales par rapport à la ZT correcte (Hindges et al., 2002; Schmitt et al., 2006).

D'autres molécules sont importantes pour l'établissement de la topographie telles que les téneurines qui sont des protéines trans-membranaires exprimées en gradients dans la rétine et dans les cibles. Ten-m3 est par exemple spécifiquement impliquée dans la topographie de la projection ipsilatérale dans le CGLd et dans le CS (Leamey et al., 2007; Dharmaratne et al., 2012).

b- Raffinement de la ZT

La ZT établie initialement est large puis elle se raffine pour devenir plus petite, plus focale et plus précise (McLaughlin et al., 2003) ; Figure 6). Cette étape de raffinement est dépendante de l'activité et indépendante des molécules de guidage. En effet, la délétion des molécules de guidage entraine certes la présence de plusieurs ZT ectopiques mais

ces ZT sont focales, leur étendue est normale (Feldheim et al., 2004; Pfeiffenberger et al., 2006) ; Tableau 2). De même, les molécules de guidage telles que les éphrines/Eph ne sont pas nécessaires à la ségrégation oeil spécifique. En effet, leur délétion entraine certes un défaut de position des domaines œil spécifique avec une projection ipsilatérale fragmentée en plusieurs amas au sein du CGLd mais ces amas de projections ipsilatérales sont ségrégés des projections controlatérales (Pfeiffenberger et al., 2005) ; Tableau 2).

c- Raffinement fin des connexions rétinotopiques

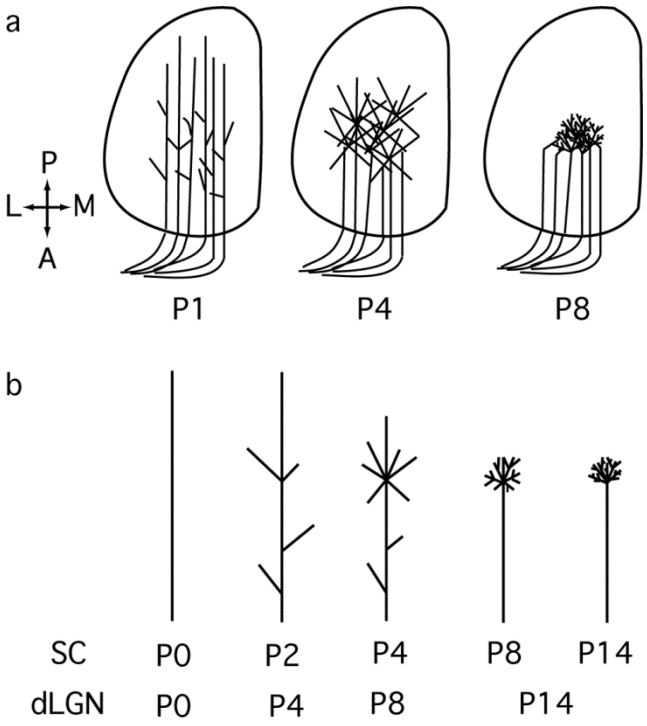


Figure 6 : a. Développement de la carte rétinotopique dans le CS ; d'après (McLaughlin et al., 2003). B. Développement d'une projection rétinienne dans le CS et dans le CGLd ; d'après Dhande et al, 2011. De P0 à P2, les projections sont exubérantes en caudal puis elles se rétractent pour occuper leur zone de terminaison (ZT). De P2 à P4, elles commencent à établir une arborisation à la bonne ZT mais elles présentent aussi des branches ectopiques le long de l'axone. De P4 à P8-14, elles éliminent les branches ectopiques et les arborisations terminales deviennent plus complexes et plus focales.

Le CS est représenté aplati en entier, en vue dorsale.

Un raffinement de la rétinotopie à une échelle très fine a lieu à la fin de la deuxième semaine postnatale, révélé par des enregistrements électrophysiologiques : à P8-10, une cellule thalamique donnée reçoit des afférences faibles provenant de plus de 20 CGRs différentes, tandis qu'à P18, une cellule thalamique donnée reçoit des afférences fortes provenant de seulement 1 à 3 CGRs différentes (Chen and Regehr, 2000; Jaubert-Miazza et al., 2005).

d- Développement d'une projection rétinienne à l'échelle individuelle

Il est possible de marquer une CGR unique par électroporation post-natale et d'étudier ainsi le développement d'une projection

rétinienne unique au sein des cibles. De cette manière, la projection rétinienne controlatérale provenant de la rétine VT à l'échelle individuelle dans le CGLd et le CS a pu être décrite (Dhande et al., 2011); Figure 6). Initialement, l'axone d'une CGR dépasse sa ZT puis se rétracte. De plus, la projection commence à brancher au niveau de sa bonne ZT mais présente aussi des branches ectopiques le long de l'axone qui sont éliminées entre P4 et P8. Puis, de P4 à P15, l'arborisation terminale de la projection devient plus complexe (augmentation du nombre de branches), plus dense et plus restreinte. La maturation de l'arborisation dans le CS a lieu plus tôt dans le CS que dans le CGLd, ce qui suggère que la maturation de l'arborisation dépend de la cible.

II- Rôle de l'actvité spontanée rétinienne dans le développement des projections rétiniennes

A- Vagues d'activité spontanée et corrélée dans la rétine au cours du développement des projections rétiniennes

Avant l'ouverture des yeux chez la souris et avant le début de l'activité rétinienne évoquée par la lumière, la rétine présente une activité spontanée. Cette activité spontanée a été révélée pour la première fois *in vivo* par des enregistrements électrophysiologiques de potentiels d'action dans les CGRs d'embryons de rats (Galli and Maffei, 1988). Par la suite, des expériences *in vitro* ont montré qu'il existait des sites d'initiation aléatoires d'activité spontanée à différents endroits de la rétine suivis de la propagation de cette activité spontanée aux cellules rétiniennes voisines, créant ainsi ce qui a été appelé des « vagues d'activité spontanée ». Les caractéristiques temporelles et spatiales de cette activité spontanée sous forme de vagues a été étudiée en détail *in vitro* par des techniques telles que l'imagerie calcique ou l'électrophysiologie au moyen de puces d'enregistrement à multi-électrodes (Meister et al., 1991; Wong et al., 1995). Chez la souris, des vagues d'activité sont initiées toutes les 25 secondes, s'étendent sur une aire supérieure à $1mm^2$ dans la rétine et sont suivies d'une période réfractaire de 25 à 35 secondes pour les CGRs (Bansal et al., 2000).

Une conséquence de cette propagation des vagues est que l'activité spontanée des CGRs voisines est corrélée : des groupes de CGRs voisines touchées par la même vague présentent le même profil temporel de décharge (Meister et al., 1991; Wong et al., 1993; Wong et al., 1995; Feller et al., 1996).

Chez la souris, il existe 3 différents types de vagues d'activité spontanée (Torborg and Feller, 2005) Figure 7) :

- des vagues I d'activité spontanée médiées par des jonctions communicantes intercellulaires (gap jonctions) qui ont lieu avant la naissance.
- des vagues II d'activité spontanée cholinergiques qui ont lieu pendant les 2 premières semaines postnatales. Ces vagues sont initiées par une sous-population de cellules amacrines, les cellules amacrines étoilées ou « starburst amacrine cells », qui déchargent spontanément, libèrent de l'acétyl-choline (ACh) et dépolarisent les cellules amacrines voisines et les CGRs voisines qui expriment des récepteurs à l'ACh.
- des vagues III d'activité spontanée glutamatergiques qui ont lieu pendant la deuxième semaine post-natale de P10 à P15 environ. Ces vagues sont initiées par les cellules

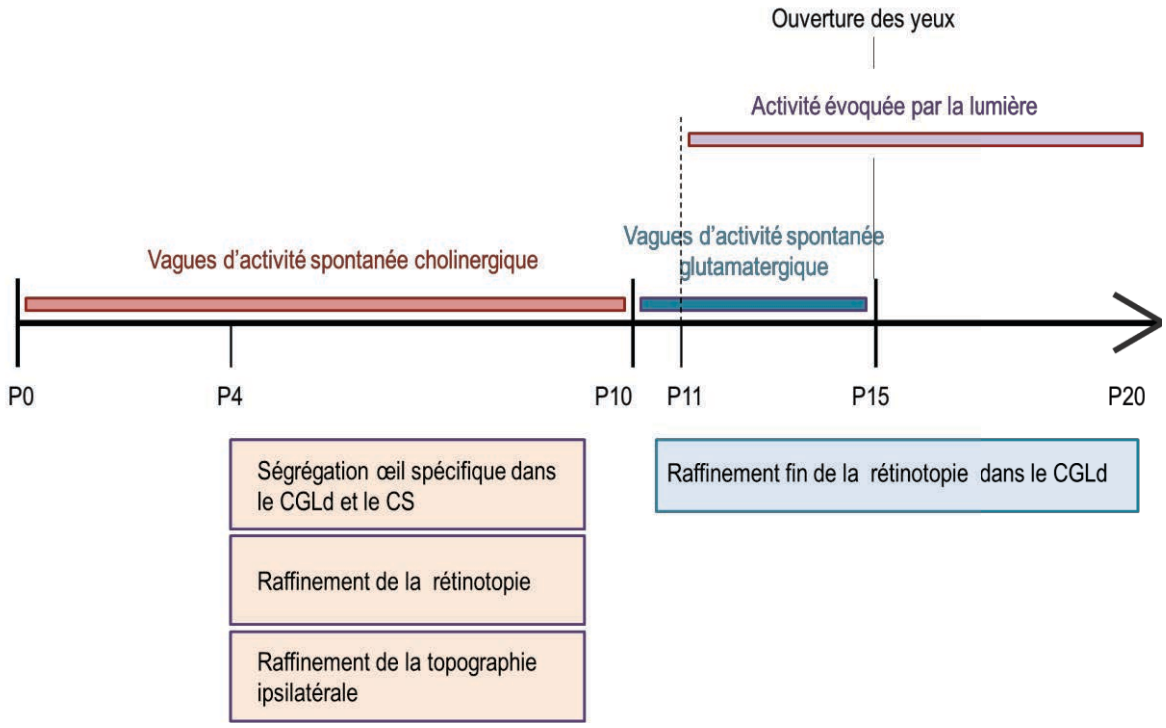


Figure 7 : Différentes phases de l'activité rétinienne et différentes étapes du raffinement des projections rétiniennes au cours du temps.

bipolaires qui libèrent du glutamate et dépolarisent les CGRs voisines qu'elles connectent.

L'ouverture des yeux chez la souris se fait autour de P15, mais le début de l'activité évoquée a lieu plus tôt autour de P11 quand les photorécepteurs deviennent fonctionnellement connectés au circuit rétinien.

Les vagues d'activité spontanée électrique de la rétine entrainent des vagues d'AMPc et de protéine kinase A (PKA) activée (Dunn et al., 2006). Inversement, l'AMPc et le calcium peuvent moduler les vagues d'activité spontanée (Meister et al., 1991; Stellwagen et al., 1999).

Une autre caractéristique importante des vagues d'activité spontanée est à noter : l'activité spontanée des CGRs est transmise à leurs cibles dans le cerveau CGLd et CS. Il a été montré *in vitro* sur des tranches de CGLd contenant le tractus optique que dès P3-4, la stimulation du tractus optique entraine une réponse dans les cellules du thalamus (Mooney et al., 1996) et du CS (Shah and Crair, 2008) démontrant l'existence de synapses glutamatergiques immatures mais fonctionnelles. De plus, il a été montré *in vivo* par des indicateurs calciques que les vagues étaient transmises au CS (Ackman et al., 2012).

Le fait que les vagues rétiniennes II et III ont lieu pendant le raffinement des projections rétiniennes (Figure 7) et que des synapses fonctionnelles soient présentes très tôt juste avant le début du raffinement des projections rétiniennes au sein de leurs cibles ont suggéré un rôle de l'activité rétinienne et de la transmission synaptique rétine-cibles dans la formation des cartes visuelles.

De nombreuses études ont ainsi été réalisées afin d'explorer le rôle de l'activité spontanée dans l'établissement des cartes visuelles (Huberman et al., 2008; Ackman and Crair, 2014).

B- Rôle de l'activité dans l'établissement des connexions rétine-cibles CS et CGLd

1- Rôle de l'activité rétinienne dans la formation de la carte œil spécifique

Les premières expériences réalisées afin d'étudier le rôle de l'activité ont été de bloquer l'activité au moyen de la tétrodotoxine (TTX), qui bloque les canaux sodiques voltage-dépendants, empêchant ainsi la formation de potentiels d'action. Le blocage de l'activité par infusion de TTX au niveau du chiasma optique chez le chat entraine des défauts de ségrégation œil spécifique dans le CGLd (Shatz and Stryker, 1988; Sretavan et al., 1988). En revanche, l'infusion de TTX en intraoculaire chez le furet retarde mais ne perturbe pas à terme la ségrégation œil spécifique (Cook et al., 1999). De plus, des injections de TTX en intraoculaire chez le hamster et chez le rat n'induisent pas de défauts de ségrégation oeil spécifique dans le CS : la projection ipsilatérale est plutôt bien restreinte dans le SO (Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989). Ces résultats contradictoires ne permettent donc pas de conclure quant au rôle de l'activité. Cependant, les injections de TTX entrainent une certaine toxicité, ce qui rend les résultats parfois difficiles à interpréter.

Ainsi, d'autres modèles plus ciblés ont été développés afin d'étudier le rôle de l'activité dans le développement des projections rétiniennes. Dans ces modèles, l'activité des CGRs est perturbée suite à la perturbation des vagues rétiniennes spontanées cholinergiques. Cette perturbation a été réalisée de deux manières : par délétion génétique de la sous-unité beta2 du récepteur à l'ACh (modèle beta2 knock-out (KO)) ou par injection intraoculaire d'épibatidine, une drogue capable de bloquer les récepteurs à l'ACh. Ces modèles ne bloquent pas complètement l'activité des CGRs. Chez les beta2KO, un certain pourcentage des CGRs sont inactives et celles qui sont encore actives présentent des vagues d'activité spontanée mais ces vagues sont fortement perturbées (Bansal et al., 2000; Singer et al., 2001; McLaughlin et al., 2003; Sun et al., 2008). Les rétines traitées par l'épibatidine ont 50% de CGRs inactives et 50% de CGRs actives cependant leur activité est augmentée et non corrélée (Cang et al., 2005; Sun et al., 2008).

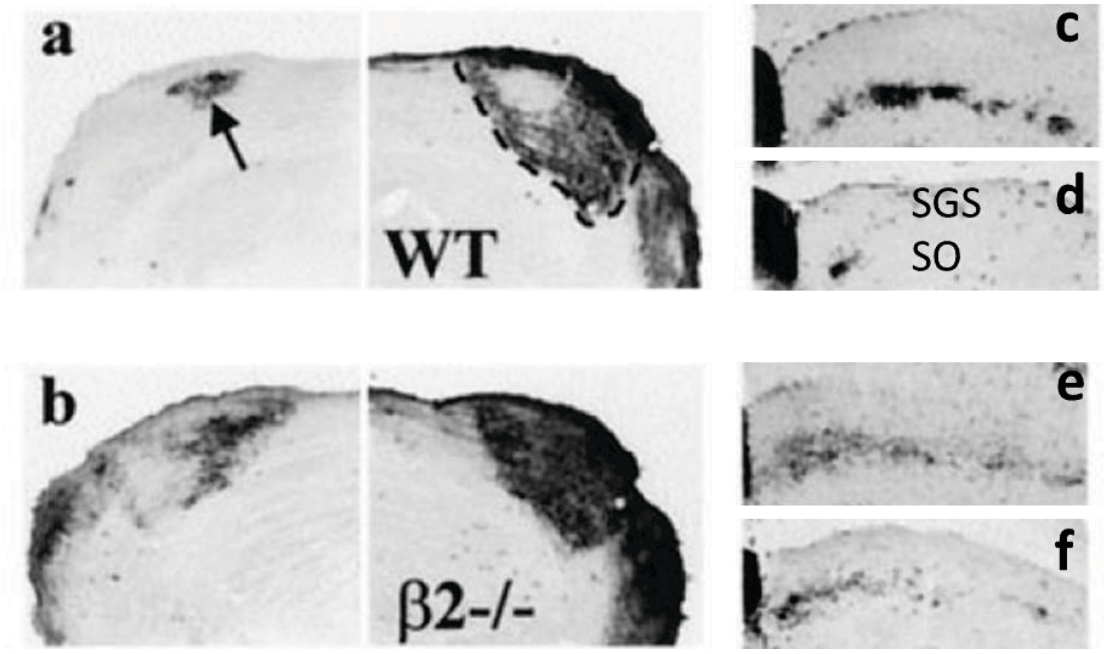


Figure 8 : Défauts de la carte œil spécifique chez une souris beta2 KO (Rossi et al., 2001).

a. Chez le contrôle dans le CGLd, les projections ipsilatérales et controlatérales sont ségrégées. C et d. Chez le contrôle dans le CS, la projection ipsilatérale est localisée dans le SO et organisée en amas tout le long de l'axe médio-latéral en rostral (c) et restreinte au CS médial en caudal (d).

b. Chez la souris beta2KO, les projections ipsilatérales et controlatérales se chevauchent : la projection controlatérale occupe tout le CGLd y compris le territoire ipsilatéral et des projections ipsilatérales ectopiques sont présentes dans le territoire controlatéral. E et f. Chez la souris beta2 KO, la projection ipsilatérale n'est pas organisée en amas, elle est diffuse et elle est localisée dans le SO mais aussi dans le SGS profond. De plus, la projection ipsilatérale est présente de manière ectopique en caudal le long de l'axe médio-latéral (f).

Les souris beta2KO ainsi que les souris et furets traités par épibatidine présentent des défauts de ségrégation oeil spécifique (Penn et al., 1998; Rossi et al., 2001; Xu et al., 2011) Tableau 2) : les projections controlatérales occupent tout le CGLd, y compris le territoire ipsilatéral et des projections ipsilatérales ectopiques sont présentes dans le territoire controlatéral (Figure 8). Ainsi, les projections ipsilatérales et controlatérales sont entremêlées et l'aire occupée par la projection ipsilatérale dans le CGLd est plus importante que chez les contrôles. Dans le CS des souris beta2KO, des projections ipsilatérales ectopiques sont présentes dans le SGS, territoire controlatéral (Xu et al., 2011). De plus, les projections ipsilatérales présentent un défaut de topographie : elles

sont diffuses, non organisées en amas et exubérantes en caudal le long de l'axe médio-latéral dans le CS (Figure 8).
Ces défauts de ségrégation sont toutefois rectifiés plus tard dans le CGLd comme dans le CS (Tableau 2). Concernant le CGLd, les souris adultes beta2KO et les furets adultes traités par épibatidine ont des projections ipsilatérales et controlatérales ségrégées (Rossi et al., 2001; Huberman et al., 2002; Muir-Robinson et al., 2002; Xu et al., 2011). De plus, dans ces modèles, des enregistrements électrophysiologiques ont montré qu'une cellule thalamique reçoit des afférences provenant d'un seul œil comme c'est le cas chez la souris et furet contrôles adultes (Huberman et al., 2002; Grubb et al., 2003). Concernant la rectification du phénotype dans le CS, chez des souris beta2KO adultes, les projections ipsilatérales sont plutôt restreintes au SO même si certaines fibres sont encore présentes dans le SGS (Figure 8), cependant l'organisation en amas de la projection ipsilatérale n'est pas rectifiée. Cette rectification de la ségrégation œil spécifique dans le CGLd et le CS est probablement dûe aux vagues d'activité glutamatergiques III, qui semblent normales chez les beta2KO (McLaughlin et al., 2003).

En revanche, malgré un sauvetage de la ségrégation œil spécifique des projections chez les souris beta2KO adultes, il faut noter que la position et l'extension du territoire ipsilatéral et du territoire controlatéral restent fortement perturbées : au lieu de former un amas restreint plutôt au centre du CGLd, la projection ipsilatérale forme plusieurs amas y compris dans le territoire controlatéral (Muir-Robinson et al., 2002) ; Tableau 2) ; de même des groupes de projections controlatérales sont présents dans le territoire normalement exclusivement ipsilatéral. A P15, il a été montré qu'à échelle individuelle les projections controlatérales provenant de la rétine VT sont normalement raffinées : elles ne présentent pas de branches ectopiques le long de l'axone, ne sont pas plus larges que les contrôles et présentent une complexité et densité similaires aux contrôles (Dhande et al., 2011). Ce résultat suggère que le défaut de carte observé dans le CGLd n'est pas dû à un défaut de raffinement de la projection à proprement dit mais plutôt à un défaut de positionnement de la projection à la bonne ZT.

La perturbation de l'activité pendant la seconde semaine postnatale notamment la perturbation des vagues glutamatergiques III entraine une déségrégation des projections ipsilatérales et controlatérales dans le CGLd ou dans le CS (Chapman, 2000;

Demas et al., 2006; Blankenship et al., 2011; Zhang et al., 2011). Dans ces études, seule la projection ipsilatérale est vraiment plastique et envahit le territoire controlatéral par une croissance *de novo* tandis que les projections controlatérales ne sont pas ou très peu affectées par une perturbation de l'activité après la seconde semaine postnatale. Ces observations suggèrent que la projection ipsilatérale serait plastique plus longtemps que la projection controlatérale.

Ces données dans leur ensemble démontrent l'importance de l'activité dans les CGRs pour le développement de la carte œil spécifique, ségrégation œil spécifique et positionnement du territoire ipsilatéral et controlatéral, selon des périodes critiques spécifiques pour chacun de ces deux processus.

Des expériences d'énucléation ont suggéré l'idée d'une compétition activité-dépendante entre les projections provenant des deux yeux pour occuper un territoire particulier dans le CGLd. Chez différentes espèces (souris, rats, hamsters), le retrait d'un œil entraine une très large expansion dans les cibles des projections de l'œil intact (Godement et al., 1980; Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989). Cette idée de compétition activité-dépendante a vraiment été explorée par des expériences chez le furet, où l'activité a été perturbée seulement dans un œil (Tableau 2) : la réduction de l'activité dans un seul œil par injection mono-oculaire d'épibatidine (Wong et al., 1995; Penn et al., 1998) ou l'augmentation de l'activité dans un seul œil par injection d'agoniste AMPc (Stellwagen and Shatz, 2002) entrainent une large expansion dans le CGLd des projections provenant de l'œil le plus actif.

2- Rôle de l'activité dans l'établissement de la rétinotopie

Au cours du développement, suite à la phase de guidage axonal dépendant des ephrines/Eph qui permet de positionner globalement les projections à la ZT correcte, l'activité vient raffiner les ZT qui deviennent de plus en plus focales (Figure 6).

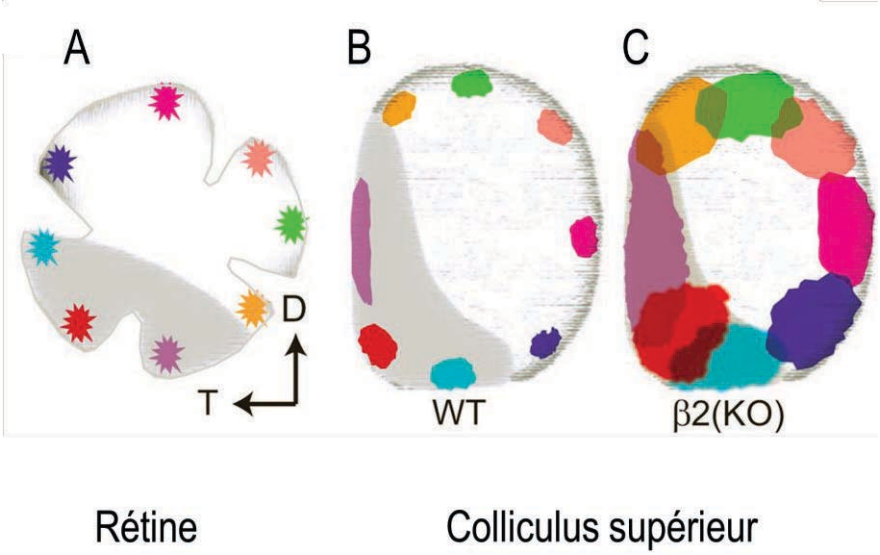


Figure 9 : Défauts de raffinement de la rétinotopie chez la souris beta2 KO dans le CS (Xu et al., 2011). Les projections rétiniennes provenant de CGRs voisines dans la rétine (A) occupent une zone de terminaison plus large chez la souris beta2 KO (C) que chez la souris contrôle (B).

a- Positionnement des projections rétiniennes à la bonne zone de terminaison

L'activité rétinienne permet de moduler la réponse des axones aux éphrines A. En effet, *in vitro* en présence de TTX, les axones ne se rétractent pas en réponse à l'éphrine A5. De plus, en co-culture rétine-CS en présence de TTX, les axones provenant de la rétine temporale ne se rétractent pas du CS postérieur créant un défaut de topographie (Nicol et al., 2007). Toutefois, les données *in vivo* ne semblent pas impliquer l'activité rétinienne au cours de la phase de guidage axonal : l'injection mono-oculaire de TTX chez le rat (O'Leary et al., 1986) ou l'expression de canaux potassiques Kir2.1 dans la rétine chez la souris (blocage de l'activité par hyperpolarisation du neurone (Benjumeda et al., 2013) n'entrainent pas de défauts de topographie globale dans le CS : les projections sont globalement à la bonne ZT, suggérant que les axones « éteints » se sont

tout de même rétractés pour se positionner correctement le long de l'axe rostro-caudal. De plus, la perturbation de l'activité rétinienne cholinergique dans les souris beta2KO ou dans les souris traitées par épibatidine présentent des projections voisines à la bonne ZT. Ainsi, le rôle de l'activité dans la modulation de la réponse aux éphrines pourrait avoir lieu *in vivo* à une autre étape que celle de la rétraction des axones pendant la phase de guidage. D'ailleurs, les éphrines sont impliquées dans de nombreuses autres fonctions que le guidage axonal, telles que la synaptogénèse et la plasticité synaptique (Hruska and Dalva, 2012).

b- Raffinement de la rétinotopie

Les souris beta2KO et les souris traitées par épibatidine présentent un défaut de raffinement de la rétinotopie dans le CGLd et dans le CS : les projections voisines occupent une ZT plus large que la normale (Figure 9) et des enregistrements électrophysiologiques montrent que les champs récepteurs sont aussi plus larges que la normale (Grubb et al., 2003; McLaughlin et al., 2003; Chandrasekaran et al., 2005; Xu et al., 2011). Concernant la projection controlatérale provenant de la rétine VT, ce défaut de raffinement peut être expliqué à l'échelle de projection unique à P8-9, par la présence de branches ectopiques le long des axones et d'arborisations terminales plus larges (Dhande et al., 2012); Figure 6). Une rectification partielle de ce défaut de raffinement dans le CS de la souris beta2KO entre P7 et P14 a été observée par injection de DiI (Chandrasekaran et al., 2005; Dhande et al., 2012) ; elle est probablement dûe à un retour à la normale de l'activité chez les beta2KO lors des vagues rétiniennes glutamatergiques. Le fait que la rectification soit seulement partielle suggère que certains mécanismes importants pour le raffinement de la rétinotopie ont une période critique pendant la première semaine postnatale chez la souris.

De façon surprenante, il a été montré qu'à P15 dans le CGLd de la souris beta2KO, les projections controlatérales provenant de la rétine VT sont normalement raffinées : elles ne présentent pas de branches ectopiques le long de l'axone, ne sont pas plus larges que les contrôles et présentent une complexité et densité similaires aux contrôles (Dhande et al., 2011). Ce résultat suggère que le défaut de raffinement de la taille de la ZT observée chez le beta2KO dans le CGLd (Xu et al., 2011) est dû à un défaut de

positionnement des arborisations terminales plutôt qu'à un défaut de raffinement de la projection à proprement dit. Ainsi, le défaut de carte oeil-spécifique chez les beta2KO (avec maintien d'arborisations ipsilatérales dans le territoire controlatéral et maintien d'arborisations controlatérales dans le territoire ipsilatéral) pourait avoir un impact sur le raffinement de la rétinotopie.

Cette idée est confortée par l'analyse de la rétinotopie dans un modèle beta2KO où la sous-unité beta2 du récepteur à l'ACh a été réinsérée dans les CGRs (modèle beta2TG ; (Xu et al., 2011). Cette réexpression entraine une activité normale dans les CGRs à l'exception du fait que les vagues d'activité corrélée au sein de CGRs voisines sont plus petites. Dans ce modèle, la ségrégation œil spécifique n'est pas sauvée ; la rétinotopie quant à elle, est sauvée comparée aux beta2KO sauf dans la zone initialement innervée de manière binoculaire. L'énucléation dans ce modèle betaTG permet de sauver la rétinotopie même dans la zone de projection initialement binoculaire ce qui suggère que des défauts de ségrégation interfèrent avec le raffinement rétinotopique.

c- Raffinement fin de la rétinotopie

Le raffinement fin de la rétinotopie est dépendant de l'activité rétinienne (Tableau 2). En effet, le blocage de l'activité rétinienne par injection intraoculaire de TTX de P11 à P14 empêche le raffinement fin d'avoir lieu : à P15-16, un neurone cible dans le CGLd reçoit des afférences de nombreuses CGRs comme chez le contrôle immature à P8-P10 ((Hooks and Chen, 2006). De plus, dans le CS des souris beta2KO à P6-P7, un neurone cible reçoit des afférences de 8 ou 9 CGRs différentes (Chandrasekaran et al., 2007) alors que dans le CS contrôle à P6-P7, un neurone cible reçoit des afférences d'environ 5 CGRs différentes (Chandrasekaran et al., 2007). Cette multi-innervation dans le CS chez la souris beta2KO est toutefois rectifiée à P21-25.

Ce raffinement fin de la rétinotopie coincide avec le début de l'activité visuelle évoquée (Demas et al., 2003) et avec la maturation des synapses cortico-thalamiques et cortico-colliculaires et des synapses inhibitrices dans le CGLd. La modulation de l'activité rétinienne par le GABA et la compétition éventuelle des projections rétiniennes avec les projections cortico-thalamiques et cortico-colliculaires pourraient participer au raffinement fin des connexions rétino-thalamiques et colliculaires.

C- Mécanismes en aval de l'activité rétinienne

Il est maintenant admis que l'activité est importante pour le développement des cartes visuelles. L'étape suivante a été de découvrir par quels mécanismes l'activité sous-tendait le raffinement des projections rétiniennes. L'activité peut jouer un rôle à de nombreux niveaux. D'une part, elle peut entrainer la transcription de gènes dans le noyau pour synthétiser des protéines effectrices ou elle peut agir directement sur des voies de signalisation sensibles au calcium. Dautre part, elle peut agir via la libération synaptique calcium-dépendante de neurotransmetteurs ou de neurotrophines et avoir un impact sur d'autres cellules qui en retour peuvent envoyer des signaux de façon rétrograde sur la cellule présynaptique. L'étude de ce dernier effet de l'activité dans le développement du système visuel est pertinent car il y a des synapses fonctionnelles rétino-géniculées et rétino-colliculaires dès P3-4 juste au début du processus de raffinement de la carte œil-spécifique et de la carte rétinotopique (Mooney et al., 1996; Shah and Crair, 2008).
La perturbation spécifique de chacune de ces voies permet de décortiquer les différents effets de l'activité et de savoir quel aspect de l'activité est impliqué dans quelle étape du développement des projections rétiniennes.

Dans le système visuel, deux mécanismes potentiels, permettant de transduire l'activité électrique en signaux chimiques ont été identifiés : la libération synaptique et l'activité de l'enzyme adénylate cyclase 1 (AC1) régulée par le calcium et la dépolarisation.

Après un bref rappel sur la libération synaptique, nous détaillerons ce qui est connu à propos du rôle de la libération synaptique rétino-géniculée et rétino-colliculaire dans le raffinement des projections rétiniennes. Le rôle de l'AC1 sera abordé dans la partie III.

1- Rappel sur la libération synaptique

La libération synaptique est médiée par l'exocytose de vésicules synaptiques au niveau des terminaisons nerveuses dans une zone appelée la zone active présynaptique.

L'exocytose synaptique implique trois protéines transmembranaires, appartenant à la famille des protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) : la synaptobrévine est exprimée à la membrane des vésicules synaptiques tandis que la syntaxine-1 et la protéine SNAP-25 sont exprimées à la membrane cellulaire. L'interaction de ces trois protéines entre elles forme le complexe SNARE, crucial pour la fusion des vésicules à la membrane cellulaire et donc à la libération synaptique. Les synaptotagmines 1 et 2 sont aussi des protéines essentielles à l'exocytose synaptique : elles constituent les protéines sensibles au calcium qui se lie à leur domaine C2. Elles se lient aux protéines SNARE de façon calcium-dépendante et calcium-indépendante (Sudhof, 2004).

Les vésicules synaptiques suivent un cycle de différents évènements (Sudhof, 2004) : l'incorporation des neurotransmetteurs dans les vésicules de façon active, le « docking », le « priming », la fusion entre la membrane vésiculaire et la membrane cellulaire suite à l'entrée de calcium et l'endocytose des vésicules qui permet leur recyclage afin de recommencer un nouveau cycle (Figure 10). Le « docking » des vésicules correspond à la mise à proximité des vésicules synaptiques de la membrane plasmique. A ce stade, les protéines SNARE n'interagissent pas encore ensemble. Le « priming » des vésicules correspond à l'assemblage des protéines SNARE vésiculaires avec les protéines SNARE membranaires rendu possible par le « docking ». L'entrée de calcium suite à un potentiel d'action entraine la liaison du calcium aux domaines C2 de la synaptotagmine qui provoque son insertion partielle dans les phospholipides de la membrane cellulaire. Il est suggéré que cette insertion déstabilise les structures et induit ainsi la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane cellulaire (Sudhof, 2004).

D'autres protéines que les protéines SNARE sont requises à la fusion synaptique, telle que la protéine de fusion Munc-18 (Verhage et al., 2000), qui interagit avec la syntaxine et régule ainsi sa fonction (Dulubova et al., 1999).

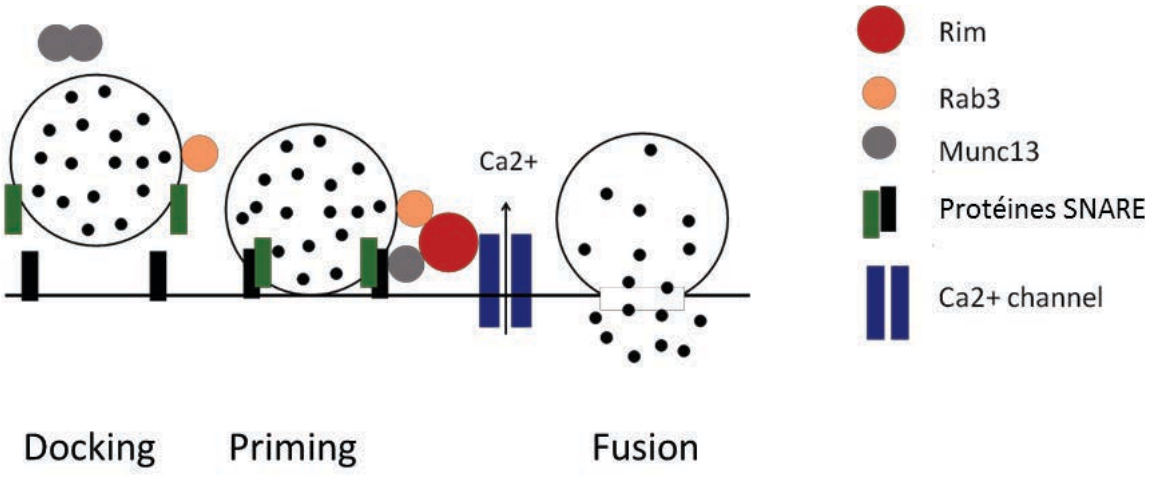


Figure 10 : Différentes étapes de la libération synaptique calcium-dépendante et rôle des protéines Rim dans la libération synaptique calcium-dépendante.

Le docking est l'étape où la vésicule est placée à proximité de la membran plasmique. Le priming est l'étape où le complexe SNARE se forme par intéraction de protéines de la membrane de la vésicule et de celle de la membrane plasmique. La fusion de la vésicule avec la membrane est induite par l'entrée de calcium dans la cellule suite à l'arrivée d'un potentiel d'action.

L'homodimérisation rend la protéine Munc13 inactive, l'intéraction de la protéine Rim avec un monomère Munc13 lève cette inactivation et lui permet de jouer son rôle dans le processus de priming. Les protéines Rim α intéragissent aussi avec les canaux calciques voltage-dépendants pour les maintenir à proximité des vésicules synaptiques et ainsi rendre efficace la libération synaptique.

Par ailleurs, les protéines Rab3, RIM (Rab3 interacting molecules) et Munc-13 forment un complexe trimérique crucial au processus d'exocytose synaptique (Dulubova et al., 1999) ; Figure 10). Les protéines Rab3 sont des protéines de liaison à la GTP qui régulent le transport intracellulaire. Ces protéines Rab3 sont associées à la membrane des vésicules synaptiques et s'en dissocient au moment de l'exocytose. Les protéines RIM sont des protéines d'échaffaudage centrales au sein de la zone active présynaptqiue. Il en existe 7 isoformes codées par 4 gènes (RIM 1 à 4) : 2 Rim α (Rim 1α et 2α), 2 Rim β (Rim 1β et 2β) et 3 Rim γ (Rim 2γ, 3γ et 4γ ; (Wang et al., 1997; Wang and Sudhof, 2003; Kaeser et al., 2008). Les protéines Rim ont différents domaines (Figure 11) : un domaine

Zinc finger, un site de phosphorylation par la PKA, un domaine PDZ, deux domaines C2, un domaine riche en proline (Wang et al., 2000). Les formes α sont les formes longues qui contiennent tous ces domaines ; la forme 1 β ne contient pas le domaine de liaison à Rab3 et la forme 2 β ne contient pas le domaine Zinc finger ; les formes γ sont les formes courtes : elles ne contiennent que le domaine C2. Les domaines Zinc finger, PDZ et riches en proline permettent aux formes longues de Rim d'interagir avec d'autres protéines : avec Munc-13 et Rab3, avec les canaux calciques voltage-dépendants, enfin avec d'autres Rim-BP (Rim binding proteins ; (Wang et al., 2000; Betz et al., 2001) ; Figure 11).

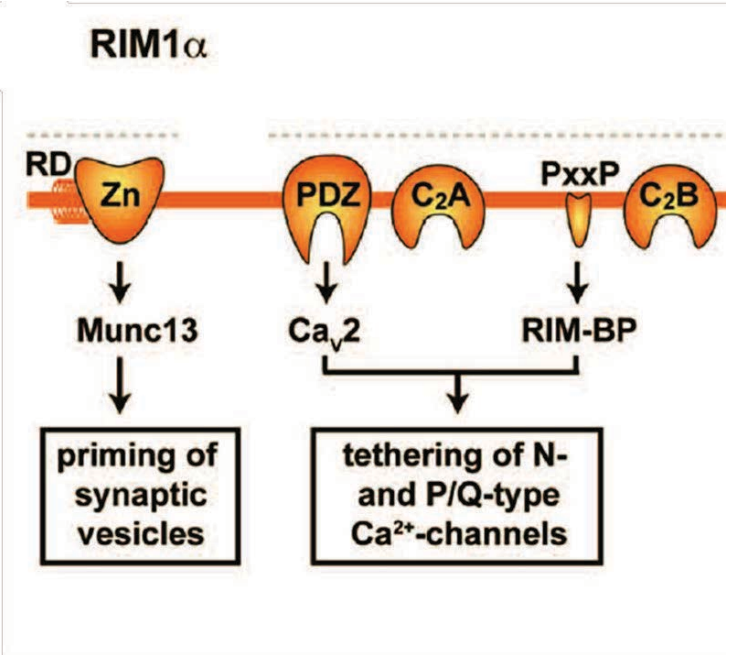


Figure 11 : Structure de Rim 1 α (Kaeser et al., 2011).

Rim 1 α est composée d'un domaine Zinc finger (Zn) qui interagit avec Munc13, un domaine PDZ qui interagit avec les canaux calciques (Cav2), un domaine riche en proline qui interagit avec des Rim-BP, deux domaines C2.

Les protéines Rim sont exprimées de façon ubiquitaire dans le cerveau (Schoch et al., 2006). La délétion des formes longues de Rim induit des défauts importants de la libération synaptique dépendante du calcium. Chez c-elegans, la délétion de la seule forme de Rim (UNC-10) exprimée, entraine une réduction de l'activité synaptique évoquée et une réduction de la fréquence des mEPSC (Koushika et al., 2001). Chez la souris, la délétion de Rim 1α et 2α est léthale en raison d'un défaut de respiration (Schoch et al., 2006). Le rôle de Rim 1α et 2α a été étudié dans les neurons de l'hippocampe (Mittelstaedt et al., 2010), à la jonction neuro-musculaire et dans le système somato-sensoriel. A la jonction neuro-musculaire, suite à la délétion des formes Rim α, l'amplitude de la libération évoquée est fortement réduite et le taux d'échecs en

réponse à un stimulus est augmenté (Schoch et al., 2006). De même, à la synapse thalamo-corticale, suite à la délétion des gènes Rim 1 et 2, l'efficacité de la transmission synaptique est réduite et le taux d'échecs en réponse à un stimulus est plus élevé que la normale (Narboux-Neme et al., 2012).

Ces effets des formes longues de Rim sont dûs à leur implication dans 2 fonctions essentielles au bon fonctionnement de la zone active (Figure 10 et 11). D'abord, elles interagissent directement avec les canaux calciques de type N et de type P/Q, ce qui permet de maintenir ces canaux à proximité des vésicules synaptiques et de rendre efficace la libération synaptique suite à l'entrée de calcium (Kaeser et al., 2011). Ensuite, elles sont impliquées dans le priming par le mécanisme éventuel suivant : elles interagissent avec un monomère de Munc-13, l'empêchant de former un homodimère inactif et lui permettant ainsi de jouer son rôle dans le « priming » (Deng et al., 2011). C'est pourquoi la délétion de Rim α entraine une diminution du nombre de vésicules synaptiques à l'état de « priming ».

2- Rôle de la transmission synaptique rétine-cible sur la ségrégation œil spécifique

Une étude récente a montré que la libération de glutamate par la projection ipsilatérale était nécessaire à l'élimination des projections controlatérales du territoire ipsilatéral (Koch et al., 2011). Cette étude a utilisé un modèle de délétion conditionnelle du transporteur vésiculaire 2 du glutamate (vGlut2) spécifiquement dans les CGRs projetant ipsilatéralement. Dans ce modèle, les projections controlatérales occupent tout le CGLd, y compris le territoire ipsilatéral, créant un défaut de ségrégation œil-spécifique.

Les récepteurs post-synaptiques impliqués dans ce raffinement ne sont pas bien identifiés. Le candidat idéal serait le récepteur NMDA. Chez la grenouille et le xénope, tous les axones rétiniens croisent au chiasma optique et projettent controlatéralement dans le tectum (équivalent du CS). Afin de pouvoir tout de même étudier la ségrégation œil spécifique dans ce modèle, des expériences de greffe ou d'ablation ont été réalisées : les projections provenant d'un œil greffé se ségrègent des projections de l'œil normal, ce qui forme des stries dans le tectum ; de même l'ablation d'un tectum entraine

l'innervation du tectum restant par les 2 yeux et les projections provenant des 2 yeux sont ségrégées. Dans ce système, le blocage des récepteurs NMDA entraine une déségrégation des projections (Cline et al., 1987; Ruthazer et al., 2003) suggérant l'implication de la transmission synaptique rétine-cible via le récepteur NMDA dans la processus de ségrégation. Toutefois, le blocage du récepteur NMDA ne perturbe pas la ségrégation œil spécifique ni dans le CGLd de furet (Smetters et al., 1994) ni dans le CS de rat (Colonnese and Constantine-Paton, 2001). Mais il faut savoir que des expériences réalisées sur des tranches de CGLd contenant le tractus optique ont montré qu'en absence des récepteurs NMDA, il persiste une activité dans les neurones thalamiques en réponse à l'activité rétinienne suggérant que d'autres récepteurs pourraient être importants (Mooney et al., 1996). Ainsi, des souris présentant une réduction en canaux calciques de type L présentent des défauts de ségrégation œil spécifique (Cork et al., 2001).
Donc il semble que les mécanismes de raffinement et les récepteurs impliqués chez la grenouille et le xénope soient différents de ceux trouvés chez le rat ou le furet.

3- Rôle de la transmission synaptique dans le raffinement de la rétinotopie

Le raffinement de la rétinotopie est dépendant de l'activité rétinienne cependant la question est de savoir si l'activité est requise seulement dans les CGRs en présynaptique de manière cell-autonome ou si la transmission synaptique rétine-cibles est requise pour ce raffinement.

In vivo, le blocage des récepteurs NMDA chez le hamster entraine un élargissement des champs récepteurs dans le CS (Huang and Pallas, 2001) et le blocage des récepteurs NMDA dans le CS du rat entraine un élargissement de la ZT des projections controlatérales provenant de la rétine temporale avec quelques fibres exubérantes en caudal (Simon et al., 1992). De plus, le blocage des récepteurs NMDA chez la grenouille semble aussi entrainer des défauts de topographie révélés par traçage rétrograde (Cline and Constantine-Paton, 1989). Cependant dans ces études, le blocage du récepteur NMDA n'est pas spécifique à la synapse rétino-colliculaire car le blocage se fait par exposition à des antagonistes NMDA dans toute la cible.

In vitro, une co-culture entre une rétine dont la libération synaptique est totalement bloquée (Munc18 KO) et un CS contrôle ne présente pas de défauts de topographie des projections rétiniennes (Nicol et al., 2007). Dans ce même système de co-culture rétino-colliculaire, le blocage des récepteurs AMPA ou NMDA n'entraine pas non plus de défauts de raffinement de la topographie.
Ces résultats dans leur ensemble ne permettent donc pas de conclure définitivement quant au rôle de la libération synaptique rétine-cibles dans le raffinement de la rétinotopie.

4- Rôle d'une signalisation rétrograde cibles-rétine dans le développement des projections rétiniennes

Le remaniement des projections rétiniennes implique des signaux rétrogrades : envoi de signaux des cellules cibles aux terminaisons axonales. Trois différentes signalisations rétrogrades ont été testées quant à leur rôle dans le développement des projections rétiniennes.

D'abord, les endocannabinoides sont des signaux libérés par les neurones post-synaptiques de façon activité-dépendante. Ils sont capables d'activer des récepteurs cannabinoides pré-synaptiques (CB1 et CB2). Ce système est impliqué dans la plasticité synaptique : il permet de médier la dépression à court et à long terme (CTD, LTD ; (Kano et al., 2009), et ceci via une signalisation dépendante de AMPc/PKA dans certaines régions du cerveau (Chevaleyre et al., 2007). Il a été montré que la LTD peut entrainer l'élimination de synapses (Wiegert and Oertner, 2013) ; ainsi la LTD pourrait médier le remaniement des synapses au cours du développement des projections rétiniennes (Lee et al., 2014). Les différents éléments du système endocannabinoide sont exprimés dans le système visuel et des expériences *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence leur implication dans le guidage axonal et la ségrégation œil spécifique dans le CS et le CGLd (Lalonde et al., 2006; Argaw et al., 2011; Duff et al., 2013).

Ensuite, les facteurs neurotrophiques tels que le BDNF et son récepteur Trk sont régulés par l'activité. Dans le développement du système visuel, BDNF et Trk protègent les CGRs et leurs cellules cibles (CS et CGLd) contre la mort cellulaire et contre une rétraction anormale des projections rétiniennes (Ma et al., 1998; Caleo et al., 2000; Menna et al.,

2003; Rodger and Frost, 2009). La signalisation BDNF/Trk est connue pour moduler la transmission glutamatergique via des mécanismes ayant lieu en pré et en post-synaptique (Carvalho et al., 2008). Cependant, la délétion du BDNF (Lyckman et al., 2005)ou la délétion de TrkB (Rodger and Frost, 2009) chez la souris n'entraine pas de défauts de ségrégation œil spécifique ni dans le CGLd ni dans le CS. Un défaut est toutefois présent chez la souris Trk KO : la projection ipsilatérale est ectopique, présente dans le CS caudal le long de l'axe médio-latéral.

Enfin, le dernier signal rétrograde testé est l'oxyde nitrique : l'inhibition de la synthétase de l'oxyde nitrique (SON) régulée par le calcium n'empêche pas la ségrégation œil spécifique dans le CGLd de furet (Cramer et al., 1996) et n'empêche pas la formation de stries ségrégées dans le modèle de grenouille après greffe d'un 3è œil (Renteria and Constantine-Paton, 1999). Mais, là encore un défaut est tout de même causé par l'inhibition de la SON : la projection ipsilatérale est ectopiquement présente en caudal dans le CS chez la souris NOS KO (Wu et al., 2000) et dans le CS de rats traités par l'inhibiteur de la SON (Vercelli et al., 2000).

D- Mécanismes concrétisant le remaniement des projections rétiniennes

Le raffinement des projections rétiniennes peut être médié par trois mécanismes différents : la mort cellulaire des CGRs dont les projections sont mal positionnées, la rétraction des branches mal positionnées ou encore la phagocytose par la glie et la microglie des projections mal positionnées.

1- Rôle de la mort cellulaire activité-dépendante

La période de développement des projections rétiniennes coincide avec un phénomène de mort cellulaire massive des CGRs. Chez la souris, environ la moitié des CGRs controlatérales meurent (Young, 1984; Voyatzis et al., 2012). Chez les animaux adultes, les CGRs ipsilatérales sont principalement situées dans le croissant VT de la rétine alors que pendant le développement, il y a des CGRs ipsilatérales ectopiques situées en dehors du croissant VT de la rétine (Tableau 2). Chez la souris, le rat et le hamster, de

nombreuses CGRs ipsilatérales sont éliminées, notamment celles qui sont situées en dehors du croissant VT de la rétine (Fawcett et al., 1984; Insausti et al., 1984; Thompson and Holt, 1989; Ravary et al., 2003).

Cette mort cellulaire des CGRs controlatérales et ipsilatérales est dépendante de l'activité (Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989; Voyatzis et al., 2012) car le blocage de l'activité par injection de TTX entraine une augmentation du nombre de CGRs dans la rétine.

Il a été suggéré que la mort cellulaire était importante pour éliminer les cellules dont les projections étaient mal positionnées. Cependant, le blocage de la mort cellulaire ne semble pas empêcher les cellules survivantes controlatérales de se rétracter en réponse aux molécules de guidage (O'Leary et al., 1986). En effet, il est possible d'induire la survie de CGRs controlatérales sensées mourir au moyen d'injections intraoculaires de TTX chez la souris. Dans ce modèle, des traçages rétrogrades du CS à la rétine n'ont pas mis en évidence de défauts de rétinotopie suggérant qu'un processus de mort cellulaire développementale a lieu mais qu'il n'est pas nécessaire au raffinement de la topographie controlatérale. Cependant, l'établissement de la topographie ipsilatérale semble spécifiquement impliquer la mort cellulaire. Ce sujet sera abordé dans la partie de discussion générale.

Un autre moyen d'étudier la mort cellulaire a été d'utiliser un modèle de souris qui surexprime une protéine anti-apoptotique Bcl-2, permettant de bloquer la mort cellulaire des CGRs. Ce modèle ne présente pas de défauts de ségrégation œil-spécifique dans le CGLd et dans le CS (Yakura et al., 2002).

2- Rôle de la glie, la microglie et de certains éléments du système immunitaire

Récemment, il a été découvert que les cellules gliales et microgliales étaient impliquées dans le raffinement des connexions au cours du développement de manière dépendante de l'activité. En effet, la ségrégation œil spécifique dans le CGLd et le raffinement fin de la rétinotopie sont, au moins en partie, médiés par la phagocytose des projections rétiniennes mal positionnées par les cellules gliales et microgliales.

Les molécules du complément C1 et C3 ainsi que le récepteur à C3 (CR3) sont exprimés à la surface de la microglie. Les souris C1q KO, C3 KO et CR3 KO présentent des défauts de ségrégation œil spécifique ; de plus concernant le raffinement de la rétinotopie à fine échelle, les souris C1q KO et C3 KO maintiennent une multi-innervation des cellules thalamiques par les CGRs (Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012). Il a été montré plus précisément que la sécrétion de TGFβ par les astrocytes induit l'expression de C1q dans les CGRs suivie de la phagocytose des synapses par la microglie (Bialas and Stevens, 2013). Ainsi, les molécules du complément pourraient agir comme des « étiquettes » permettant l'identification des synapses à éliminer par la microglie.

De plus, tout comme la microglie, les astrocytes (cellules gliales) sont capables de phagocyter les projections rétiniennes au cours du développement. MEGF10 et MERTK sont des récepteurs exprimés par les astrocytes et impliqués dans le processus de phagocytose. La délétion de ces récepteurs (MEGF10 KO et MERTK KO) chez la souris entraine des défauts de ségrégation œil spécifique et de raffinement de la rétinotopie à fine échelle avec maintien d'une multi-innervation des cellules thalamqiues par les CGRs (Chung et al., 2013).

Il est important de signaler que tous ces mécanismes de phagocytose par la microglie et par la glie cités sont dépendants de l'activité rétinienne. En effet, l'injection monoculaire d'épibatidine entraine l'extension du territoire occupé par les projections provenant de l'œil actif. Le ratio de projections contra/ipsi phagocytées par les astrocytes augmente du côté controlatéral à l'injection : les astrocytes phagocytent plus les projections venant de l'œil le moins actif. Dans le modèle MEGF10 KO et MERTK KO, suite à l'injection monoculaire d'épibatidine, le ratio de projections contra/ipsi phagocytées n'augmente pas. Ce résultat démontre que l'activité rétinienne contrôle l'élimination des projections via la phagocytose par les astrocytes de manière dépendante de la signalisation des récepteurs MEGF10 KO et MERTK KO (Chung et al., 2013). De même, suite à une injection monoculaire de TTX, la microglie phagocyte plus de projections provenant de l'œil moins actif que celles provenant de l'œil plus actif (Schafer et al., 2013).

Par ailleurs, d'autres molécules, appartenant au système immunitaire, sont importantes pour le raffinement des projections rétiniennes : la délétion de 2 gènes H2-Kb et H2-Db (H2-Kb KO et H2-Db KO) appartenant à la famille de classe I du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMHI) entraine des défauts de ségrégation œil spécifique et de raffinement de la rétinotopie à fine échelle (Datwani et al., 2009).

E- Mécanismes de sélection des connexions au cours du développement des projections rétiniennes

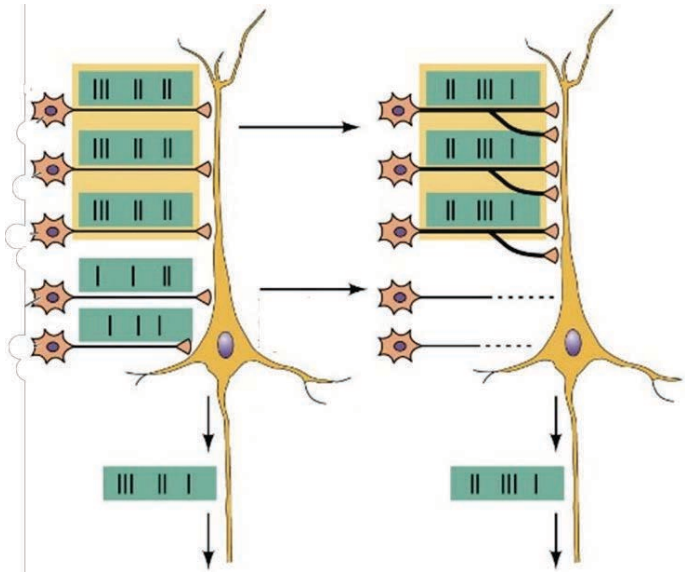


Figure 12 : Sélection des synapses selon le concept de Hebb.

La coopération entre neurones présynaptiques, dont l'activité est corrélée, pour induire l'activité du neurone post-synaptique permet de renforcer et de maintenir leurs synapses tandis que les synapses d'un neurone pré-synaptique dont l'activité n'est pas corrélée à celle du neurone post-synaptique sont affaiblies puis éliminées.

Cette configuration peut être appliquée au raffinement de la rétinotopie où le 1er groupe des 3 neurones du haut seraient des CGRs voisines dont l'activité est corrélée car touchées par la même vague d'activité rétinienne, tandis que le 2è groupe des 2 neurones du bas seraient des CGRs éloignées touchées par d'autres vagues d'activité. Etant plus nombreuses, les CGRs du 1er groupe contrôlent l'activité du neurone post-synaptique et leurs contacts sont donc maintenus contrairement aux CGRs du 2è groupe. Dans une zone de terminaison donnée, les CGRs du 1er groupe sont plus nombreuses car les molécules de guidage exprimées en gradients permettent initialement de positionner les projections provenant de CGRs voisines au même endroit dans la cible.

Cette configuration peut aussi être appliquée à l'élimination des synapses controlatérales du territoire ipsilatéral : les CGRs ipsi seraient les 3 neurones du haut dont l'activité est corrélée et les CGRs contra seraient les 2 neurones du bas.

Des synapses fonctionnelles mais immatures sont présentes dans le CGLd et le CS dès P3-4 (Mooney et al., 1996; Shah and Crair, 2008). La ségrégation œil spécifique et le raffinement fin de la rétinotopie impliquent l'élimination des synapses mal positionnées et le maintien des synapses correctes de manière activité-dépendante. Mais comment la sélection des synapses est-elle instruite ?

1- Hypothèse de Hebb et plasticité synaptique

L'hypothèse de Hebb stipule que lorsque l'activité d'un neurone présynaptique entraine l'activité du neurone post-synaptique auquel il est connecté, leur synapse est renforcée et maintenue. Au

contraire, si l'activité d'un neurone pré-synaptique et celle d'un neurone post-synaptique sont asynchrones, alors leur synapse est affablie et éliminée (Figure 12). C'est le concept « fire together, wire together ». Concrètement, il serait sous-tendu par des mécanismes de potentiation à long terme (LTP) et de dépression à long terme (LTD).

Si une afférence n'est toutefois pas capable d'induire à elle seule des potentiels d'action dans le neurone post-synaptique, elle peut tout de même induire une LTP si elle fait partie d'un groupe d'afférences qui connectent le même neurone et dont l'activité est corrélée (même profil temporel d'activité) car dans ce cas, elles peuvent entrainer des potentiels d'action dans le neurone post-synaptique suite à une sommation spatiale de l'activité induite en post-synaptique (Figure 12). C'est ce que l'on appelle la coopérativité qui permet d'induire une LTP à chacune des synapses dont les afférences ont participé à la sommation spatiale. Dans ce contexte en revanche, si une afférence n'est pas corrélée avec la majorité des afférences, en d'autres termes si elle est inactive lorsque les autres sont actives et inversement, alors cette afférence ne sera pas capable de se maintenir et sera éliminée (Figure 12).

Etant donné que les vagues spontanées d'activité rétinienne permettent de corréler l'activité de CGRs voisines et qu'elles sont assez infréquentes pour ne pas avoir lieu dans les deux yeux aux mêmes temps, elles sont parfaitement appropriées pour entrainer une plasticité synaptique selon le concept de Hebb et instruire la sélection des synapses à maintenir et celles à éliminer requise pour le raffinement de la rétinotopie et pour la ségrégation œil spécifique (Figure 12, légende). Ainsi, sur une tranche de CGLd ou de CS *in vitro*, il a été possible d'induire une LTP ou une LTD à la synapse rétino-géniculée (Butts et al., 2007; Lee et al., 2014) ainsi qu'à la synapse rétino-colliculaire (Shah and Crair, 2008) suivant le concept de Hebb, selon que des stimulations en pré-synaptique et en post-synaptique soient induites de façon synchrone ou asynchrone en mimant l'activité induite par les vagues rétiniennes. De plus, une étude intéressante a montré que la délétion d'une molécule du système immunitaire appartenant à la famille du CMH, H2D(b), entraine des défauts de ségrégation œil spécifique et de raffinement fin de la rétinotopie (Lee et al., 2014). Sur une tranche de CGLd délétée pour H2D(b), il n'est plus possible d'induire une LTD en mimant l'activité des vagues rétiniennes. Ce résultat suggère que les défauts anatomiques observés chez les souris H2D(b) KO (défauts de

ségrégation œil spécifique et défauts de raffinement fin de la rétinotopie) sont liés à un défaut d'élimination des synapses dû à un défaut d'induction de la LTD.

2- Rôle de la corrélation de l'activité dans les CGRs voisines

In vivo, le premier modèle qui a suggéré que la corrélation de l'activité entre CGRs voisines était importante pour le raffinement des projections rétiniennes correspond à la souris beta2KO car elle présente des vagues d'activité cholinergique spontanée perturbées associées à des défauts de raffinement des projections des CGRs. Cependant, ce modèle présente aussi un certain pourcentage de CGRs éteintes donc le phénotype pourrait être du à un défaut de corrélation comme à la diminution du niveau d'activité dans la rétine. Ainsi, la souris beta2KO ne permet pas de trancher la question concernant le rôle de la corrélation de l'activité dans la sélection des synapses.
Par ailleurs, l'élimination des cellules amacrines « starburst » initiatrices des vagues cholinergiques chez le furet n'entraine pas de défauts de la carte œil spécifique dans le CGLd (Huberman et al., 2003). Ce modèle présente un niveau d'activité normal, cependant il a été découvert que malgré l'élimination des cellules amacrines « starburst », il présente tout de même une propagation de l'activité spontanée au sein de CGRs voisines (Speer et al., 2011). Ainsi, ce deuxième modèle n'a pas non plus permis de trancher la question.

Récemment, deux études ont cherché à nouveau à déterminer le rôle de la corrélation de l'activité au sein de CGRs voisines dans le raffinement des projections rétiniennes (Xu et al., 2011; Zhang et al., 2011).
Dans un premier modèle (Xu et al., 2011), un transgène codant pour la sous-unité beta2 du récepteur à l'ACh a été spécifiquement réinséré dans les CGRs de la souris beta2 KO. Dans ce modèle (beta2TG), les CGRs ont un niveau normal d'activité mais les vagues rétiniennes sont plus petites que la normale (le nombre de CGRs touchées par la même vague est plus petit). Dans la souris beta2TG, le défaut de raffinement de la rétinotopie est rectifié dans la majorité du CS mais étant donné que ce modèle présente un niveau d'activité normal et des vagues certes un peu différentes mais toujours corrélées, il n'est pas possible de savoir quelle composante de l'activité est requise au raffinement. En revanche, le défaut de ségrégation œil spécifique dans le CGLd et le CS n'est rectifié que

de manière partielle, ce qui suggère qu'un niveau d'activité normal dans les CGRs ne suffit pas et que les informations spatio-temporelles codées par les vagues spontanées normales sont requises pour le processus de ségrégation œil spécifique.

Dans un deuxième modèle (Zhang et al., 2011), l'expression de « channelrhodopsin » ChR2 dans 20 % des CGRs a permis de manipuler le profil de leur activité. La stimulation de l'activité par la lumière dans les deux yeux de manière synchrone entre P9 et P13 entraine une « déségrégation » : les projections ipsilatérales envahissent le territoire controlatéral dans le CGLd et le CS par une croissance *de novo*, cependant les projections controlatérales ne sont pas modifiées, c'est pourquoi l'effet sur la ségrégation œil spécifique n'est pas très important. La stimulation de l'activité par la lumière dans les deux yeux de manière asynchrone améliore un peu la ségrégation œil spécifique dans le CS. Ces résultats suggèrent que le profil temporel de l'activité dans un œil par rapport à l'autre œil est impliqué dans ce processus de croissance *de novo* des projections ipsilatérales. Concernant la rétinotopie, la stimulation synchrone et asynchrone des deux yeux, améliore le raffinement de la rétinotopie (la taille de la zone de terminaison est plus petite que la normale). Il est difficile d'interpréter ces résultats : soit le raffinement de la rétinotopie n'est pas affecté par la synchronisation de l'activité de CGRs non voisines à travers toute la rétine, soit il l'est car le raffinement de la rétinotopie implique une compétition synaptique selon Hebb entre les projections provenant d'un même œil et ici dans cette étude, seule 1 CGR sur 5 est concernée par la stimulation donc 1 CGR sur 5 est désynchronisée de ses voisines ce qui selon Hebb, pourrait mener à son élimination et ainsi expliquer pourquoi la taille de la zone de terminaison diminue (les projections d'1 CGR sur 5 pourraient être éliminées).

3- Instruction de la position des domaines œil spécifique

a- Position du domaine ipsilatéral

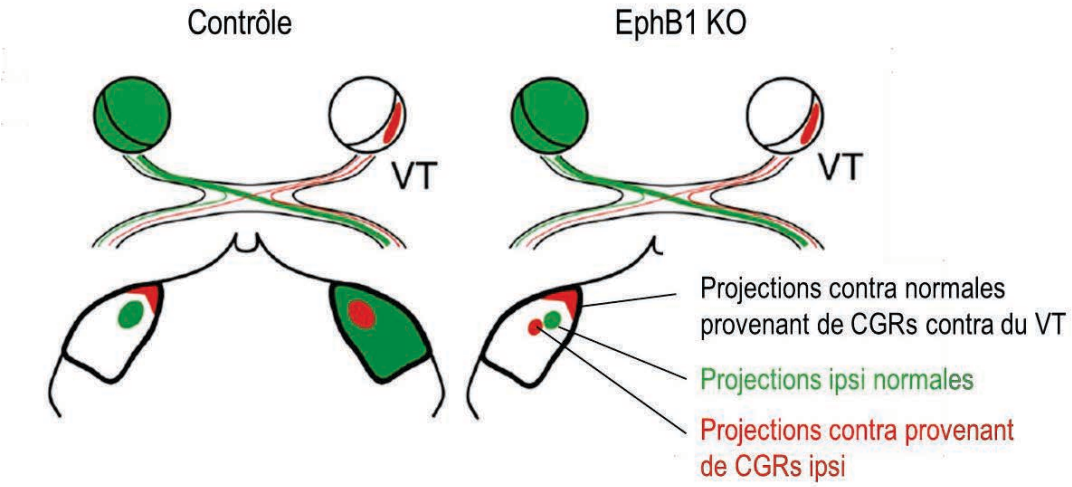


Figure 13 : Phénotype de la souris EphB1 KO dans le CGLd (Rebsam et al, 2009).

La position du domaine ipsilatéral au sein du CGLd ne semble pas instruite uniquement par l'activité rétinienne. En effet, des projections de CGRs ipsilatérales modifiées pour aller en controlatéral (modèle de souris EphB1 KO) projettent tout de même dans le domaine ipsilatéral et non pas dans le CGLd très dorsal normalement occupé par les projections controlatérales provenant du VT et ceci malgré le fait qu'elles présentent le même profil d'activité que les autres CGRs controlatérales qui leur sont voisines (Rebsam et al., 2009). Donc, il semble que l'activité ne suffise pas à exclure du territoire ipsilatéral ces projections controlatérales provenant de CGRs ipsilatérales. Cette donnée suggère que les CGRs ipsilatérales ont une signature moléculaire qui leur permet de se maintenir dans leur territoire.

b- Rôle de la sérotonine dans le développement de la carte œil spécifique

La sérotonine (5HT) joue un rôle dans le développement des cartes visuelles et pourrait instruire la position des domaines œil spécifique. En effet, des modèles qui présentent une augmentation des taux de 5HT dans le cerveau (Rhoades et al., 1993; Upton et al.,

1999; Salichon et al., 2001) telles que les souris délétées pour le SERT (transporteur de la 5HT qui recapte dans les cellules la 5HT extra-cellulaire) ou délétées pour la MAOA (enzyme de dégradation de la 5HT) ont des défauts de ségrégation œil spécifique dans le CGLd et de topographie (la projection ipsilatérale dans le CS est présente en caudal de manière ectopique le long de l'axe médio-latéral). La double délétion de SERT et du récepteur 5HT1B ou de MAOA et 5HT1B permet de sauver le phénotype suggérant que les effets passent par ce récepteur.

Les projections ipsilatérales expriment SERT alors que les projections controlatérales ne l'expriment pas. Par ailleurs, toutes les projections rétiniennes expriment le récepteur 5HT1B. Il a été montré que la fixation de la sérotonine à ce récepteur présynaptique entrainait une réduction de la transmission glutamatergique (Mooney et al., 1994). Ainsi, l'hypothèse émise a été que les projections controlatérales libéraient moins de glutamate que les projections ipsilatérales protégées de l'activation du 5HT1B étant donné qu'elles recaptent la 5HT par SERT ; cette différence permettrait ainsi aux projections ipsilatérales de gagner la compétition avec les projections controlatérales dans le CGLd et d'exclure les projections controlatérales du territoire ipsilatéral. Cependant, la délétion du 5HT1B n'entraine pas de défauts de ségrégation œil spécifique remettant en cause cette hypothèse ; elle entraine toutefois un défaut de topographie de la projection ipsilatérale dans le CS qui ne forme pas d'amas et qui est ectopique en caudal.

En résumé, le système sérotoninergique est clairement impliqué dans le raffinement des projections rétiniennes mais les mécanismes qui sous-tendent son action sont encore mal connus.

III – Adénylates cyclases, signaux AMPc et compartimentation spatiale

A- Les adénylates cyclases

1- Différentes ACs

Il existe 10 isoformes d'adénylate cyclases (AC), 9 sont des protéines trans-membranaires (AC1 à 9) et une est dite « soluble » car non membranaire et adressée à des compartiments cytoplasmiques (AC10). Les ACs sont des enzymes qui convertissent l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc est un second messager intra-cellulaire ubiquitaire. L'AMPc est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation intra-cellulaire régulant de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la réponse immunitaire, la contractilité des myocytes cardiaques, la plasticité neuronale (Willoughby and Cooper, 2007). Par ailleurs, au cours du développement du SNC, l'AMPc est impliqué dans le guidage axonal : il est requis pour la réponse des axones à de nombreuses molécules de guidage telles que la nétrine 1, la sémaphorine, les éphrines (Ming et al., 1997; Hopker et al., 1999; Terman and Kolodkin, 2004; Nicol et al., 2006a; Wu et al., 2006).

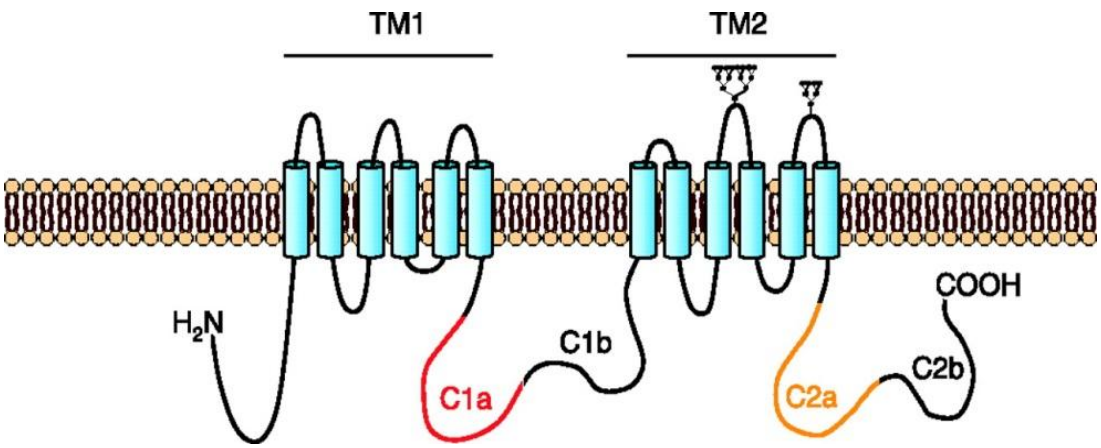


Figure 14 : Structure de l'adénylate cyclase trans-membranaire.

Les AC sont constituées de deux domaines à 6 passages transmembranaires (TM1 et TM2) et de deux boucles cytoplasmiques (C1 et C2). La partie N-terminale de C1 (C1a) et de C2 (C2a) interagissent pour former le site catalytique. Le site de régulation par le calcium est situé sur la partie C-terminale de C1 (C1b). Les autres sites de régulation sont situés sur C1a et C2, sur les parties exposées de la protéine.

Les ACs trans-membranaires sont composées de 2 domaines (TM1 et TM2) à 6 passages trans-membranaires chacun, de 2 boucles intra-cellulaires (C1 composée de C1a et C1b et C2 composée de C2a et C2b), ainsi que d'une courte extrémité N-terminale intra-cellulaire (Krupinski et al., 1989*;* Figure 14). Le second domaine trans-membranaire TM2 est pourvu de sites extra-cellulaires de N-glycosylation. C1a et C2a ont des séquences très conservées car ils dimérisent pour former le site catalytique de l'enzyme ; ils correspondent au site de liaison de l'enzyme à l'ATP (Sunahara et al., 1996).

2- Régulation de l'activité des ACs

Chaque AC a un mode unique de régulation qui découle d'une combinaison différente de molécules activatrices et inhibitrices (Tableau 1).

a- Régulation par le calcium

Les ACs 1 et 8 sont stimulées par le calcium (Ca^{2+}) via la calmoduline (Cam ; (Fagan et al., 1996). Une élévation de la concentration intra-cellulaire en Ca^{2+} suivie de la fixation du complexe Ca^{2+}/Cam aux domaines de liaison à la Cam de ces ACs entraine leur activation par exposition du site catalytique au substrat. La régulation de l'AC3 par le calcium est moins claire. En effet, l'AC 3 est stimulée *in vitro* par une forte concentration de calcium via la Cam (Choi et al., 1992) associée à la présence de forskoline (activateur pharmacologique des ACs) mais une autre étude a montré qu'elle ne l'était pas par des concentrations physiologiques en calcium (Fagan et al., 1996). *In vivo*, l'AC3 est inhibée par le Ca^{2+} directement ou via la CamKinase II (CamKII ; (Wayman et al., 1995). Ces isoformes, AC 1, 3 et 8, ne sont pas stimulées par toutes les augmentations de concentrations en calcium : la libération des stocks intracellulaires de calcium est incapable d'induire cette stimulation, alors que l'entrée de calcium extracellulaire via les canaux calciques voltage-dépendants ou capacitatifs stimulent ces ACs (Cooper et al., 1998; Fagan et al., 2000). Les ACs 5 et 6 sont directement inhibées par des concentrations physiologiques de Ca^{2+}. L'AC9 est indirectement inhibée par le Ca^{2+} via la calcineurine, une protéine phosphatase (Antoni et al., 1998). Les AC 2, 4 et 7 ne sont pas régulées par le Ca^{2+}. L'AC soluble est stimulée par le Ca^{2+} (Jaiswal and Conti, 2003; Litvin et al., 2003).
Par ailleurs, toutes les ACs sont inhibées par de très fortes concentrations de calcium (Cooper et al., 1998).

b- Régulation par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les ACs sont différentiellement stimulées ou inhibées par des récepteurs couplés aux protéines G. Toutes les ACs sont stimulées par la protéine Gsα, sauf l'AC soluble. Les ACs 1, 3, 5, 6, 8 et 9 sont inhibées par la protéine Giα alors que les ACs 2, 4 et 7 ne sont pas

régulées par Giα. La protéine Gβγ inhibe les ACs 1 et 8, elle active les ACs 2, 4 et 7 et elle ne régule pas les ACs 3, 5, 6 et 9.

L'AC soluble n'est pas régulée par les protéines G.

c- Régulation par PKA, PKC, CamK

La phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) des ACs 5 et 6 diminue leur activité catalytique (Iwami et al., 1995; Chen et al., 1997).

La protéine kinase C (PKC) stimule les ACs 2, 4, 5 et 7 (Kawabe et al., 1996; Tabakoff et al., 2001; Schallmach et al., 2006), inhibe l'AC9 (Cumbay and Watts, 2004) et diminue l'activité de l'AC6 (Cheung et al., 2005).

La CamKIV est capable de phosphoryler l'AC1, entrainant son inhibition (Wayman et al., 1996).

3- Profil d'expression des ACs dans le système nerveux central

L'AC soluble est exprimée dans les testicules chez la souris où la signalisation AMPc est importante pour la différenciation, motilité et maturation des spermatozoides (Esposito et al., 2004). Par la suite, il a été montré qu'elle était aussi exprimée par les neurones (Wu et al., 2006; Corredor et al., 2012) mais son profil d'expression précis reste à déterminer. En revanche, le profil d'expression des différentes AC transmembranaires dans le SNC a été décrit de manière assez précise au cours du développement et à l'âge adulte par hybridation in situ (Nicol et al., 2006b; Visel et al., 2006). Excepté, l'AC 4 qui n'est exprimée que dans les vaisseaux sanguins du système nerveux central et l'AC 7 qui est très peu exprimée dans le SNC, toutes les autres AC sont exprimées dans le SNC. En résumé, l'AC1 est surtout exprimée dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus, le cervelet, la moelle épinière et le striatum ; l'AC3 est principalement exprimée dans l'épithélium olfactif ; l'AC 8 est surtout exprimée dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus et le bulbe olfactif ; l'AC5 est surtout exprimée dans le striatum, l'hippocampe, le bulbe olfactif et le thalamus ; l'AC 6 est surtout exprimée dans l'hippocampe, le cortex,

le bulbe olfactif, le thalamus et le striatum ; l'AC 2 est principalement exprimée dans le cortex, le striatum, le bulbe olfactif et le thalamus; l'AC 9 est principalement exprimée dans l'hippocampe et le bulbe olfactif.
En termes de profil d'expression au cours du temps, l'AC1 est exprimée plus largement à des âges embryonnaires tandis que l'AC8 est exprimée plus largement à l'âge adulte (Nicol et al., 2005). En terme de profil d'expression dans les différentes régions du cerveau, les AC dépendantes du calcium, AC 1 et 8, sont généralement « complémentaires » : elles ne sont pas exprimées dans les mêmes régions du cerveau, excepté dans l'hippocampe par exemple où elles sont plutôt « colocalisées ». Au contraire, les AC stimulées par Gβγ et inhibées par Giα sont « colocalisées » : l'AC2 est exprimée dans les mêmes régions du cerveau que l'AC5 et/ou l'AC6. Les AC 1 et 8 d'une part et les AC 2, 5 et 6 d'autre part sont tantôt complémentaires tantôt colocalisées selon le stade observé (développement à P7 ou stade adulte) et selon la région du cerveau observée.

Dans le système visuel de la souris, différentes AC sont exprimées (Nicol et al., 2006b; Corredor et al., 2012) ; Tableau 1) : les CGRs expriment les ACs 1, 2, 3, 5, 8, 9 ainsi que l'AC soluble, le CGLd exprime les AC 1 et 8, le CS exprime les AC 1, 2 et 8. Cependant le profil d'expression de ces AC varie au cours du temps. Dans les CGRs, l'AC1 est fortement exprimée en prénatal au moins dès E15, en postnatal jusqu'à P10 puis son expression décline fortement à l'âge adulte ; les AC 2, 3 et 8 sont faiblement exprimées en prénatal puis elles présentent un pic d'expression en postnatal jusqu'à P10 avant de décliner légèrement à l'âge adulte ; l'AC5 est assez fortement exprimée en prénatal avec un pic d'expression entre P4 et P10 puis est toujours exprimée à l'âge adulte mais moins fortement ; l'AC 9 est modérement exprimée en périnatal avant de décliner à l'âge adulte. En bref, les AC les plus exprimées dans les CGRs pendant le développement des projections rétiniennes sont les AC 1, 2, 5 et 8.
Dans le CS, l'AC1 est exprimée en périnatal jusqu'à P10 et n'est quasiment plus du tout exprimée à l'âge adulte ; l'AC 2 est peu exprimée en prénatal contrairement à l'AC8 puis leur expression augmente crescendo pour atteindre un pic à l'âge adulte. Dans le CGLd, l'AC1 est fortement exprimée en prénatal et postnatal jusqu'à P10 avant de diminuer à l'âge adulte ; à l'opposé, l'AC8 est moins exprimée en périnatal que l'AC1 tandis que son expression est forte à l'âge adulte.

Tableau 1 : Les différentes adénylates cyclases

Adénylate cyclase	Principale expression dans le SNC	Expression dans le système visuel			Rôle dans raffinement des projections rétiniennes	Régulation			Compartiment
		CGRs	CGLd	CS		Calcium	RCPG	PKA/PKC	
AC 1	Cortex, hippocampe, thalamus, cervelet, moelle épinière, striatum	Oui Fortement exprimée entre P4 et P10	oui	oui	Oui	Stimulée par le Ca^{2+} via la Cam Inhibée par la CamKIV	Stimulée par Gsα Inhibée par Gi α et Gβγ		Membrane plasmique DANS radeaux lipidiques
AC 2	Cortex, thalamus, striatum, bulbe olfactif	Oui Fortement exprimée entre P4 et P10	Oui Faiblement exprimée	oui	Non évalué	Non régulée par le Ca^{2+}	Stimulée par Gsα et Gβγ Non régulée par Gi α	Stimulée par PKC	Membrane plasmique EN DEHORS des radeaux lipidiques
AC 3	Epithélium olfactif	oui	non	non	Non évalué	Stimulée *in vitro* par le Ca^{2+} via la Cam Inhibée *in vivo* par le Ca^{2+}	Stimulée par Gsα Inhibée par Gi α Non régulée		Membrane plasmique DANS radeaux lipidiques

						directement ou via la CamKII	par Gβγ		
AC 4	Vaisseaux sanguins du SNC	non	non	non	Non évalué	Non régulée par le Ca^{2+}	Stimulée par Gsα et Gβγ Non régulée par Gi α	Stimulée par PKC	Membrane plasmique EN DEHORS des radeaux lipidiques
AC 5	hippocampe, thalamus, striatum, bulbe olfactif	Oui Fortement exprimée entre P4 et P10	non	non	non	Inhibée par le Ca^{2+}	Stimulée par Gsα Inhibée par Gi α Non régulée par Gβγ	Inhibée par PKA Stimulée par PKC	Membrane plasmique DANS radeaux lipidiques
AC 6	Cortex, hippocampe, thalamus, striatum, bulbe olfactif	non	non	non	Non évalué	Inhibée par le Ca^{2+}	Stimulée par Gsα Inhibée par Gi α Non régulée par Gβγ	Inhibée par PKA Stimulée ou inhibée par PKC	Membrane plasmique DANS radeaux lipidiques
AC 7	Très peu exprimée dans le SNC	non	non	non	Non évalué	Non régulée par le Ca^{2+}	Stimulée par Gsα et Gβγ	Stimulée par PKC	Membrane plasmique EN DEHORS des

							Non régulée par Gi α		radeaux lipidiques
AC 8	Cortex, hippocampe, thalamus, bulbe olfactif	Oui Fortement exprimée entre P4 et P10	oui	oui	non	Stimulée par le Ca^{2+} via la Cam	Stimulée par Gsα Inhibée par Gi α et Gβγ		Membrane plasmique DANS radeaux lipidiques
AC 9	Hippocampe, bulbe olfactif	oui	non	non	Non évalué	Inhibée indirectement par le Ca^{2+} via la calcineurine	Stimulée par Gsα Inhibée par Gi α Non régulée par Gβγ	Inhibée par PKC	Membrane plasmique EN DEHORS des radeaux lipidiques
AC soluble	Exprimée dans neurones du SNC mais profil non évalué	oui	Non évalué	Non éva-lué	Non évalué *in vivo* mais rôle connu dans survie des CGRs et élongation axonale *in vitro*	Stimulée par le Ca^{2+} et par le bicarbonate	Non régulée par les protéines G		Cytosol, noyau, mitochondrie, structures du cytosquelette (centrosome)

4- Rôle de l'AC1 dans le développement du SNC

a- Rôle d'AC1 dans le développement du SNC

L'AC 1 est requise au cours du développement des circuits neuronaux dans différents sytèmes. Elle est importante entre autres dans le système visuel pour le développement des projections rétino-géniculées et rétino-colliculaires, dans le système somato-sensoriel pour le développement des projections thalamo-corticales, dans le système moteur pour le développement des projections cortico-spinales et dans le système sensori-moteur.

Le système somato-sensoriel permet de transmettre les informations sensorielles provenant des vibrisses jusqu'au cortex en passant par différents relais. Chaque vibrisse est reprensentée individuellement dans la couche IV du cortex par un bouquet de projections thalamiques entourées et connectées par des neurones corticaux ; cette structure est appelée « baril ». Il y a donc dans le cortex somatosensoriel autant de barils que de vibrisses. L'AC1 est exprimée dans les neurones du thalamus et du cortex (Nicol et al., 2005). Les souris « barrelless » (*brl*) découvertes à l'université de Lausanne en Suisse ne présentent pas de barils car les projections thalamocorticales provenant de différentes vibrisses voisines sont entremêlées (Welker et al., 1996). Ces souris *brl* présentent en fait une mutation spontanée correspondant à l'insertion d'un rétrotransposon dans le gène de l'AC1 causant une inactivation du gène par décalage du cadre de lecture (Abdel-Majid et al., 1998). Les souris *brl* et les souris KO pour AC1 générées par la suite (AC1 KO) ont le même phénotype dans le système somato-sensoriel (Welker et al., 1996; Abdel-Majid et al., 1998) ainsi que dans le système visuel (Ravary et al., 2003; Nicol et al., 2006b).
Par ailleurs, les souris *brl* présentent des défauts du tractus cortico-spinal : comparé aux contrôles, il y a une augmentation du nombre d'axones ipsilatéraux dans les funiculi médiaux dorsaux et ventraux de la moelle épinière cervicale associée à une augmentation du nombre de neurones moteurs corticaux-spinaux (Nait Taleb Ali et al., 2014). Les souris *brl* présentent aussi une augmentation anormale des branchements concernant l'innervation sensorielle de la peau au niveau des membres et du tronc et concernant l'innervation motrice de la paroi musculaire (Haupt et al., 2010).

b- Rôle de l'AC1 dans le développement des projections rétiniennes

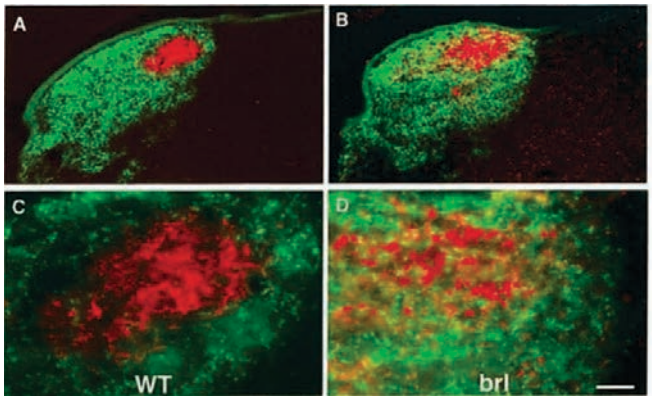


Figure 15 : Défauts de ségrégation chez la souris *brl* (mutation dans le gène AC1) dans le CGLd (Ravary et al, 2003).
A et C. Chez une souris contrôle, les projections ipsilatérales et controlatérales sont ségrégées.
B et D. Chez une souris *brl*, la projection controlatérale occupe tout le CGLd y compris le territoire ipsilatéral et des projections ipsilatérales ectopiques sont présentes dans le territoire controlatéral.

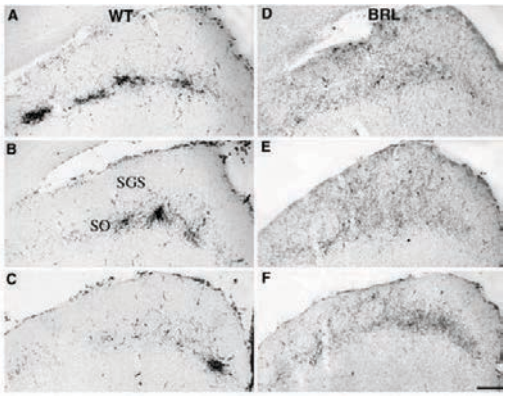


Figure 16 : Défauts de topographie de la projection ipsilatérale chez une souris *brl* dans le CS (Ravary et al, 2001).
A, B et C. Chez une souris contrôle, la projection est organisée en amas restreinte dans le SO.
D, E, F. Chez une souris *brl*, la projection est diffuse, non organisée en amas et occupe le SGS de manière ectopique.

L'AC 1 est requise pour l'établissement des projections rétiniennes (ségrégation œil spécifique et rétinotopie) au sein du CGLd et du CS (Ravary et al., 2003; Plas et al., 2004; Nicol et al., 2006b; Dhande et al., 2012).

Concernant la ségrégation œil-spécifique, chez les souris *brl* et AC1 KO, les projections controlatérales occupent tout le CGLd y compris le territoire ipsilatéral et des projections ipsilatérales ectopiques sont présentes dans le territoire controlatéral (Ravary et al., 2003; Nicol et al., 2006b) Figure 15). Dans le CS, les projections ipsilatérales occupent le SO mais des projections ipsilatérales ectopiques sont aussi présentes dans la couche controlatérale (SGS ; (Ravary et al., 2003; Nicol et al., 2006b) ; Figure 16). Concernant la rétinotopie chez les souris *brl* et AC1 KO, les projections provenant de CGRs voisines occupent une ZT plus large que chez les souris contrôles dans le CGLd et dans le CS (Ravary et al., 2003; Plas et al., 2004; Dhande et al., 2012) ; Figure 17). De plus, la projection ipsilatérale des souris *brl* et AC1KO est très clairement exubérante : de nombreuses projections ipsilatérales sont présentes dans la partie caudale du CS tout le long de l'axe médio-latéral (Ravary et al., 2003; Dhande et al., 2012)Figure 16). Des projections rétiniennes uniques AC1 KO provenant de la rétine temporale ont été reconstruites dans les cibles (Dhande et al., 2012). Ainsi dans le CS de la souris AC1KO, le défaut de rétinotopie peut être expliqué par le fait que les projections rétiniennes présentent des branches ectopiques le long des axones et une arborisation terminale plus large et moins dense (Nicol et al., 2006a; Dhande et al., 2012). Cependant, dans le CGLd, les projections AC1 KO ayant une arborisation élaborée, ne présentent pas de différence importante avec une projection contrôle (Dhande et al., 2012), suggérant que le défaut de rétinotopie dans le CGLd (Ravary et al., 2003) serait plutôt dû à un défaut de positionnement précis à la ZT adéquate.

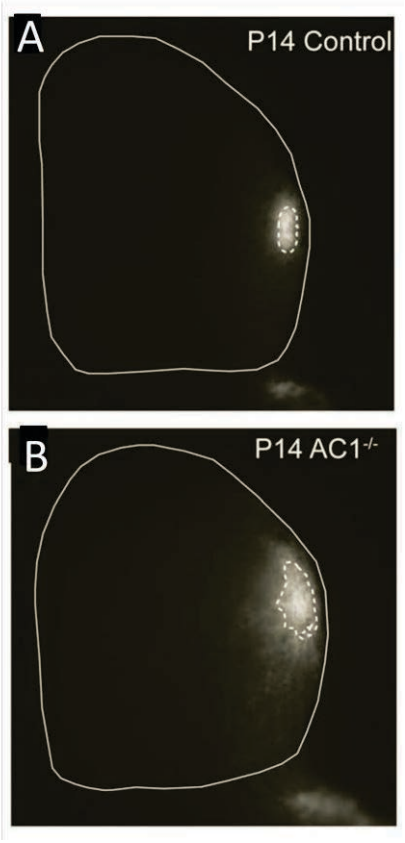


Figure 17 : Défauts de raffinement de la rétinotopie chez une souris AC1 KO dans le CS (Dhande et al., 2012).

La zone de terminaison occupée par un groupe de projections AC1 KO (B) est plus large que celle occupée par un groupe de projections

Par ailleurs, dans la co-culture rétino-colliculaire, les projections déficientes en AC1 en provenance de la rétine temporale ne se rétractent pas du CS caudal contrairement aux projections contrôles provenant de la rétine temporale (Nicol et al., 2006a). *In vitro*, alors que les axones issus d'explants rétiniens contrôles se rétractent en réponse à l'éphrine A5, les axones déficients en AC1 eux, « collapsent » (rétraction du lamellipode seulement) mais ne se rétractent pas. Ce résultat démontre l'importance de l'AC1 pour la réponse aux éphrines A *in vitro* (Nicol et al., 2006a). Etant donné que le positionnement des projections rétiniennes à la ZT adéquate est établi par les gradients d'éphrinesA/EphA, ces expériences de co-culture et de « collapse » *in vitro* pourraient expliquer le fait que dans certains cas *brl in vivo*, quelques axones controlatéraux provenant de la rétine temporale ne sont pas complètement rétractés de la partie caudale du CS (Ravary et al., 2003).
L'utilisation de KO conditionnels permettant de supprimer AC1 soit dans la rétine soit dans les cibles ainsi que des expériences de co-culture rétine AC1KO - CS contrôle ou rétine contrôle – CS AC1KO ont permis de mettre en évidence que ces défauts de ségrégation œil spécifique et de rétinotopie sont dus à l'absence de l'AC1 uniquement en présynaptique dans les CGRs et non pas en post-synaptique dans les cellules cibles des CGRs dans le CGLd ou le CS (Nicol et al., 2006a; Dhande et al., 2012).

c- L'AC1 et l'activité rétinienne

L'AC1 est un candidat idéal pour faire un lien entre l'activité et les signalisations qui contrôlent le raffinement des projections.

Les souris déficientes pour le gène de l'AC1 ont un phénotype similaire aux souris dont l'activité rétinienne est perturbée ; à savoir des défauts de ségrégation œil spécifique et des défauts de raffinement de la rétinotopie. Cette similitude suggère que l'activité et l'AC1 agissent via les mêmes voies de signalisation.

Cependant, les défauts de ségrégation œil spécifique chez les souris beta2 KO ou chez les furets traités par épibatidine ainsi que les défauts de rétinotopie chez les souris beta 2KO sont rectifiés avec le temps (Huberman et al., 2002; Muir-Robinson et al., 2002) probablement lors des vagues d'activité glutamatergique alors que chez les souris AC1 KO, les défauts de ségrégation sont maintenus (Ravary et al., 2003) jusqu'à l'âge adulte

et chez des souris beta2 – AC1 double KO, les défauts de rétinotopie ne sont pas rectifiés (Rossi et al., 2001; Dhande et al., 2012). Cette observation suggère que l'AC1 agit en aval ou en amont non seulement des vagues II cholinergiques mais aussi des vagues III glutamatergiques.

La signalisation AMPc dépendante de l'AC1 pourrait agir en amont de l'activité spontanée. En effet, une étude a montré que les niveaux d'AMPc dans les corps cellulaires des CGRs peuvent moduler les vagues d'activité spontanée au sein des CGRs : l'augmentation de la concentration d'AMPc augmente la taille, la vitesse et la fréquence des vagues tandis que l'inhibition de l'activité de l'AC ou de la PKA bloque l'activité spontanée (Stellwagen et al., 1999). L'AC impliquée n'est pas connue. Cependant, il a été montré récemment que la délétion d'AC1 n'entraine pas de défauts d'activité des CGRs : les rétines AC1 KO présentent les mêmes caractéristiques électrophysiologiques que les rétines contrôles (Dhande et al., 2012). Ce résultat démontre que les défauts de cartes observés chez les AC1 KO ne sont pas dûs à une perturbation de l'activité spontanée de la rétine.

Ainsi, étant donné que l'AC1 est régulée par le calcium qui entre dans la cellule suite à l'arrivée de potentiels d'action (Cooper et al., 1998; Fagan et al., 2000), la signalisation AMPc dépendante de l'AC1 pourrait plutôt agir en aval de l'activité spontanée. En d'autres termes, l'AC1 pourrait convertir l'activité spontanée en signalisations cellulaires importantes pour le raffinement des projections rétiniennes. Une expérience conforte fortement cette hypothèse : *in vitro*, la délétion de l'AC1 d'une part ou le blocage de l'activité d'autre part par le TTX empêchent la rétraction des axones rétiniens en réponse à l'éphrine A5 mais le fait de générer des oscillations d'AMPc dans les CGRs dont l'activité est bloquée par le TTX permet de sauver la réponse des axones aux éphrines A (Nicol et al., 2007).
Par ailleurs, la transcription génique activité-dépendante passe par la signalisation AMPc/CREB. La réduction de l'expression du facteur de transcription CREB chez la souris entraine des défauts de ségrégation oeil spécifique dans le CGLd (Pham et al., 2001). Cependant, il semble que dans cette étude la transcription génique dépendante de CREB ait lieu dans les cellules thalamiques alors que les effets de l'AC1 sont présynaptiques dans la rétine. L'AC impliquée dans cette étude n'a pas été identifiée.

B- Le Concept de compartimentation de la signalisation AMPc générée par les ACs

1- Spécificité fonctionnelle des signaux AMPc

Au cours du développement du système visuel, les cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs) expriment plusieurs ACs ((Nicol et al., 2006b; Corredor et al., 2012). *In vivo*, seule l'AC1 est requise pour le développement des projections rétiniennes au sein du CGLd et du CS. En effet, seules les souris AC1KO présentent des défauts de raffinement des projections, et la présence des autres ACs exprimées dans les CGRs ne compense pas l'absence de l'AC1. D'autre part, les souris déficientes en AC 5 et en AC 8 ne présentent pas de défauts des projections rétiniennes (Nicol et al., 2006b) ni dans le CGLd, ni dans le CS. Par ailleurs, le rôle *in vivo* des AC 2, 3, 9 exprimées dans les CGRs au cours du développement n'est pas connu. *In vivo*, le seul rôle connu de l'AC soluble est son implication dans la génération des vagues d'AMPc dans la rétine (Dunn et al., 2009).
Ensuite, il a été montré *in vitro* que seule l'AC soluble est importante pour la survie et la croissance axonale des CGRs (Corredor et al., 2012). L'inhibition pharmacologique ou par siRNA de l'AC soluble diminue fortement la survie ainsi que la croissance axonale des RGCs *in vitro* tandis que l'inhibition pharmacologique des ACs trans-membranaires ou l'utilisation d'explants de rétine AC1-AC8 dbKO n'affectent pas ces fonctions.
Pour finir, *in vitro* concernant des axones issus d'explants de moelle épinière dorsale de rat, la réponse du cône de croissance (croissance axonale stimulée et élaboration des filopodes) à la molécule attractive Nétrine-1 et à la molécule PACAP est dépendante de l'AMPc. Cependant, seule l'AC soluble est requise pour la réponse à la Nétrine-1 et inversement seules les ACs trans-membranaires sont requises pour la réponse à PACAP (Wu et al., 2006).

L'AMPc est une molécule soluble dans le cytoplasme, qui peut diffuser très rapidement. Comment expliquer alors la spécificité fonctionnelle des ACs au sein d'une même cellule alors qu'elles produisent le même second messager diffusible, l'AMPc capable de réguler de nombreux effecteurs ? L'existence d'une compartimentation spatiale de la signalisation AMPc sous forme de microdomaines (Figure 18) pourrait expliquer cette spécificité fonctionnelle. Un microdomaine contiendrait une AC, associée à des

régulateurs et effecteurs spécifiques d'une voie de signalisation donnée. Le microdomaine empêcherait la diffusion du signal AMPc produit en réponse à un stimulus donné par la présence de phosphodiestérases, enzymes de dégradation de l'AMPc (Figure 18).

La compartimentation spatiale de la signalisation AMPc présente différents intérêts : mettre à proximité les différents acteurs d'une fonction donnée pour faciliter leur interaction et donc potentialiser leur efficacité, empêcher la diffusion des signaux AMPc qui pourraient réguler des cibles non désirées/non spécifiques et contrôler la concentration en composants/substrats dans le compartiment.

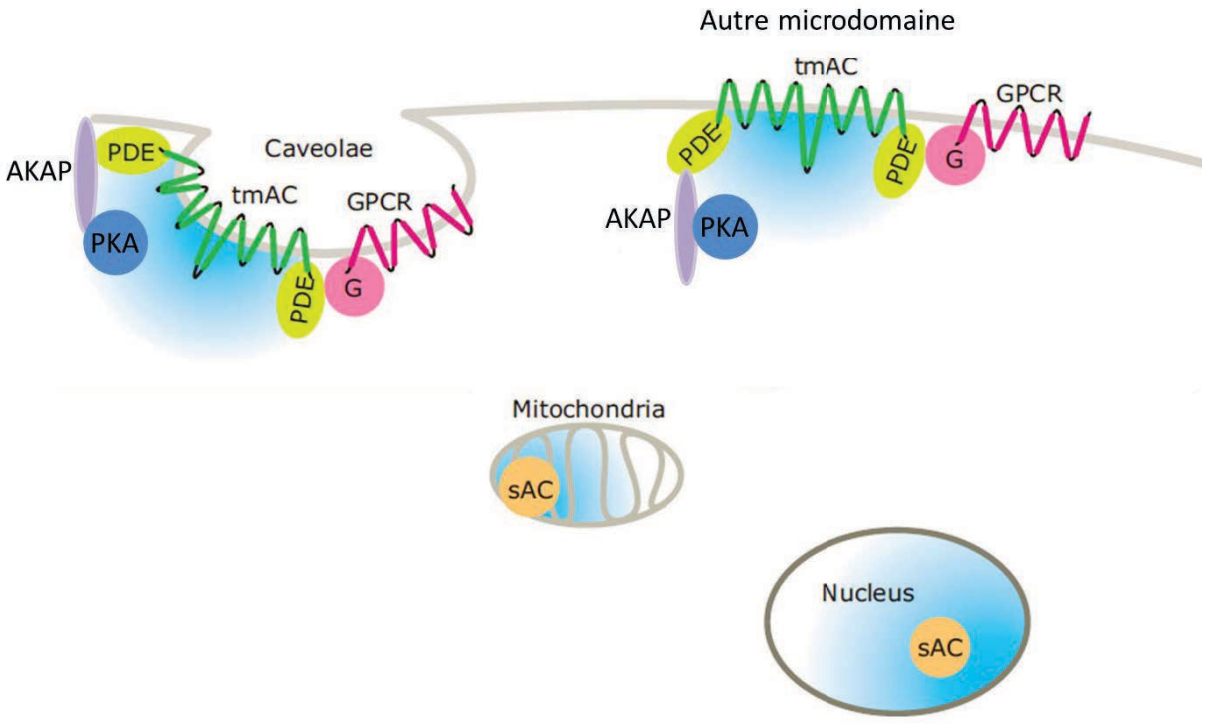


Figure 18 : Microdomaines de signalisation AMPc ((Bundey and Insel, 2004).
Les protéines d'échaffaudage AKAP forment des microdomaines autour des sites de synthèse d'AMPc par les adénylates cyclases trans-membranaires (tmAC) et par l'AC soluble (sAC). Elles forment des complexes protéiques incluant la PKA (permettant la transmission du signal AMPc à ses effecteurs) et des phosphodiestérases (PDE) dégradant l'AMPc afin de limiter sa diffusion.

2- Composition d'un microdomaine de signalisation AMPc

Les phosphodiestérases (PDEs) sont les enzymes de dégradation de l'AMPc : elles convertissent le 3'-5' AMPc en 5'AMP (Lugnier, 2006). Elles constituent ainsi une barrière empêchant la diffusion des signaux AMPc. Il existe 11 familles de PDEs, plus de 20 gènes ont été identifiés codant pour plus de 50 isoformes différentes. Les PDEs de chaque famille présentent une structure et une régulation différentes. Certaines familles de PDEs hydrolysent seulement l'AMPc, certaines seulement le GMPc et certaines familles ne sont pas spécifiques et hydrolysent l'AMPc et le GMPc. La distribution des différentes PDEs dans le cerveau de rat et de souris a été décrite récemment (Kelly et al., 2014). Une étude a décrit l'expression de la PDE4 dans la rétine de rat : trois isoformes différentes de PDE4 sont exprimées par les CGRs (Whitaker and Cooper, 2009). Différentes PDEs peuvent être exprimées dans le même type cellulaire, avoir différentes localisations sub-cellulaires et être associées à des réponses cellulaires spécifiques (Mongillo et al., 2004; Hepp et al., 2007).

Il a été montré que l'AMPc pouvait voyager sur de longues distances dans la cellule (Kasai and Petersen, 1994; Vincent et al., 2012), notamment des terminaisons axonales ou des dendrites jusqu'au soma afin d'enclencher une synthèse protéique en réponse à certains stimuli (Emptage and Carew, 1993). Ces données contredisent en quelque sorte l'idée d'une compartimentation de la signalisation AMPc qui sous-tend une spécificité fonctionnelle. Cependant, les PDEs pourraient en fait non seulement jouer le rôle de non-diffusion des signaux AMPc générés au sein d'un microdomaine particulier en réponse à un stimulus donné, mais aussi le rôle de protection des effecteurs localisés dans un microdomaine contre une activation non appropriée par des signaux AMPc qui ont besoin de voyager et diffuser dans la cellule.

La protéine kinase A (PKA) est l'effecteur principal de l'AMPc. Cette enzyme est constituée de 4 sous-unités : 2 sous-unités régulatrices (R) et 2 sous-unités catalytiques (C) Taylor *et al.*, 1990. L'intéraction des sous-unités régulatrices avec les sous-unités catalytiques inhibe l'activité enzymatique de la PKA. Chaque sous-unité régulatrice présente 2 sites de liaison à l'AMPc ; la fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices entraine un changement de conformation de ces sous-unités suivi de leur dissociation

des sous-unités catalytiques. Les sous-unités catalytiques, libérées de leur intéraction avec les sous-unités régulatrices deviennent actives et peuvent ainsi phosphoryler leurs protéines cibles. Lorsque la concentration en AMPc diminue, les sous-unités régulatrices perdent leur ligand et interagissent à nouveau avec les sous-unités catalytiques entrainant leur inhibition (Tasken and Aandahl, 2004).
4 sous-unités régulatrices (RIα, RIβ et RIIα, RIIβ) et 4 sous-unités catalytiques différentes (Cα, Cβ, Cγ et PRKX) ont été identifiées (Skalhegg and Tasken, 2000). Il existe 2 types de PKA, I et II, selon qu'elles soient composées des sous-unités régulatrices I ou II (Lee et al, 1983 ; Scott et al, 1987). Les différentes sous-unités R de la PKA ont des affinités différentes pour l'AMPc.

La sous-unité de type II de la PKA est enrichie dans les cônes de croissance et cette localisation lui permet de médier les effets de l'AMPc dans le guidage axonal (Han et al., 2007).

Une autre famille de protéines est activée par l'AMPc : les protéines Epac (exchange protein directly activated by cAMP). Il existe deux isoformes Epac, Epac 1 et Epac 2. Dans les cellules, les protéines Epac peuvent être localisées dans les mitochondries, le cytosol, le noyau, aux membranes nucléaires et plasmiques et en périnucléaire (Breckler et al, Cell.Signalling **23**, 1257–1266). Cette localisation suggère que les protéines Epac seraient plutôt activées par des signaux AMPc générés par l'AC soluble. Selon sa localisation sub-cellulaire, Epac est capable d'activer différents effecteurs (Breckler et al., 2011). Les protéines Epac sont exprimées dans le SNC, où leur implication dans différentes fonctions commence à être identifiée telles que la différenciation des neurones, la croissance axonale, la mémoire et l'apprentissage (Laurent et al, 2011).

Les AKAPs (PKA-anchoring proteins) sont des protéines d'échaffaudage qui permettent d'ancrer les PKA à différentes localisations subcellulaires à proximité de leurs substrats (Gao et al., 1997; Cantrell et al., 1999; Klussmann et al., 1999; Fraser et al., 2000; Carnegie and Scott, 2003). En effet, il existe de nombreuses isoformes de protéines AKAPs et chaque isoforme a une séquence particulière d'adressage à une localisation sub-cellulaire (membrane plasmique, noyau, mitochondrie, cytosquelette ; (Wong and

Scott, 2004). La majorité des AKAPs interagissent avec la sous-unité RII de la PKA. Outre leur interaction avec la PKA, chaque isoforme AKAP peut interagir spécifiquement avec un ensemble de protéines différentes telles que des protéines kinase, des PDEs, des phosphatases, des récepteurs trans-membranaires, des canaux ioniques, les protéines Epac. Les AKAPs créent ainsi des complexes protéiques et semblent permettre une compartimentation spatiale et une spécificité et efficacité fonctionnelle des signalisations intra-cellulaires dépendantes de la PKA (Wong and Scott, 2004). Par exemple, chez la drosophile, la fixation de la sémaphorine 1a, molécule de guidage, à son récepteur, plexin A entraine une répulsion de l'axone. La signalisation PKA permet d'antagoniser cet effet et le domaine de liaison de Nervy, membre de la famille AKAP, à la PKA est nécessaire à cette régulation (Terman and Kolodkin, 2004).

3- Etudes de la compartimentation de la signalisation AMPc

Il est maintenant possible de visualiser les signaux AMPc, GMPc, calciques ainsi que l'activité de la PKA au moyen de sondes spécifiques (FRET, GcaMP…) et ceci à une résolution spatiale (adressage des sondes spécifiquement à certains compartiments) et temporelle de plus en plus fine.

La compartimentation de la signalisation AMPc a été découverte et principalement étudiée dans les cardiomyocytes. La signalisation AMPc, dépendante des ACs 5 et 6, au sein des cardiomyocytes permet de médier la régulation sympathique de la contractilité et relaxation cardiaques. Les régulateurs et effecteurs de l'AMPc impliqués dans différents aspects de ces fonctions ont des localisations sub-cellulaires différentes et la spécificité fonctionnelle de l'AMPc est permise par des PDEs (Mika et al., 2012).

Ainsi, les catécholamines telles que la noradrénaline se fixent aux récepteurs β-adrénergiques exprimés à la surface des cardiomyocytes et entrainent une cascade de signalisation intracellulaire : stimulation de l'AC par activation de la protéine Gs, synthèse d'AMPc qui active la PKA, phosphorylation par la PKA de protéines impliquées dans la contraction cardiaque telles que les canaux calciques de type L (CCTL), phospholamban (PLB), les récepteurs à la ryanodine (régulateur des canaux calciques), la troponine I (TnI), la protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C). Les cardiomyocytes expriment par ailleurs des récepteurs à la prostaglandine E1 (PGE1).

La stimulation du récepteur à la PGE1 et la stimulation du récepteur beta adrénergique par les cathécolamines entrainent toutes deux la production d'AMPc mais entrainent des réponses spécifiques différentes. La stimulation par isoproterenol, activateur spécifique des récepteurs β-adrénergiques, augmente la synthèse d'AMPc dans le compartiment contenant la sous-unité RII de la PKA alors que la stimulation par la PGE1 augmente l'AMPc dans le compartiment contenant la sous-unité RI de la PKA (Di Benedetto et al., 2008). Ainsi, la spécificité de réponse induite par l'activation des récepteurs β-adrénergiques ou des récepteurs à la PGE1 peut être expliqué par des signalisations qui ont lieu dans des compartiments différents.

De plus, il existe en fait deux types de récepteurs β-adrénergiques, les récepteurs de type 1 et de type 2. De façon surprenante, bien que ces 2 types de récepteurs aboutissent à la production d'AMPc au sein des cardiomyocytes, ils entrainent des réponses cellulaires différentes par la régulation d'effecteurs différents : par exemple, la stimulation des récepteurs β1-adrénergiques entraine la phosphorylation des LTCC, RyR2, PLB, TnI et MyBP-C alors que la signalisation des récepteurs β2-adrénergiques est restreinte à la membrane cellulaire et active seulement les LTCC (Xiao and Lakatta, 1993; Xiao et al., 1994; Calaghan et al., 2008). En fait, il a été montré que les récepteurs β1 et β2-adrénergiques ne sont pas localisés dans les mêmes compartiments dans la cellule : les récepteurs β2 sont localisés dans les tubules T qui forment des stries alors que les récepteurs β1 sont distribués à travers toute la membrane plasmique (Nikolaev et al., 2010). Ainsi, la spécificité fonctionnellle de chacun des deux types de récepteur β-adrénergique est liée au fait qu'ils sont confinés à des compartiments distincts.

Dans les neurones, il y a peu d'études qui ont directement testé l'hypothèse de compartimentation spatiale de la signalisation AMPc. Une expérience a tout de même été réalisée, elle renforce l'idée de compartiments AMPc (Nicol et al., 2011). Il est connu que le cône de croissance d'un axone de neurone de moelle épinière de xénope est attiré par la nétrine-1. Il est possible de contrôler la production de signaux AMPc par expression d'une AC photoactivable. Au sein même du cône de croissance, la production de signaux AMPc spécifiquement au niveau des filopodes mime l'attraction du cône en réponse à la nétrine alors que la production de signaux AMPc au centre du cône au niveau du

lamellipode ne mime pas cette réponse. Ce résultat renforce l'idée que la spécificité fonctionnelle de la signalisation AMPc serait liée à sa localisation sub-cellulaire.

4- Adressage des ACs à différents compartiments sub-cellulaires

Il est maintenant établi que les différentes ACs sont adressées à des microdomaines particuliers (Figure 18) : les ACs qui sont sensibles au calcium (ACs 1, 3, 5, 6 et 8) sont spécifiquement adressées aux radeaux lipidiques tandis que celles qui sont insensibles au calcium (ACs 2, 4 et 7) ainsi que l'AC9 ne le sont pas (Willoughby and Cooper, 2007). Etant donné que les radeaux lipidiques contiennent les canaux calciques capacitatifs, l'adressage des ACs calcium-sensitives aux radeaux lipidiques semble crucial pour leur proximité avec les voies d'entrée du calcium dans la cellule. L'AC soluble est localisée dans le cytosol, le noyau, la mitochondrie, les structures du cytosquelette tel que le centrosome (Bundey and Insel, 2004).

Les radeaux lipidiques sont enrichis en sphingolipides et cholestérol ; ils forment ainsi des microdomaines distincts du reste de la membrane plasmique qui est plutôt riche en glycérophospholipides. Dans différents types cellulaires, les radeaux lipidiques peuvent contenir des protéines trans-membranaires d'échaffaudage, les cavéolines, qui permettent de former une sous-population de radeaux lipidiques invaginés au niveau de la membrane, nommés cavéoles. Les radeaux lipidiques sont considérés comme des plateformes de signalisation qui permettent de regrouper des protéines impliquées dans les mêmes fonctions cellulaires et de faciliter ainsi leur interaction et leur efficacité.

Les radeaux lipidiques sont des structures dynamiques qui se font et se défont et la composition en protéines des radeaux lipidiques aussi est dynamique. En réponse à certains stimuli par exemple, des récepteurs peuvent être recrutés ou exclus (Pike, 2003). L'endocytose des radeaux lipidiques permet d'internaliser certains composants et mettre ainsi fin à leurs signalisations.

Dans les neurones, les radeaux lipidiques sont impliqués dans de nombreuses fonctions telles que la polarité cellulaire (Ledesma et al., 1998), la morphologie et la densité des épines (Hering et al., 2003), le trafic de récepteurs et leur signalisation (Bruses et al.,

2001; Tsui-Pierchala et al., 2002; Allen et al., 2007). Par ailleurs, différentes données montrent que les radeaux lipidiques forment des microdomaines au sein des cônes de croissance, importants pour la croissance et le guidage axonal. En effet, il a été montré que l'intégrité des radeaux lipidiques était requise à la réponse des axones au BDNF, à la netrine-1 et à la sémaphorine 3A (Guirland et al., 2004). La localisation du récepteur DCC à la nétrine 1, dans les radeaux lipidiques est nécessaire à la réponse de l'axone à cette molécule de guidage (Herincs et al., 2005). L'adressage de la protéine kinase Akt dans les radeaux lipidiques est nécessaire au branchement axonal et à l'expansion du cône de croissance (Grider et al., 2009).

Outre la régulation spatiale, la régulation temporelle des signaux AMPc est importante pour leur fonction. L'activité neurale est requise pour la réponse des axones rétiniens à l'éphrine A5. La restauration de la rétraction axonale bloquée par l'absence d'activité est obtenue par la génération d'oscillations des niveaux d'AMPc, mais pas par la stimulation continue des AC (Nicol et al., 2007).
De plus, les niveaux d'AMPc sont importants pour leur fonction. La nétrine-1 induit une attraction du cône de croissance médiée par les signaux AMPc. Au niveau de la tête du nerf optique en revanche, la laminine-1 (protéine de la matrice extra-cellulaire) convertit l'effet de la nétrine-1 en répulsion via une modulation des niveaux d'AMPc : un faible niveau d'AMPc est lié à une une répulsion induite par la nétrine-1 (Hopker et al., 1999).

RESULTATS

ARTICLE 1

Résumé Article 1

L'activité spontanée rétinienne est importante pour le raffinement des projections rétiniennes dans leurs cibles : pour la formation de la carte œil spécifique et pour le raffinement de la rétinotopie. L'activité spontanée peut jouer un rôle à différentes étapes du développement des projections rétiniennes : pendant la phase de guidage axonal, de synaptogénèse ainsi que de raffinement des contacts synaptiques. Au niveau de la cellule, l'activité peut agir via différents mécanismes : via la transcription de gènes, via la modulation de voies de signalisation intra-cellulaires dépendantes du calcium ou de l'AMPc, via la libération synaptique.

Etant donné que la majorité des études menées sur le rôle de l'activité dans le développement des cartes visuelles a été réalisée en perturbant globalement l'activité rétinienne, les mécanismes activité-dépendants impliqués dans chaque étape du raffinement des projections rétiniennes ne sont pas bien identifiés. C'est pourquoi, j'ai cherché à déterminer précisément le rôle de la libération synaptique calcium-dépendante dans le raffinement des cartes visuelles en utilisant un modèle où Rim 1 et 2, protéines essentielles à la libération synaptique calcium-dépendante, sont délétées dans les CGRs.

J'ai montré que la libération synaptique calcium-dépendante était nécessaire au processus de ségrégation œil spécifique dans le CGLd mais pas dans le CS. Ce résultat suggère que la ségrégation œil spécifique implique une compétition synaptique entre les axones provenant des deux yeux pour occuper un territoire particulier dans le CGLd. Dans le CS en revanche, la rétraction des projections ipsilatérales du territoire controlatéral implique des mécanismes activité-dépendants qui ne passent pas par la libération synaptique.

Par ailleurs, la perturbation de la libération synaptique induit un défaut de topographie de la projection ipsilatérale mais n'affecte pas la topographie des projections controlatérales. Dans le CGLd, des projections ipsilatérales ectopiques sont présentes dans le territoire controlatéral. Dans le CS, la projection ipsilatérale est plus étendue en caudal le long de l'axe médio-latéral de manière ectopique et elle n'est pas organisée en amas. Ces données suggèrent soit que la libération synaptique est nécessaire spécifiquement à la réponse des axones ipsilatéraux à certaines molécules de guidage dans le CS, soit que la libération synaptique est nécessaire à la mort cellulaire développementale de certaines CGRs ipsilatérales localisées en dehors du croissant VT de la rétine dont la zone de terminaison se situe dans le CS caudal.

Le fait que la libération synaptique ne soit pas importante pour le raffinement de la rétinotopie des projections controlatérales est intéressant car il remet en cause l'idée « Hebbienne » de compétition synaptique entre projections du même œil pour raffiner globalement la zone de terminaison. Il n'est toutefois pas exclu que la libération synaptique soit nécessaire au raffinement fin de la rétinotopie, non évalué ici.

Ainsi, ce travail a permis de préciser à quel niveau du développement des projections rétiniennes, l'activité agissait via la libération synaptique calcium-dépendante.

Differential requirement of presynaptic release for eye-specific and topographic retinal maps

Ahlem Assali [1,2,3], Mohamed Bennis [4], Pascal Kaeser [5], Thomas Südhof [5], Xavier Nicol[6,7,8], Patricia Gaspar [1,2,3,], Alexandra Rebsam [1,2,3,*]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S 839, 75005, Paris, France,

[2]Université Pierre et Marie Curie, 75005, Paris, France,

[3]Institut du Fer à Moulin, 75005, Paris, France,

[4]Cadi Ayyad University, Marrakesh, Morocco

[5]Howard Hughes Medical Institute, Stanford University, Stanford, USA

[6]CNRS, UMR_7210, Paris, F-75012, France

[7]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France

[8]INSERM, U968, Paris, F-75012, France

E-mail :

ahlem.assali@inserm.fr, mbennis@uca.ma, kaeser@hms.harvard.edu, tcs1@stanford.edu, patricia.gaspar@inserm.fr, alexandra.rebsam@inserm.fr

*Corresponding author: Alexandra Rebsam, INSERM U839, Institut du Fer à Moulin, 17 rue du fer à moulin, 75005, Paris, France. Phone: +33 1 45 87 61 27; Fax: +33 1 45 87 61 32; email: alexandra.rebsam@inserm.fr

Key Words: retinal ganglion cell, axon, retinogeniculate, visual, patterning, retina, activity, retinotectal, synaptic release, activity, ipsilateral, contralateral, development

abstract (237 words), introduction (x words), discussion (x words).

Acknowledgements: We thank members of the Gaspar lab for helpful discussions and critical review of the manuscript. This research was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the ANR, INSERM and UPMC. Ahlem Assali was awarded doctoral fellowships by the French Ministry of Research and Rétina France.

Abstract

Development of proper retinal connections requires neural activity. As most of studies have been done by globally disturbing neural activity, the precise activity-dependent cellular mechanisms involved in each step of visual map refinement remain poorly understood. To assess the role of synaptic release in the refinement of retinal projections within their main targets, the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and the superior colliculus (SC), we used a mouse model where retinal ganglion cells (RGCs) are conditionally invalidated for Rim 1 and 2 proteins (Rim cDKO), which control calcium dependent synaptic exocytosis.

Ipsilateral and contralateral retinal projections initially overlap and then segregate into eye specific domains through activity-dependent mechanisms. Similarly, neighboring RGCs connect neighboring target cells but during development, this topographic organization involves an activity-dependent step where the larger termination zone (TZ) of neighboring RGCs refines to become more focal.

Eye specific segregation in the dLGN but not in the SC is impaired in the Rim cDKO suggesting that calcium dependent synaptic release is required for eye specific segregation only in the dLGN. Interestingly, the topography of ipsilateral axons in the dLGN and SC is perturbed in the Rim cDKO but not the topography of controlateral axons in the SC indicating a specific role of synaptic release from the retina to its targets in the ipsilateral topography refinement. Thus, we show a discrimination between a synaptic versus a non synaptic role of retinal activity in retinal projection refinement.

Introduction

Establishment of specific neural connections during development requires the remodeling of axonal branches with the elimination of improper collaterals and a dense branching at the appropriate location. The role of activity in these refinement steps has been extensively studied in the visual system (Huberman et al., 2008), but most studies have focused on perturbing the neuronal activity in the retina (Rossi et al., 2001; McLaughlin et al., 2003; Rebsam et al., 2009) and do not distinguish what feature dependent of RGC activity is important for the formation of retinal maps. Retinal ganglion cell (RGC) projections in their main targets, the Superior Colliculus (SC) and the dorsal Lateral Geniculate Nucleus (dLGN), form two organized maps: an eye-specific map with segregated ipsilateral and contralateral RGC projections and a topographic map (retinotopy) with neighboring RGCs connecting neighboring target cells. At birth, ipsilateral and contralateral projections overlap and then segregate to form eye specific domains during the first postnatal week (Godement et al., 1984; Jaubert-Miazza et al., 2005). Moreover, retinal projections initially overshoot their termination zone (TZ) within the targets and then retract and refine to form precise retinotopic connections

During the establishment of these two levels of organization, waves of spontaneous and correlated neuronal activity occur in the retina (Galli and Maffei, 1988; Wong et al., 1993). This spontaneous and correlated activity within neighboring retinal cells is transmitted from the RGCs to their brain targets through synaptic release of glutamate (Mooney et al., 1996; Ackman et al., 2012). Perturbing spontaneous retinal activity genetically or pharmacologically leads to defects in both eye specific segregation and retinotopic refinement (Rossi et al., 2001; McLaughlin et al., 2003; Rebsam et al., 2009). Neurotransmission at retinogeniculate and retinocollicular synapses could drive the connectivity refinement through synaptic competition between the projections to occupy a specific territory for eye specific segregation (Penn et al., 1998; Stellwagen and Shatz, 2002) and to connect specifically located target neurons for retinotopy establishment (Butts et al., 2007).

Here, we focused on the role of synaptic release from the RGCs to their main targets in the visual map establishment. Rim 1 and 2 are scaffolding proteins acting at the presynaptic active zone, involved in vesicle priming (Deng et al., 2011) and in vesicle fusion efficacy (Kaeser et al., 2011). We strongly reduced the calcium-dependent synaptic release at RGC terminals by a conditional deletion of Rim 1 and 2 genes in RGCs.

We found that synaptic release from RGCs to their targets is required for eye specific segregation in the dLGN but not for correct eye specific lamination in the SC. Furthermore, synaptic release is important for a correct refinement of the ipsilateral innervation in the SC and in the dLGN.

However, surprisingly synaptic release is not necessary for global retinotopy establishment in the SC.

Materiel and methods

Animals

$Rim1^{flox/flox}Rim2^{flox/flox}$ mouse line (Kaeser et al., 2008; Kaeser et al., 2011) is a gift from P. Kaeser and T. Sudhof (Stanford university, USA). This line was maintained on a mixed 129Sv x C57BL/6 background at the Institut du Fer à Moulin. Serotonin transporter (Sert) Cre mouse line is a knock-in of NLS-Cre in the 5'UTR region of Sert gene (Zhuang et al., 2005). This line was maintained on a C57BL/6 background.

$Rim1^{flox/flox}Rim2^{flox/flox}$ females were crossed to $Sert^{Cre/+}$ $Rim1^{flox/flox}Rim2^{flox/flox}$ males (Narboux-Neme et al., 2008). For the study, we used $Sert^{Cre/+}$ $Rim1^{flox/-}Rim2^{flox/-}$ mice (Narboux-Neme et al., 2012), reffered to as Rim conditional double knock-out (Rim-cDKO) and $Sert^{+/+}Rim1^{flox/-}Rim2^{flox/-}$ mice, refered to as controls (Ctrl). In their home cages, Rim-cDKO could not be distinguished from their control littermates and showed normal survival rates. For genotyping, PCR (described in Kaeser et al, 2008 and 2011) were conducted on tail lysates obtained by tissue immersion in 50mM NaOH at 95°C during 1 hour and neutralisation with 1M Tris-HCl.

For the recombination study, the Sert Cre mouse line was crossed to the reporter mouse line $Tau^{mGFP\text{-}NLS\text{-}LacZ}$ which is a knock-in in the Tau gene of a stop cassette flanked by loxP sites, a MARCKS sequence fused to the green fluorescent protein (GFP) and an IRES-NLS-LacZ cassette (Hippenmeyer et al., 2005).

Experiments were conducted in compliance with the standard ethical guidelines (European community guidelines and French Agriculture and Forestry Ministry guidelines for handling animals—decree 87849).

Anterograde labeling of retinogeniculate and retinocollicular projections

Adult mice were anesthetized with ketamine-xylazine (93.75mg/kg and 12.5 mg/kg respectively, in 0.9% saline). Pups were anesthetized on ice during 5-8 min.

For whole eye labeling, whole eyes of P6 and P24 mice were injected with a glass micropipette intravitreally by 2-3 µl of 0.2% cholera-toxin subunit B (CTB ; Molecular Probes) conjugated to AlexaFluor 594 (left eye) or 488 (right eye) diluted in 1% DMSO.

Focal injections of liquid DiI (Molecular probes ; 0.4% in 4% dimethylformamide and 10% sucrose) into the nasal (right eye) or temporal (left eye) retinal quadrants of P13 mice were performed using a Picospritzer® III pressure injection system.

Three or two days after CTB or DiI injection respectively, mice were anesthetized with pentobarbital (545.7mg/kg) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.12M phosphate buffer (PB).

Concerning CTB injections, brains were postfixed overnight in 4% PFA, cryprotected 2 days in 30% sucrose in PB and sectioned with a freezing microtome (60µm). Sections were directly mounted in Mowiol DabCo (Calbiochem ; Sigma). Concerning DiI injections, brains and eyes were postfixed overnight in 4% PFA. Whole superior colliculi and retinas were dissected and mounted in Mowiol DabCo. Four peripheral incisions were done to flatten retinas before mounting.

Retrograde tracing of retinal ganglion cells (RGCs)

$Sert^{Cre/+}$ $Tau^{mGFP\text{-}NLS\text{-}LacZ/+}$ adult mice (2 months) were anesthetized with ketamine-xylazine (93.75mg/kg and 12.5 mg/kg respectively, in 0.9% saline) and fixed in a stereotaxic apparatus (Kopf). Glass micropipettes were pulled (tips broken) and filled with Fluorogold 5% (Molecular Probes) in 0.9% saline. Stereotaxically guided injections were performed in the right dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) through a hole in the dorsal surface of the cranium. Fluorogold injections (0.2-0.3µL) were targeted to the dLGN using the following coordinates : 2.5 mm caudal to the bregma, 2.2 mm lateral to the midline, and 2.5 mm depth from the brain surface. After injection with a nanoinjector (Narishige), micropipettes were left in place 10 min before removal to minimize leakage.

After a 5-day survival, mice were perfused. Brains and eyes were postfixed overnight in PFA. Whole retinas were dissected and mounted in Mowiol DabCo. To check the injection site, brains were sectionned with a vibratome (100µm) and mounted in Mowiol DabCo.

Quantitative analyses were done in cases where the injections were correctly positioned and filling the entire dLGN.

Immunohistochemistry

Mice were euthanized with an overdose of pentobarbital-xylazine and perfused transcardially with 4% PFA in 0.12M PB. Eyes were postfixed overnight in the same fixative, cryoprotected with 10% sucrose in PB during 2 days. Eyes were then embedded with 7.5% gelatin and 10% sucrose in PB frozen 1 minute in isopentane at – 55°C. Eyes were sectioned with a cryostat (20µm; Leica CM 3000) and collected on superfrost slides. Slides were stocked at -20°C.

Sections were first washed in PBS and incubated in PGTx (0.2% gelatin and 0.25% Triton X-100 in PBS) for 1 hour. Sections were then incubated overnight at 4°C in primary antibody solution diluted in PGTx : anti-βGal (1/5000, Rockland), anti-ChAT (1/200, Chemicon). Finally, sections were washed in PBS, incubated during 2 hours in secondary antibody solution (1/500 in PGTx) with DAPI (1/2000), washed again and mounted in mowiol-Dabco.

For Brn3 immunostaining (1/200, Santa Cruz), the first incubation and the antibody solutions were done with BSA 0.5% in PBS-Tween 0.02%. This antibody marks the Brn3a, b and c leading to the labeling of 80% of RGCs (Xiang et al., J. Neurosci., 1996; Gan et al., PNAS,1995).

Recombination analysis

Using Cell Counter of Image J software, the proportion of recombined RGCs has been quantified in the 4 square images taken in the 4 different quadrants of flattened retinas by counting the number of βGal positive cells among the fluorogold positive cells. This was done in contralateral and ipsilateral retinas to the injection site.

Analysis of the number, distribution, and segregation of ipsilateral fibers in the dLGN

Quantification of eye-specific segregation was performed on 10× images obtained with a 10x/0.40 objective of a Leica DM 6000B fluorescent microscope from three consecutive coronal sections through the region of the dLGN containing the greatest extent of the ipsilateral projection. We have used variable thresholds for the contralateral projection and a fixed threshold for the ipsilateral projection (as in Rebsam et al, 2009). As Alexafluor-594 labeled contralateral/Alexafluor-488 labeled ipsilateral projections had a better signal to noise ratio, we conducted our analyses on these images. Using Metamorph software (Molecular Devices), the boundary of the dLGN was outlined, excluding the intrageniculate leaflet, the vLGN and the optic tract. The overlap between ipsilateral and contralateral projections (pixel overlap) was measured at every tenth threshold value for the

contralateral image to obtain the curve function of overlap between ipsilateral and contralateral projections as previously described (Muir-Robinson et al., 2002; Rebsam et al., 2009). Statistical analyses were performed using an ANOVA test.

Briefly, using Metamorph software, the proportion of ipsilateral projections within the dLGN was measured as a ratio of ipsilateral pixels to the total number of pixels in the dLGN. Statistical analyses were performed using a Student's t-test.

The extent of ipsilateral projections within the dLGN was measured by two ways. First, the boundary of the ipsilateral territory and the boundary of the dLGN were outlined and the obtained ipsilateral area was divided by the obtained whole dLGN area. Second, a line was traced along the dorsoventral or mediolateral axis of the dLGN between the two points delineating the maximal extent of the ipsilateral signal and a parallel line was traced along the two points delineating the maximal extent of the dLGN itself. Then, the length of the ipsilateral projection was divided by the dLGN length for each axis. Statistical analyses were performed using a Student's t-test.

Analysis of the number and distribution of ipsilateral projections in the SC

All the analysis were conducted by doing the average on three consecutive coronal sections of the SC for the rostral part where the ipsilateral projection is distributed along the mediolateral axis of the SC and on three consecutive coronal sections of the SC for a more caudal part where the ipsilateral projection is restricted to the medial part of the SC.

Using Metamorph software, the proportion of ipsilateral projections within the SC was measured as a ratio of ipsilateral pixels to the total number of pixels in the SC. Statistical analyses were performed using a t-test.

The lateral extent of ipsilateral projections within the SC was measured by tracing the boundary of the ipsilateral projection and the boundary of the whole SC and the obtained ipsilateral area was divided by the obtained whole SC area. Statistical analyses were performed using a t-test.

Analysis of the retinotopy of contralateral fibers

Images of whole flattened dorsal SC were captured with a fluorescent macroscope (Olympus MVX10X). A threshold has been applied to DiI pixels and a threshold has been applied such that the whole SC was saturated. Using Metamorph software, the DiI patch size was measured as a ratio

of DiI pixels to the total number of pixels in the SC. This was done blind to genotype. Statistical analyses were performed using a t-test.

Results

Expression of cre recombinase in RGCs

The deletion of Rim 1 and 2 in neurons leads to a strong reduction in the calcium-dependent synaptic release (Narboux-Neme et al., 2012) (Kaeser et al., 2008; Han et al., 2011). Hence, in order to reduce the calcium dependent synaptic release in RGCs, we produced a Rim conditional double knock out mouse model (Rim cDKO) by crossing Rim 1 and 2 floxed mice with mice expressing the cre recombinase under the control of the serotonin transporter (sert) promoter, expressed in RGCs.

Sert expression is restricted to the peripheral ventro-temporal crescent of the retina in the RGCs projecting ipsilaterally (Upton et al., 1999). To characterize the recombination in our model, we crossed the Sert Cre line with a reporter mouse line expressing NLS-LacZ under the Tau promoter (Fig.1). On whole flattened retinas of P7 and adult mice, we found recombined cells across all the retina, not only in the VT crescent (Fig.1B). On retinal sections labeled with βGal/DAPI staining, recombined cells were found in the RGC layer (Fig.1B-E) as expected and did not colocalize with displaced starbust amacrine cells labeled with Choline Acetyl Transferase (ChAT) (Fig.1C) at P7. The retinal waves of spontaneous activity are initiated by the starburst amacrine cells and are transmitted to the RGCs through ACh release. Using confocal imaging at high magnification, no starbust amacrine cells labeled with ChAT marker were colocalized with βGal staining. ACh neurotransmission from amacrine cells to RGCs should not be affected in our model, thus allowing normal retinal waves.

To quantify the number of recombined RGCs, RGC retrograde labeling was done by injecting fluorogold into the dLGN of 2 months old mice. We found that 98% of the fluorogold retrogradely labeled RGCs were colocalized with the βGal positive recombined cells (Fig 1F-H). Otherwise, 15% of the βGal positive cells were not fluorogold positive, possibly explained by eventual incomplete injections and by the fact that all the RGCs do not project to the dLGN. When quantified at P7, 40% of Brn3+ RGCs were βGal positive (n=2 so far, quantification to be finished before manuscript submission). As Brn3+ RGCs represent 80% of RGCs (Xiang et al., 1995; Gan et al., 1996), this suggests that at least 1/3 of RGCs are recombined at P7 in our model.

Together these data indicate that at least 1/3 of RGCs should be Rim cDKO with a strong reduction of the calcium dependent release at retinogeniculate and retinocollicular synapses and that the recombination is occuring before the refinement of retinal map; second that the retinal waves in our model should not be affected allowing a distinction between a synaptic versus a non synaptic role of neuronal activity in the establishment of retinogeniculate and retinocollicular connections.

Eye specific segregation defects in the dLGN of RimcDKO mice

To investigate the role of synaptic release from RGCs to dLGN neurons in the formation of eye specific domains, whole eye anterograde labeling (CTB injections) were performed in control and Rim cDKO mice (Fig.2). In control mice, there is a gap in the contralateral projection (Fig.2A') where the ipsilateral projection is located (Fig.2A). However, in Rim cDKO, the contralateral projection covers the entire dLGN (Fig.2B) so the ipsilateral and contralateral projections still overlap (Fig.2B''). Thus, eye-specific segregation is reduced in the dLGN of Rim cDKO (Fig. 2C) at P27. Similar defects were already observed at P9 (data not shown).

Moreover, there is a significant expansion of the ipsilateral projection in the dLGN of Rim cDKO compared to the control mice (Fig.2A,B), quantified in terms of area occupied by the ipsilateral inputs within the dLGN (Fig.2E) and in terms of distribution of the ipsilateral inputs along the medio-lateral and ventro-dorsal dLGN axis (Fig.S1, data not shown). So Rim cDKO mice would contain ectopic ipsilateral terminations in the contralateral territory (Fig.2A). However, there is no difference in terms of proportion of ipsilateral inputs between the Rim cDKO and control mice at P27, quantified in terms of ipsilateral pixel number over all dLGN pixel number (Fig.2D), suggesting that the number of ipsilateral fibers is similar but only their distribution is altered.

All these data together indicate that the calcium-dependent synaptic release from RGCs to dLGN neurons is absolutely required for eye specific segregation : both for the elimination of contralateral terminations from the ipsilateral territory and for the elimination of ipsilateral terminations from the contralateral territory.

Normal eye specific lamination but ipsilateral innervation defects in the SC of Rim cDKO mice

In the SC, contralateral axons project to the superficial part of the SC, the stratum griseum superficiale (SGS)(Fig.3A), and the ipsilateral projection is restricted to a deeper layer in the SC, the stratum opticum (SO)(Fig. 3A'). In Rim cDKO mice, this eye specific lamination occurs correctly as each projection occupies its right layer and no overlap is observed between the 2 types of projections (Fig.3B-B'').

During development, at P3, the ipsilateral projections have invaded the SC but overshoot their TZ, then retract to occupy only the very rostral part of the SC along all the medio-lateral axis of the SC (Godement et al., 1984; Dharmaratne et al., 2012), except in the very medial part where the mature projection branches all along the rostro-caudal axis. Thus, at P9 in control mice on coronal sections, the ipsilateral projection forms only one patch restricted to the medial part of the SC (Fig. 3C) except at the most rostral part where it forms several patches along the medio-lateral axis (Fig.3A). At P27, Rim cDKO present the same proportion of ipsilateral inputs than the control mice (Fig.3E,G) but instead of being organized in patches (Fig. A,C), the projection is spread and very diffuse (Fig.3B,D). Moreover, instead of being restricted to the medial part of the SC, in more caudal sections of the SC, there is a significant lateral extension of the ipsilateral projection compared to the control (Fig.3H), suggesting that the ipsilateral axons did not retract from the caudal part of the SC and moreover the ipsilateral projection seems to branch there ectopically.

To conclude, the calcium-dependent synaptic release from RGCs to the SC neurons is not involved in the eye specific lamination but is important for the refinement of the ipsilateral projection namely, for the retraction of the ipsilateral axons from the caudal SC and for the formation of ipsilateral patches in the SC.

Normal global retinotopy in RimcDKO

To determine if topographic mapping occurs normally when presynaptic release is perturbed, we performed focal DiI injections in the nasal and temporal part of the retina of control and Rim cDKO mice at P15.

Interestingly, no difference was found in the SC between the control and Rim cDKO mice (Fig 4). First, in RimcDKO mice, the patch was correctly located in the SC with temporal RGCs projecting to the anterior part of the SC (Fig. 4A,C) and nasal RGCs projecting to the posterior part of the SC (Fig.4B,D), suggesting that the calcium-dependent synaptic release is not involved in the axon guidance phase as expected. Second and more interestingly, there is no significant difference in the patch size between the control and Rim cDKO mice (Fig. 4E,F) suggesting that the global retinotopic refinement of the contralateral retinal projection is not dependent on synaptic release.

Discussion

Establishment of global retinotopy is not dependent on presynaptic release

Global retinotopy establishment requires spontaneous retinal activity, in addition to gradients of guidance cues such as Ephrins and Eph receptors to eliminate ectopic branches and to remodel the properly targeted terminal arborization (Pfeiffenberger et al., 2006). Activity is thought to act through synaptic competition between terminals depending on hebbian learning rules (Butts et al., 2007): neurotransmission from neighboring correlated RGCs to neighboring correlated target neurons could drive the elimination of the uncorrelated ectopic inputs coming from distant RGCs.

Surprisingly, in our study, we found that calcium-dependent synaptic release from the retina to its targets is not involved in the global retinotopy establishment. Our result demonstrates that the axon retraction at the right TZ in response to ephrin/Eph signaling is not dependent on presynaptic release as expected since retinal axons in activity perturbed models still project to the right TZ (McLaughlin et al., 2003; Chandrasekaran et al., 2005). More interestingly, since the DiI patch/TZ size in the Rim cDKO mice is normal, our result suggests that the global elimination of ectopic branches along the axons and the restriction of terminal arborization to a specific area important for the topographic refinement is not induced through retina-targets synaptic release dependent mechanisms, contesting the hebbian hypothesis at least at a large scale level.

Our result is coherent with Nicol et al. (2007), who demonstrated using retina-SC co-culture that the global topography ordering of retinal inputs is activity-dependent but not dependent on synaptic release. Huang and Pallas (2001) also showed in vivo that NMDA receptor blockade is not interfering with the global retinotopy establishment but is impairing a more fine scale level of retinotopic refinement.

Adenylate cyclase 1 KO mice present the same retinotopic defects, enlarged TZ (Ravary et al., 2001; Nicol et al., 2006; Dhande et al., 2012) than activity perturbed mice models suggesting that the activity could act presynaptically and cell-autonomously through AC1/cAMP signaling to drive the global refinement of the retinotopy independently of synaptic release. Moreover, the AC1/beta2 double KO mice do not present stronger defects than the simple KO (Dhande et al., 2012), supporting the idea that retinal activity and AC1/cAMP are acting through the same signaling pathway.

Eye specific segregation requires calcium-dependent synaptic release at retinogeniculate synapses

We found that synaptic release from RGCs to dLGN neurons is required to eliminate the contralateral terminations from the ipsilateral territory and to eliminate or to inhibit the formation of

ectopic ipsilateral terminations from the contralateral territory. Rim cDKO mice present exactly the same eye specific segregation defects than the activity-perturbed models such as the epibatidine-treated mice or the beta-2 KO mice (Rossi et al., 2001; Muir-Robinson et al., 2002; Rebsam et al., 2009). Thus, our result shows that retinal activity drives the eye specific segregation process in the dLGN through retina-dLGN synaptic release dependent mechanisms.

It is thought in the field that there is a synaptic competition between the retinal projections from both eyes to occupy their proper territory (Penn et al., 1998; Stellwagen and Shatz, 2002). Our Rim cDKO model cannot test the competition hypothesis because we induce a global neurotransmission decrease from ipsilateral and contralateral inputs so there is no competition at all, explaining may be why the map stays immature as in earlier stages. One study directly tested the synaptic competition hypothesis (Koch et al., 2011): Glutamate neurotransmission was perturbed specifically in the ipsilateral inputs and resulted in eye-specific segregation defects with no contralateral inputs retraction from the ipsilateral territory, indicating that the ipsilateral neurotransmission is absolutely required for the elimination of the contralateral inputs from the ipsilateral area. However, in contrast to our result, they found no defects in the distribution of the ipsilateral inputs: no ectopic ipsilateral fibers were present in the contralateral territory. In view of this previous finding, our own results suggest that the synaptic release from contralateral terminations is required to prune ectopic ipsilateral terminations from the contralateral territory.

Interestingly, a similar number of ipsilateral axons is found in the dLGN of Rim cDKO and controls, but their distribution is different, with diffuse ectopic terminals in the contralateral territory in Rim cDKO, instead of a concentration of ipsilateral terminals in the correct ipsilateral territory. This result suggests that synaptic activity would trigger a remodeling of the positioning of inputs by eliminating the mistargeted inputs and at the same time creating new inputs at the right place and strengthening the right ones.

NMDA receptor blockade does not impair/prevent eye-specific segregation in the dLGN (Smetters et al., 1994) but it does not question/contradict our result because in the absence of NMDA receptors, there is still correlated firing in LGN cells in response to the correlated activity in RGCs (Mooney et al., 1996). Moreover, mice with perturbed level of L-type Ca2+ channels present eye specific segregation defects (Cork et al., 2001) suggesting that the changes in retinogeniculate connectivity could be underlied by this type of channels rather than by NMDA receptors.

Presynaptic release is required for a correct refinement of the ipsilateral projections in the SC

At P3, the retinal axons overshoot their TZ and then retract to occupy only the very anterior part of the SC. Gradients of EphrinA/EphA signaling are known to drive this retraction to position the ipsilateral and contralateral axons at the right TZ (McLaughlin and O'Leary, 2005; Pfeiffenberger et al., 2006; Haustead et al., 2008). Surprisingly, we found that retina-SC synaptic release is specifically required for the topography of ipsilateral axons but not for the contralateral ones. However, Rim cDKO ipsilateral projections coming from the ventro-temporal part of the retina have not retracted from the posterior SC and moreover seem to branch there ectopically. This result suggests that the gradients of EphrinA/EphA supposed to drive the axon retraction at the right TZ are not sufficient to position correctly the ipsilateral projections as it is the case for the contralateral axons. Interestingly, ipsilateral axons seem to be more sensitive to activity than contralateral axons as in several rescue models of retinal activity or serotoninergic levels (Xu et al., 2011) (Upton et al., 2002, eye-specific segregation and topographic refinement are normal but ipsilateral projections in the SC are still exuberant. This strongly suggests that ipsilateral axons respond differently to activity changes. It would be interesting to investigate whether molecules affecting specifically ipilateral projection such as teneurins {Leamey, 2007 #244; Young et al., 2013) or expressed specifically in ipsilateral axons such as the serotonin transporter (Upton et al., 1999) could be activity-dependent and involved in the refinement process.

References

Ackman JB, Burbridge TJ, Crair MC (2012) Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. Nature 490:219-225.

Butts DA, Kanold PO, Shatz CJ (2007) A burst-based "Hebbian" learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement. PLoS Biol 5:e61.

Chandrasekaran AR, Plas DT, Gonzalez E, Crair MC (2005) Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. J Neurosci 25:6929-6938.

Cork RJ, Namkung Y, Shin HS, Mize RR (2001) Development of the visual pathway is disrupted in mice with a targeted disruption of the calcium channel beta(3)-subunit gene. The Journal of Comparative Neurology 440:177-191.

Deng L, Kaeser PS, Xu W, Sudhof TC (2011) RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. Neuron 69:317-331.

Dhande OS, Bhatt S, Anishchenko A, Elstrott J, Iwasato T, Swindell EC, Xu HP, Jamrich M, Itohara S, Feller MB, Crair MC (2012) Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development. The Journal of Comparative Neurology 520:1562-1583.

Dharmaratne N, Glendining KA, Young TR, Tran H, Sawatari A, Leamey CA (2012) Ten-m3 is required for the development of topography in the ipsilateral retinocollicular pathway. PLoS One 7:e43083.

Galli L, Maffei L (1988) Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. Science 242:90-91.

Gan L, Xiang M, Zhou L, Wagner DS, Klein WH, Nathans J (1996) POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93:3920-3925.

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.

Han Y, Kaeser PS, Sudhof TC, Schneggenburger R (2011) RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. Neuron 69:304-316.

Haustead DJ, Lukehurst SS, Clutton GT, Bartlett CA, Dunlop SA, Arrese CA, Sherrard RM, Rodger J (2008) Functional topography and integration of the contralateral and ipsilateral retinocollicular projections of ephrin-A-/- mice. J Neurosci 28:7376-7386.

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005) A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. PLoS biology 3:e159.

Huang L, Pallas SL (2001) NMDA antagonists in the superior colliculus prevent developmental plasticity but not visual transmission or map compression. Journal of neurophysiology 86:1179-1194.

Huberman AD, Feller MB, Chapman B (2008) Mechanisms Underlying Development of Visual Maps and Receptive Fields. Annu Rev Neurosci 31:479-509.

Jaubert-Miazza L, Green E, Lo FS, Bui K, Mills J, Guido W (2005) Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. Vis Neurosci 22:661-676.

Kaeser PS, Kwon HB, Chiu CQ, Deng L, Castillo PE, Sudhof TC (2008) RIM1alpha and RIM1beta are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions. J Neurosci 28:13435-13447.

Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Sudhof TC (2011) RIM proteins tether Ca2+ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. Cell 144:282-295.

Koch SM, Dela Cruz CG, Hnasko TS, Edwards RH, Huberman AD, Ullian EM (2011) Pathway-specific genetic attenuation of glutamate release alters select features of competition-based visual circuit refinement. Neuron 71:235-242.

McLaughlin T, O'Leary DD (2005) Molecular gradients and development of retinotopic maps. Annu Rev Neurosci 28:327-355.

McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD (2003) Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. Neuron 40:1147-1160.

Mooney R, Penn AA, Gallego R, Shatz CJ (1996) Thalamic relay of spontaneous retinal activity prior to vision. Neuron 17:863-874.

Muir-Robinson G, Hwang BJ, Feller MB (2002) Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers. J Neurosci 22:5259-5264.

Narboux-Neme N, Pavone LM, Avallone L, Zhuang X, Gaspar P (2008) Serotonin transporter transgenic (SERTcre) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). Neuropharmacology 55:994-1005.

Narboux-Neme N, Evrard A, Ferezou I, Erzurumlu RS, Kaeser PS, Laine J, Rossier J, Ropert N, Sudhof TC, Gaspar P (2012) Neurotransmitter release at the thalamocortical synapse instructs barrel formation but not axon patterning in the somatosensory cortex. J Neurosci 32:6183-6196.

Nicol X, Muzerelle A, Rio JP, Metin C, Gaspar P (2006) Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. J Neurosci 26:862-872.

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.

Penn AA, Riquelme PA, Feller MB, Shatz CJ (1998) Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. Science 279:2108-2112.

Pfeiffenberger C, Yamada J, Feldheim DA (2006) Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. J Neurosci 26:12873-12884.

Ravary A, Muzerelle A, Darmon M, Murphy DL, Moessner R, Lesch KP, Gaspar P (2001) Abnormal trafficking and subcellular localization of an N-terminally truncated serotonin transporter protein. Eur J Neurosci 13:1349-1362.

Rebsam A, Petros TJ, Mason CA (2009) Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. J Neurosci 29:14855-14863.

Rossi FM, Pizzorusso T, Porciatti V, Marubio LM, Maffei L, Changeux JP (2001) Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. Proc Natl Acad Sci U S A 98:6453-6458.

Smetters DK, Hahm J, Sur M (1994) An N-methyl-D-aspartate receptor antagonist does not prevent eye-specific segregation in the ferret retinogeniculate pathway. Brain research 658:168-178.

Stellwagen D, Shatz CJ (2002) An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity. Neuron 33:357-367.

Upton AL, Salichon N, Lebrand C, Ravary A, Blakely R, Seif I, Gaspar P (1999) Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. J Neurosci 19:7007-7024.

Upton AL, Ravary A, Salichon N, Moessner R, Lesch KP, Hen R, Seif I, Gaspar P (2002) Lack of 5-HT(1B) receptor and of serotonin transporter have different effects on the segregation of retinal axons in the lateral geniculate nucleus compared to the superior colliculus. Neuroscience 111:597-610.

Wong RO, Meister M, Shatz CJ (1993) Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. Neuron 11:923-938.

Xiang M, Zhou L, Macke JP, Yoshioka T, Hendry SH, Eddy RL, Shows TB, Nathans J (1995) The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. J Neurosci 15:4762-4785.

Xu HP, Furman M, Mineur YS, Chen H, King SL, Zenisek D, Zhou ZJ, Butts DA, Tian N, Picciotto MR, Crair MC (2011) An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development. Neuron 70:1115-1127.

Young TR, Bourke M, Zhou X, Oohashi T, Sawatari A, Fassler R, Leamey CA (2013) Ten-m2 is required for the generation of binocular visual circuits. J Neurosci 33:12490-12509.

Zhuang X, Masson J, Gingrich J, Rayport S, Hen R (2005) Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. Journal of neuroscience methods 143:27-32.

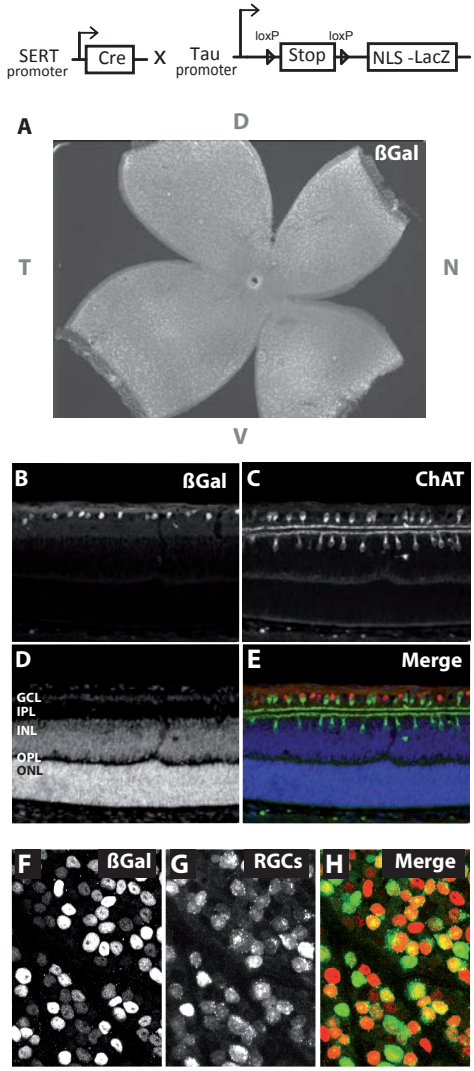


Figure 1: Cre recombination in the retina of Sert-Cre mice. A reporter mouse line was used to determine the retinal cells that express Cre recombinase. (A)Whole-mount retina after βGal immunostaining and βGal (B), ChAT (C) and DAPI (D) stainings on retinal sections in SertCre/+ TaumGFP-NLS-LacZ/+ mice at P7. Merged image (E) clearly shows that most recombined retinal cells are located in the ganglion cell layer (GCL) and are excluded from displaced starbust amacrine cells (ChAT+) located in this layer. (H) βGal immunostaining (F) after retrograde injection of fluorogold from the dLGN that labels RGCs (G) shows that almost all retrogradely labeled RGCs were βGal positive in adult mice.

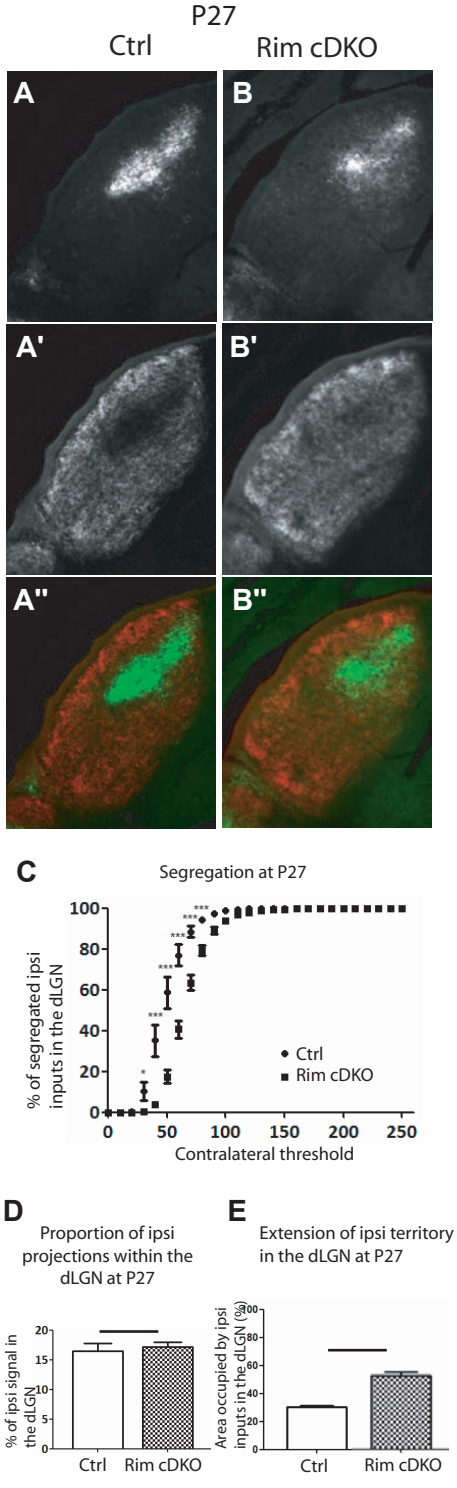


Figure 2 : Eye specific segregation requires synaptic release at retinogeniculate terminals.

Dye-labeled retinogeniculate projections in control (n=8) and RimcDKO mice (n=7) at P27 (A-B''). Ipsilateral (A) and contralateral (A') retinal projections are segregated in control animals (A'', merge). Ipsilateral (B) and contralateral (B') retinal projections are not segregated in RimcDKO animals with contralateral projections present within almost all the ipsilateral territory and ectopic ipsilateral projections within the contralateral territory (B'', merge). C. Segregation plot : Percentage of ipsilateral segregated inputs as a function of contralateral threshold (ipsilateral threshold is fixed). Two-way ANOVA test revealed a significant eye specific segregation defect in RimcDKO mice. D. Ratio of ipsilateral pixels to the total number of pixels in the dLGN. T-test revealed no difference between control and RimcDKO in terms of proportion of ipislateral projections within the dLGN. E. Area occupied by the ipsilateral projection within the dLGN. T-test revealed that the ipsilateral territory is more extended in RimcDKO mice than in control mice. Error bars: SEM values. * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

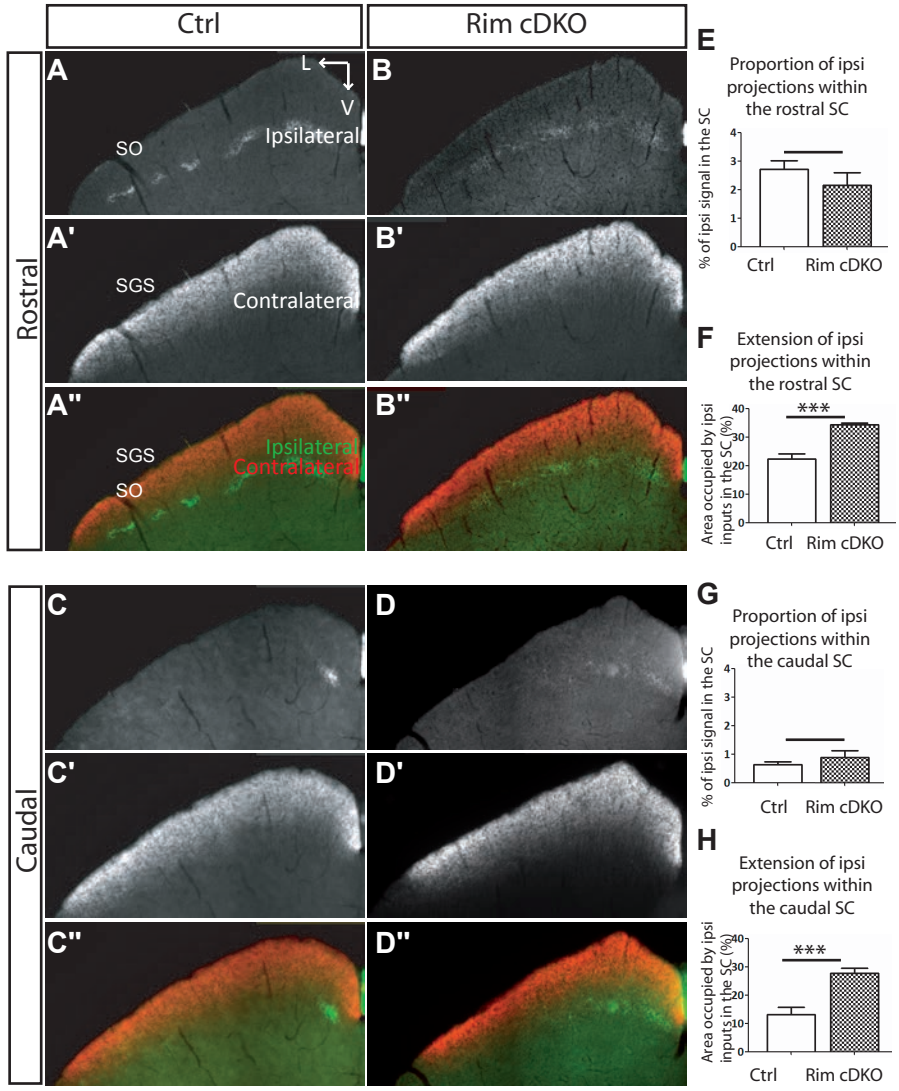


Figure 3 : Ipsilateral retinocollicular projection requires synaptic release for their topographic refinement. Dye-labeled retinal projections in control (A-A'', C-C''; n=8) and RimcDKO (B-B'', D-D''; n=7) mice at P27 in coronal rostral (A-B'') or caudal (C-C'') sections of the SC. In Rim cDKO mice (B), in the rostral part of the SC, the ispilateral projection is spread, diffuse and not organized in patches along the medio-lateral axis as in control mice (A). In Rim cDKO mice (D), in the caudal part of the SC, the ispilateral projection is not restricted to the medial part as in control mice (C). F, H. Area occupied by the ipsilateral projection within the rostral (F) and caudal SC (H). The ipsilateral territory is more extended in Rim cDKO mice than in control mice (t-test) both in the rostral and caudal SC. E, G. Ratio of ipsilateral pixels to the total number of pixels in the rostral (E) and caudal (G) SC. No difference in the proportion of ipsilateral projections between control and RimcDKO mice (t-test) both in the rostral and caudal SC. Error bars: SEM values. *** $p<0.001$.

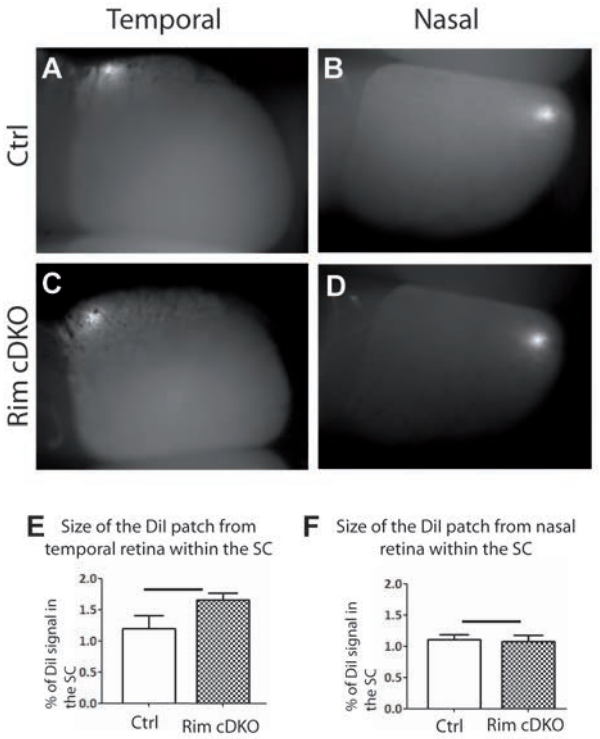


Figure 4 : Global retinotopy establishment of contralateral retino-collicular projections does not require Rim function at the retino-collicular terminals. A-D. Dorsal view of whole SC at P15. A,C. Focal target spot in the anterior part of the contralateral SC after a focal DiI injection into the temporal retina in control (A ; n=8) and in RimcDKO (C ; n=7). B,D. Focal target spot in the posterior part of the contralateral SC after a focal DiI injection into the nasal retina in control (B ; n=9) and in RimcDKO (D ; n=8). There is no difference in terms of localisation of the target spot. E,F. Percentage of DiI signal within the SC. T-test revealed no difference in the size of the anterior (E ; p=0.0955) and posterior (F ; p=0.7761) target spot between control and Rim cDKO mice. Error bars: SEM values.

ARTICLE 2

Résumé Article 2

Les adénylates cyclases (ACs) sont des enzymes qui convertissent l'ATP en AMPc. L'AMPc est un second messager intra-cellulaire ubiquitaire capable de réguler de nombreux effecteurs impliqués dans de nombreuses voies de signalisation. L'AMPc étant une molécule diffusible, en réponse à un stimulus donné, comment la cellule peut-elle attribuer les signaux AMPc à la voie de signalisation adéquate ? L'existence d'une compartimentation spatiale de la signalisation AMPc sous forme de microdomaines pourrait participer à cette spécificité de réponse. Ces microdomaines contiendraient les régulateurs et effecteurs spécifiques d'une voie de signalisation donnée. Ils contiendraient aussi des phosphodiestérases qui dégradent l'AMPc empêchant ainsi la diffusion des signaux AMPc au reste de la cellule.

Le système visuel constitue un modèle de choix pour explorer cette hypothèse. En effet, les CGRs expriment plusieurs ACs, mais seule l'AC1 est importante pour le raffinement des projections rétiniennes ; les autres isoformes exprimées ne compensent pas les défauts induits par la délétion de l'AC1. Les radeaux lipidiques constituent un microdomaine candidat idéal pour structurer la signalisation AMPc impliqué dans le raffinement des projections rétiniennes pour différentes raisons. D'une part, l'AC1 est une protéine trans-membranaire adressée aux radeaux lipidiques. D'autre part, les radeaux lipidiques constituent des plateformes de signalisation permettant de mettre à proximité des protéines impliquées dans les mêmes fonctions cellulaires et faciliter ainsi leur intéraction.

Dans cette étude, nous avons utilisé des outils permettant de capter les signaux AMPc pour les empêcher de réguler leurs effecteurs. J'ai montré que la perturbation *in vivo* de la signalisation AMPc spécifiquement dans le microdomaine radeaux lipidiques des CGRs entraine des défauts de raffinement des projections rétiniennes. Ces défauts sont les mêmes que ceux induits par la délétion d'AC1 : les projections présentent des branches ectopiques le long des axones. La perturbation de la signalisation AMPc à la membrane cellulaire mais en dehors des radeaux lipidiques n'induit pas de défauts. Ces résultats confortent l'idée de compartimentation spatiale de la signalisation AMPc.

Par ailleurs, les axones rétiniens se rétractent en réponse aux éphrines A. *In vitro*, cette réponse est dépendante de la signalisation AMPc/AC1. Stefania Averaimo et Xavier Nicol ont montré *in vitro* dans cette étude que la perturbation de la signalisation AMPc au sein des radeaux lipidiques empêche la rétraction des axones en réponse aux éphrines A tandis que la perturbation en dehors des radeaux lipidiques n'affecte pas cette réponse. De plus, ils ont montré que l'exposition des axones aux éphrines A entraine une diminution de la concentration en AMPc spécifiquement dans les radeaux lipidiques des cônes de croissance des CGRs.

Toutes ces données démontrent l'existence d'un microdomaine structuré par les radeaux lipidiques spécifiquement impliqué dans le raffinement des projections rétiniennes *in vivo* et la réponse des axones aux éphrines A *in vitro*. Plus généralement, cette étude conforte l'idée que la spécificité fonctionnelle de la signalisation AMPc est liée à sa localisation sub-cellulaire.

Local cAMP signaling restricted to lipid rafts is required for the developmental refinement of axonal arbors

Stefania Averaimo[1,2,3,6], Ahlem Assali[4,5,6], Sandrine Couvet[1,2,3], Yvrick Zagar[1,2,3], Alexandra Rebsam[4,5] & Xavier Nicol[1,2,3]

[1] CNRS, UMR_7210, Paris, F-75012, France;

[2] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France;

[3] INSERM, U968, Paris, F-75012, France;

[4] Inserm UMR-S 839, Paris, F-75005, France

[5] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968, Institut du Fer à Moulin, Paris, F-75005, France

[6] These authors contributed equally to this work

Correspondence to: X.N. (xavier.nicol@inserm.fr)

SUMMARY

Precise patterning of axonal projections is crucial for the development of nervous system connectivity. Cellular second messengers, including cAMP, integrate signals from extracellular cues, shaping neuronal networks. cAMP is also involved in a wide range of unrelated cellular processes in developing neurons. How this second messenger achieves specificity for its distinct downstream pathways is elusive, and the coding strategies used to attribute specific modulation of cAMP to axon guidance regulation have not been identified. Subcellular compartmentalization of cAMP signaling is thought to be one of these coding strategies. However, the cellular domains involved are unknown. Lipid rafts are cholesterol-enriched domains of the plasma membrane involved in the axonal response to a subset of axon guidance molecules. We investigated the role of local cAMP signals in the organization of retinal projections and developmental pruning of exuberant axonal branches, and uncovered that the cAMP signaling regulating these events is restricted to lipid rafts. We developed and used a cAMP toolbox to locally monitor and manipulate the local cAMP concentration in lipid rafts or in the non-raft fraction of the plasma membrane. Using these local tools, we found a decrease in cAMP concentration within but not outside lipid rafts of retinal ganglion cell growth cones when axons are exposed to the repulsive guidance cue, ephrin-A5. Blocking cAMP signaling specifically in lipid rafts is sufficient to prevent ephrin-A-induced axon retraction, whereas cAMP downstream signaling outside of lipid rafts is not required for the axonal response to ephrin-As. The local blockade of cAMP signaling in lipid rafts *in vivo*, during the development of retinal projections, induces the maintenance of exuberant branches in retinal ganglion cell axonal arbors in the superior colliculus. In contrast, preventing the activation of cAMP signaling in the non-raft fraction of the plasma membrane does not affect the developmental pruning of retinal axon arbors. These findings indicate that lipid rafts define a microdomain of cAMP signaling in retinal axons, and that this subcellularly restricted signal is required for both the response to axon guidance cues and the developmental pruning of ectopic axonal branches.

INTRODUCTION

The development of precise neuronal connectivity in the mammalian sensory systems results of elimination of ectopic axonal branches that refine initially exuberant projection maps (Luo and O'Leary, 2005). The ubiquitous second messenger cAMP and one of its synthesizing enzyme adenylyl cyclase 1 (AC1) are crucial for the refinement of sensory axon arbors in the visual and somato-sensory system (Gheorghita et al., 2006; Nicol and Gaspar, 2014; Ravary et al., 2003; Welker et al., 1996). Other ACs, synthesizing the same second messenger cAMP, are expressed in retinal ganglion cells and their targets during the refinement of retinal projections. However, they are not involved in shaping retinal axon arbors (Nicol et al., 2006a), emphasizing the limited functional redundancy between the member of the adenylyl cyclase family. The disparities between AC1-generated and other AC-generated cAMP signal are still elusive.

In non neuronal cell types, subtypes of ACs are targeted to distinct subcellular compartments (Willoughby and Cooper, 2007), presumably creating subcellular microdomains of cAMP signaling (Agarwal et al., 2014; Depry et al., 2011; Nikolaev et al., 2010). In cell lines AC1 is targeted to lipid rafts (Masada et al., 2009), a domain of the plasma membrane that is involved in the response of growth cones to soluble guidance molecules *in vitro* (Guirland et al., 2004; Hérincs et al., 2005). Subcellular restriction of cAMP signals has been suggested to explain how this ubiquitous second messenger achieves specificity for its wide range of downstream signaling pathways (Edwards et al., 2012). In developing neurons, subcellular domains of cAMP signaling have previously been observed (Nicol et al., 2011; Shelly et al., 2010), but the identity of these compartments and ACs generating local cAMP signals have not been identified.

Lipid rafts are dynamic microdomains of the plasma membrane that are thought to be involved in the spatial segregation of distinct signaling pathways (Lingwood and Simons, 2010). Perturbing their organization is sufficient to alter axonal response to Netrin-1 or BDNF *in vitro* (Guirland et al., 2004; Hérincs et al., 2005). However it is unclear whether or not these plasma membrane compartments structure domains of intracellular signaling, and whether or not their regulation of the response to axon guidance molecules has physiological relevance *in vivo*.

We demonstrate here that lipid rafts define microdomains of cAMP signaling in axonal growth cones and that lipid raft-restricted cAMP signals are required for the refinement of retinal axon arbors *in vivo*. We first establish that ephrin-As, the axon guidance molecules that are

required for the development of retinal topography (Feldheim et al., 1998; Frisén et al., 1998), induce a lipid raft-specific reduction in cAMP concentration in retinal axons. Lipid raft-specific cAMP signals are required for both ephrin-A-induced axon retraction *in vitro* and retinal arbors pruning in the superior colliculus *in vivo*. This indicates that lipid raft-segregated cAMP signals are functionally relevant and is required for the establishment of precise connection in the developing nervous system.

RESULTS

AC1 is targeted to lipid rafts, a critical domain for ephrin-A-induced retraction

AC1 is the only adenylyl cyclase required for the development of retinal axons in their targets (Nicol et al., 2006a). In an attempt to identify a biochemically defined subcellular compartment where the cAMP signaling might be restricted during the development of retinal projections, we overexpressed a GFP-tagged AC1 in retinas from E15.5 mouse embryos and isolated lipid raft fraction by sucrose-density gradient. Although AC1 is expressed in the developing retina (Nicol et al., 2005), detection of endogenous AC1 was not possible due to lack of available specific antibody. We verified that the GFP-tagged AC1 was targeted to the plasma membrane (Figure 1C). AC1 is highly enriched in lipid rafts in retinal neurons (Figure 1A and 1B), suggesting that this subcellular compartment might contained the AC1-dependent cAMP signals that regulates ephrin-A-induced axonal retraction and retinal axons connectivity. To test further this hypothesis, cultured retinal axons in which lipid raft integrity was altered using sphingomyelinase (SMase) were exposed to ephrin-A5. SMase specifically degrades sphingomyelins resulting in the removal of cholesterol and the associated proteins from the plasma membrane (Neufeld et al., 1996). Ephrin-As induces a collapse of retinal growth followed by the retraction of the axon. Perturbing lipid raft integrity prevents the retraction but does not affect the collapse of the growth cone, mimicking the phenotype of AC1-deficient retinal axons (Figure 1D).

Differential cAMP modulation by ephrin-As in distinct membrane compartments.

cAMP signaling is required for ephrin-A-induced retraction of retinal axons (Nicol et al., 2006b). However, whether cAMP is permissive for ephrin-A-induced repulsion or modulated by these axon guidance molecules has not been elucidated. To elucidate the link between cAMP signaling and ephrin-As, we measured cAMP concentration in retinal ganglion cells growth cones exposed to ephrin-A5 *in vitro*. To evaluate at the same time whether differentially modulated cAMP signals exist in distinct subcellular compartment, we monitored cAMP concentration in and outside lipid rafts. we modified an existing cAMP FRET sensor, H147 (Polito et al., 2013), to target it to each compartment and monitor cAMP signals arising in lipid raft or in the non-raft domain of the plasma membrane. Targeting lipid rafts was achieved using the 5' insertion of two palmitoylation-myristoylation tandems derived from Lyn kinase (Depry et al., 2011). H147 was targeted to the plasma membrane and excluded from lipid rafts by the a CaaX sequence along with a poly lysine motif derived from K-Ras (Depry et al., 2011) (Figure 2A). The specific subcellular localization of both targeted probes (LynLyn-H147 and H147-Kras) was validated using membrane fractionation with a sucrose density gradient. LynLyn-H147 expressed in embryonic retinas was found in the same membrane fractions than Caveolin-1, a marker of lipid rafts (Simons and Ikonen, 1997) (Figure 2C and D). In contrast H147-Kras was highly enriched in the non-raft fraction of the plasma membrane, together with the lipid raft excluded protein β-Adaptin (Figure 2C, D).

These subcellularly targeted FRET sensors were electroporated in retinal explants and cAMP concentration was monitored in growth cones exposed to the repellent guidance cue ephrin-A5. Ephrin-As induced a 6% +/- 2% reduction in the CFP/FRET ratio of LynLyn-H147 expressing growth cones, revealing a decrease in cAMP in lipid rafts that was absent after sham stimulation (Figure 3A). cAMP concentration reached a plateau 8 min after stimulation. In contrast, cAMP concentration monitored by H147-Kras in the non-raft fraction of the plasma membrane was not affected by ephrin-As (Figure 3B). We verified that both sensors were able to detect cAMP variations in axonal growth cones after exposure to the adenylyl cyclase activator Forskolin (Fsk, 25µM) combined with the non-specific phosphodiesterases inhibitor IBMX (100 µM). CFP/FRET ratio of LynLyn-H147 and H147-Kras increased of 11% +/- 5% and 60% +/- 6% respectively, suggesting that the basal concentration of cAMP is different in lipid rafts and in the non-raft fraction of the plasma membrane (Figure 3A and B).

cAMP signals in but not outside lipid rafts are required for ephrin-A-induced axon retraction.

Local cAMP signals suggested a differential role of cAMP signaling inside and outside of lipid rafts during ephrin-A-stimulated axon retraction. To evaluate whether lipid rafts are required for axonal response to ephrin-As, we monitored the retraction of ephrin-A-exposed retinal axons after perturbation of this membrane compartment with sphyngomyelinase, an enzyme that hydrolyses one of the main component of lipid rafts, sphyngomyelin,. Sphyngomyelinase did not perturb the morphology of retinal growth cones. Upon ephrin-A application, untreated retinal growth cones collapsed and retracted leaving a long single filopodia (Figure 1D). In contrast, sphyngomyelinase treated axons collapsed but retraction was reduced of 49.9% +/- 2.2% (Figure 1D), mimicking the phenotype of $AC1^{-/-}$ axons (Nicol et al., 2006b), and supporting the hypothesis of a key role of lipid rafts in ephrin-A-induced axon retraction.

To further investigate the cellular signaling involved in lipid rafts, we targeted "cAMP sponge", a genetically-encoded chelator of cAMP (Lefkimmiatis et al., 2009), to or outside lipid rafts, enabling local blockade of cAMP signaling. Targeting cAMP sponge subcellular localization was performed using the same targeting sequences than for the H147: a Lyn sequence tandem in 5' for lipid rafts and a Kras sequence for the non raft compartment (Figure 4 A and B). Appropriate subcellular localization of LynLyn-cAMP sponge and cAMP sponge-Kras was checked biochemically. LynLyn-cAMP sponge was highly enriched in lipid rafts, whereas cAMP sponge-Kras was mainly excluded from lipid rafts (Figure 4C and D).

LynLyn-cAMP sponge or cAMP sponge-Kras were electroporated in the retina *ex vivo* and growing axons were monitored while exposed to ephrin-A5. Axon outgrowth was not affected by either local cAMP blockade (Figure 5). cAMP buffering in lipid rafts significantly slowed down axon retraction upon ephrin-A5 exposure (Figure 5B, E and F). Although a response to ephrin-A was initiated with a collapse of the growth cone the subsequent axon retraction was severely reduced, mimicking $AC1^{-/-}$ phenotype (Nicol et al., 2006b). In contrast, cAMP signaling blockade in the non-raft fraction of the plasma membrane had no effect on the retraction rate of ephrin-A-exposed retinal axons (Figure 5C, E and F). Retraction of axons expressing a variant of LynLyn-cAMP sponge unable to bind cAMP was not distinguishable

from GFP-expressing axons (Figure 5D, E and F). This demonstrates that local cAMP signaling in but not outside of lipid rafts is required for ephrin-A-induced axonal retraction *in vitro.*

Local cAMP signals in lipid rafts are critical for the refinement of retinal arbors in the superior colliculus.

Since ephrin-As are critical for the refinement of RGC arborizations (Frisén et al., 1998), we investigated the role of local cAMP signaling in lipid rafts for the development of retinal projections in the superior colliculus (SC) . We co-electroporated *in utero* GFP together with either LynLyn-cAMP sponge or cAMP sponge-Kras in the retina at E15.5, allow the electroporated embryos to develop, and trace individual retinal axons in the SC at P10. E15.5 electroporation enables sparse enough expression of the constructs of interest RGCs in the retina and to follow and reconstruct single RGC axons in the SC. Electroporated RGCs reside in the center of the retina and their projections were mostly located in the middle of the SC on the rostro-caudal axis.

Retinal axons electroporated with GFP alone are mostly refined: they retract from the caudal SC to target a focal termination zone (TZ) int the middle of the rostro-caudal axis of the SC. They elaborate a dense terminal arbor without ectopic branches along the shaft of the axon (Figure 6A and B). Projections co-expressing GFP and LynLyn-cAMP sponge exhibit a dense terminal arbor but fail to eliminate ectopic branches. The remaining exuberant branches are located along the shaft of the axon and in some cases branches were found caudally to the termination zone (Figure 6A and B). This defect is reminiscent of the AC1-deficient retinal axon arbors *ex vivo* and *in vivo* (Dhande et al., 2012; Nicol et al., 2006b). In contrast, blocking cAMP signaling in the non-raft fraction of the plasma membrane (with cAMP sponge-Kras) or using a variant of cAMP sponge unable to bind cAMP (LynLyn mutated cAMP sponge) did not affect the development of retinal axon arbor in the SC. In both cases the terminal arborization forms normally, and no ectopic branches were detected (Figure 6A and B). This demonstrates that cAMP signaling within but not outside the lipid rafts is required for the refinement of retinal projection.

Since cAMP has previously been shown to be an important regulator of RGC axon outgrowth (Corredor et al., 2012), we evaluated whether LynLyn-cAMP sponge expression affect the retino-collicular pathway before the refinement of the projections. LynLyn-cAMP

sponge and GFP-electroporated retinal axons were not distinguishable in the SC at P2 before the elimination of ectopic branches. In both conditions, immature retinal axons expanding until the caudal end of the SC, with visible growth cones and exhibiting few collateral branches were observed (Figure 6C), ruling out an alteration in axon outgrowth. Taken together our data establish a functional specificity for distinct subcellular cAMP signals during the development of neuronal connectivity.

DISCUSSION

Our experiments identify the code of cAMP signals that regulates retinal growth cone response to the axon repellents ephrin-As. We demonstrate here that a local reduction in cAMP concentration restricted to lipid rafts is required for retinal axon retraction *in vitro* and for axonal arbor refinement *in vivo*. Confined cAMP signals has previously been shown to be crucial in non-neuronal cells, e.g. to achieve specificity of β1- versus β2-adrenergic receptor in cardiac myocytes (Nikolaev et al., 2010). In neurons, large scale compartments have been identified. Uneven cAMP concentration in somato-dendritic versus axonal compartments favor neuronal polarization *in vitro* (Shelly et al., 2010). cAMP interactions with calcium is inverted in filopodia and growth cone center of axons exposed to Netrin-1: cAMP is upstream calcium in filopodia, whereas it is downstream of calcium in growth cone center of cultured *X. laevis in vitro* (Nicol et al., 2011). Here we extend the concept of local cAMP signaling to nano- to micrometer-scale compartments in developing neurons, determine the biochemical identity of the subcellular compartment in which the signaling of this second messenger is confined, and describe a critical role for local cAMP signaling in the development of precise neuronal connectivity *in vivo*. We show that cAMP concentration decreases in but not outside lipid rafts when retinal axons are expose to ephrin-As, and that local cAMP signaling is required for the development of confined retinal axon arbors in the SC *in vivo*.

The integrity of the lipid raft compartment is required for the response of axons to the axon guidance molecule netrin-1, and to the neurotrophin BDNF *in vitro* (Guirland et al., 2004). Association of the netrin-1 receptor DCC with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance (Hérincs et al., 2005). We extend the axon guidance molecules that require lipid rafts to ephrin-As, and identify the local intracellular signal involved. Since cAMP is a second

messenger involved in the regulation of a wide range of axon guidance molecules (Ming et al., 1997; Murray et al., 2009; Nishiyama et al., 2003; Song et al., 1997), its local signaling in lipid rafts might reflect a signature of the signals required for the regulation of axon outgrowth directionality. Spatially-restricted cAMP modulation is likely to contribute to achieve specificity of axon guidance regulating signals, limiting the cross-talk with the wide range of other cAMP-regulated cellular processes.

Local cAMP signals might be the result of restricted targeting of ACs (Wachten et al., 2010). In cell lines transmembrane ACs are sorted in two subcellular compartments based on their calcium dependency: calcium-regulated ACs (AC1, 3, 5, 6 and 8) are targeted to lipid rafts, whereas the calcium insensitive ACs (AC2, 4, 7 and 9) are excluded from lipid rafts. In non-neuronal cells, the soluble AC (sAC), is targeted to distinct subcellular compartments including mitochondria and nucleus (Bundey and Insel, 2004; Zippin et al., 2003). AC1 is involved in the regulation of ephrin-A-induced axonal retraction (Nicol et al., 2006b) but does modulates axon outgrowth, like the other transmembrane ACs (Corredor et al., 2012). In contrast sAC regulates intrinsic and netrin-1-stimulated axon outgrowth (Corredor et al., 2012; Wu et al., 2006), and is not involved in netrin-1-dependent axon guidance (Moore et al., 2008). This is in line with our findings that define lipid rafts as a compartment of cAMP signaling regulating axon guidance but not outgrowth, which might be regulated by cAMP signals located near to sAC. The non-lipid raft fraction of the plasma membrane might reflect a third cAMP signaling compartment that has yet no identified role in regulating the development of neuronal connectivity-related processes.

The finding that cAMP concentration in lipid rafts decreases when retinal axons are exposed to ephrin-As was unexpected given that previous studies have suggested that pulses of cAMP are required for axon retraction (Nicol et al., 2007). Yet this discrepancy may be more apparent than real in the context of a requirement of dynamics of cAMP signals. Imposing a sustain low cAMP signal pharmacologically or in AC1-deficient mice leads to the reduction of ephrin-A-induced axon retraction *in vitro* and ectopic axonal branches in the SC (Dhande et al., 2012; Nicol et al., 2006b; Ravary et al., 2003). A sustained increase of cAMP induces the same absence of retraction *in vitro*, and an exuberant arborization of retinal axons in a retino-collicular coculture that mimics the development of retinal topography (Nicol et al., 2007). In contrast, pulses of cAMP rescue the retraction of retinal axons when it is blocked by the lack of electrical activity. However, when pulses are replaced by repeated steps of cAMP increase with no cAMP

degradation between steps, axon retraction does not occur (Nicol et al., 2007), suggesting that a drop of cAMP concentration is required for growth cones to retract when exposed to ephrin-As. This is in line with our observation that a dynamic reduction of cAMP concentration in lipid rafts is require for axon to retract.

Overall, we demonstrate here that cAMP signaling is spatially restricted in microdomains of the plasma membrane of growth cones, and that cAMP modulation in lipid rafts is required for ephrin-A-induced retraction of retinal axons. *In vivo*, lipid-rafts-localized cAMP signals are required for the confinement of retinal axon arbors to a restricted portion of the superior colliculus.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Pregnant C57BL6/J mice were purchased from Janvier and treated in accordance with the European Community Council Directive dated November 24, 1986 (86/609/EEC) and were approved by the French Ministry of Health and by the Institut de la Vision Ethical Committee.

Chemicals

Ephrin was purchased from R&D and dissolved in water at 1mg/ml stock concentration and further diluted at a final concentration of 500ng/ml in the recording medium. Forskolin was purchased from Sigma and dissolved in DMSO at 10mM concentration and further diluted in the recording medium at 25 µM. IBMX was purchased from Sigma, dissolved in DMSO to a 100mM concentration and further diluted at 100uM in the recording medium.

Plasmids

The non-targeted cAMP sponge-mCherry, its mutated variant that does not bind cAMP, and the FRET sensor H147were previously described (Lefkimmiatis et al., 2009; Polito et al., 2013). All construct used were subcloned into a pCX backbone and targeting to lipid rafts was achieved using a double-Lyn sequence (ATGGGCTGCATCAAGAGCAAGCGCAAGGAC AAGATGGGCTGCATCAAGAGCAAGCGCAAGGACAAG) at the 5’ of the coding region of

the cAMP sponge (using EcoRV-KpnI restriction sites), obtaining a LynLyn-cAMP-sponge. The targeting outside of the lipid rafts was achieved using a Kras targeting sequence (AAGAAG AAGAAGAAGAAGAGCAAGACCAAGTGCGTGATCATG) at the 3' end of the constructs. In the cAMP sponge-KRAS the mCherry tag was replaced by monomeric Red Fluorescent Protein (mRFP), because of mCherry toxicity when combined with the targeting sequence Kras.

Lipid raft isolation by detergent-free method

Electroporated retinas were pellet (195g for 5 min at 4°C) and resuspended in 1.34 ml of 0.5 M sodium carbonate, pH 11.5, with protease inhibitors cocktail and phosphatase inhibitor cocktail 1, 2 and 3 (Sigma-Aldrich). The homogenate was sheared through a 26-gauge needle and sonicated three times during 20-s bursts. The homogenate was adjusted to 40% sucrose by adding 2.06 ml of 60% sucrose in MBS (25 mM MES, pH 6.4, 150 mM NaCl, and 250 mM sodium carbonate), placed under a 5–30% discontinuous sucrose gradient, and centrifuged at 34,000 rpm for 15–18 h at 4°C in a Beckman SW-41Ti rotor. Nine fractions (1.24 ml each) were harvested from the top of the tube mixed with 9 volumes of MBS, and centrifuged at 40,000 rpm for 1 h at 4°C (Beckman SW-41Ti rotor). Supernatants were discarded, and membrane pellets were resuspended in 100µl of 1% SDS.

For immunoblotting, samples were separated on 4-15% Mini- Protean TGX® Tris-Glycine-buffer SDS-PAGE and transferred onto 0.2µm Trans-Blot Turbo® nitrocellulose membranes (both Biorad). Membranes were blocked for one hour at room temperature in 1xTBS (10mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl,) supplemented with 5% (w/v) dried skim milk powder Primary antibody incubation was carried out overnight at 4°C, with the following antibodies: rabbit anti-GFP (A11122; Life Technologies), rabbit anti-DsRed (632476 ; Clontech), rabbit anti-β-Adaptin (sc-10762; Santa Cruz) and rabbit anti-Caveolin (610060; BD Transduction Laboratories) at a dilution of 1/200. A goat anti-rabbit-HRP coupled secondary antibody was used for detection (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). In between and after antibody incubations, membranes were extensively washed in TBS-T (TBS containing 2.5% Tween-20). Western blots were visualized using the enhanced chemiluminescence method (ECL prime Western Blotting detection reagent, Amersham).

***Ex vivo* retinal electroporation and culture of retinal explants.**

Mice were sacrificed with CO2, and E14.5 embryos were isolated and kept in cold PBS. Embryos were decapitated and DNA was injected subretinally using an elongated borosilicate glass capillary (Harvard Apparatus). All constructs were coelectroporated with GFP subcloned in the same vector. The success of DNA injection was assessed using 0.03% fast green supplemented to the DNA solution. The paddles of the electrode (CUY650P5, Sonidel) were placed at the bottom and at the top of the head respectively (Petros et al., 2009). Two poring pulses (square wave, 175V, 5ms duration, with 50ms interval) followed by four transfer pulses (40V, 50ms and 950ms interpulse) were applied. The protocol was repeated with inverted polarities. After electroporation the retinas were isolated as previously described (Petros et al., 2009) and kept 24 hours in culture medium (DMEM-F12 supplemented with 1mM glutamine (Sigma Aldrich), 1% penicillin/streptomicin (Sigma Aldrich), 0.01% BSA (Sigma Aldrich), 0.07% glucose), in a humidified incubator at 37°C and 5% CO2. Retinas were cut into 200 µm squares and explants were plated on glass coverslips coated with 100 ug/mL poli-L-lysin (Sigma Aldrich) overnight at 37°C and 20 ug/ml Laminin (Sigma Aldrich) for 3 hours at 37°C. Cells were cultured for 24 hours in culture medium supplemented with 0.4% methyl cellulose and B27.

Retraction assay

Cell imaging was performed using an inverted DMI6000B Leica microscope, with a 40X objective. Recording medium was replaced with a laminar flux. Temperature was kept at 37°C during the whole recording. Retraction assays were performed by bathing the cells in a medium containing: 1 mM $CaCl_2$, 0.0003 mM MgCl2, 0.5 mM Na_2HPO_4, 0.5 mM NaH_2PO_4, 0.0004 mM $MgSO_4$, 4.25 mM KCl, 0.014 mM $NaHCO_3$, 120 mM NaCl, 0.0004% $CuSO_4$, 0.00124 mM Fe $(NO_3)_3$, 0.0015 mM $FeSO_4$, 0.0015 mM thymidine, 0.00051 mM lipoic acid, 0.0015 mM $ZnSO_4$, 0.0005 mM sodium pyruvate, 1X MEM Amino Acids, 1X non essential amino acids, 25 mM Hepes , 0.5 mM putrescine, 0.01% BSA, 0.46% glucose, 1 mM glutamine, 2% penicillin streptomicin. DIC images were acquired using a CCD camera (ORCA-D2, Hamamatsu). Cells were imaged every 2 minutes for up to 90 minutes. Solution was perfused at a speed of 0.2 mL/min. Cells were bathed in control medium for 30 minutes in order to measure the growth rate

and eliminate from the analysis the immobile growth cones. Only axons that grew faster than 60 µm per hour were included in the analysis. After 30 minutes, the culture medium was replaced by a medium containing Ephrin-A5 (500ng/µL) and axons were imaged for 1 hour. The speed of axon outgrowth or retraction was measured using a manual tracking plugin of imageJ (NIH).

FRET imaging and data analysis

Images were taken every 30 seconds for 30 minutes with the same experimental setup, using a 63X, 1.40 NA. A CFP filter (436/20 nm) was used for excitation and emission was collected using the optical block of the dual CCD camera ORCA D2 (CFP: 483/32 nm, YFP: 542/27 nm). Metamorph was used to collect images. Post-acquisition analysis was performed using ImageJ (NIH). After background subtraction and correction for the CFP bleedthrough into the YFP channel, a threshold was applied to images to compute the CFP over YFP ratio. The ratio was normalized to the first value of the trace and corrected for photobleaching based on the slope of the trace before the first stimulation.

***In utero* electroporation**

In utero electroporation has been done as previously described (Garcia-Frigola et al., 2007; Petros et al., 2009). Pregnant wild-type females were anesthetized with isofluorane. Using a glass micropipette (Dutscher), left eyes of E15.5 embryos were injected with a mix of 2 DNA constructs : LynLyn-cAMP sponge (2.7µg/µL) and GFP (1.1µg/µL), cAMP sponge-Kras (1.8µg/µL) and GFP (1.1µg/µL), or LynLyn-mutated cAMP sponge (2.1µg/µL) and GFP (1.1µg/µL). Eyes were then electroporated with 5 pulses of 45V during 50 ms every 950 ms (Nepagene electroporator). The positive electrode was placed on the injected eye and the negative electrode at the opposite side (CUY650P5, Sonidel). Sub-cutaneous injections of flunixin-meglumine (4mg/kg, Sigma) were done for analgesia after the surgery. To increase the survival of the pups, a Swiss female mated on day earlier than the electroporated mice was used to nurse the pups. At P0, all but 3 Swiss pups were removed to stimulate the nursing.

Immunostaining

At P10, after anesthesia with pentobarbital (545 mg/kg), *in utero* electroporated pups were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.12M phosphate buffer.

Brains and eyes were postfixed overnight in 4% PFA. Whole superior colliculi (SC) and electroporated retinas were dissected.The retinas were oriented with an incision in the peripheral ventral part. SC and retinas were washed in saline PB (PBS), permeabilized in 1% triton for 30 minutes, blocked in 0.1% triton 10% horse serum in PBS for 1h. Then, SC and retinas were incubated at 4°C during 3 days in antibodies raised against DsRed (1/800, Clonetech California) and GFP (1/1000, Aves) diluted in the blocking solution. Finally, SC and retinas were washed in PBS 3 times 10 minutes, incubated at room temperature during 2 hours in the secondary antibodies (Alexa 488 Donkey anti-Chicken, 1/200, Invitrogen; and CY3 Donkey anti-rabbit, 1/200, Jackson) diluted in the blocking solution and washed again in PBS 3 times during 10 minutes. SC and retinas were mounted in mowiol-Dabco. Three additional incisions were performed to flatten the retinas before mounting.

Imaging and analysis

Whole-mount SC were imaged using a Leica SP5 confocal and a 20X objective. It has been checked *in vitro* that when the GFP plasmid was less concentrated than the cAMP sponge plasmid, most of the cells which incorporate the GFP plasmid also incoporate the cAMP sponge. Since the signal-to-noise ratio was higher in the GFP channel , electroporated axons were imaged using the GFP staining. Individual axons were manually reconstructed from the anterior SC and through the SC depth using Photoshop (without reconstructing the terminal arbor). Axons were qualitatively classified in 3 types: normal (with an elaborated terminal arbor and without ectopic branches along the axon), immature (without a terminal arbor and with ectopic branches along the axon) and abnormal (with an elaborated terminal arbor but with ectopic branches along the axon).

Statistics

Data were presented as mean values ± standard error of the mean. Statistical significance was calculated using a Mann Whitney test for non parametrical tendencies, or a Chi square test for axonal arbors comparison *in vivo*. Differences were considered statistically significant when $p<0.05$.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr A. Hofer for the gift of cAMP-sponge, and Dr K. Jalink for the gift of H147. We are grateful to members of our labs and of A. Chédotal lab for thoughtful discussion. This work was supported, by a Berthe Fouassier / Fondation de France fellowship to S.A., by a Retina France fellowship to A.A., by ANR-11-PDOC-0004 and by a Fondation Fyssen grant to X.N. This work performed in the frame of the LABEX LIFESENSES [reference ANR-10-LABX-65] was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir program under reference ANR-11-IDEX-0004-02.

REFERENCES

Agarwal, S.R., Yang, P.-C., Rice, M., Singer, C.A., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Clancy, C.E., and Harvey, R.D. (2014). Role of membrane microdomains in compartmentation of cAMP signaling. PloS One *9*, e95835.

Bundey, R.A., and Insel, P.A. (2004). Discrete intracellular signaling domains of soluble adenylyl cyclase: camps of cAMP? Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. *2004*, pe19.

Corredor, R.G., Trakhtenberg, E.F., Pita-Thomas, W., Jin, X., Hu, Y., and Goldberg, J.L. (2012). Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *32*, 7734–7744.

Depry, C., Allen, M.D., and Zhang, J. (2011). Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. Mol. Biosyst. *7*, 52–58.

Dhande, O.S., Bhatt, S., Anishchenko, A., Elstrott, J., Iwasato, T., Swindell, E.C., Xu, H.-P., Jamrich, M., Itohara, S., Feller, M.B., et al. (2012). Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development. J. Comp. Neurol. *520*, 1562–1583.

Edwards, H.V., Christian, F., and Baillie, G.S. (2012). cAMP: novel concepts in compartmentalised signalling. Semin. Cell Dev. Biol. *23*, 181–190.

Feldheim, D.A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M.J., Frisén, J., Lu, Q., Barbacid, M., and Flanagan, J.G. (1998). Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. Neuron *21*, 1303–1313.

Frisén, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D., and Barbacid, M. (1998). Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. Neuron *20*, 235–243.

Garcia-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., and Herrera, E. (2007). Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. BMC Dev. Biol. *7*, 103.

Gheorghita, F., Kraftsik, R., Dubois, R., and Welker, E. (2006). Structural basis for map formation in the thalamocortical pathway of the barrelless mouse. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 10057–10067.

Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., and Zheng, J.Q. (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. Neuron *42*, 51–62.

Hérincs, Z., Corset, V., Cahuzac, N., Furne, C., Castellani, V., Hueber, A.-O., and Mehlen, P. (2005). DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. J. Cell Sci. *118*, 1687–1692.

Lefkimmiatis, K., Moyer, M.P., Curci, S., and Hofer, A.M. (2009). "cAMP sponge": a buffer for cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. PloS One *4*, e7649.

Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science *327*, 46–50.

Luo, L., and O'Leary, D.D.M. (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. Annu. Rev. Neurosci. *28*, 127–156.

Masada, N., Ciruela, A., Macdougall, D.A., and Cooper, D.M.F. (2009). Distinct mechanisms of regulation by Ca2+/calmodulin of type 1 and 8 adenylyl cyclases support their different physiological roles. J. Biol. Chem. *284*, 4451–4463.

Ming, G.L., Song, H.J., Berninger, B., Holt, C.E., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M.M. (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. Neuron *19*, 1225–1235.

Moore, S.W., Lai Wing Sun, K., Xie, F., Barker, P.A., Conti, M., and Kennedy, T.E. (2008). Soluble adenylyl cyclase is not required for axon guidance to netrin-1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 3920–3924.

Murray, A.J., Tucker, S.J., and Shewan, D.A. (2009). cAMP-dependent axon guidance is distinctly regulated by Epac and protein kinase A. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 15434–15444.

Neufeld, E.B., Cooney, A.M., Pitha, J., Dawidowicz, E.A., Dwyer, N.K., Pentchev, P.G., and Blanchette-Mackie, E.J. (1996). Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. J. Biol. Chem. *271*, 21604–21613.

Nicol, X., and Gaspar, P. (2014). Routes to cAMP: shaping neuronal connectivity with distinct adenylate cyclases. Eur. J. Neurosci.

Nicol, X., Muzerelle, A., Bachy, I., Ravary, A., and Gaspar, P. (2005). Spatiotemporal localization of the calcium-stimulated adenylate cyclases, AC1 and AC8, during mouse brain development. J. Comp. Neurol. *486*, 281–294.

Nicol, X., Bennis, M., Ishikawa, Y., Chan, G.C.-K., Repérant, J., Storm, D.R., and Gaspar, P. (2006a). Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections. Eur. J. Neurosci. *24*, 3401–3414.

Nicol, X., Muzerelle, A., Rio, J.P., Métin, C., and Gaspar, P. (2006b). Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. J. Neurosci. *26*, 862–872.

Nicol, X., Voyatzis, S., Muzerelle, A., Narboux-Nême, N., Südhof, T.C., Miles, R., and 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.

Nicol, X., Hong, K.P., and Spitzer, N.C. (2011). Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 13776–13781.

Nikolaev, V.O., Moshkov, A., Lyon, A.R., Miragoli, M., Novak, P., Paur, H., Lohse, M.J., Korchev, Y.E., Harding, S.E., and Gorelik, J. (2010). Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. Science *327*, 1653–1657.

Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J.R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.-M., and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca2+ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. Nature *423*, 990–995.

Petros, T.J., Rebsam, A., and Mason, C.A. (2009). In utero and ex vivo electroporation for gene expression in mouse retinal ganglion cells. J. Vis. Exp. JoVE.

Polito, M., Klarenbeek, J., Jalink, K., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., and Castro, L.R.V. (2013). The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. Front. Cell. Neurosci. *7*, 211.

Ravary, A., Muzerelle, A., Hervé, D., Pascoli, V., Ba-Charvet, K.N., Girault, J.-A., Welker, E., and Gaspar, P. (2003). Adenylate cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps. J. Neurosci *23*, 2228–2238.

Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., and Poo, M. (2010). Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. Science *327*, 547–552.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. Nature *387*, 569–572.

Song, H.J., Ming, G.L., and Poo, M.M. (1997). cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. Nature *388*, 275–279.

Wachten, S., Masada, N., Ayling, L.-J., Ciruela, A., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., and Cooper, D.M.F. (2010). Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. J. Cell Sci. *123*, 95–106.

Welker, E., Armstrong-James, M., Bronchti, G., Ourednik, W., Gheorghita-Baechler, F., Dubois, R., Guernsey, D.L., Van der Loos, H., and Neumann, P.E. (1996). Altered sensory processing in the somatosensory cortex of the mouse mutant barrelless. Science *271*, 1864–1867.

Willoughby, D., and Cooper, D.M.F. (2007). Organization and Ca2+ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. Physiol. Rev. *87*, 965–1010.

Wu, K.Y., Zippin, J.H., Huron, D.R., Kamenetsky, M., Hengst, U., Buck, J., Levin, L.R., and Jaffrey, S.R. (2006). Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. Nat Neurosci *9*, 1257–1264.

Zippin, J.H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M.S., Fischman, D.A., Levin, L.R., and Buck, J. (2003). Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *17,* 82–84.

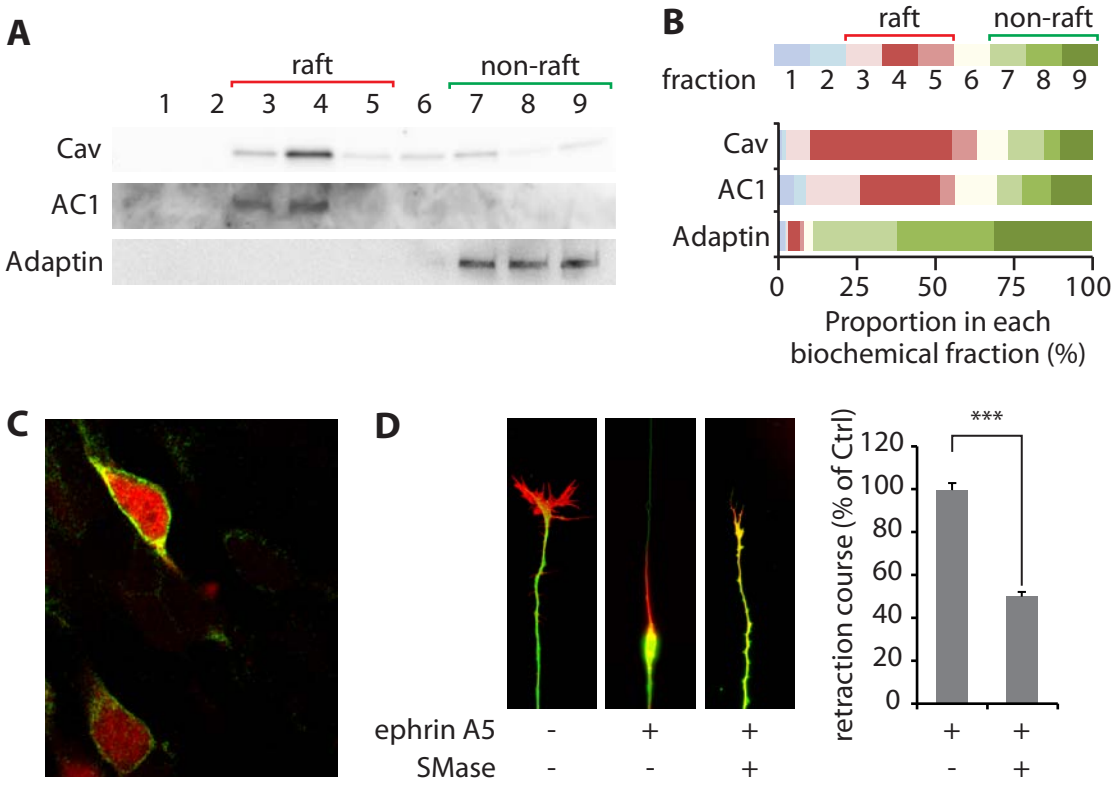


Figure 1: AC1 is targeted to lipid rafts, a domain of the plasma membrane required for ephrin-A-induced axonal retraction. (A) AC1 overexpressed in the developing retina is detected in fraction 3 and 4 after sucrose-density gradient fractionation of the plasma membrane. This coincides with the location of the lipid raft marker Caveolin-1 (Cav, enriched in fractions 3 to 5). AC1 is excluded from the fraction enriched in β-adaptin (7 to 9), a marker of the non-raft fraction of the membrane. (B) The fraction of Caveolin, AC1, and β-adaptin are quantified from ≥3 experiments. Raft and non-raft fractions are represented in red and green tones respectively. (C) Overexpressing AC1 fused to GFP (green) in retinal neurons does not affect its plasma membrane targeting. The retina is coelectroporated with mCherry (cytoplasmic localization, red). (D) Ephrin-A5 induces a collapse of retinal growth cones in vitro, and a subsequent axonal retraction leaving a long trailing process. Altering lipid raft integrity prevents axon retraction without affecting the collapse of the growth cone, mimicking the lack of retraction of AC1-/- axons. n≥ 120 axons per conditions, from ≥3 experiments. Error bars, SEM; *** p≤0.001.

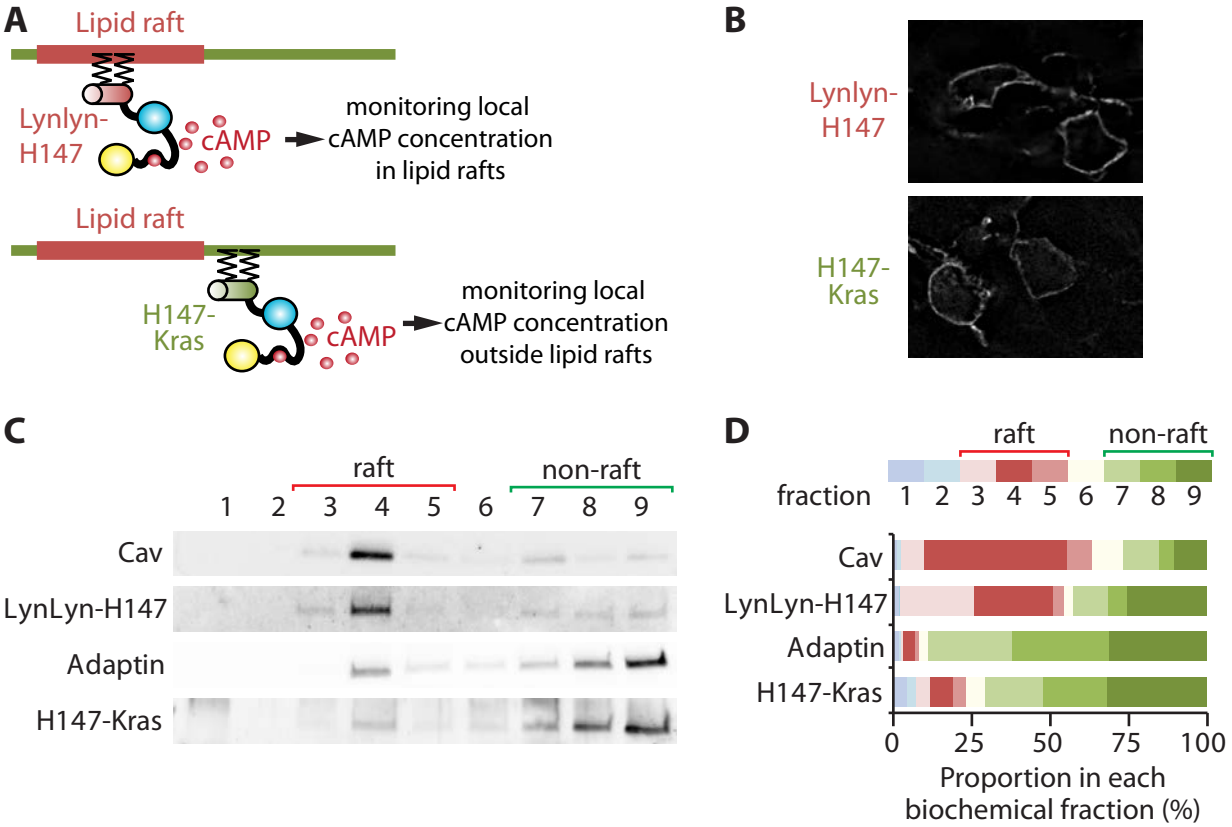


Figure 2: Monitoring cAMP specifically in or outside lipid raft. The strategy used to monitor raft and non-raft cAMP signals is schematized in (A). The cAMP-sensitive FRET sensor H147 is fused to either a tandem of two Lyn sequence in 5' or a Kras sequence in 3' to confine the probe and monitor cAMP in or outside lipid rafts respectively. (B) Lynlyn-H147 and H147-Kras expression are both restricted to the plasma membrane in developing retinal neurons. (C,D) Lynlyn-H147 is enriched in the biochemically-isolated lipid raft fractions (3 to 4, similar to the lipid raft marker Caveolin), whereas H147-Kras is mostly found in the non-raft compartment (fractions 7 to 9, like β-adaptin). n≥3 experiments.

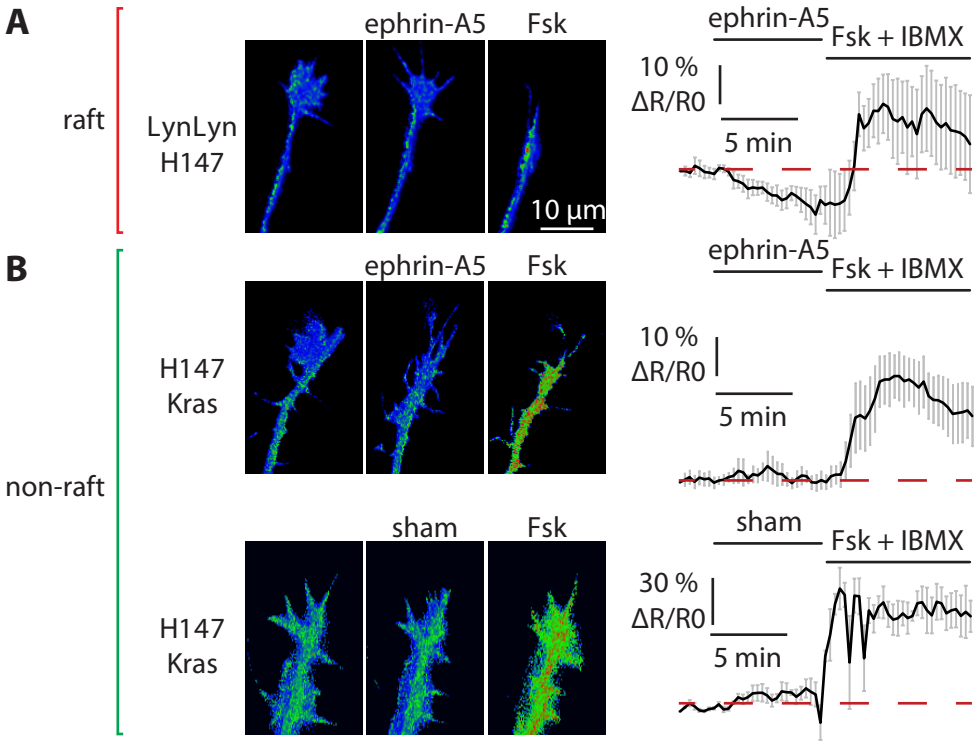


Figure 3: cAMP concentration decreases specifically in lipid rafts of retinal growth cones upon ephrin-A5-exposure. The computed CFP/FRET ratio is shown in retinal growth expressing either the lipid raft-targeted cAMP sensor Lynlyn-H147 or the raft-excluded probe H147-Kras, revealing the local variation in cAMP concentration. The ratio is color-coded from blue (low ratio, low cAMP concentration) to red (high ratio, high cAMP concentration). Viability of the axons is tested at the end of the experiment, verifying that cAMP level increase upon stimulation of the transmembrane adenylyl cyclase using Forskolin, together with the phosphodiesterase inhibitor IBMX. (A) Ephrin-A5 induces a reduction in cAMP concentration in lipid rafts, whereas (B) the CFP/FRET ratio of the biosensor excluded from lipid rafts was stable. (C) cAMP concentration

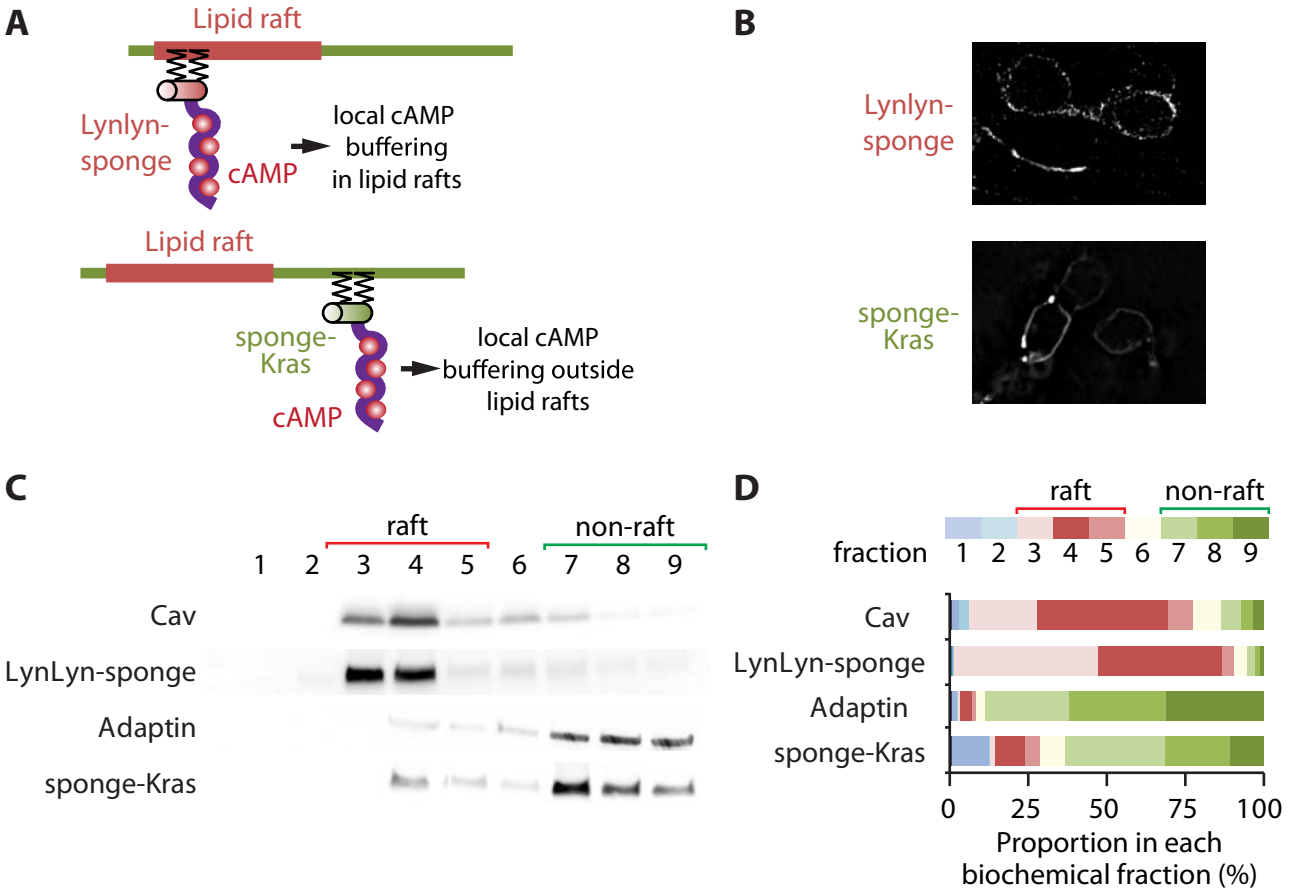


Figure 4: Lipid raft or non-raft specific blockade of cAMP. The strategy used to block raft and non-raft cAMP signals is schematized in (A). The genetically-encoded cAMP blocker "cAMP sponge" is fused to either a tandem of two Lyn sequence in 5' or a Kras sequence in 3' to target the blocker to lipid rafts, or exclude it from this plasma membrane compartment respectively. (B) Lynlyn-cAMP sponge and cAMP sponge-Kras are both restricted to the plasma membrane in developing retinal neurons. (C,D) Lynlyn-H147 is enriched in the biochemically-isolated lipid raft fractions (3 to 4, similar to the lipid raft marker Caveolin), whereas H147-Kras is mostly found in the non-raft compartment (fractions 7 to 9, like β-adaptin). n≥3 experiments.

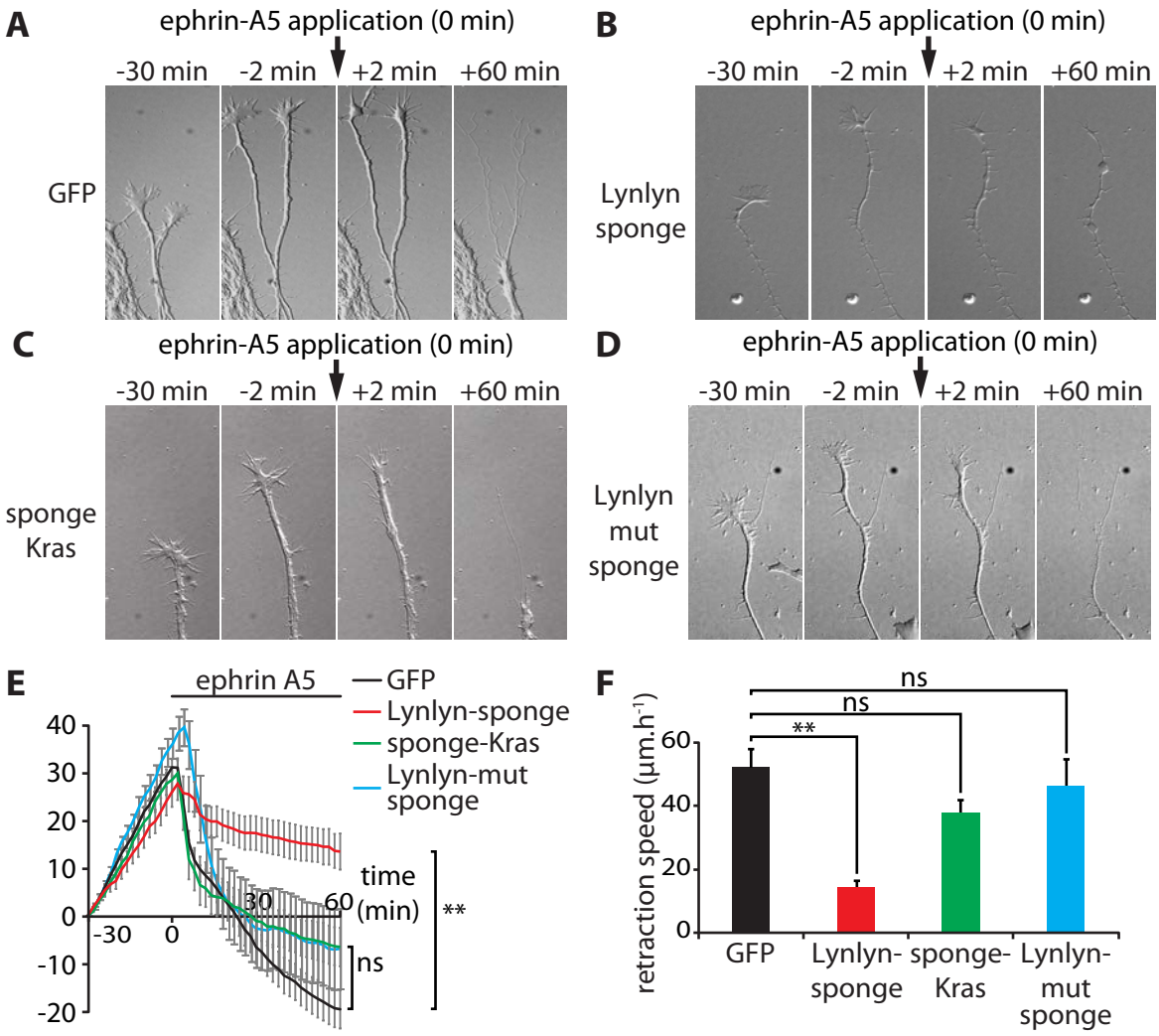


Figure 5: cAMP signaling is required within but not outside of lipid rafts for ephrin-A5-induced retraction of retinal axons. (A) GFP-expressing axons grow before ephrin-A5 addition to the cuture medium (-30 min to -2min), collapse shortly after ephrin-A5 application (+2 min) and retract during 60 min after ephrin exposure. (B) In contrast, axons expressing Lynlyn-cAMP sponge, in which cAMP signaling is blocked specifically in lipid rafts, are unable to retract following the initial collapse. The blockade of cAMP outside of lipid rafts (C) or the expression of a variant of Lynlyn-cAMP sponge unable to bind cAMP (D) does not affect ephrin-A5-induced axon retraction. (D) Lynlyn-cAMP sponge reduces axon retraction without perturbing axon outgrowth before ephrin-A5 application. (E) The distance of the growth cones from its initial position (t=0) is monitored before and after application of ephrin-A5. GFP-, cAMP sponge-Kras- and Lynlyn-cAMP mutated sponge-expressing axons grow and retract similarly, whereas the ephrin-A5-induced retraction of Lynlyn-cAMP sponge-expressing axons is reduced, (F) resulting in a decreased retraction speed. from ≥3 experiments. Error bars, SEM; ** p≤0.01

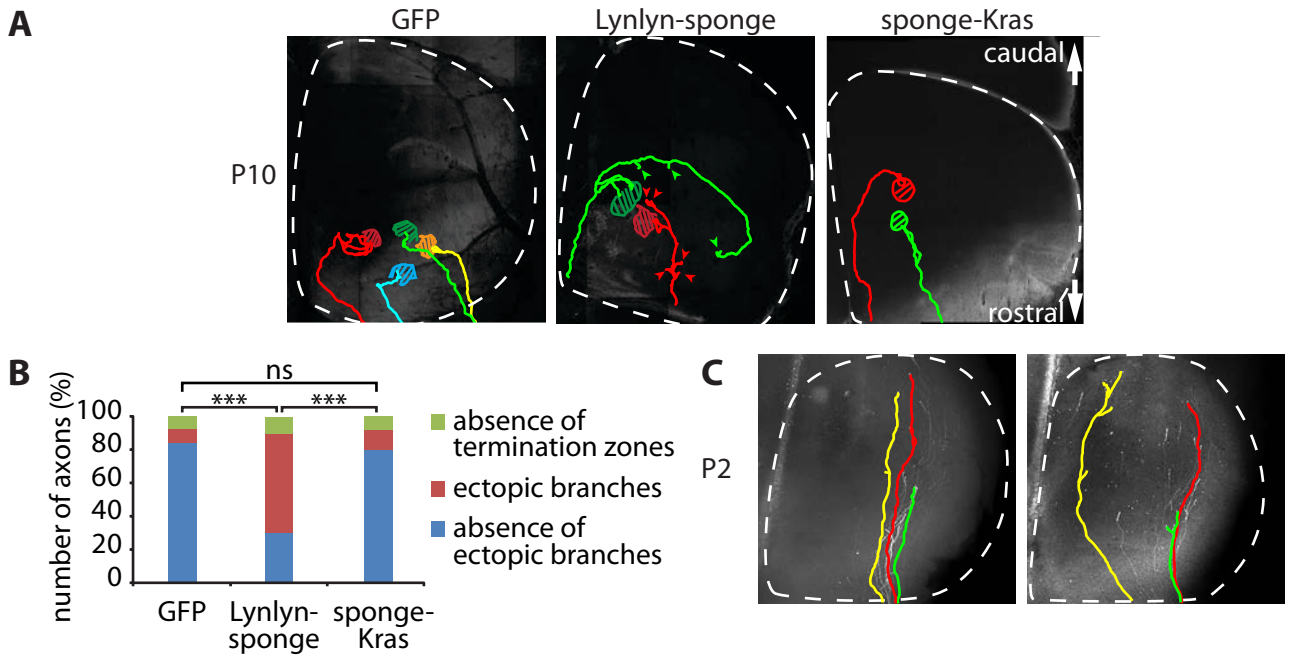


Figure 6: cAMP signaling in but not outside lipid rafts is required for retinal axon arbors refinement in the SC. (A,B) Individual axonal arbors in the SC are reconstructed at P10. The SC is delineated by the dashed contour. GFP expressing axons exhibit a dense arborization, and lack axonal branches that do not reach the termination zone. In contrast, exuberant branches are detected in Lynlyn-cAMP sponge expressing axons (arrowheads). The expression of cAMP sponge-Kras or the variant of Lynlyn-cAMP sponge that does not bind cAMP does not affect the arborization pattern of retinal axons. *** $p \leq 0.001$, Chi-square test. (C) GFP- and Lynlyn-cAMP sponge-expressing axons do not differ at P2, exhibiting few branches.

PARTIE 3

I- Introduction

L'adénylate cyclase 1 est importante pour la formation des cartes visuelles, raffinement de la rétinotopie et ségrégation œil-spécifique (Ravary et al., 2003; Nicol et al., 2006b; Dhande et al., 2012).

Nous avons observé que la perturbation *in vivo* de la signalisation AMPc spécifiquement au niveau des radeaux lipidiques entrainait des défauts de raffinement des projections controlatérales dans le colliculus supérieur (Article 2) : les projections présentent des arborisations terminales élaborées, cependant elles présentent aussi des collatérales ectopiques le long de l'axone. La perturbation de la signalisation AMPc à la membrane cellulaire mais en dehors des radeaux lipidiques n'entraine pas de défauts. Ces résultats ont démontré que la signalisation AMPc devait avoir lieu dans un compartiment précis, les radeaux lipidiques, pour jouer son rôle dans le raffinement des projections rétiniennes. Ces données confortent l'idée selon laquelle la spécificité fonctionnelle des signaux AMPc capables d'activer de nombreuses voies intra-cellulaires, est liée à la localisation sub-cellulaire de ces signaux AMPc.

Afin de savoir si la localisation sub-cellulaire de la signalisation AMPc participe aussi au processus de formation de la carte œil spécifique (ségrégation œil-spécifique et positionnement des domaines œil spécifique), nous avons perturbé cette signalisation à nouveau spécifiquement au niveau des radeaux lipidiques ou à la membrane cellulaire en dehors des radeaux lipidiques.

Les projections rétiniennes ipsilatérales et controlatérales qui innervent initialement le même territoire au sein des cibles et qui se ségrègent ensuite, proviennent du croissant ventro-temporal de chacune des deux rétines. De ce fait, nous avons perturbé la signalisation AMPc dans les cellules du croissant ventro-temporal d'une seule rétine par électropration *in utero* (E*IU*) d'une séquence protéique capable de tamponner les signaux AMPc (« éponge AMPc ») et donc d'inhiber les voies normalement activées par ces signaux. Il a été possible de perturber ces signaux spécifiquement au niveau ou en dehors des radeaux lipidiques par ajout à l'éponge AMPc, de petites séquences d'adressage à ces compartiments, Lyn et Kras respectivement.

II- Matériel et méthode

L'expérience contrôle de cette étude correspond à l'E*IU* d'un plasmide exprimant seulement la GFP. Un meilleur contrôle serait d'électroporer la construction Lyn éponge AMPc mutée qui est adressée aux radeaux lipidiques mais qui ne tamponne pas les molécules d'AMPc suite à des mutations dans la séquence codant pour le domaine de liaison à l'AMPc.

L'E*IU* a été effectuée à E14.5. Afin de visualiser les domaines œil-spécifique, des injections de CTB couplé à l'Alexa 594 dans l'œil droit et 647 dans l'œil gauche ont été effectuées à P13 et les animaux ont été sacrifiés et analysés à P15.

L'EIU a été réalisée de la même manière que celle décrite dans le matériel et méthode de l'article 2. Afin de cibler le quadrant VT, il suffit de placer l'électrode négative sur le VT de l'œil injecté, de couvrir seulement la moitié de l'œil par l'électrode et de placer l'électrode positive en face.

L'injection de CTB, la perfusion des animaux et le traitement des cerveaux ont été réalisés de la même manière que celle décrite dans le matériel et méthode de l'article 1.

III- Résultats

La description chez un contrôle de la carte œil-spécifique de façon précise aux différents niveaux de l'axe rostro-caudal du CGLd et du CS, permet de mieux identifier les défauts induits par la perturbation de la signalisation AMPc. La CTB nous permet ici de marquer toutes les projections rétiniennes provenant de chacun des deux yeux. L'expression de la GFP par E*IU* spécifiquement dans les cellules du croissant ventro-temporal (VT ; Figure 1, E) de la rétine (n=3) permet de visualiser les projections ipsilatérales et controlatérales provenant de CGRs voisines dans le VT (Figure 1).

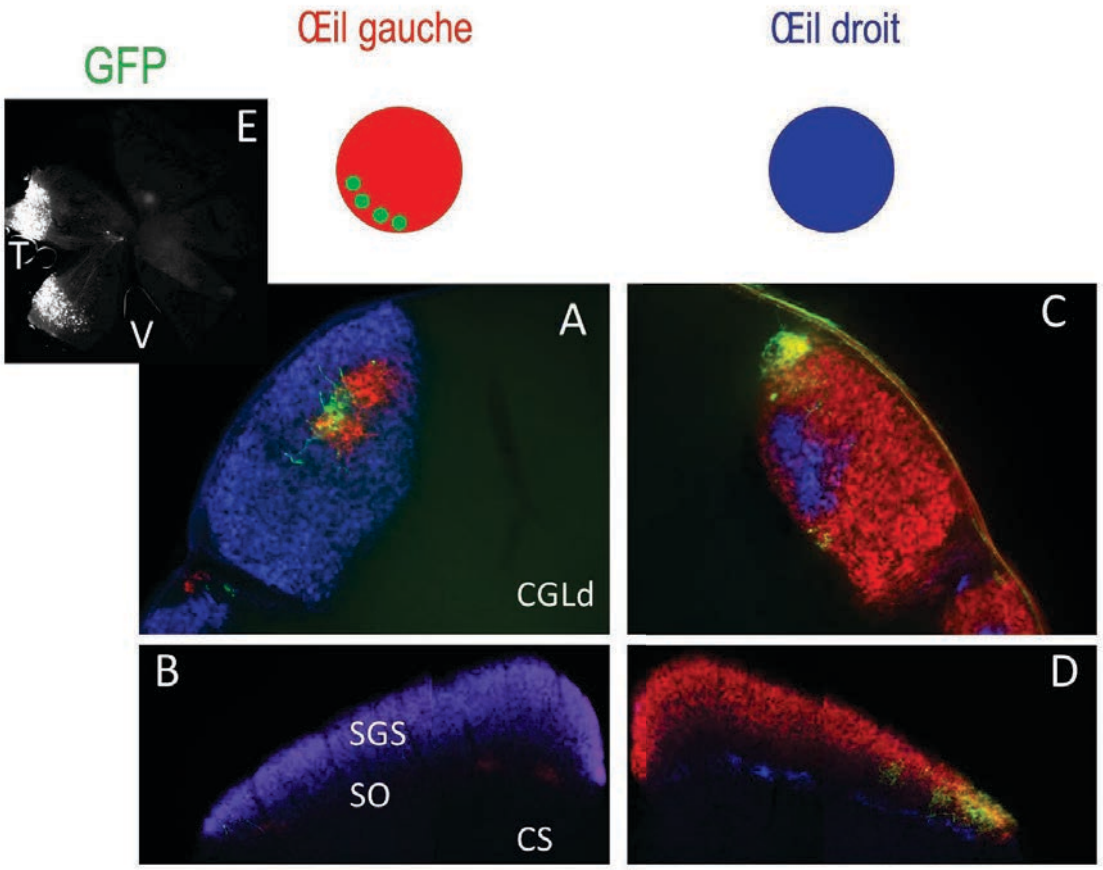


Figure 1 : Carte œil spécifique chez une souris contrôle suite à l'électroporation *in utero* de la GFP dans la rétine ventro-temporale.

A et C. Coupes coronales du corps genouillé latéral dorsal (CGLd) médian (selon l'axe rostro-caudal). Les projections controlatérales occupent entièrement le CGLd excepté la zone occupée par les projections ipsilatérales. Les projections controlatérales provenant du croissant ventro-temporal (VT) de la rétine (E) occupent la partie très dorsale du CGLd (C, en vert).

B et D. Coupes coronales du colliculus supérieur (CS) rostral. Les projections controlatérales occupent entièrement une couche superficielle (stratum griseum superficiale, SGS) du colliculus supérieur (CS) tandis que les projections ipsilatérales occupent une couche plus profonde (stratum opticum, SO) ; les projections ipsilatérales y forment des amas tout le long de l'axe médio-latéral du CS rostral.

Dans le CGLd, au niveau très rostral, la projection ipsilatérale est très compacte, elle est localisée dans le CGLd très dorsal à l'extrémité. La ségrégation est particulièrement claire à ce niveau avec un trou dans la projection controlatérale à l'endroit où se loge la projection ipsilatérale. Au niveau central, la projection ipsilatérale devient rapidement

située plus au centre de la moitié dorsale du CGLd, où elle est entourée de la projection controlatérale. A ce niveau, la projection ipsilatérale est bien délimitée et la ségrégation avec la projection controlatérale est claire. La projection controlatérale provenant du croissant VT de la rétine se positionne au niveau très dorsal du CGLd et la projection ipsilatérale est juste en-dessous plus ventrale (Figure 1, C). Ce résultat a déjà été observé au moyen d'injections focales de DiI dans la rétine VT (Figure 2 ; (Rebsam et al., 2009). Au niveau caudal, la projection ipsilatérale se situe dans le CGLd médial (selon l'axe médio-latéral), plutôt au centre du dLGN (selon l'axe dorso-ventral). A ce niveau, la projection ipsilatérale est plus dispersée, moins bien délimitée et la ségrégation avec la projection controlatérale est moins claire qu'aux niveaux rostral et central (selon l'axe rostro-caudal).

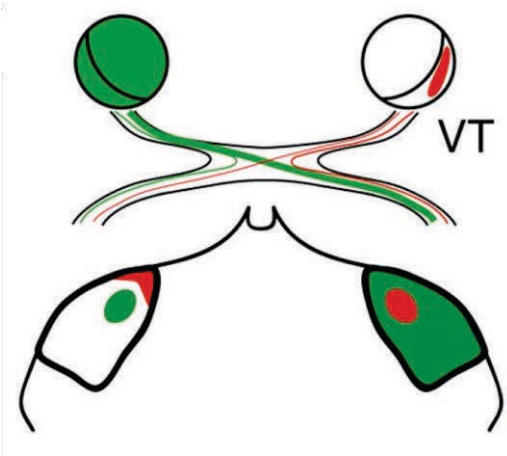


Figure 2 : Localisation des projections ipsilatérales et controlatérales provenant de la rétine ventro-temporale (VT) dans le CGLd ; (Rebsam et al., 2009).

Dans le CS, la projection controlatérale est située dans le stratum griseum superficiale (SGS), couche superficielle du CS, et la projection ipsilatérale est située plus profondément dans la couche stratum opticum (SO) du CS, juste en-dessous du SGS (Figure 1, B et D). La projection ipsilatérale et la projection controlatérale provenant du croissant VT de la rétine ne sont pas alignées, elles n'ont pas la même position dans l'axe rostro-caudal : la projection controlatérale verte provenant du VT est plus antérieure que la projection ipsilatérale verte provenant aussi du VT. C'est pourquoi, pour un même niveau de coupe sur le CS rostral, les projections controlatérales vertes provenant du VT sont visibles mais les projections ipsilatérales ne le sont pas car elles apparaissent plus caudalement (Figure 1, B et D). Ce résultat avait déjà été observé suite à des injections focales de DiI dans le croissant VT de la rétine (Dharmaratne et al., 2012).

La perturbation dans un seul œil de la signalisation AMPc spécifiquement au niveau des radeaux lipidiques engendre des défauts importants de la carte œil-spécifique.

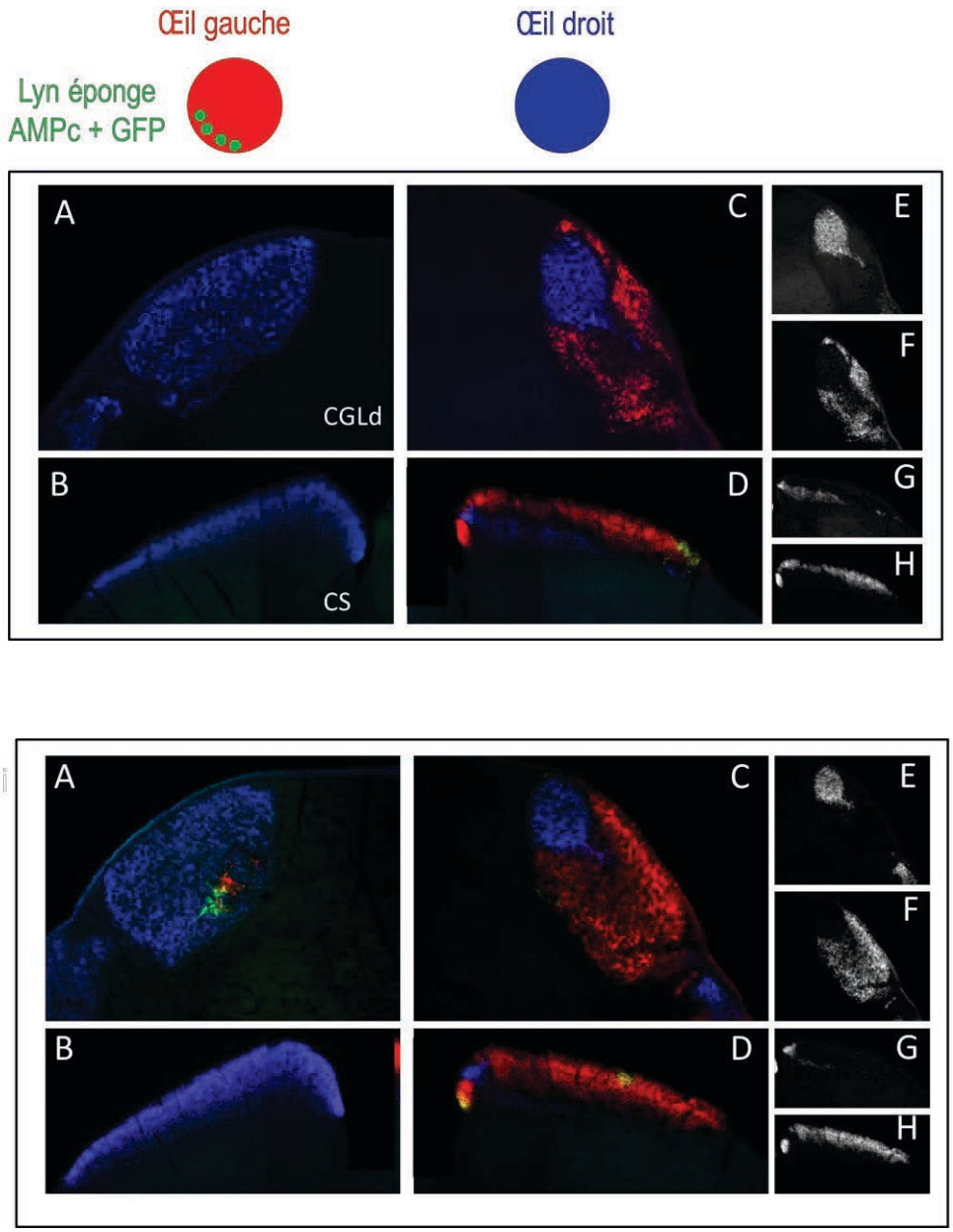


Figure 3 : Deux cas de défauts de la carte œil spécifique suite à la perturbation dans un seul œil de la signalisation AMPc dans les radeaux lipidiques, par électroporation *in utero* du plasmide Lyn éponge AMPc dans la rétine ventro-temporale.

A et B. Du côté ipsilatéral à l'électroporation sur des coupes coronales du CGLd (A) et du CS (B), les projections controlatérales normales (bleues) envahissent le territoire des projections ipsilatérales (rouges) dont une fraction a été électroporée par le plasmide Lyn éponge AMPc (vertes) ; les projections ipsilatérales sont absentes ou très peu nombreuses.

C et D. Du côté controlatéral à l'électroporation dans le CGLd (C) et le CS (D), les projections ipsilatérales (bleues) sont très étendues, elles envahissent le territoire normalement occupé par les projections controlatérales (rouges) notamment celles provenant du VT dont une fraction a été électroporée par Lyn éponge AMPc (vertes). Dans le CS rostral, elles perdent leur organisation en amas et forment une projection continue (D) ; les projections ipsilatérales (E et G) sont ségrégées des projections controlatérales qu'elles ont exclues (F et H).

L'électroporation *in utero* n'est pas une technique reproductible en ce qui concerne le nombre et la localisation exacte des cellules électroporées. Le phénotype obtenu suite à l'électroporation de l'éponge AMPc adressé aux radeaux lipidiques est plus ou moins important selon la localisation des cellules électroporées dans la rétine. Il y a un premier variant du phénotype, dans lequel les cellules électroporées sont localisées dans le croissant ventro-temporal périphérique qui contient les cellules ipsilatérales et controlatérales qui innervent les mêmes territoires au cours du développement. Et il y a un deuxième variant du phénotype, dans lequel les cellules électroporées sont localisées dans le quadrant ventro-temporal mais central et non périphérique ou dans lesquels les cellules électroporées sont localisées en dehors du quadrant ventro-temporal, dans le quadrant ventral ou temporal de la rétine.

Le premier variant du phénotype correspondant aux cas (n=4) ayant des CGRs électroporées localisées dans le croissant ventro-temporal périphérique présente des défauts de la carte œil spécifique dans les cibles CGLd et CS des deux côtés du cerveau, ipsilatéralement et controlatéralement à l'électroporation (Figure 3).

Le côté controlatéral à l'électroporation correspond à l'hémisphère qui reçoit les projections ipsilatérales normales et les projections controlatérales provenant de la rétine VT dont une fraction exprime la Lyn éponge AMPc. Dans le CGLd controlatéral à l'électroporation, la projection ipsilatérale normale envahit le territoire controlatéral notamment dans la partie très dorsale du CGLd correspondant à la projection controlatérale provenant du VT (Figure 3, C), mais aussi dans une partie plus ventrale du CGLd. L'invasion du territoire controlatéral par la projection ipsilatérale se traduit par un branchement dense ectopique dans ce territoire ; en effet, la CTB marque les terminaisons axonales. Dans le CS controlatéral à l'électroporation, la carte œil-spécifique est aussi altérée. La projection ipsilatérale normale envahit le territoire controlatéral et se retrouve dans le SGS au lieu d'être restreinte seulement au SO (Figure 3, D). Elle envahit notamment le territoire controlatéral au niveau très médial du CS. Dans deux cas, elle envahit le SGS au niveau latéral du CS. Quand c'est le cas, cette zone contient de nombreuses projections controlatérales qui expriment l'éponge AMPc. De plus, dans le SO, la projection ipsilatérale est plus étendue dans l'axe dorso-ventral mais

aussi dans l'axe médio-latéral car elle perd son organisation en amas, elle est continue (Figure 3, D et G).
Par ailleurs, dans le CGLd et le CS controlatéraux à l'électroporation, les projections ipsilatérales et controlatérales sont ségrégées y compris dans les zones normalement controlatérales qui ont été envahies par la projection ipsilatérale (Figure 3, E-H). Ainsi en général, les projections controlatérales marquées par la GFP qui expriment la Lyn-Eponge AMPc se retrouvent confinées dans des zones qui encadrent la projection ipsilatérale dans le CGLd et le CS.
En résumé, non seulement la projection ipsilatérale non perturbée envahit le territoire controlatéral notamment celui qui a reçu les projections controlatérales provenant du VT avec une signalisation AMPc inhibée, mais en plus la projection ipsilatérale exclut les projections controlatérales des territoires qu'elle envahit. Donc les défauts obtenus ici impliquent des défauts de positionnement et d'étendue des domaines œil-specifique mais n'impliquent pas de défauts de ségrégation œil-spécifique.

Le côté ipsilatéral à l'électroporation correspond à l'hémisphère qui reçoit les projections controlatérales normales et les projections ipsilatérales provenant de la rétine VT dont seulement une fraction exprime la Lyn-éponge AMPc.
Dans le CGLd ipsilatéral à l'électroporation, la projection controlatérale normale envahit le territoire ipsilatéral. Sur les coupes du CGLd central (selon l'axe rostro-caudal), la projection ipsilatérale est inexistante (Figure 3, A, premier cas, panel du haut) ou alors seules quelques projections ipsilatérales subsistent (Figure 3, A, deuxième cas, panel du bas) et ceci concerne les projections ipsilatérales électroporées (marquées par la GFP) mais aussi les projections ipsilatérales non électroporées (marquées par la CTB). Cependant, dans le CGLd rostral et caudal, des projections ipsilatérales marquées par la CTB et la GFP sont visibles. Dans le CS ipsilatéral à l'électroporation, là aussi les projections ipsilatérales sont inexistantes (Figure 3, B) ou alors seules quelques projections ipsilatérales subsistent.

Le deuxième variant du phénotype correspondant aux cas (n=6) ayant des CGRs électroporées localisées dans le quadrant ventro-temporal mais dans la rétine centrale et non périphérique ou des CGRs électroporées en dehors du quadrant VT (dans le

quadrant temporal ou ventral de la rétine) présente des défauts de la carte œil spécifique dans le CGLd controlatéralement à l'électroporation.
En effet, du côté controlatéral à l'électroporation dans le CGLd, la projection ipsilatérale est plus large, occupe un territoire plus étendu dans la cible que chez un cas contrôle. Cependant, elle n'envahit pas la partie très dorsale du CGLd comme c'est le cas quand les CGRs électroporées sont celles du VT périphérique. De même, dans le CS controlatéral à l'électroporation, la projection ipsilatérale est bien localisée dans le SO et n'envahit pas le territoire controlatéral dans le SGS.
Du côté ipsilatéral à l'électroporation dans le CGLd et le CS, les projections ipsilatérales et controlatérales sont similaires au contrôle.

Par ailleurs, le phénotype obtenu suite à la perturbation dans la rétine VT de la signalisation AMPc à la membrane plasmique mais en dehors des radeaux lipidiques (Kras éponge AMPc ; n=3) semble similaire aux contrôles (cas électroporés seulement avec la GFP) avec une différence toutefois du côté controlatéral à l'électroporation. Dans le CGLd et le CS, les projections ipsilatérales et controlatérales sont bien présentes des deux côtés du cerveau, sont ségrégées et sont positionnées dans les territoires appropriés (Figure 4). Cependant, du côté controlatéral à l'électroporation dans le CGLd, la projection ipsilatérale semble un peu plus large que chez le contrôle (Figure 4, C).

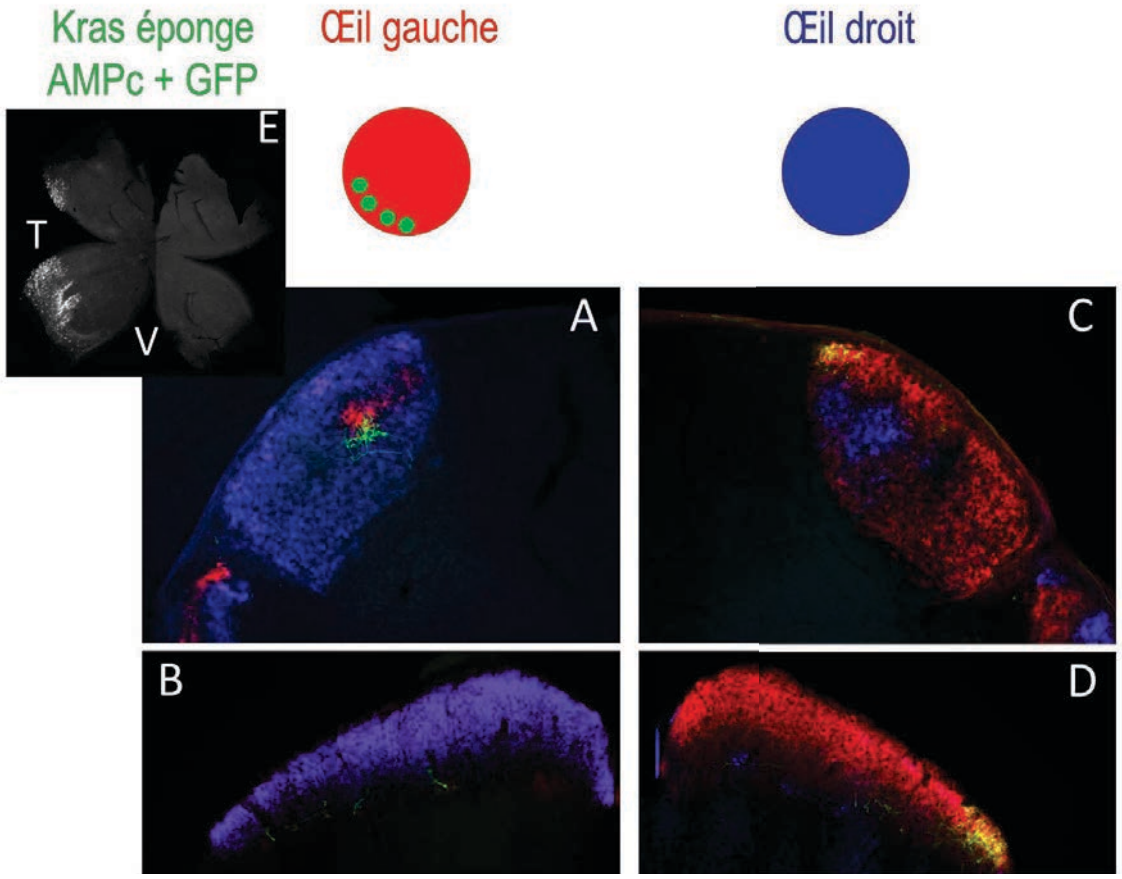


Figure 4 : Carte œil spécifique normale suite à la perturbation dans un seul œil de la signalisation AMPc à la membrane plasmique en dehors des radeaux lipidiques, par électroporation *in utero* du plasmide Kras éponge AMPc dans la rétine ventro-temporale.

A et C. Coupes coronales du corps genouillé latéral dorsal (CGLd) médian (selon l'axe rostro-caudal). Les projections controlatérales occupent entièrement le CGLd excepté la zone occupée par les projections ipsilatérales. Les projections controlatérales provenant du croissant ventro-temporal (VT) de la rétine (E) occupent la partie très dorsale du CGLd (C, en vert).

B et D. Coupes coronales du colliculus supérieur (CS) rostral. Les projections controlatérales occupent entièrement une couche superficielle du colliculus supérieur (CS) tandis que les projections ipsilatérales occupent une couche plus profonde ; les projections ipsilatérales y forment des amas tout le long de l'axe médio-latéral du CS rostral.

IV- Conclusion/Discussion

A- Conclusion

En résumé, les résultats obtenus ici indiquent que la perturbation dans un seul œil de la signalisation AMPc dans les radeaux lipidiques entraine des défauts de la carte œil spécifique. Du côté ipsilatéral à la perturbation, les projections controlatérales non perturbées envahissent le territoire ipsilatéral. Du côté controlatéral à l'électroporation, les projections ipsilatérales non perturbées envahissent le territoire controlatéral. Dans les deux cas, le territoire envahi correspond au territoire qui a reçu une fraction de projections électroporées dont la signalisation AMPc a été inhibée. Ce phénotype est observé lorsque les CGRs électroporées sont celles localisées dans le croissant VT périphérique de la rétine.

Concernant ces défauts de la carte œil-spécifique, il faut d'abord signaler que ce travail est en cours, que les observations sont principalement qualitatives. Afin de conclure et d'éclaircir le phénotype, différentes analyses doivent être faites dans les cas électroporés par le plasmide Lyn éponge AMPc, Kras éponge AMPc et GFP seule.
D'abord, il est important de corréler le phénotype obtenu avec la localisation des cellules électroporées dans la rétine. Ensuite, les différents éléments qui seront quantifiés dans les cibles, des deux côtés du cerveau, sont les suivants : la position de la projection ipsilatérale (présente ou non dans le CGLd très dorsal ; présente dans le SGS ou restreinte au SO dans le CS), son extension et son organisation (amas ou non dans le CS) ainsi que la ségrégation des projections ipsilatérales et controlatérales.

B- Effet cell autonome et cell non-autonome des signaux AMPc

Au cours du développement, les projections controlatérales sont présentes dans tout le CGLd, y compris dans le territoire ipsilatéral et les projections ipsilatérales sont présentes dans toute la moitié dorsale du CGLd, y compris le territoire très dorsal du CGLd correspondant au futur territoire des projections controlatérales provenant du VT (Godement et al., 1984; Pfeiffenberger et al., 2005). Initialement, une cellule cible donnée dans le CGLd reçoit des afférences des deux yeux (Jaubert-Miazza et al., 2005). Ainsi, au cours du développement, les projections ipsilatérales et controlatérales se

chevauchent. Puis au cours de la première semaine postnatale, les projections se ségrègent de manière dépendante de l'activité : les projections controlatérales sont éliminées du territoire ipsilatéral et les projections ipsilatérales occupent un territoire moins important, elles sont éliminées du territoire controlatéral notamment de la partie très dorsale du CGLd. A ce stade, une cellule cible donnée du CGLd reçoit des afférences seulement d'un des deux yeux selon le territoire concerné (Jaubert-Miazza et al., 2005).
Les défauts de carte œil spécifique obtenus ici suite à la perturbation des signaux AMPc dans un œil semblent correspondre à des défauts de raffinement des projections au cours du développement. En effet chez les petits électroporés, les projections controlatérales sont toujours présentes à P15 dans le territoire ipsilatéral d'un côté et les projections ipsilatérales sont toujours présentes à P15 dans le territoire controlatéral de l'autre côté.

La signalisation AMPc est donc nécessaire d'une part au maintien des projections dans leur territoire de manière « cell autonome », et d'autre part à l'exclusion de leur territoire des projections provenant de l'autre œil de manière « cell non-autonome ». Deux possibilités peuvent expliquer ces effets « cell autonome » sur les projections perturbées et « cell non-autonome » sur les projections non perturbées.
La première possibilité est que, de manière indépendante des projections provenant de l'autre œil, les projections perturbées ne sont pas capables de se maintenir dans leur territoire, de maintenir leurs contacts avec les cellules post-synaptiques. Ainsi, elles se rétracteraient laissant le champ libre aux projections provenant de l'autre œil déjà présentes initialement, de rester par défaut dans leur territoire. Il a été montré que le BDNF permet de stabiliser les synapses rétino-tectales chez le xénope (Hu et al., 2005). L'augmentation de la concentration en AMPc dans des CGRs en culture permet de recruter les récepteurs TrkB à la membrane et ainsi de potentialiser les effets du BDNF (Meyer-Franke et al., 1998). Donc ici la rétraction des projections perturbées pourrait être dûe à un défaut de réponse au BDNF. La signalisation BDNF/TrkB est par ailleurs impliquée dans la survie/mort cellulaire mais son rôle dans le système visuel est controversé (Lyckman et al., 2005; Rodger and Frost, 2009). Toutefois, étant donné que les projections des CGRs électroporées localisées en dehors de la rétine VT ont des projections qui persistent et qui branchent normalement dans les cibles (cf Article 2), la première possibilité semble peu probable : la perturbation de la signalisation AMPc en

elle-même n'empêche pas les projections de se maintenir dans les cibles et de brancher correctement.

La deuxième possibilité est que, dans la zone innervée de manière binoculaire initialement, il y a une compétition synaptique entre les projections des deux yeux pour occuper un territoire particulier qui implique les signaux AMPc ; auquel cas la perturbation des signaux AMPc empêcherait les projections concernées « de gagner la compétition dans le territoire où normalement, elles sont sensées la gagner ». Ainsi, les contacts synaptiques des projections électroporées par Lyn éponge AMPc seraient éliminés dans leur propre territoire et les contacts synaptiques des projections non perturbées seraient anormalement maintenus.

C- Signaux AMPc et activité spontanée rétinienne

Le phénotype obtenu ressemble fortement aux phénotypes obtenus lorsque l'activité spontanée rétinienne est manipulée dans un seul œil chez le furet. Dans ces expériences, la projection de l'œil le plus actif envahit le territoire recevant la projection de l'œil le moins actif (Penn et al., 1998; Stellwagen and Shatz, 2002). Ces données suggèrent que les signaux AMPc pourraient agir en aval de l'activité spontanée sur la compétition activité-dépendante entre les projections des deux yeux pour occuper un territoire particulier dans les cibles.

Cependant, le phénotype obtenu pourrait aussi être expliqué par une action des signaux AMPc en amont de l'activité. En effet, les vagues d'activité spontanée dans la rétine sont affectées par des perturbations des signaux AMPc (Stellwagen et al., 1999) et l'E*IU* touche des CGRs mais aussi des cellules amacrines ou bipolaires. Donc, le phénotype que l'on observe ici pourrait être dû à une perturbation de l'activité des CGRs par perturbation des signaux AMPc. Il est connu que la perturbation des signaux AMPc générés par l'AC1 n'affecte pas l'activité des CGRs car les rétines AC1KO ne présentent pas de défauts de l'activité spontanée (Dhande et al., 2012). Mais ici, la perturbation est plus large, elle affecte tous les signaux AMPc générés dans les radeaux lipidiques.

Afin de savoir si le phénotype obtenu est du à une perturbation des signaux AMPc importants pour le raffinement des projections en amont ou en aval de l'activité

rétinienne spontanée, il suffira d'évaluer les vagues d'activité spontanée et l'activité des CGRs des rétines électroporées par la Lyn-éponge AMPc par imagerie calcique ou en enregistrant l'activité électrique de la rétine avec des multiélectrodes array.

La perturbation de l'activité dans les deux yeux entraine des défauts de ségrégation œil spécifique avec la projection controlatérale qui occupe le CGLd entièrement y compris le territoire ipsilatéral et avec des projections ipsilatérales ectopiques dans le territoire controlatéral. Si les signaux AMPc agissent bien en aval de l'activité, la perturbation des signaux AMPc dans un seul œil par E*IU* dans un modèle de souris où l'activité est perturbée dans les deux yeux, chez les beta2 KO par exemple, devrait annuler le phénotype observé lorsque seule la signalisation AMPc est perturbée dans un œil et entrainer les défauts classiques observés chez les beta2KO.

D- Signaux AMPc et compétition entre projéctions rétiniennes

Il est intéressant de noter que la perturbation des signaux AMPc dans les deux yeux chez la souris AC1 KO entraine des défauts de ségrégation œil spécifique mais des projections ipsilatérales et controlatérales sont bien présentes des deux côtés. Ce phénotype est similaire à celui observé suite à la perturbation de l'activité dans les deux yeux renforçant l'idée que les signaux AMPc agiraient en aval de l'activité. Il est aussi similaire au phénotype de la souris contrôle au début du développement à P3-5 avant le raffinement des projections. Le phénotype obtenu suite à la perturbation de l'activité ou de la signalisation AMPc dans un seul œil, quant à lui, ne présente pas de défauts de ségrégation œil spécifique mais il entraine la diminution de la projection ipsilatérale d'un côté et controlatérale de l'autre, par invasion de leur territoire par les projections non perturbées. Ces données suggèrent que le blocage de l'activité ou de la signalisation AMPc dans les deux yeux annulent le processus de compétition et entrainent un maintien des projections à l'état immature non raffiné alors que le blocage de l'activité ou de la signalisation AMPc dans un seul œil donne l'avantage aux projections non perturbées au cours du processus de compétition.

E- Coopérer pour gagner

Le phénotype obtenu suite à la perturbation dans un œil des signaux AMPc dans la rétine VT périphérique entraine presque la disparition de la projection ipsilatérale entière, électroporée marquée par la GFP et même non électroporée marquée en CTB dans le CGLd et dans le CS ipsilatéralement à l'électroporation, ainsi que la disparition de la projection controlatérale dans le territoire très dorsal du CGLd ou dans le SGS du CS médial, électroporée marquée par la GFP et même non électroporée marquée en CTB, controlatéralement à l'électroporation.

D'une part, ces observations suggèrent que les CGRs correspondant à ces projections qui ont disparu meurent suite à des mécanismes impliquant les signaux AMPc lors de la compétition ou que ces projections sont restreintes à de toutes petites zones de branchement encadrant la projection non perturbée qui s'est étendue. Afin de savoir si les projections sont présentes plus tôt au cours du développement puis disparaissent suite au fait qu'elles perdent la compétition, il serait intéressant d'analyser le phénotype plus tôt à P5.

D'autre part, l'E*IU* ne permet pas de toucher toutes les CGRs ipsilatérales, ni toutes les CGRs controlatérales du VT, mais seule une certaine fraction des CGRs du VT est électroporée. Pourtant, bien que seul un certain pourcentage de CGRs ipsilatérales et controlatérales présente une inhibition de la signalisation AMPc, la majorité de la population de CGRs ipsilatérales d'un côté et controlatérales dans le territoire très dorsal du CGLd de l'autre côté est affectée. Ainsi, ces données suggèrent qu'il n'y aurait pas qu'une compétition entre les projections ipsilatérales et controlatérales à l'échelle individuelle localement pour connecter certains neurones cibles, il y aurait en fait plus largement une compétition de population, « ipsilatérale versus controlatérale ». Les projections provenant d'un même œil auraient besoin de coopérer ensemble pour gagner la compétition contre les projections provenant de l'autre œil (se maintenir dans leur territoire et en exclure les projections de l'autre œil).

Cette hypothèse pourrait être testée par l'électroporation de constructions qui permettent de marquer à la fois des projections perturbées et des projections non perturbées voisines venant du même œil (technologie brain-bow) et de suivre leur devenir.

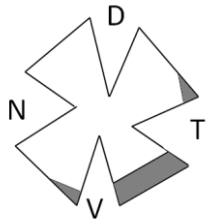
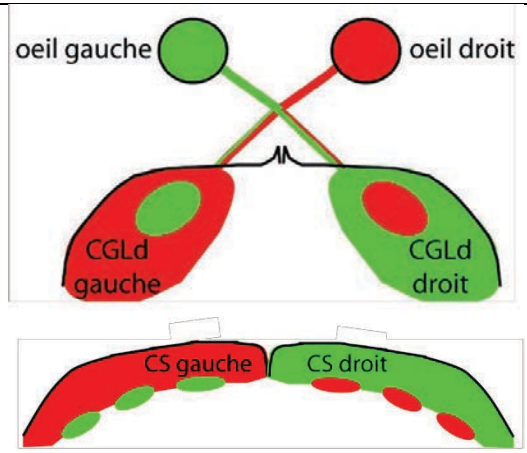
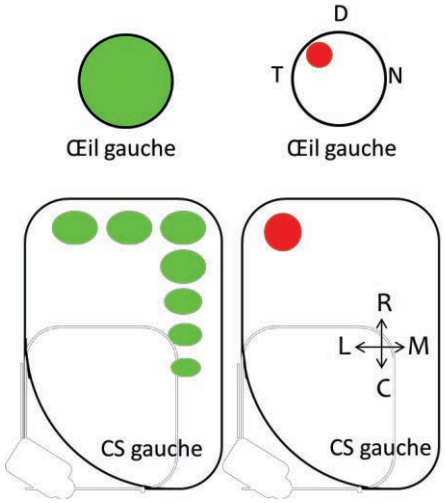
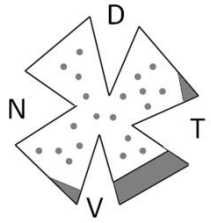
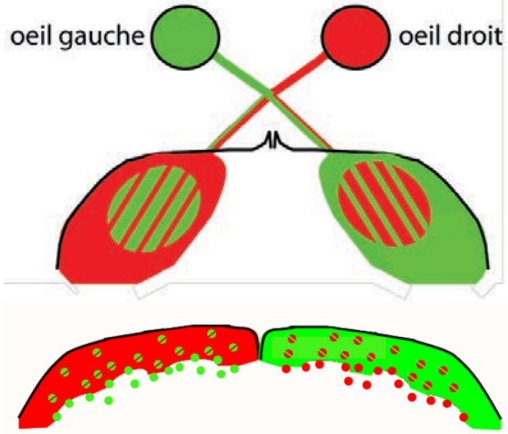
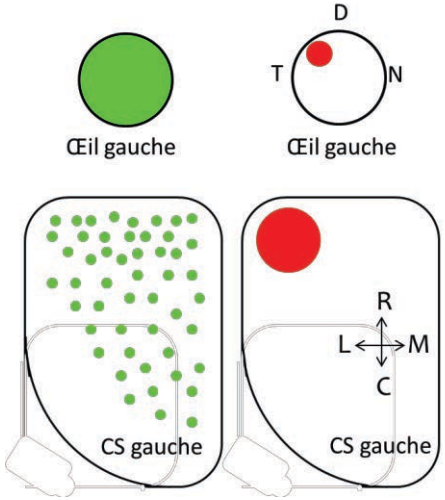
DISCUSSION

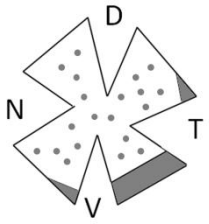
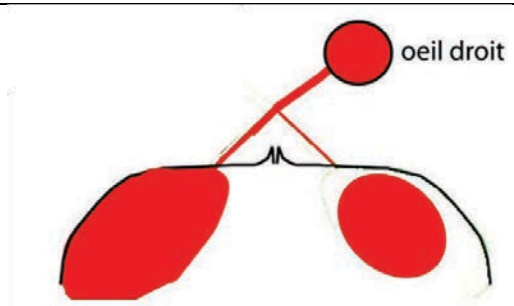
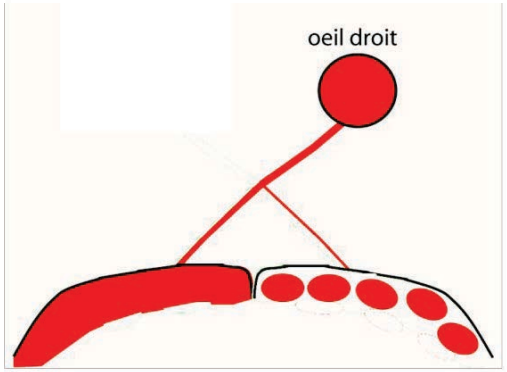
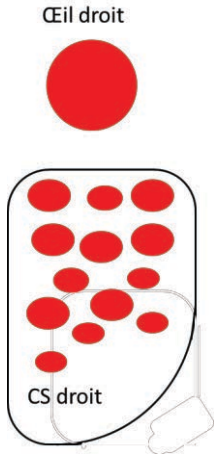
Le développement des projections rétiniennes inclut le guidage des axones rétiniens à leurs cibles dans le cerveau, l'établissement puis le raffinement des connexions neuronales.

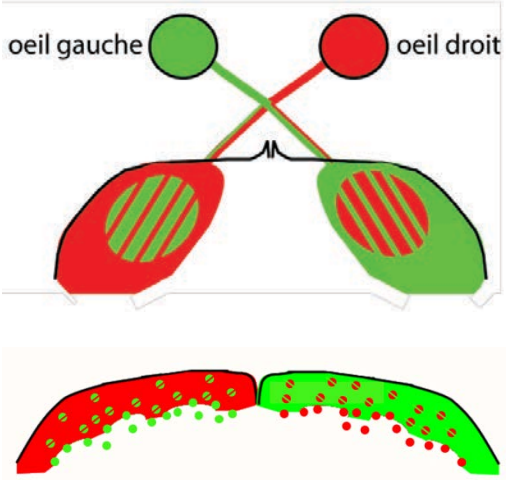
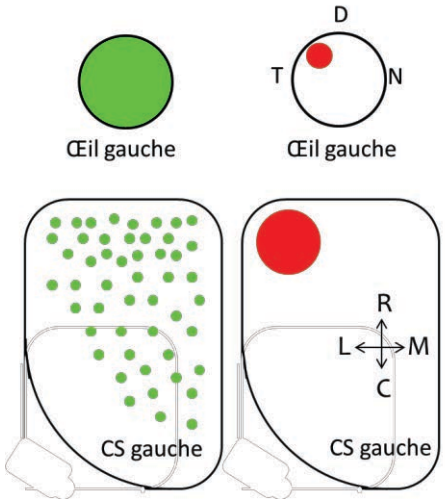
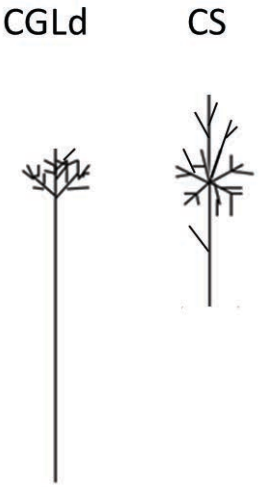
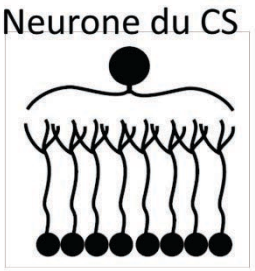
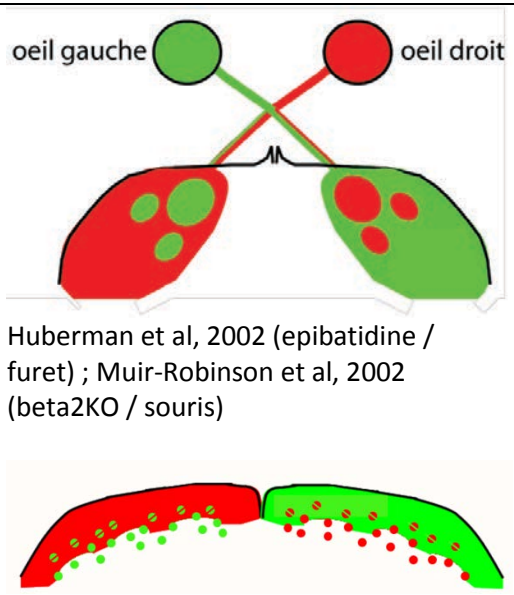
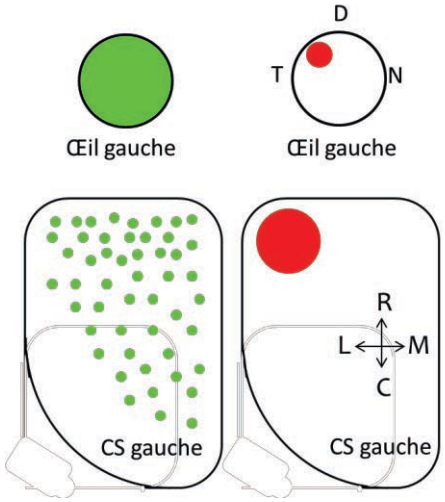
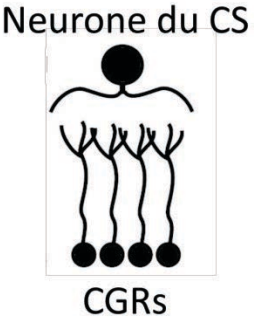
Les mécanismes qui sous-tendent le développement des projections rétiniennes sont diverses (Tableau 2). Certains de ces mécanismes sont bien décrits tandis que d'autres nécessitent des travaux supplémentaires.

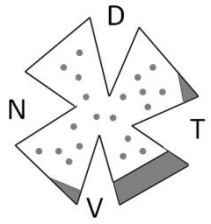
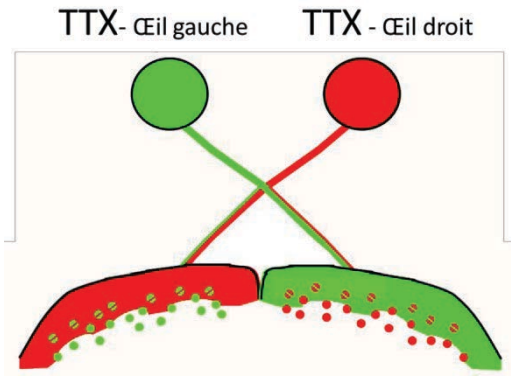
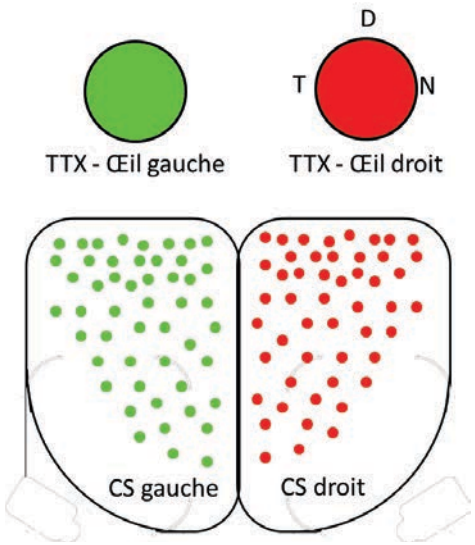
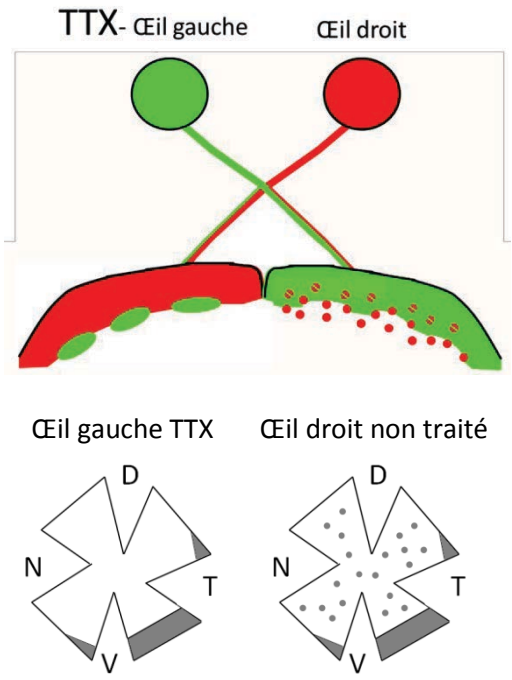
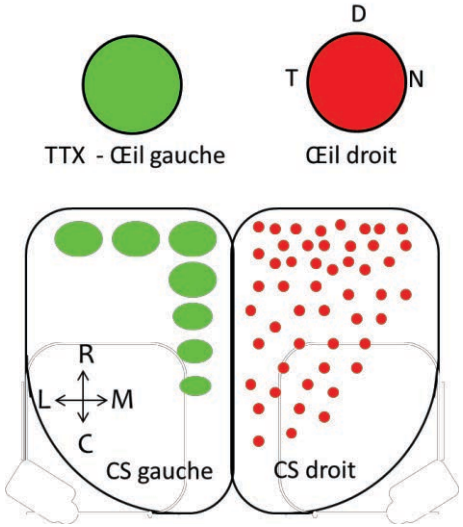
Nous discuterons dans une première partie des mécanismes activité-dépendants importants pour le raffinement des cartes visuelles, notamment du rôle de la libération synaptique de la rétine à ses cibles. Dans une deuxième partie, nous présenterons les mécanismes liés aux signaux AMPc dans le développement des projections rétiniennes. Dans une dernière partie, nous présenterons un lien éventuel entre les signaux AMPc pré-synaptiques et la libération synaptique au cours du raffinement des projections rétiniennes.

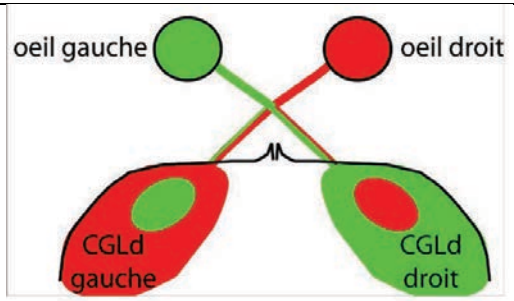
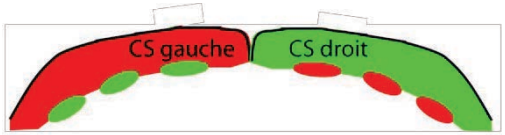
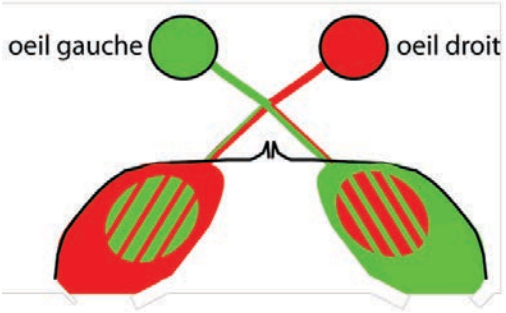
Tableau 2 : Récapitulatif des phénotypes dans le système visuel

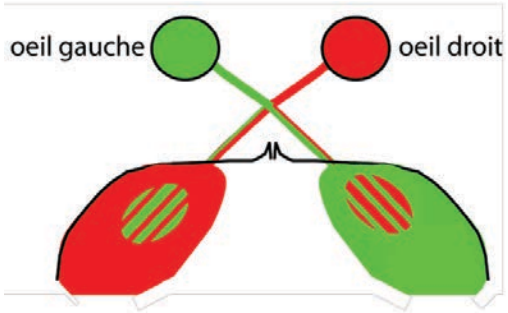
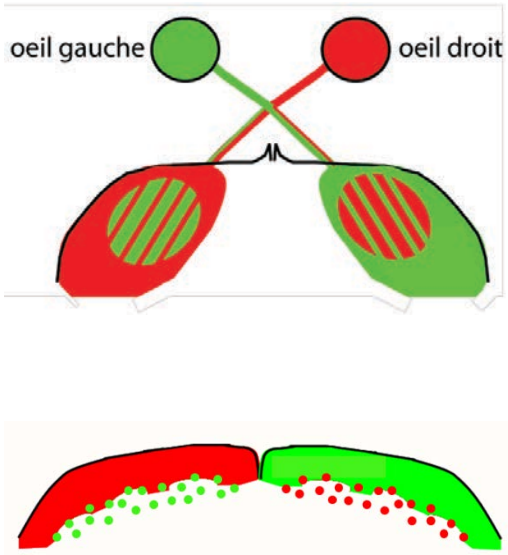
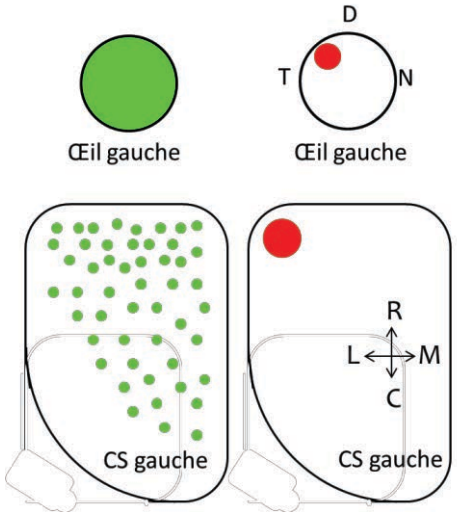
Génotype/ Perturbation	Localisation des CGRs ipsilatérales dans la rétine	Carte œil spécifique dans le CGLd + dans le CS	Topographie de la projection ipsilatérale + Rétinotopie de la projection controlatérale	Reconstruction d'une projection controlatérale unique	Raffinement fin de la rétinotopie
Contrôle adulte	 Ravary et al, 2003 (souris) ; Fawcett et al, 1984 (rat) ; Insausti et al, 1984 (hamster)	 Godement et al, 1984	 Godement et al, 1984 ; MacLaughlin et al, 2003	CGLd et CS  Dhande et al, 2011 ; Benjumeda et al, 2013	Dans le CGLd **à P18**, un neurone cible reçoit des afférances de seulement de 1 à 3 CGRs (Jaubert-Miazza et al, 2005 ; Chen et Regehr, 2000). Dans le CS à **P21-25**, un neurone cible reçoit des afférances d'environ 5 CGRs (Chandrasekaran et al, 2007).
Contrôle P3	 Ravary et al, 2003 (souris) ; Fawcett et al, 1984 (rat) ; Insausti et al, 1984 (hamster)	 Godement et al, 1984 ; Wu et al, 2000	 Godement et al, 1984 ; Dharmaratne et al, 2012 ; MacLaughlin et al, 2003	CGLd et CS  Dhande et al, 2011	Dans le CGLd à **P8-P10**, un neurone cible reçoit des afférances de plus de 10 CGRs différentes (Jaubert-Miazza et al, 2005 ; Chen et Regehr, 2000). Dans le CS à **P6-P7**, un neurone cible reçoit des afférances d'environ 5 CGRs différentes (Chandrasekaran et al, 2007).

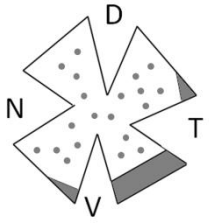
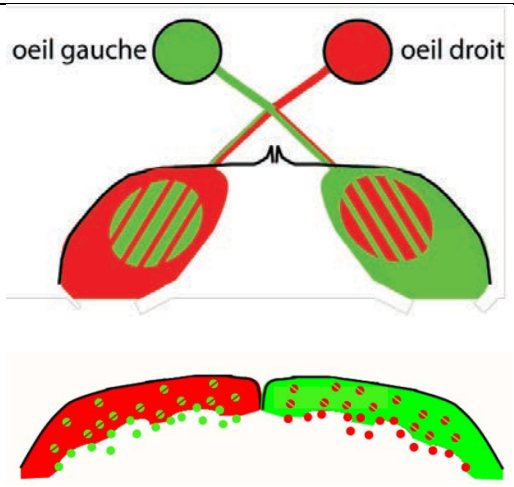
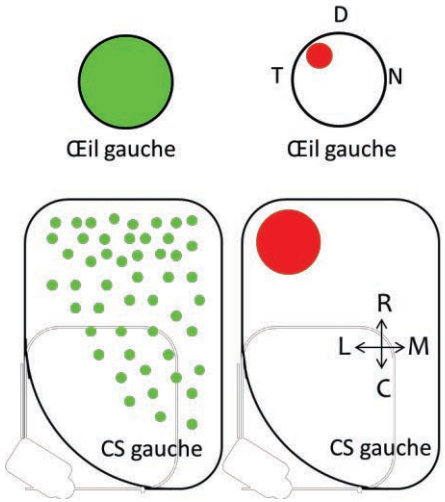
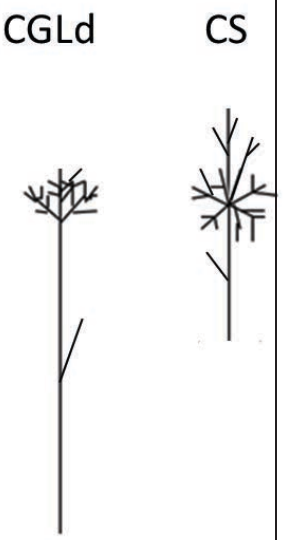
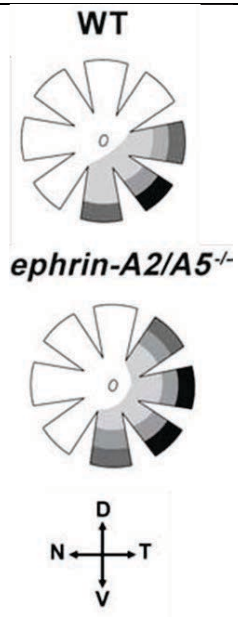
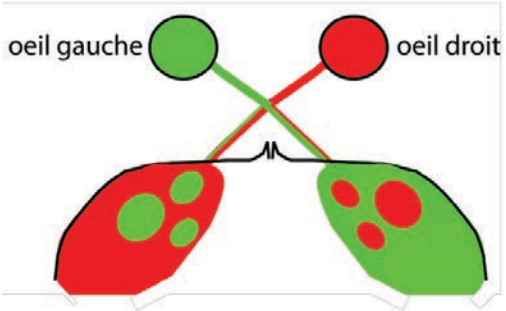
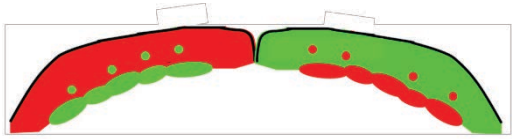
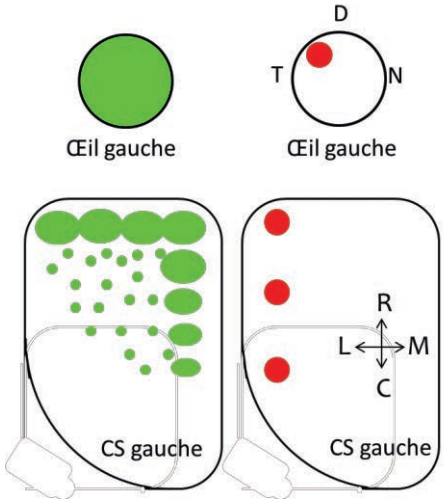
Enucléation	 Insausti et al, 1984 (hamster) ; Fawcett et al, 1984 (rat)	  Godement et al, 1980 (souris) ; Insausti et al, 1984 (hamster) ; Fawcett et al, 1984 (rat)	 Godement et al, 1980 (souris) ; Insausti et al, 1984 (hamster) ; Fawcett et al, 1984 (rat)	Non évalué	Non évalué

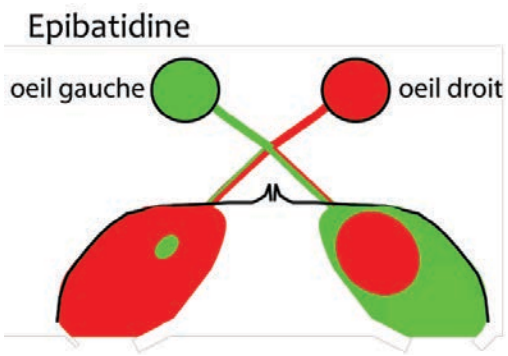
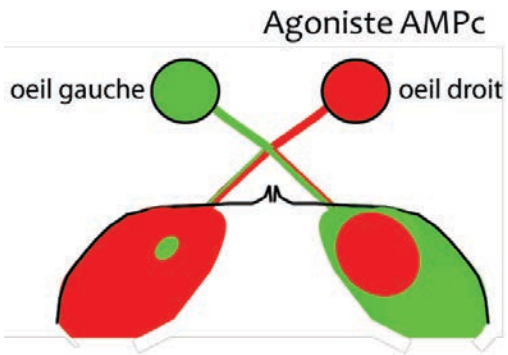
Beta2KO / Epibatidine 2yeux (Perturbation des vagues spontanées cholinergiques) Souris jeune P8-P10	Non évalué à ma connaissance	 Rossi et al, 2001 (Beta2KO et épibatidine / souris) ; Xu et al, 2011 (beta2KO / souris)	 Rossi et al, 2001 ; McLaughlin et al, 2003 ; Xu et al, 2011 ; Chandrasekaran et al, 2005	 Dhande et al, 2011 **P15 / rétine VT**	 Dans le CS à **P6-P7**, un neurone cible reçoit des afférances de 8 ou 9 CGRs différentes (Chandrasekaran et al, 2007).
Beta2 KO / Epibatidine 2 yeux Adultes	Non évalué à ma connaissance	 Huberman et al, 2002 (epibatidine / furet) ; Muir-Robinson et al, 2002 (beta2KO / souris) Rossi et al, 2001 (beta2KO / souris)	 Rossi et al, 2001 ; Chandrasekaran et al, 2005		 Dans le CS à **P21-25**, un neurone cible reçoit des afférances d'environ 5 CGRs comme chez le contrôle (Chandrasekaran et al, 2007).

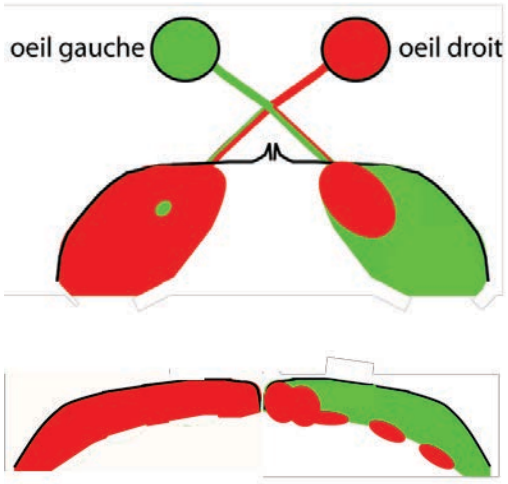
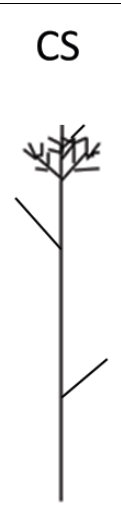
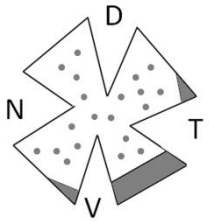
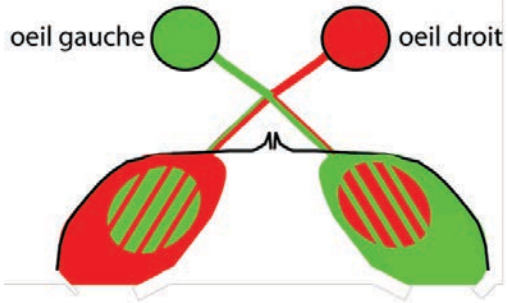
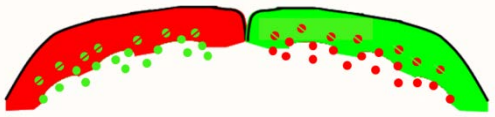
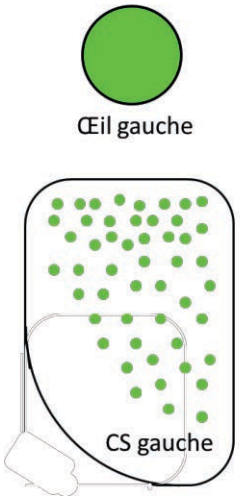
TTX dans les 2 yeux (Blocage de l'actiité par blocage des potentiels d'action) Rat	 Fawcett et al, 1984	 Fawcett et al, 1984	 Fawcett et al, 1984	Non évalué	Le blocage de l'activité spontanée par injection de TTX de P11 à P14 empêche le raffinement fin d'avoir lieu : à P15-16, un neurone cible dans le CGLd reçoit des afférances de nombreuses CGRs comme chez le contrôle immature à P8-P10 (Hooks et Chen, 2006).
TTX dans un œil Rat		 Fawcett et al, 1984	 Fawcett et al, 1984	 Benjumeda et al, 2013 : **fibre unique électroporée *in utero* Kir2.1 (souris). P10 / rétine centrale**	Non évalué

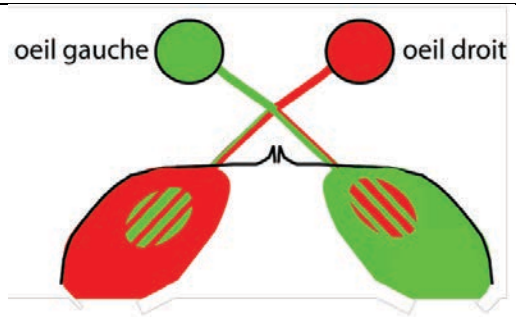
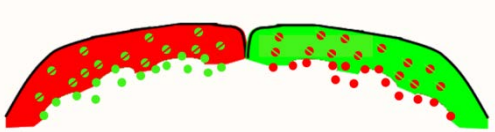
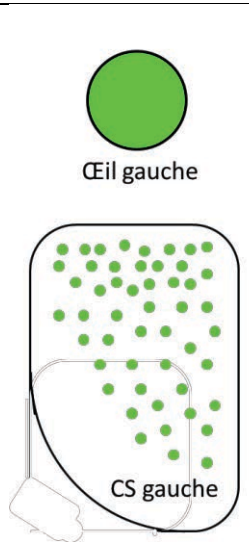
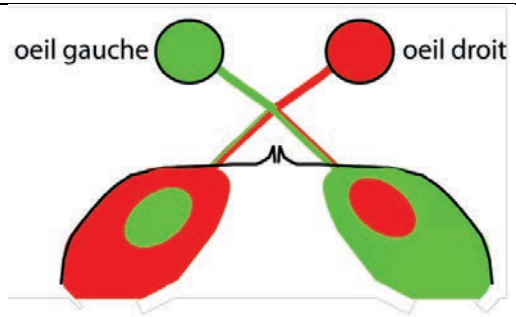
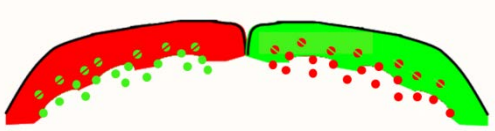
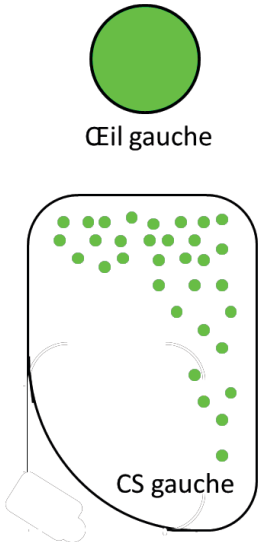
Blocage du récepteur NMDA	Non évalué	 Smetters et al, 1994 (furet)  Colonnese et al, 2001 (rat) Verifier si projection ipsi diffuse ou non ?	Simon et al, 1992 : blocage NMDA entraine Zone de Terminaison plus large dans le CS provenant du VT avec quelques fibres en caudal (rat). Huang et Pallas, 2001 : blocage NMDA entraine champ récepteur plus large dans le CS (hamster). Nicol et al, 2007 : blocage R AMPA ou R NMDA n'entraine pas de défauts de rétinotopie dans un système de co-culture rétino-colliculaire (souris). Cline et Constantine-Paton, 1989 : blocage R NMDA entraine un défaut de raffinement de la rétinotopie dans le tectum (grenouille).	Non évalué	Non évalué
CCKO (Déletion du gène codant pour les canaux calciques de type L) Souris	Non évalué	 Images du CS en coupes coronales mais difficile de conclure quant à l'extension dorso-ventrale de la projection ipsi (on ne voit pas bien sur les images) ; projection ipsi assez compacte. Cork et al, 2001	Ça s'étend en latéro-caudal mais ce n'est pas diffus, plutôt compact comme le contrôle. Cork et al, 2001	Non évalué	Non évalué

VGlut2 cKO (forte diminution de la libération de glutamate spécifiquement des projections ipsilatérales)	Non évalué	 Koch et al, 2011	Non évalué	Non évalué	Non évalué
Rim cDKO (diminution de la ibération synaptique calcium-dépendante de 40% des CGRs)					

Adénylate Cyclase 1 KO	 Ravary et al, 2003	 Ravary et al, 2003 ; Nicol et al, 2006	 Ravary et al, 2003 ; Dhande et al, 2012	 Dhande et al, 2012 **P15 rétine temporale**	Non évalué
Ephrine KO ou Eph KO	 Haustead et al, 2008	 Pfeiffenberger et al, 2005 (Ephrines A2/A3/A5 tKO)  Haustead et al, 2008 (Ephrines A2/A5 dbKO)	 Haustead et al, 2008 (Ephrines A2/A5 dbKO) Pfeiffenberger et al, 2006 (Ephrines A2/A3/A5 tKO) ; Feildheim et al, 2004 (EphA5 KO)	Non évalué	Non évalué

Epibatidine dans un oeil Furet	Non évalué	 Penn et al, 1998	Non évalué	Non évalué	Non évalué
Agoniste AMPc dans un œil (augmentation de la taille et de la fréquence des vagues spontanées) Furet	Non évalué	 Stellwagen et al, 2002	Non évalué	Non évalué	Non évalué

Expression de l'éponge AMPc dans une fraction de CGRs du VT Souris	Non évalué		Non évalué	 Expression de l'éponge AMPc dans le centre de la rétine. **P10**	Non évalué
MAOA KO (modèle excès de 5HT dans le cerveau) Souris	 Upton et al, 1999	 Sauvetage du phénotype si MAOA/5HT1B dbKO  Pas de sauvetage du phénotype (diffus) si MAOA/5HT1B db KO Upton et al, 1999	 Sauvetage du phénotype si MAOA/5HT1B db KO (pas d'éxubérance en caudal)	Non évalué	Non évalué

SERT KO (modèle excès de 5HT dans le cerveau) Souris	Non évalué	 Sauvetage du phénotype si SERT/5HT1B dbKO ou si SERT KO + traitement PCPA (diminution des taux de 5HT)  Sauvetage partiel du phénotype si SERT/5HT1B db KO ou si SERT KO + PCPA (moins diffus) Upton et al, 2002	 Sauvetage du phénotype si SERT/5HT1B db KO (pas d'éxubérance en caudal) ; Upton et al, 2002	Non évalué	Non évalué
5HT 1B KO Souris	Non évalué	 Salichon et al, 2001  Upton et al, 2002	 Upton et al, 2002	Non évalué	Non évalué

I- Mécanismes activité-dépendants et raffinement des cartes visuelles

L'activité rétinienne est impliquée dans le raffinement des projections rétiniennes. Nous avons spécifiquement étudié le rôle de la libération synaptique de la rétine à ses cibles.

A- Validité du modèle Rim cDKO pour l'étude du rôle de la libération synaptique

Afin d'étudier le rôle de la libération synaptique de la rétine à ses cibles dans le développement des projections rétiniennes, nous avons délété de manière conditionnelle les gènes Rim 1 et 2 dans les CGRs, par utilisation de souris exprimant la Cre recombinase sous contrôle du promoteur du gène Sert (modèle RimcDKO, Article 1). L'expression de Sert est restreinte au croissant ventro-temporal de la rétine et aux CGRs ipsilatérales. Cependant, dans notre modèle Rim cDKO, la recombinaison a eu lieu dans des CGRs localisées dans toute la rétine, suggérant une fuite de l'expression de la Cre.
Etant donné que la recombinaison est toutefois spécifique aux CGRs et que les CGRs sont parmi les premières cellules de la rétine à être générées, il est peu probable que la recombinaison ait lieu dans les progéniteurs qui donnent naissance à l'ensemble des cellules de la rétine. Une explication serait que les CGRs controlatérales expriment aussi Sert mais de manière très transitoire, entrainant cette large recombinaison qui touche des CGRs localisées dans toute la rétine.

Dans la rétine de souris rapportrices adultes âgées de deux mois (souris Sert-Cre croisées à des souris Tau lox-stop-lox GFP LacZ), la majorité des CGRs controlatérales marquées de manière rétrograde sont recombinées (βGalactosidase-positives). En revanche, à P7, environ seulement 40% des CGRs marquées par Brn3 (spécifique des CGRs) sont recombinées (βGalactosidase-positives). Cette différence pourrait être expliquée par le fait que toutes les CGRs ne projettent pas dans le thalamus car 70 à 80% des CGRs sont marquées par Brn3 alors que seules les CGRs projetant dans le CGLd sont marquées par traçage rétrograde. Donc la différence en pourcentage de CGRs recombinées à P7 et à l'âge adulte pourrait être expliquée par la manière de marquer les CGRs. L'expression de Sert débute à E15 (Upton et al., 1999). L'autre possibilité est qu'à

P7, seule une fraction de CGRs a pu être recombinée et que la recombinaion continue après P7.

Sert est exprimé ailleurs dans le cerveau que dans la rétine, notamment dans le raphé et dans le CGLd lui-même (Narboux-Neme et al., 2008). Donc, le modèle Rim cDKO présente une diminution de la libération synaptique des projections sérotoninergiques et des projections thalamo-corticales qui pourraient être à l'origine du phénotype observé dans le système visuel.

L'étude de modèles hypersérotoninergiques a démontré que la sérotonine est impliquée dans le développement des projections rétiniennes (Upton et al., 1999; Upton et al., 2002). Pet1 est un facteur de transcription important pour la différenciation des neurones sérotoninergiques ; sa délétion entraine l'élimination de la majorité des neurones sérotoninergiques créant un modèle hyposérotoninergique (Hendricks et al., 2003). Vmat est le transporteur vésiculaire de la sérotonine ; sa délétion crée aussi un modèle hyposérotoninergique (Narboux-Neme et al., 2011). Les souris Pet1 KO et les souris Vmat KO conditionnelles (croisement de souris Vmat « floxé » avec la souris Sert-Cre) ne présentent pas de défauts de la carte œil spécifique (résultats non présentés ici). Ainsi, le phénotype des souris RimcDKO n'est pas dû à une diminution de sérotonine dans le cerveau.

Le cortex envoie des projections au thalamus et au CS. Les cellules du cortex visuel situées dans la couche VI innervent le CGLd seulement à la fin de la deuxième semaine postnatale (Jacobs et al., 2007). Les afférences du cortex commencent à arboriser dans le CS seulement après P7 (Lopez-Medina et al., 1989) et leur raffinement a lieu à la fin de la deuxième semaine post-natale (Thong and Dreher, 1986; Lopez-Medina et al., 1989; Binns and Salt, 1997). Le raffinement de la carte œil spécifique et de la rétinotopie ayant lieu au cours de la première semaine post-natale, il est donc peu probable que ce raffinement implique les afférences provenant du cortex. Donc il est peu probable que la perturbation de la libération synaptique des projections thalamo-corticales, qui pourraient être importantes pour le développement des projections cortico-thalamiques et cortico-colliculaires, soit la cause du phénotype des souris Rim cDKO.

Une alternative à l'utilisation de la souris Sert-Cre, afin de déléter les gènes Rim seulement dans la rétine, aurait été d'électroporer la Cre recombinase *in utero* dans l'œil.

Cependant, l'électroporation d'un plasmide exprimant la Cre sous un promoteur ubiquitaire tel que pCAG ne serait pas spécifique des CGRs et entrainerait la recombinaison de Rim dans tous les types cellulaires de la rétine, y compris les cellules amacrines et les cellules bipolaires. La délétion de Rim dans ces interneurones entrainerait une perturbation des vagues rétiniennes et donc de l'activité des CGRs. Ainsi, dans ce contexte, il serait impossible de faire la distinction entre un effet synaptique et un effet non synaptique de l'activité dans les CGRs sur le développement des projections rétiniennes et les résultats n'apporteraient pas de nouveauté dans ce qui est déjà connu.

De plus, jusqu'à maintenant, il n'y a pas de gène spécifique des CGRs exprimé en prénatal (suffisamment tôt) dont le promoteur pourrait servir à faire exprimer des gènes d'intérêt dans les CGRs pour étudier le développement des cartes visuelles. Thy1 est une glycoprotéine exprimée à la surface des CGRs mais aussi de certaines cellules amacrines (Raymond et al., 2008). Islet est un facteur de transcription spécifique des CGRs mais comme Thy1, ils est exprimé trop tard en post-natal pour être utilsé pour étudier le développement des projections rétiniennes. Les gènes Brn3 (facteurs de transcription) sont spécifiques des CGRs et exprimés en embryonnaire mais il existe différentes isoformes de Brn 3 (a, b etc) et chacune des isoformes n'est exprimée que dans une sous-population de CGRs. Donc l'expression d'un gène d'intérêt sous le contrôle de ce type de promoteur ne concernerait qu'une certaine fraction des CGRs.

Des virus ayant un tropisme spécifique pour les CGRs commencent à être générés pour transfecter des rétines adultes mais ils ne sont pas encore efficaces sur des rétines embryonnaires. S'ils sont exprimés assez vite par les cellules, leur injection *in utero* pourrait devenir une alternative à l'électroporation.

Ainsi, le modèle RimcDKO présente des imperfections, mais il reste un bon modèle d'étude de la libération synaptique dans le développement des cartes visuelles.

B- Activité rétinienne et carte œil spécifique

La libération synaptique est impliquée dans la ségrégation œil spécifique dans le CGLd mais pas dans le CS (Article 1).

1- Carte oeil spécifique dans le CGLd

Les souris RimcDKO présentent des défauts de ségrégation œil spécifique dans le CGLd (Article 1) : la projection controlatérale est présente dans le CGLd entier, y compris dans le territoire ipsilatéral et des projections ipsilatérales sont présentes dans le territoire controlatéral. Ce phénotype est similaire au phénotype immature. Le phénotype RimcDKO pourrait ainsi être dû au fait que les projections ipsilatérales et controlatérales ne sont plus en compétition synaptique entre elles, elles restent donc figées à un état immature.

Une étude s'est intéressée au rôle de la compétition synaptique entre les projections ipsilatérales et controlatérales pour occuper un territoire particulier dans le CGLd. Le transporteur du glutamate VGlut 2 a été délété spécifiquement des CGRs ipsilatérales qui présentent donc une forte réduction de la libération de glutamate (Koch et al., 2011). Dans ce modèle, les projections controlatérales couvrent entièrement le CGLd y compris le territoire ipsilatéral. Cependant, la projection ipsilatérale est restreinte à son territoire, ni plus ni moins étendue que la normale. Le fait que le modèle RimcDKO présente des projections ipsilatérales ectopiques dans le territoire controlatéral alors que ce n'est pas le cas dans le modèle VGlut2 cKO, suggère que la libération synaptique des projections controlatérales est nécessaire à l'élimination ou à l'inhibition de la présence de projections ipsilatérales dans le territoire controlatéral.
Par ailleurs, dans le modèle RimcDKO, la diminution de la libération synaptique ne concerne pas seulement le glutamate mais tous les facteurs potentiellement libérés de manière dépendante du calcium à la synapse. Dans le modèle VGlut2, seul le glutamate est concerné, ce qui démontre que la libération de glutamate par les projections ipsilatérales est nécessaire et suffisante à l'élimination des projections controlatérales de leur territoire.

Maintenant qu'il est clair que l'activité rétinienne et que la libération synaptique sont importantes pour la ségrégation œil spécfique, il serait intéressant d'explorer plus précisément les mécanismes impliqués : identifier les récepteurs post-synaptiques impliqués, identifier les liens/molécules de communicaton entre les projections rétiniennes, les cellules de la glie et de la microglie qui phagocytent les synapses mal positionnées et les cellules cibles.

2- Ségrégation ou lamination œil spécifique dans le CS ?

La perturbation de l'activité spontanée cholinergique chez la souris beta2KO entraine un défaut de ségrégation à P10 dans le CS : la projection ipsilatérale est présente de manière ectopique dans le SGS (Xu et al., 2011). La rétraction de la projection ipsilatérale ne dépend pas de la libération synaptique (Article 1), elle dépend en revanche de l'AC1 qui pourrait médier l'effet de l'activité spontanée car les souris AC1 KO présentent aussi des projections ipsilatérales dans le SGS (Ravary et al., 2003).

Cependant, les mécanismes impliqués dans l'établissement de la carte œil spécifique semblent différents dans le CGLd et le CS.

D'abord, dans le CGLd, la ségrégation est principalement dûe à l'élimination des projections controlatérales du territoire ipsilatéral alors que dans le CS, c'est le contraire, elle est principalement dûe à l'élimination des projections ipsilatérales du territoire controlatéral (SGS). Donc globalement dans le CGLd, les projections ipsilatérales gagnent et se maintiennent là où elles sont initialement alors que dans le CS, elles perdent et se rétractent. De plus, l'établissement des domaines œil spécifique dans le CGLd et le CS n'ont pas lieu aux mêmes périodes : dans le CGLd, la ségrégation dure de P4 à P8 environ alors que dans le CS, il y a une présence dense de terminaisons ipsilatérales dans le CS seulement à P3 et à P4, la projection ipsilatérale est déjà principalement localisée dans le SO (Godement et al., 1984).

Ensuite, contrairement au CGLd, le rôle de l'activité dans la formation de la carte œil spécifique du CS peut être controversé. D'ailleurs, la littérature concernant le CGLd

utilise les termes de « ségrégation œil spécifique activité-dépendante » alors que celle concernant le CS utilise parfois le terme de « lamination ».

Les premières expériences qui ont suggéré une compétition activité dépendante entre les projections des deux yeux pour occuper une couche particulière (SGS ou SO) dans le CS sont des expériences d'énucléation. Le fait de retirer un œil à la naissance entraine l'invasion du SGS par la projection ipsilatérale de l'œil intact (Tableau 2 ; refs). Mais dans ce cas, les projections ipsilatérales pourraient envahir le SGS seulement car celui-ci est complètement libre. D'ailleurs, suite à une lésion à P5-6 d'une partie de la rétine controlatérale, des projections ipsilatérales envahissent le SGS au niveau du CS laissé vide par la dégénérescence des projections controlatérales dont les CGRs sont mortes (Colonnese and Constantine-Paton, 2001).

Suite à la perturbation de l'activité rétinienne par injection intraoculaire de TTX dans les deux yeux chez le rat et le hamster, la projection ipsilatérale est localisée dans le SO (Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989). De plus, dans le CGLd, la perturbation de l'activité dans un seul œil par injection monoculaire d'épibatidine chez le furet entraine l'invasion du territoire recevant les projections perturbées par les projections actives alors que dans le CS, la perturbation de l'activité rétinienne dans un seul œil par injection monoculaire de TTX chez le rat et le hamster n'entraine pas l'invasion du SGS contenant les projections controlatérales inactives, par la projection ipsilatérale active (Tableau 2 ; (Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989) ; la bibliographie ne contient aucune donnée concernant la ségrégation œil spécifique dans le CS suite à une injection monoculaire d'épibatidine.

Par ailleurs, contrairement au CGLd, la libération synaptique n'est pas nécessaire à la ségrégation oeil spécifique dans le CS (cf Article 1) : la projection ipsilatérale des souris Rim conditional dbKO est un peu diffuse en dorso-ventral mais elle est localisée dans le SO. Le blocage du récepteur NMDA dans le CS n'entraine pas non plus de défauts de ségrégation (Colonnese and Constantine-Paton, 2001).

Ces résultats dans leur ensemble suggèrent que la ségrégation œil spécifique dans le CS n'implique pas de compétition synaptique. D'ailleurs, aucune donnée n'existe encore

quant au fait de savoir si la ségrégation œil spécifique dans le CS implique une phase où une cellule colliculaire reçoit des afférences des deux yeux avant de recevoir des afférences seulement d'un œil, comme c'est le cas dans le CGLd (Furman et al., 2013). Afin de répondre à cette question, il suffirait d'utiliser le modèle de tranche de cerveau contenant le CS et le tractus optique (Furman et al., 2013) mais contenant aussi le nerf optique afin de stimuler de manière distincte chacun des deux yeux et d'enregistrer la réponse dans une même cellule colliculaire.

Une expérience semble tout de même indiquer qu'une compétition synaptique pourrait être importante pour la ségrégation œil spécifique dans le CS (Zhang et al., 2011). Selon le concept de Hebb, la compétition entre axones importante pour la ségrégation œil spécifique serait basée sur la différence du profil temporel de l'activité entre les CGRs ipsilatérales et controlatérales (Figure 12). Une étude a exploré le rôle de cette différence du profil temporel de l'activité entre les projections ipsilatérales et controlatérales pour occuper un territoire particulier dans le CS : la synchronisation temporelle de l'activité des deux yeux entraine la présence de projections ipsilatérales dans le SGS, suggérant que la ségrégation œil spécifique dans le CS impliquerait bien une compétition synaptique selon Hebb. Cependant, dans cette étude, la modulation de l'activité est effectuée entre P5-6 et P7-8 ou entre P9-10 et P11-12, après que la ségrégation soit presque complètement terminée dans le CS (Godement et al., 1984). Donc, il est difficile de conclure quant au rôle du profil temporel de l'activité dans la sélection des synapses puisqu'anatomiquement les projections des deux yeux sont déjà séparées à l'âge de la perturbation.

C- Libération synaptique et rétinotopie des projections controlatérales

1- Raffinement de la ZT et libération synaptique

Nous avons montré que le rôle de l'activité rétinienne dans le raffinement de la ZT n'implique pas par la libération synaptique (Article 1) dans le CS. Ce résultat est étonnant car le mécanisme proposé pour expliquer le raffinement de la ZT est l'élimination de synapses mal positionnées par une compétition synaptique selon Hebb

entre les projections provenant du même œil mais de localisations différentes dans la rétine (Figure 6 et 12). Ce résultat suggère que la restriction de l'arborisation et l'élimination des branches ectopiques le long des axones seraient dépendantes de l'activité et de la signalisation AC1 indépendamment d'une communication des projections avec les cellules cibles.

Une autre possibilité serait que la libération synaptique est requise mais que la diminution de la libération synaptique par la délétion des gènes Rim n'est pas assez drastique pour induire un défaut de rétinotopie. En effet, le modèle RimcDKO a été utilisé pour étudier le rôle de la libération synaptique thalamo-corticale dans la formation des barils (Narboux-Neme et al., 2012). Le phénotype obtenu est mineur comparé à celui obtenu par un modèle de souris VGlut2 KO conditionnelle (Li et al., 2013).

Cependant, il faut signaler que la diminution de la libération synaptique dans le modèle RimcDKO est suffisante pour induire des défauts de ségrégation œil spécifique et de topographie de la projection ipsilatérale. De plus, le blocage des récepteurs AMPA et NMDA dans un sytème de co-culture rétino-colliculaire n'entraine pas de défauts de raffinement de la rétinotopie (Nicol et al., 2007). Donc la libération synaptique pourrait bel et bien être inutile au raffinement de la rétinotopie des projections controlatérales.

Par ailleurs, il aurait été intéressant d'évaluer le raffinement de la rétinotopie dans le CGLd afin de déterminer si l'effet de la libération synaptique serait dépendant de la cible. De plus, il semble que des défauts de ségrégation œil spécifique peuvent interférer avec le raffinement de la rétinotopie ((Xu et al., 2011). Afin de tester cette hypothèse, il aurait été intéressant d'évaluer la taille de la ZT provenant de la rétine VT, localisée dans la zone innervée de manière binoculaire dans le CGLd des souris RimcDKO et de la comparer à celle provenant de la rétine dorsale, localisée dans une zone innervée de manière monoculaire chez les souris Rim cDKO.

2- Raffinement de la rétinotopie à fine échelle et libération synaptique

Il serait intéressant de marquer des projections Rim cDKO uniques par électroporation post-natale (Dhande et al., 2011) afin d'évaluer les caractéristiques de l'arborisation terminale (taille, densité) et la présence ou non de branches ectopiques le long des axones. La co-électroporation d'une construction Ds-Red avec une construction lox-stop-lox-GFP afin de marquer en vert les projections Rim cDKO et en rouge les projections non recombinées dans un même cas et évaluer ainsi d'éventuels effets cell autonomes ou cell non-autonomes de la libération synaptique.

Les effets cell autonomes ou non autonomes de l'activité rétinienne sur la morphologie de la projection ont été évalués chez le zébrafish mais les résultats sont contradictoires. Dans le tectum de zébrafish, la projection d'une CGR dont la libération présynaptique a été supprimée par la toxine tétanique TenT-Lc et qui est entourée de projections normales présente une arborisation plus large, alors que si elle est entourée de projections aussi éteintes, elle ne présente pas de défauts (Ben Fredj et al., 2010). En revanche, dans le tectum de zébrafish, une projection dont l'activité est bloquée par Kir2.1 et qui est entourée de projections normales présente des branches terminales plus courtes et moins nombreuses, alors que si elle est entourée de projections éteintes aussi, elle ne présente pas de défauts (Hua et al., 2005).

Chez la souris, la perturbaton de l'activité cholinergique dans le modèle beta2 KO entraine le maintien de branches ectopiques (Dhande et al., 2011). Le blocage de l'activité dans une CGR unique dès E15 par Kir2.1 dans un contexte où les projections voisines sont normales, n'entraine pas la présence de branches ectopiques mais l'arborisation terminale est beaucoup moins complexe que la normale (moins de branches) et est plus large (Benjumeda et al., 2013). Ce dernier résultat suggère que chez la souris, l'activité rétinienne au sein de la CGR est importante de manière cell autonome dans la maturation de l'arborisation terminale.

Par ailleurs, nous n'avons pas évalué la rétinotopie fine dans le modèle RimcDKO. Celle-ci pourrait nécessiter la libération synaptique. Pour cela, des enregistrements électrophysiologiques sur tranche de CGLd ou de CS issus de souris RimcDKO seraient requis.

D- Spécificité de la topographie de la projection ipsilatérale

1- Organisation en amas

L'organisation en amas de la projection ipsilatérale est dépendante des projections controlatérales. En effet, suite à la perturbation de l'activité rétinienne dans un seul œil par injection monoculaire de TTX, la projection ipsilatérale du côté controlatéral à l'injection n'est pas organisée en amas, elle est diffuse et elle est exubérante en caudal le long de l'axe médio-latéral, alors que du côté ipsilatéral à l'injection, elle est normale, organisée en amas (Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989). Ces résultats suggèrent que l'activité n'est pas requise de manière cell autonome au sein des projections ipsilatérales pour l'organisation en amas mais qu'elle est requise au sein des projections controlatérales qui induisent le raffinement de la projection ipsilatérale. De même, la perturbation des signaux AMPc au sein des projections controlatérales perturbe l'organisation de la projection ipsilatérale qui est continue au lieu d'être organisée en amas, bien que les signaux AMPc de celle-ci ne soit pas perturbés (cf Résultats partie III).

Le modèle RimcDKO présente aussi une projection ipsilatérale diffuse et non organisée en amas, ce qui suggère que la libération synaptique des projections controlatérales est nécessaire à l'organisation de la projection ipsilatérale.

Ce défaut d'organisation de la projection ipsilatérale est un défaut de raffinement car au cours du développement, la projection ipsilatérale est diffuse avant d'être organisée en amas (Godement et al., 1984). Les CGRs ipsilatérales qui projettent en dehors des amas pourraient mourir ou bien les projections ipsilatérales pourraient se positionner dans les amas en réponse à des molécules exprimées dans le CS.

Les mécanismes impliqués dans l'organisation en amas de la projection ipsilatérale et la fonction d'une telle organisation restent un mystère.

2- Restriction de la projection ipsilatérale dans le CS rostral et mort cellulaire

Nous avons montré que la perturbation de la libération synaptique dépendante du calcium était spécifiquement importante pour le raffinement de la topographie ipsilatérale dans le CS : chez les souris Rim cDKO, la projection ipsilatérale est exubérante en caudal alors que les projections controlatérales provenant de la rétine temporale sont bien localisées dans le CS rostral (Article 1, Tableau 2). Différentes possibilités peuvent expliquer cette exubérance.

Dans la rétine mature, les CGRs ipsilatérales sont localisées dans le croissant ventro-temporal. Cependant au cours du développement chez la souris, le rat et le hamster, il y a des CGRs ipsilatérales ectopiques situées en dehors du croissant VT de la rétine (Fawcett et al., 1984; Insausti et al., 1984; Ravary et al., 2003). Ces CGRs ipsilatérales ectopiques sont ensuite éliminées pendant la période de raffinement des projections rétiniennes. Dans la littérature, la présence de CGRs ectopiques dans la rétine mature est toujours associée à une projection ipsilatérale ectopique en caudal dans le CS (Fawcett et al., 1984; Insausti et al., 1984; Ravary et al., 2003) sauf dans une étude (Yakura et al., 2002).

Les projections ipsilatérales ectopiques en caudal dans ces modèles et dans notre modèle RimcDKO proviennent-elles de CGRs ipsilatérales localisées dans le VT ou proviennent-elles de CGRs ectopiques localisées en dehors du VT ? La distinction entre ces deux possibilités est importante car elles impliquent des mécanismes de raffinement de la projection ipsilatérale différents.

Afin de tester ces deux possibilités, il faudrait faire des injections rétrogrades de fluoroglod dans un des deux CGLd et voir si les CGRs ipsilatérales sont localisées uniquement dans le VT, auquel cas il y aurait bien un problème de topographie. Si des CGRs ipsilatérales sont localisées en dehors du VT, il ne sera pas possible de conclure. Dans ce dernier cas, il faudrait faire des injections focales de DiI dans la rétine VT afin de marquer les projections ipsilatérales provenant du VT et de localiser dans le CS leur ZT. Si elles sont restreintes au CS rostral, cela indiquera que les projections caudales proviennent de CGRs situées en dehors du VT.

La première possibilité est que les projections ipsilatérales proviennent bien de la rétine VT auquel cas elles présentent un défaut de topographie/rétinotopie car elle devraient être localisées dans le CS rostral. Cette possibilité suggère que les projections ne se sont

pas bien rétractées en réponse aux molécules de guidage. Etant donné que la rétinotopie dans l'axe rostro-caudal est établie par les gradients d'éphrinesA/EphA, la libération synaptique calcium-dépendante des projections rétiniennes pourrait être requise spécifiquement pour la réponse des axones ipsilatéraux aux éphrines. Il se pourrait que le glutamate ou d'autres facteurs libérés se fixent à leurs récepteurs sur les cellules cibles du CS et qu'ils modulent/permettent la signalisation éphrine/Eph importante pour le raffinement des projections ipsilatérales. Ou alors, il y aurait d'autres molécules de guidage que les éphrines spécifiques pour établir la topographie des projections ipsilatérales, qui requerraient une libération synaptique calcium-dépendante normale. Ten-m3 par exemple est une molécule spécifiquement impliquée dans la mise en place de la topographie ipsilatérale et la délétion de Ten-m3 induit une projection ipsilatérale plus étendue en caudal comme c'est le cas chez les Rim cDKO. Cette première possibilité semble peu probable.

La deuxième possibilité est que les projections ipsilatérales exubérantes en caudal proviennent de CGRs situées en dehors du croissant VT de la rétine qui n'ont pas été éliminées par mort cellulaire au cours du développement ; auquel cas il n'y aurait pas de problème de topographie/rétinotopie car les projections pourraient répondre correctement aux molécules de guidage, cibler la bonne ZT en adéquation avec leur position dans la rétine. Le défaut serait un défaut de mort celullaire. Ainsi la mort cellulaire des CGRs ipsilatérales ectopiques permettrait de dessiner la projection ipsilatérale telle qu'elle est dans le CS adulte : restreinte en rostral selon l'axe médio-latérale et plus caudale seulement au niveau du CS médial.

Dans ce cas, la libération synaptique serait requise pour induire la mort cellulaire de CGRs ipsilatérales situées en dehors du croissant VT. Ce qui est connu quant l'élimination des CGRs au cours du développement est qu'elle est au moins en partie dépendante de l'activité rétinienne (Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989) et de la signalisation AC1 (Ravary et al., 2003). La délétion de l'AC1 entraine une projection ipsilatérale ectopique en caudal associée à la présence de CGRs ipsilatérales ectopiques dans la rétine.

Chez le rat et le hamster, l'injection monoculaire de TTX ne perturbe pas la topographie de la projection ipsilatérale du côté ipsilatéral à l'injection (Fawcett et al., 1984; Thompson and Holt, 1989) ce qui suggère que l'activité ne serait pas requise intrinsèquement pour cibler les projections ipsilatérales à la bonne zone de terminaison

au sein des cibles. Cependant, chez le rat, l'injection de TTX dans les deux yeux perturbe cette topographie et de manière plus surprenante, l'injection monoculaire de TTX perturbe la topographie de la projection ipsilatérale du côté controlatéral à l'injection (Fawcett et al., 1984)et donc de la projection correspondant à l'œil non traité : elle est exubérante en caudal. De plus, ce défaut est associé à la présence de CGRs ipsilatérales ectopiques en dehors du croissant VT dans la rétine non traitée correspondant au côté du cerveau où la projection ipsilatérale est exubérante en caudal (schéma Tableau 2). En résumé, le défaut concerne ici la projection ipsilatérale provenant de l'œil non traité dans l'hémisphère qui reçoit la projection controlatérale inactive de l'œil traité par TTX. Le raffinement de la topographie ipsilatérale est ainsi dépendant de l'activité, de la libération synaptique mais de manière cell non-autonome : il est dépendant de la projection controlatérale. D'ailleurs, suite à une énucléation chez le rat (Fawcett et al., 1984) ou chez le hamster (Insausti et al., 1984), la projection ipsilatérale est largement présente en caudal et ce défaut est associé à la présence anormale de CGRs ipsi ectopiques en dehors du VT. Ces expériences confortent l'idée selon laquelle la projection controlatérale est importante pour le raffinement de la projection ipsilatérale. A ce stade, il semble que l'activité des projections controlatérales (Fawcett et al., 1984) et la libération synaptique (modèle RimcDKO) soient nécessaires à l'établissement correct de la topographie ipsilatérale soit en empêchant les projections ipsilatérales de brancher caudalement dans le CS, soit suite à une compétition dépendante de l'activité qui entrainerait la mort cellulaire des CGRs localisées en dehors du VT et qui projettent « normalement » dans le CS caudal.

Le fait est que la projection ipsilatérale présente en caudal dans le CS est tout de même localisée dans le SO chez le modèle RimcDKO ainsi que chez le modèle injecté en TTX (Fawcett et al., 1984). On pourrait penser qu'un défaut dans la compétition ipsi/contra dans le CS par perturbation de l'activité de la projection controlatérale aurait mené à la présence de projections ipsilatérales dans le SGS connectant des neurones sensés recevoir seulement des afférences controlatérales. Cette observation suggère que la mort cellulaire des CGRs ipsilatérales ectopiques dans le CS pourrait ne pas dépendre de la compétition ipsi/contra dans le CS.

Des défauts de ségrégation œil-spécifique dans le CGLd incluant la présence de projections ipsilatérales ectopiques dans le territoire controlatéral sont toujours associés à une projection ipsilatérale ectopique exubérante en caudal dans le CS (Upton

et al., 1999; Rossi et al., 2001; Upton et al., 2002; Ravary et al., 2003) sauf dans deux études (5HT1B KO et TrkBKO : pas de défauts dans le CGLd mais projection ipsilatérale ectopique). Les projections ipsilatérales ectopiques dans le CGLd pourraient correspondre aux CGRs ectopiques localisées en dehors de la rétine VT. Etant donné que les projections ipsilatérales sont moins nombreuses que les projections controlatérales dans le territoire controlatéral, au cours du processus de ségrégation dans le CGLd, les projections ipsilatérales ectopiques pourraient être éliminées via une compétition activité dépendante avec les projections controlatérales qui induirait la mort cellulaire de leurs CGRs correspondantes, situées en dehors du VT. Chez le rat et la souris, une CGR donnée projette à la fois dans le CGLd et dans le CS : l'axone donne naissance à deux branches, l'une innerve le CGLd et l'autre innerve le CS (Dhande et al., 2011).

Ainsi, la mort cellulaire de CGRs ectopiques suite à la compétiton activité dépendante dans le CGLd entrainerait la dégénération de leurs branches correspondantes dans le CS qui seraient spécifiquement celles qui sont présentes dans le CS caudal. La compétition œil-spécifique dans le CGLd qui pourrait entrainer la mort cellulaire de CGRs dont les projections sont mal positionnées dans le CGLd pourrait avoir un impact sur l'organisation des projections dans le CS. Cette idée est intéressante conceptuellement car elle suggère que concernant les axones qui ont plusieurs collatérales, un défaut au cours du développement qui affecte une collatérale dans une région du cerveau pourrait avoir un impact sur les collatérales situées dans les autres régions du cerveau innnervées par le même axone.

II- Rôle des différentes ACs et compartiments cellulaires impliqués dans le développement des projections rétiniennes

Différentes ACs sont exprimées dans le système visuel pendant le développement (Tableau 1). Dans les paragraphes suivants, j'ai tenté de combiner nos données aux données de la littérature afin de déterminer les étapes du développement des projections rétiniennes qui nécessitent les signaux AMPc, ainsi que pour chaque étape, d'identifier la/les AC concernées, savoir si elle est requise dans les CGRs ou dans les cibles et enfin de déterminer si la signalisation AMPc impliquée est liée à un microdomaine particulier.

A- Signaux AMPc et vagues spontanées rétiniennes

Les signaux AMPc sont capables de moduler les vagues rétiniennes : l'augmentation des niveaux d'AMPc augmente la taille, la vitesse et la fréquence des vagues tandis que l'inhibition de l'activité AC ou de la PKA abolit l'activité spontanée (Stellwagen et al., 1999). Cette fonction implique certainement une AC trans-membranaire car elle a été étudiée par utilisation d'un activateur (forskoline) et d'un inhibiteur (SQ-22536) spécifique des ACs trans-membranaires. L'implication de l'AC soluble n'a pas été évaluée. La régulation des propriétés spatio-temporelles des vagues rétiniennes passe par la libération d'adénosine qui se fixe à ses récepteurs exprimés à la surface des cellules amacrines et des CGRs.

L'AC1 ne semble pas impliquée dans la modulation des vagues rétiniennes car sa délétion n'induit pas de défauts des caractéristiques électrophysiologiques de l'activité des CGRs (Dhande et al., 2012). Les ACs 5 et 8 KO n'ont pas de défauts des cartes visuelles suggérant qu'elles ne sont pas impliquées dans la régulation des vagues rétiniennes.

Nous avons montré que l'inhibition des signaux AMPc en dehors des radeaux lipidiques n'entrainait pas de défauts connus pour être dépendant des vagues rétiniennes (Article2

et partie III des résultats), ce qui suggère que les ACs 2 et 9 exprimées par les CGRs ne sont pas impliquées dans la modulation des vagues rétiniennes.

Ces données dans leur ensemble suggèrent que l'AC3 exprimée dans les radeaux lipidiques des CGRs pourrait être l'AC impliquée dans cette fonction de régulation de l'activité spontanée. Ainsi, les défauts de raffinement observés suite à l'inhibition des signaux AMPc dans les radeaux lipidiques (Article 2 et partie III des Résultats) pourraient être dûs à une perturbation des vagues rétiniennes médiée par l'AC3.

Par ailleurs, les vagues spontanées d'activité de la rétine induisent des vagues d'AMPc et de PKA activée (Dunn et al., 2006). Ces vagues d'AMPc générées par la dépolarisation dans les CGRs impliquent les ACs transmembranaires AC 1 et 8 et l'AC soluble (Dunn et al., 2009), toutes trois stimulées par le calcium.

B- AC1, AC soluble et mort/survie cellulaire

Les signaux AMPc sont impliqués dans les processus de mort/survie des CGRs pendant la période post-natale (Meyer-Franke et al., 1995).

Nous avons observé que la perturbation des signaux AMPc à la membrane plasmique *in vivo* ou *in vitro* n'entraine pas la mort des CGRs perturbées (Article 2) alors que l'expression de l'éponge AMPc dans le cytoplasme des CGRs dans des explants rétiniens en culture induit la mort des CGRs ou empêche leur différenciation (donnée non présentée ici). Par ailleurs, une étude *in vitro* a montré que contrairement à l'inhibition des ACs trans-membranaires, l'inhibition de l'AC soluble entraine une diminution de la survie des CGRs (Corredor et al., 2012). Ces résultats sont cohérents et suggèrent que la signalisation AMPc impliquée dans la régulation de la mort/survie des CGRs a lieu dans le compartiment cytoplasmique et serait de ce fait médiée par l'AC soluble.

Cependant, il semble qu'il y ait une exception à cette règle. La délétion de l'AC1 trans-membranaire entraine spécifiquement la survie de CGRs ipsilatérales localisées en dehors du croissant VT de la rétine (Ravary et al., 2003). Cette observation suggère que les signaux AMPc générés par l'AC1 à la membrane plasmique sont spécifiquement impliqués dans la mort développementale de ces CGRs ipsilatérales.

La mort cellulaire développementale des CGRs implique les caspases et les protéines de la famille Bcl-2, Bax et Bcl-2, qui sont pro- ou anti-apoptotiques. La surexpression de Bcl-2 entraine la survie de CGRs localisées en dehors de la rétine VT (Yakura et al., 2002). Le lien entre les signaux AMPc et la mort cellulaire pourrait être la régulation de la transcription des gènes codant pour ces molécules. En effet, le facteur de transcription CREB ainsi que son répresseur ICER sont tous deux régulés par l'AMPc et sont impliqués dans le processus de survie neuronale (Jaworski et al., 2003).

C- Signaux AMPc et molécules de guidage

Les signaux AMPc sont requis pour la réponse des axones à certaines molécules de guidage telles que la nétrine-1, les sémaphorines, les molécules Slits et les éphrines (Ming et al., 1997; Hopker et al., 1999; Terman and Kolodkin, 2004; Nicol et al., 2006a; Wu et al., 2006). Ils pourraient être ainsi requis à la réponse des axones des CGRs aux molécules de guidage exprimées le long de leur chemin jusqu'aux cibles.

Les signaux AMPc générés à la membrane plasmique n'affectent pas la croissance axonale (Article 2) ni *in vivo,* ni *in vitro*. En revanche, l'inhibition de l'AC soluble perturbe l'élongation axonale (Corredor et al., 2012).

Les axones controlatéraux et ipsilatéraux atteignent le chiasma optique entre E12 et E18. Le guidage axonal au chiasma impliquant le croisement ou non de la ligne médiane ne semble pas impliquer les signaux AMPc générés à la membrane plasmique. En effet, des traçages rétrogrades chez les souris AC1 KO ne montrent pas de différence du nombre de CGRs ipsilatérales localisées dans le croissant VT de la rétine ou du nombre de CGRs controlatérales par rapport aux souris contrôles (Ravary et al., 2003). De plus, la perturbation des signaux AMPc à E14,5 dans ou en dehors des radeaux lipidiques dans les CGRs de la rétine centrale n'affecte pas leur projection normale controlatérale (Article 2). Donc la réponse des axones à l'éphrine B2 (Williams et al., 2003), à la molécule NrCAM (Williams et al., 2006) ou à Islet 2 (Pak et al., 2004) n'impliqueraient pas la signalisation AMPc à la membrane. Il n'est toutefois pas exclu que l'AC soluble soit impliquée.

D- Signaux AMPc et rétinotopie

1- Signaux AMPc et positionnement à la bonne ZT

Au cours du développement, les projections provenant de la rétine temporale dépassent leur zone de terminaison (ZT) et croissent jusqu'au CS caudal avant de se rétracter en réponse aux éphrines A pour se positionner dans le CS rostral. Les signaux AMPc ne semblent pas impliqués *in vivo* dans le positionnement des projections rétiniennes à la bonne ZT au sein du CS. En effet, suite à la perturbation des signaux AMPc *in vivo* dans les radeaux lipidiques par électroporation *in utero* de la Lyn éponge AMPc dans la rétine temporale, les projections des CGRs controlatérales de la rétine temporale qui expriment la Lyn éponge AMPc, sont localisées dans le CS rostral (Lyn éponge AMPc n=2 ; contrôle GFP seule n=2 ; données non présentées ici). Donc la perturbation des signaux AMPc dans les radeaux lipidiques de CGRs controlatérales localisées dans la rétine temporale n'entraine pas de défaut de rétinotopie. Ce résultat est étonnant car dans le système de co-culture rétino-colliculaire, avec une rétine temporale déficiente en AC1, les projections rétiniennes ne se rétractent pas du CS caudal (Nicol et al., 2006a). Etant donné que les souris AC1 KO ont un défaut de topographie des projections ipsilatérales dans le CS qui sont exubérantes en caudal au lieu d'être restreintes en rostral et que la rétine temporale est constituée d'un mixte de CGRs controlatérales et ipsilatérales, le défaut de rétraction dans le système de co-culture pourrait être spécifiquement dû à un défaut de rétraction de projections provenant de CGRs ipsilatérales de l'explant rétinien.

2- Signaux AMPc et raffinement de la rétinotopie

Les signaux AMPc générés par l'AC1 sont importants pour raffiner la ZT occupée par des projections rétiniennes voisines. En effet, la délétion de l'AC1 entraine une ZT plus large que la normale (tableau ; (Ravary et al., 2003; Dhande et al., 2012). Ce raffinement est dû entre autres à l'élimination, dépendante de l'AC1, de branches ectopiques présentes initialement le long des axones rétiniens (Dhande et al., 2011; Dhande et al., 2012). Nous avons montré que seuls les signaux AMPc générés dans les radeaux lipidiques des CGRs étaient importants pour l'élimination des branches ectopiques des projections rétiniennes alors que ceux générés à la membrane plasmique mais en dehors des

radeaux lipidiques ne paraissent pas impliqués. Ce résultat permet d'exclure une action des ACs 2 et 9 exprimées par les CGRs en dehors des radeaux lipidiques dans cette étape de raffinement (Tableau 1).

La perturbation de l'activité rétinienne entraine aussi la présence de branches ectopiques le long des axones (Dhande et al., 2011). Donc, les signaux AMPc générés par l'AC1 pourraient agir en aval de l'activité pour induire l'élimination de ces branches ectopiques. L'AC3 est aussi exprimée par les CGRs pendant la période de ce raffinement, régulée par le calcium et adressée aux radeaux lipidiques, donc elle pourrait aussi être impliquée dans ce raffinement (Tableau 1).

3- Signaux AMPc et raffinement fin

Le raffinement fin de la rétinotopie est dépendant de l'activité (Hooks and Chen, 2006; Chandrasekaran et al., 2007) et implique l'élimination des connexions mal positionnées (tableau 2). Il pourrait passer par des mécanismes de LTP et LTD (Butts et al., 2007; Shah and Crair, 2008; Lee et al., 2014). Le raffinement fin de la rétinotopie n'a pas été évalué chez les souris déficientes en AC1 et nous ne l'avons pas non plus évalué suite à la perturbation des signaux AMPc dans ou en dehors des radeaux lipidiques. Il n'est donc pas exclu que les signaux AMPc soient aussi nécessaires à ce stade tardif du développement.

Dans le système somato-sensoriel, l'AC1 est importante pour le développement des barils dessinés par la topographie des connexions thalamo-corticales (Welker et al., 1996). Son rôle dans l'établissement global des barils est pré-synaptique dans le thalamus (Iwasato et al, 2008 ; Suzuki et al, 2013) cependant des étapes plus fines du raffinement nécessitent l'activité de l'AC1 en pré-et en post-synaptique. Plus précisément, dans le système thalamo-cortical, la signalisation AC1/PKA est impliquée dans la plasticité synaptique LTP/LTD par une action post-synaptique sur le trafic des récepteurs AMPA à la membrane (Lu et al., 2003; Inan et al., 2006; Iwasato et al., 2008) et par une action pré-synaptique sur l'efficacté de la transmission synaptique thalamo-corticale (Lu et al., 2006)

Ainsi, de la même manière, aux synapses rétino-géniculées et rétino-colliculaires, l'AC1 ou d'autres ACs exprimées par les CGRs et/ou par les cibles pourraient être impliquées dans les mécanismes de LTP/LTD potentiellement requis pour la sélection des synapses sous-tendant le raffinement fin de la rétinotopie (Butts et al., 2007; Shah and Crair, 2008; Lee et al., 2014).

La sélection synaptique au niveau d'une même cellule cible nécessite que la signalisation sous-tendant la LTP ou LTD ait lieu spécifiquement à chaque synapse au niveau de l'arbre dendritique. Dans l'hippocampe, l'induction de la LTP en post-synaptique est dépendante de la signalisation AMPc/PKA. La perturbation des protéines AKAPs abolit l'induction de la LTP. Une étude (Kim et al., 2011) a manipulé la localisation de la PKA par rapport à celle de l'AC : le maintien de la PKA à proximité de l'AC entraine plus efficacement la phosphorylation par la PKA des effecteurs de la LTP que lorsque la PKA est localisée à distance de l'AC. L'inhibition des PDEs dans la configuration où la PKA et l'AC sont éloignées l'une de l'autre permet à nouveau l'efficacité de la phosphorylation par la PKA de ses cibles. Cette étude démontre qu'il existe au niveau des épines dendritiques une compartimentation de la signalisation AMPc/PKA médiée par les protéines AKAPs (mise à proximité des acteurs d'une même voie de signalisation) et PDEs (restriction de la diffusion de l'AMPc), importante pour la plasticité synaptique.

E – Signaux AMPc et carte œil spécifique

La signalisation AMPc est impliquée en pré- et en post-synaptique dans le raffinement de la carte œil spécifique.

Les signaux AMPc générés par l'AC1 sont importants en pré-synaptique pour la formation de la carte œil spécifique tandis que ceux générés par les ACs 5 et 8 ne le sont pas. Les signaux AMPc générés au sein des radeaux lipidiques des CGRs (liées aux AC1 et/ou 3) sont importants pour le processus de compétition entre axones ipsi/controlatérales (Résultats partie III). Etant donné que les signaux AMPc générés en dehors des radeaux lipidiques entrainent un défaut assez mineur de la carte œil spécifique, les ACs 2 et 9 pourraient ou non être impliquées.

Nos résultats montrent que la perturbation des signaux AMPc dans une fraction seulement des CGRs du croissant VT de la rétine affecte l'ensemble de la population des CGRs du croissant VT de la rétine. Alors que seule une fraction des CGRs est perturbée, l'ensemble des projections perturbées et non perturbées provenant du VT perdent la compétition face aux projections provenant de l'autre œil (Partie III Résultats). Cette donnée suggère que les projections ont besoin de coopérér pour se maintenir dans leur territoire et en exclure les projections provenant de l'autre œil. Elle conforte l'idée de compétition selon le principe de Hebb : le fait que l'activité de cellules voisines provenant du même œil soit corrélée leur permet de dicter ensemble le profil temporel de l'activité de la cellule post-synaptique et ainsi de renforcer et maintenir leurs synapses alors que les cellules provenant de l'autre œil ont une activité asynchrone car les vagues n'ont pas lieu au même moment dans les deux yeux et leurs synapses sont affaiblies et éliminées.

La signalisation AMPc semble aussi requise en post-synaptique. En effet, pendant la phase de raffinement des projections rétiniennes, le CGLd chez la souris présente une vague d'expression génique médiée par la signalisation CRE/CREB et dépendante de l'activité rétinienne. Des souris présentant une réduction de l'expression du facteur de transcription CREB ont des défauts de ségrégation œil spécifique dans le CGLd (Pham et al., 2001). L'activation de CREB est dépendante de l'AMPc ce qui démontre l'implication d'une AC dans le CGLd importante pour la ségrégation œil spécifique. La délétion conditionnelle de l'AC1 dans le CGLd n'entraine pas de défauts (Dhande et al., 2012) et les souris AC5 et AC8 KO n'ont pas d'anomalies de ségrégation (Nicol et al., 2006b). Ces données suggèrent que l'AC2 exprimée dans le CGLd pourrait être impliquée mais elle n'est pas régulée par le calcium ce qui en fait un candidat peu probable. Il reste l'AC soluble régulée par le calcium mais dont l'expression dans le CGLd n'est pas connue.

III- Modulation de la libération synaptique par différentes voies de signalisation régulées par les signaux AMPc

A- Signaux AMPc et libération synaptique

La diminution de la libération synaptique (Article 1) et la délétion de l'AC1 entrainent des défauts similaires de ségrégation œil spécifique dans le CGLd et de topographie de la projection ipsilatérale dans le CS (Ravary et al., 2003). La délétion de l'AC 1 entraine par ailleurs d'autres défauts non retrouvés chez les Rim cDKO indépendants de la libération synaptique. L'effet principal de l'AC1 est pré-synaptique dans les CGRs (Nicol et al., 2006b; Dhande et al., 2012) et la perturbation des signaux AMPc dans les CGRs en pré-synaptique est suffisante à induire des défauts importants de raffinement des projections rétiniennes (Article 2 et Résultats partie III). Ces observations suggèrent qu'il pourrait y avoir un lien en pré-synaptique entre la signalisation AMPc et la libération synaptique au cours du raffinement des connexions de la rétine à ses cibles.

De manière intéressante, la plasticité pré-synaptique (LTP/LTD) implique la régulation de la fonction de Rim1α par la PKA, modulant la libération synaptique (Castillo et al., 2002; Chevaleyre et al., 2007).

Dans le système visuel, la signalisation AMPc/PKA pourrait intégrer différents signaux intra- et extra-cellulaires et moduler la plasticité présynaptique et la libération synaptique aux synapses rétino-géniculées et rétino-colliculaires expliquant la similarité des phénotypes AC1 KO et Rim cDKO.

B- Signaux AMPc et système endocannabinoide

Des candidats intéressants à étudier dans notre système sont les récepteus pré-synaptiques CB1 et CB2. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G, connus pour inhiber la signalisation AC/PKA (Oddi et al., 2007). Dans l'hippocampe, l'activation du récepteur CB1 entraine la diminution de la libération synaptique de GABA par induction d'une LTD. Cet effet est dû à l'inhibition de la phosphorylation de Rim1α par l'activité AMPc/PKA (Chevaleyre et al., 2007).

Dans le système visuel, la signalisation endocannabinoide rétrograde est importante pour la ségrégation œil spécifique (Lalonde et al., 2006; Argaw et al., 2011; Duff et al., 2013) via l'activation des récepteurs CB1 et CB2. L'induction de la LTD est importante pour l'élimination des synapses mal positionnées (Lee et al., 2014). Ainsi, l'effet de CB1 et CB2 dans la ségrégation œil spécifique pourrait être médiée par l'induction d'une LTD via l'inhibition de la signalisation AMPc.

L'AC couplée aux récepteurs CB1 et CB2 dans les CGRs n'est toutefois pas identifiée. Les récepteurs CB1 et CB2 étant localisés dans les radeaux lipidiques, l'AC impliquée pourrait être soit l'AC1, soit l'AC3 (Tableau 1).

C- Signaux AMPc et système sérotoninergique

Le système sérotoninergique est impliqué dans le raffinement des projections rétiniennes. L'activation du récepteur pré-synaptique 5HT1B par la sérotonine induit la diminution de la libération synaptique aux synapses thalamo-corticales (Laurent et al., 2002) ainsi qu'aux synapses rétino-colliculaires (Mooney et al., 1994).

Des modèles de souris ayant un excès de sérotonine dans le cerveau présentent des défauts de la ségrégation œil spécifique et un défaut de topographie de la projection ispilatérale dans le CS qui est exubérante en caudal le long de l'axe médio-latéral (Tableau 2 ; (Upton et al., 1999; Upton et al., 2002)). Ces défauts sont similaires à ceux observés chez les Rim cDKO (Article 1) et ils sont sauvés par la délétion du récepteur 5HT1B (Upton et al., 2002) ce qui suggère que la suractivation du récepteur 5HT1B par l'excès de 5HT entraine une diminution de la libération synaptique aux synapses rétino-géniculées et rétino-colliculaires responsable des défauts observés.

Le récepteur 5HT1B est un récepteur couplé aux protéines G, qui régule de manière négative l'activité AC (Bouhelal et al., 1988). Donc, la régulation de la libération synaptique par l'activation du récepteur 5HT1B pourrait passer par la signalisation AMPc mais l'AC concernée n'a pas été identifiée.

ANNEXE

ACTIVITY DEPENDENT MECHANISMS OF VISUAL MAP FORMATION

FROM RETINAL WAVES TO MOLECULAR REGULATORS

Ahlem Assali, Patricia Gaspar and Alexandra Rebsam*

INSERM U839, Institut du Fer à Moulin, Paris, France

UPMC, Paris, France

email: ahlem.assali@inserm.fr, patricia.gaspar@inserm.fr, alexandra.rebsam@inserm.fr

*corresponding author: INSERM U839, Institut du Fer à Moulin, 17 rue du fer à Moulin, 75005, Paris, France

Phone: +33 1 45 87 61 27; Fax: +33 1 45 87 61 32; email: alexandra.rebsam@inserm.fr

Keywords: (6 max to choose) retinogeniculate, retinocollicular, retinal wave, ipsilateral, contralateral

Abstract

The refinement of neural connections requires activity-dependent mechanisms in addition to the genetic program initially establishing wiring diagrams. The well-understood organization of the visual system comprises an accessible model for analyzing the contribution of activity in the formation of connectivity. Prior to visual experience, patterned spontaneous activity in the form of retinal waves has an important role for the establishment of eye-specific and retinotopic map by acting on the refinement of axon arborization. Here, we will review the works that highlight the features of retinal activity important for visual map formation and question whether synaptic release and Hebbian based competition rules apply in this system. Recent evidence using genetic tools that allow activity manipulation have clarified the controversy on whether activity is instructive or permissive for visual map formation. Furthermore, different mechanisms seem at play depending on the type of axons (ipsilateral vs. contralateral), map (eye-specific vs. retinotopic) or target and we are now reaching a stage where this will be deciphered. Many molecules that either modulate activity or are modulated by activity are important in the formation of visual map, such as adenylate cyclase 1, serotonin, molecules from the immune system, also retrograde messengers signaling from the target cell to the retinal axons as well as microglia that could eliminate inappropriate synapses. We will review these works, focusing on experimental data on mice and ferrets, but also integrate data from other species when enlightening.

1. Introduction
2. Organization and Development of visual maps
    2.1. Eye-specific map
    2.2. Retinotopic map
    2.3. Axonal arborization and collaterals
3. Spontaneous and correlated retinal waves
4. Role of retinal activity on visual map formation
    4.1. Role of activity on eye-specific segregation
    4.2. Role of synaptic release on eye-specific segregation
    4.3. Role of activity on retinotopy
    4.4. Role of synaptic release on retinotopy
    4.5. Instructive vs. permissive role of activity
5. Other factors involved in visual map formation and linked to activity
    5.1. Retinal ganglion cell death
    5.2. Adenylate cyclase
    5.3. Retrograde signaling
    5.4. Serotonin
    5.5. Immune system molecules, microglia and astrocytes
6. Specificity of the ipsilateral projection
7. Conclusion
Acknowledgments
References

1. Introduction

Constructing precise neural circuits is a complex task. Molecular factors guide neurons to establish a primary scaffold that undergoes activity-dependent refinement to build a fully functional circuit. While the role of activity has been assumed for long, a clear demonstration of its effects has taken longer to demonstrate, raising a number of questions, such as determining where activity comes from, at a time when the network is still immature and sensory experience is lacking. The finding that several systems display spontaneous activity during their developmental period [1-4] suggested that spontaneous activity could play a role in neural circuit refinement. In this regard, the visual system is an ideal model not only because retinal maps are sharply organized and their developmental sequences are well known but also because the developing retina presents waves of spontaneous activity that propagate within the retina [5, 6] and are transmitted to the axons in the targets [7]. Many experiments manipulating retinal activity pharmacologically and genetically now demonstrate a role of this spontaneous activity on retinal maps. A controversy arose about whether this activity is instructive or permissive [8, 9] but recent evidence has shifted the balance of argument towards an instructive role. However, as will be discussed in the present review, the required features of activity are still unclear. We further focus our review on two lingering questions in the field which are how this retinal activity is transformed into molecular mechanisms that enable the cellular changes, such as axon retraction or branching that are involved in the refinement of neural circuits and what is the molecular control of activity dependent mechanisms. Furthermore, recent experiments using genetic tools to manipulate activity have shown that activity can affect differently each visual map and thus, that the mechanisms at hand may be distinct. Following this new line, we here discuss each map separately to review the role of activity, upstream modulators, and finally the downstream targets that enact the refinement of these connections.

2. Organization and development of visual maps

The appropriate processing of visual information requires the correct organization of connections between the retina and the brain. Within the retina, numerous neuronal cell types integrate visual information, yet only the retinal ganglion cells (RGCs) convey this information to the brain. RGCs project to numerous brain nuclei [10] but their main targets are the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and the superior colliculus (SC). The dLGN is a relay nucleus that conveys information to the visual cortex for the image-forming pathway. The SC (sometimes referred also as the optic tectum in reference to the equivalent structure in other non mammalian vertebrates) is involved in non-image forming visual pathways, such as the control of head and eye-movements. In both targets, retinal axons organize in a topographic manner and ipsilateral and contralateral fibers

innervate distinct regions (Fig. 1). This segregation into eye-specific territory (Fig. 1a) is crucial for binocular vision [11]. The topographic organization (Fig. 1b) is crucial for a coherent representation of the external world.

2.1. Eye-specific map

In the mammalian brain, most visual centers receive afferents from both eyes. This level of organization of retinal inputs is referred to as the eye-specific maps. The initial step leading to eye-specific maps is the axon guidance choice of retinal ganglion cells (RGCs) at the optic chiasm to cross or not the midline thus forming the contralateral and ipsilateral projections, respectively. In mice, RGCs projecting to the ipsilateral side are specifically located in the ventrotemporal (VT) retina and represent 3-5% of total RGCs [12]. Ipsilateral and contralateral axons travel in the optic tract and innervate first the dLGN and then the SC. In the dLGN, ipsilateral axons are located close to the center of the nucleus and surrounded by contralateral axons. Ipsilateral and contralateral terminals are segregated from each other and form an eye-specific map (Fig.1a). The degree of overlap between the ipsilateral and contralateral axons in the dLGN is often used to measure the level of refinement of retinal axons and serves as a read-out for axonal refinement and synaptogenesis. In the SC, ipsilateral and contralateral projections are also segregated from one another, as they target different laminas (Fig.1a). Contralateral axons are essentially localized in the most superficial layer of the SC, the stratum griseum superficiale (SGS), while the ipsilateral axons are located in the underlying layer, the stratum opticum (SO). Furthermore, ipsilateral axons are distributed along the full extent of the mediolateral axis in the rostral SC where they form aggregated patches and are restricted to a single medial patch in the caudal SC (Fig.1a). The most classic way to observe eye-specific domains is to use ocular injection of anterograde tracers, originally horse radish peroxidase (HRP) and nowadays, Cholera Toxin beta subunit (CTB) coupled with different AlexaFluor dyes to label projections coming from both eyes with different colors.

The development of the eye-specific maps has been well established. First, RGCs extend their axon out of the retina to reach the optic chiasm between E12 and P0 [13] and reach the dLGN at E16 and SC from E18 in mice [14]. Even though ipsilateral axons arrive early at the optic chiasm (E12-E17) they innervate and spread within the dLGN only from P0 [14], suggesting a waiting mechanism or a slower growth or branching compared to contralateral axons. Initially, ipsilateral and contralateral axons overlap in the dLGN but start to segregate into distinct domains from P4 [14] (Fig.2). By P8, ipsilateral and contralateral inputs are mainly segregated with ipsilateral projections forming a "patch" mostly devoid of contralateral axons. At that age, however, one thalamic target still receives inputs from both eyes [15]. At P15, the eye-specific domains are similar to those in adult (Fig.2) and one thalamic target cell receives now inputs only from one eye [15]. Thus, eye specific

segregation involves a synapse selection with elimination of misplaced synapses and maintenance of proper synapses.

The developmental sequence is somewhat similar in the SC, with a progressive elimination of ipsilateral inputs in the most superficial layers, although ipsilateral axons do not invade completely the SGS even before P3, and are mainly eliminated by P8 [14, 16]. Thus, in the SC, the overlap of ipsilateral and contralateral retinal inputs is not as important as in the dLGN possibly because other molecular factors set up a laminar organization in parallel to the segregation of ipsilateral and contralateral axons, preventing a complete overlap.

2.2. Retinotopic map

Retinal axons are topographically distributed: the nasotemporal axis in the retina projects to the caudo-rostral axis in the SC, and the dorso-ventral axis in the retina to the latero-medial axis in the SC (Fig.1b). Most studies of retinotopy focus on the retinocollicular (or retinotectal) projections as retinal projections are organized mainly in two dimensions (rostro-caudal and medio-lateral) which facilitates tracking of defects, however, the retinogeniculate projections in the dLGN are also organized in a topographic manner, but the three-dimensional organization renders it more difficult to examine (Fig.1b). Roughly, the nasotemporal retinal axis maps onto the ventrolateral – dorsomedial axis of the dLGN, and the dorsoventral retinal axis maps along the ventromedial – dorsolateral axis of the dLGN [17, 18]. This topographic organization is specific to the contralateral projections but ipsilateral axons also target specific regions. The contralateral VT RGCs project to the dorsal tip of the dLGN and the rostromedial part of the SC while the ipsilateral VT RGCs project to a similar topographic region but slightly shifted ventrally in the dLGN and caudally in the SC [17, 19]. The easiest way to examine topographic organization is to achieve small injections of DiI into different retinal quadrants and to observe their projection most often in the SC but also in the dLGN.

The development of retinotopic ipsilateral and contralateral maps is determined by gradients of repulsive guidance molecules from the ephrin family (ephrin and Eph receptor) that are expressed in RGCs and targets and indicate a positional information based on repulsive interactions [20] see in this issue, review by Franco Weth. The maturation of the topographic maps comprises different sequential steps [21, 22]. First, retinal axons distribute in the entire target, then gradients of Eph/ephrins position encode the proper localization of the terminal zone (TZ) according to the retinal position (Fig.3a). Second, the axonal arborization is refined with the retraction of abnormal

collaterals and there is an increased branching and synapse formation in the correct location (Fig.3a). Finally, there is a fine scale refinement of retinotopy after eye-opening as electrophysiological recordings indicate that one geniculate neuron receives inputs from more than 10 RGCs at P8-P10 and only 1-3 RGCs after P18 [15, 23].

2.3. Axonal arborization and collaterals

In mice, a given RGC can innervate both the dLGN and the SC, by a collateral branching out of the optic tract [24]. Single RGC labeling techniques in vivo allowed to follow the refinement of single RGC arbor during development [25]. Retinal axons often overshoot their final topographic zone with temporal axons projecting to the caudal SC for instance [21, 24, 26, 27] (Fig.3a). Interestingly, there is a temporal mismatch between the maturation of contralateral axonal arbors in the dLGN and the SC, with axon arbors being more complex one week earlier in the SC than in the dLGN [24]. Thus, by P8, retinogeniculate axons only start to branch while retinocollicular axons are already fully branched already with an adult like pattern (Fig.3a). While this temporal mismatch is observed for contralateral axons, ipsilateral axons in both dLGN and SC mature later similarly to contralateral axons in the dLGN (Fig.2b, 3b). This suggests that the maturation of axon arbor relies on mechanisms that are different depending on the target (dLGN or SC) and eye of origin (ipsilateral or contralateral).

3. Spontaneous retinal waves

The role of neural activity on visual circuit development started initially with studies in cats and ferrets examining effects of visual inputs on neural circuit development, with experiments such as monocular occlusion [28] or effects of changing ocular stimuli [29]. It was only recognized later that non-visually driven neural activity could contribute to early activity-related mechanisms and the shaping of neural connectivity.

The existence of spontaneous activity in the retina was described for the first time by *in vivo* recordings of action potentials in the retina of rat embryos [2]. Calcium imaging and multielectrode array studies allowed to detail the temporal and spatial characteristics of this spontaneous retinal activity) [5, 30], showing that it starts from random initiation sites in the retina followed by a propagation to neighboring cells, creating spreading pattern of spontaneous activity, called "retinal waves". The details of retinal waves have been extensively reviewed [31, 32]. These waves initiate every 25 sec (on a domain >1mm2), propagate in restricted domains and are followed by refractory periods of RGCs (25-35 sec) [33]. This low frequency would enable neighboring RGCs to show correlated activity [5, 6].

Three different stages of spontaneous retinal activity have been described [31]: gap junction-mediated activity waves (stage I) occurring before birth, ACh mediated waves (stage II) occurring mostly during the first postnatal week and glutamate mediated waves (stage III) occurring during the second postnatal week. Visually evoked activity starts around P11 with photoreceptors functionally connected to the retinal network. Stage II waves have been the most studied : they are driven by starburst amacrine cells which fire spontaneously, release ACh and depolarize neighboring amacrine cells and RGCs expressing ACh receptors (AChR). Stage III retinal waves are driven by bipolar cells which release glutamate and trigger activity in neighboring RGCs.

Importantly, spontaneous retinal activity is transmitted from RGCs to their targets and has been imaged by genetically encoded calcium indicators in vivo [7]. It is also noteworthy that the retinal waves are not completely random as waves initiate preferentially from the VT retina which corresponds to the binocular region and propagate preferentially towards the dorsonasal retina *in vivo* [7]. The fact that stage II and III retinal waves coincide with visual map establishment suggested a role of spontaneous activity in retinal projection development.

4. Role of activity on visual map formation

4.1. Role of activity in eye specific segregation

The role of activity has been assessed in many different experimental conditions, blocking activity in either the eye or targets with pharmacological agents or with genetic tools, leading sometimes to controversy in the field that we briefly overview here.

Early experiments analyzing the effects of activity used the voltage-gated sodium channel blocked tetrodotoxin (TTX), which inhibits the firing of action potentials and propagation of nerve impulse. TTX infusion around the optic nerve in cats induced eye-specific segregation defects in the dLGN [34, 35]. However, TTX infusion in the eye did not impair eye-specific segregation in the ferret dLGN [36] nor eye specific lamination defects in the rodent SC [37, 38], which seemed to disprove a role for activity in eye-specific segregation. However experiments using TTX *in vivo* are hard to interpret because of the toxicity of the compound, making it hard to have an effective and yet non-toxic dosage.

Subsequent experiments analyzing the role of activity focused on a more specific removal of retinal waves focusing on the cholinergic system, to inhibit pharmacologically the nicotinic receptor with epibatidine, or to remove the beta2-acetylcholine receptor (beta2-AChR), the subunit of nicotinic receptor that appears to mediate the main cholinergic drive of RGCs. In both models, blockade of nicotinic transmission was found to cause clear eye-specific segregation defects in the dLGN and the SC. In epibatidine-treated mice or ferrets and in beta2-AChR KO mice, contralateral retinal

projections cover the entire dLGN, including the ipsilateral territory and ectopic ipsilateral projections are present within the contralateral territory [19, 39, 40]. In the SC of beta2-AChR KO mouse, ectopic ipsilateral projections are present in the contralateral territory (SGS), instead of being restricted to the SO, such that ipsilateral and contralateral projections still overlap [40, 41]. In beta2-AChR KO mice and epibatidine-treated ferrets, eye specific segregation is partially rescued during later phases of development [40-43], possibly because of later glutamatergic retinal waves.

In both beta2-AChR KO mice and epibatidine treated ferrets, adult thalamic target neurons receive inputs solely from one eye as in the controls, confirming by electrophysiology the anatomical rescue of eye-specific segregation [43, 44]. Furthermore, single axon reconstructions in beta2-AChR KO mice at P15 show that contralateral retinal axons display normal terminal arbors in the dLGN [24] although their topographic position remains abnormal [42, 43].

The rescue of eye-specific segregation in the beta2-AChR KO mice indicated the importance of the third glutamatergic retinal waves during the second postnatal week. Other experiments indicated that late perturbation of these glutamatergic waves could indeed induce a desegregation of eye-specific projections in the dLGN and the SC [45-48]. Interestingly, in all these studies, only the ipsilateral projections showed a *de novo* sprouting, invading the contralateral territory, whereas the contralateral projections seemed not to be plastic beyond the first postnatal week. Thus, contralateral projections mislocated because of perturbations during the first postnatal week cannot be rescued later and activity perturbation after the first postnatal week has no effect, suggesting a critical period for the positioning of contralateral projection specifically during the first postnatal week.

Altogether, these data suggest that normal RGC activity is important for eye specific map establishment, eye specific segregation and eye specific domains positioning, but that the critical periods are not the same for each event. Also the critical periods of plasticity for ipsilateral and contralateral projections are different: ipsilateral projections are plastic until later ages than contralateral projections.

Other sets of experiments have investigated the role of activity-dependent competition, rather than blocking overall activity. The hypothesis explored is that there is a balance between axons coming from both eyes and that modifying activity in some axons will perturb this balance. Enucleation experiments in rats, hamsters and mice showed that removal of one eye leads to the expansion of the projections coming from the remaining eye [37, 38, 49], suggesting that indeed there is a competition between ipsilateral and contralateral projections to occupy a specific territory. However, the enucleation is a rather crude experiment, and does not only affect activity but also the availability to trophic factors. Activity dependent competition was assessed in studies in which

activity was altered specifically in one eye: monocular epibatidine injection (reduced activity in the treated eye) [39] or monocular injection of a cAMP agonist (increased activity in the treated eye) [50] lead to the expansion in the dLGN of the projections coming from the more active eye. However, eye specific segregation is not modified in such experiments, the contralateral projections enlarge but do not invade the smaller ipsilateral territory corresponding to the less active eye. These experiments strongly suggest that activity based competition is required for determining both the size of the eye-specific projections and their segregation pattern. These effects of activity could also reflect a modified uptake of trophic factors such as BDNF that influence both RGC survival and branching.

4.2. Role of synaptic release on eye-specific segregation

While the role of retinal activity in the establishment on eye-specific retinal projections has now been clearly demonstrated by the experiments described above, the downstream mechanisms are unknown. One logical mechanism is the conversion of this electrical activity into calcium dependent synaptic release at axon terminals. Functional synapses are already present in the targets during eye specific segregation [51]. Recent experiments showed the requirement of glutamate synaptic release in ipsilateral projections to exclude the contralateral projections using the VGlut2 conditional KO [52]. In this model, glutamate release is impaired specifically in ipsilateral axons but the main effect observed is that contralateral axons do not retract from the ipsilateral territory (which is normal in size). This suggests that synaptic release from ipsilateral axons modifies the presynaptic terminals of contralateral RGCs axons, either by a direct effect of transmitter release on preterminal axons or via postsynaptic receptors on the targets cells involving a retrograde signal sent to the contralateral axons. Which postsynaptic receptors could be involved in the formation of eye-specific segregation? One ideal candidate for plasticity events linked to glutamate release is the NMDA receptor, which acts as a "coincidence detector", as the neuron has to be depolarized for the receptor to function. In frogs, all the projections cross the midline and project contralaterally in the tectum (SC equivalent). Grafting a third eye inducing stripes in the tectum with projections coming from this grafted eye segregated from the ones coming from the normal eye [53] due to selective branch elimination [54]. NMDA receptor antagonists in this system induce a desegregation of these projections [55] by preventing branch elimination [54]. However, NMDA receptor blockade does not impair eye-specific segregation in the ferret dLGN [56] and in the rat SC [57]. It is possible that other postsynaptic glutamate receptors are also involved in the segregation process, since there is still correlated retinal induced firing in the dLGN cells in the absence of NMDA receptors [51]. Moreover, mice with perturbed levels of L-type Ca2+ channels display eye-specific segregation defects [58] suggesting the importance of this type of channels. Thus, the role of synaptic release

from RGCs to their targets seems to be important but the postsynaptic receptors involved still need to be identified.

4.3. Role of activity on retinotopy

The global position of the retinal axons along the antero-posterior axis of the SC has been shown to depend largely on ephrin-EphA signaling [20]. Neural activity was shown to modulate the response of RGCs to ephrins and thereby influence the retraction of inappropriately located axons. *In vitro*, the collapse response of RGCs to ephrins is arrested by acute TTX application and TTX prevents the normal topographic refinement of temporal and nasal retinal explants in a retino-collicular co-culture where the refinement of nasal axons in the caudal SC and temporal axons in the rostral SC is reproduced [59]. *In vivo* data however, do not seem so far to confirm the involvement of activity for the final topographic positioning of RGCs. Monocular TTX injection, did not impair the retraction from the caudal SC of temporal RGCs [60] and expression of inward-rectifier potassium ion channels (Kir2.1) in the mouse retina (which blocks activity by membrane potential hyperpolarization) does not induce major targeting defects of retinal axons in the SC [61].

In the beta2-AChR KO and the epibatidine-treated mice, targeting of the retinal projections was broader but located at the right topographic termination zone (TZ) [22, 41, 44, 62]. This defect can be explained by ectopic branches along the axon and larger terminal arbor in beta2-AChR KO [24] a feature also observed after TTX blockade [59] or Kir2.1 expression [61]. In the beta2-AChR KO, a partial rescue of the TZ size refinement shown in the SC occurs between P7 and P14 [24, 62]. Although single axon reconstruction show no major defects [24], TZ in the dLGN and SC are enlarged, reflecting the fact that neighboring RGCs do not converge on the same TZ contrary to controls [22, 41]. Overall these results suggest that early RGC activity is intrinsically important for the maturation of the RGC terminal arbors and act on the precise position of TZ at a very fine scale level.

The fine scale retinotopic refinement corresponding to the time of stage III retinal waves is revealed by both anatomical and electrophysiology recordings: single thalamic neurons receive weak inputs from 10 to 30 RGCs at P7 and only from 1 to 3 RGCs by P14 [15, 23, 63]. Retinal activity blockade by TTX between P11 and P14 impairs this fine scale refinement [63]. Single axon reconstructions between P9 and P15, show an increase in the number of branch points [24] suggesting an increase in synaptic contacts. Thus, at the presynaptic level of a RGC terminal arbor, the fine scale refinement is due to both an elimination of synapses from most of the postsynaptic cells in parallel to an important elaboration of synapses on very few postsynaptic cells.

Overall these data indicate that although retinal activity modulates axon guidance, the effects are not crucial for the global topographic positioning of RGCs in vivo but are more likely to affect the size/extent of the RGC terminal zone (TZ).

4.4. Role of synaptic release on retinotopy

Is synaptic release from RGCs to their targets important for retinotopy refinement ? The global topography is normal in retinocollicular co-cultures using Munc18-1 KO retinal explants, that have no synaptic release, or using pharmacological blockade of NMDA or AMPA receptors contrasting with the effects of TTX, suggesting that ordering of retinal projections is activity-dependent but not dependent on presynaptic release [59]. However later stages of refinement may require synaptic mechanisms since NMDA receptor blockade in hamster and rat SC leads to enlarged receptive fields in the SC [64, 65]. Whether presynaptic release and NMDA receptors are required for topographic map is thus still an open question.

4.5. Instructive vs. permissive role of activity

While the role of activity on the formation of retinal maps is now widely accepted, its precise role is still debated and especially whether activity is permissive or instructive for retinal projection development [8, 9]. “Permissive” implies that only the presence of activity is required while “Instructive” implies that the patterns of activity contains information necessary for the development of visual maps. This later hypothesis is very attractive as spontaneous retinal waves through their various spatio-temporal features can code information meaningful for the refinement of retinal axon. Since the spontaneous retinal waves trigger correlated activity within groups of neighboring RGCs, they are ideal candidate to underlie eye specific segregation and retinotopy refinement through Hebbian synaptic rules. Burst timing dependent plasticity can be elicited at retinogeniculate synapse in rats [66] and retinocollicular synapse [67] suggesting that Hebbian type rules can apply at these synapses. If activity is indeed instructive, changing the pattern of activity or the correlation of neighboring RGCs without modifying the overall level of activity should be sufficient to alter visual system development. However, this has proven very difficult to achieve as most models end up changing both the spatio-temporal pattern of activity and the global level of activity as is the case for epibatidine-treated mice and beta2-AChR KO mice [33, 41, 68, 69]that showed similar defects in both eye-specific segregation and retinotopic refinement [22, 40, 42, 44, 62]. An interesting study eliminated starburst amacrine cells by using an immunotoxin in the ferret postnatal retina [70] and showed normal eye-specific segregation suggesting that retinal waves were not required. However, the initial report that neighboring RGC activities were decorrelated [70] was later disproven as retinal waves were still present, although with a lower correlation of activity between neighboring RGCs [71]. As these results have been extensively studied in two previous "viewpoints" [8, 9], we will not discuss their detail, but will focus on two recent models that pertain to this question. A transgene of beta2-AChR subunit has been specifically expressed in RGCs in

combination with the full beta2-AChR to rescue the expression of beta2-AChR only in RGCs. In this model (beta2TG), RGCs have a normal level of activity but retinal waves are modified (they are smaller and with different number of bursts per wave) [41]. The beta2TG mice present a rescue of the major retinotopic defects in the dLGN and SC but only a partial rescue of the eye specific segregation deficits found in the beta2-AChR mice, suggesting that a normal level of activity is not sufficient for proper eye-specific segregation and thus fitting with the idea of an instructive role of activity. The limiting factor seems to be the size of the waves but this will need to be proven by other experiments in the future. Interestingly, retinotopic defects are maintained in the binocular region in both the dLGN and SC of beta2TG mice, and these defects are rescued by a monocular enucleation [41]. The latter result suggests that the alteration of eye-specific maps could impact the proper refinement of retinotopic maps in the binocular zone and thus points to an interplay between ipsilateral and contralateral inputs for the establishment of both maps, an interesting notion that will need further confirmation.

Another model used optogenetic tools to manipulate the pattern of retinal activity using the expression of channelrhodopsin ChR2 in RGCs with light-induced synchronous or asynchronous stimulation from P5 to assess eye specific segregation and retinotopy at P9 [48]. Synchronous stimulation of both eyes, induced a mild desegregation of eye-specific maps, while asynchronous stimulation enhanced slightly the segregation in the SC [48]. These results suggest that the relative timing of activity in the two eyes mediates the non-retraction and/or sprouting of ipsilateral axons, suggesting that activity has an instructive role through Hebb-based activity dependent competition for this phenomenon and also highlight that mechanisms could be different in the dLGN and SC.

5. Other factors involved in visual map formation and linked to activity

5.1. Retinal ganglion cell death

Refinement of eye-specific and retinotopic maps coincides with a period of massive developmental cell death. Up to 50% of RGCs are lost due to cell death, between P0 and P7 in mice, while at the same time period amacrine cells and photoreceptors are increasing in numbers [72]. Early studies of O'Leary et al. [60] showed that the postnatal removal of erroneously positioned retino-collicular axons (Fig.3a) could be due to developmental cell death in an activity dependent manner. These experiments were done in rats using a clever combination of tracer and TTX injections at different developmental times. More recently, TTX application in the retino-collicular model showed that TTX reduced both the topographic refinement and developmental cell death of RGCs, further supporting this hypothesis [59, 73]. However, arguments against a requirement of cell death for the specific modeling of retinal maps came from genetic experiments in which the anti-apoptotic

molecule Bcl-2 was overexpressed; in Bcl2-Tg mice, normal maps were noted despite the substantial decrease in cell death [74]. However, it is likely that activity acts on cell death for population matching and could play a role in activity-dependent competition for retinal targets. For instance, BDNF, whose expression is increased by neural activity in retinal targets [75], can selectively increases the survival of ipsilateral RGCs although it has no effect on total RGC survival [76]. Thus, activity-dependent cell death contributes to the elimination of RGCs during this developmental time window but does not appear to be the main factor to eliminate RGCs with inappropriately located arbors.

5.2. Adenylate Cyclases

One of the important questions raised when considering the effect of neural activity on neural circuit patterns is to understand how changes in the intensity/frequency of action potentials are converted into morphological changes of axon terminals. One of the obvious downstream signals is calcium that enters the cells via voltage-gated channels, triggering molecular cascades that involve cAMP and PKA-dependent mechanisms. Interesting candidates in this respect are the calcium dependent adenylate cyclases (AC) [77]: these enzymes are directly stimulated by calcium entry. Several isoforms of AC have been demonstrated in the developing rodent retina but only one, AC1, was shown to be required for retinal map development [78, 79]. AC1-KO mice have similar eye specific segregation and retinotopic refinement defects as the beta2-AChR KO [78-80]. However, unlike the beta2-AChR KO, AC1-KO mice have normal retinal waves [80] and there is no late rescue of the segregation defects [42, 78]. This suggests that AC1 could transduce the electrical activity in RGCs (action potentials) into chemical signals within the neuron during the stage II and III retinal waves. Because AC1 was shown to be required in the RGCs and not in the targets for retinal map refinement [27], possible effects of changes in cAMP signaling in the growth cones were investigated. Although the general topography of the map was unaltered in the AC1-KO, lack of AC1 changed the response of RGCs to ephrin-A5 in an unexpected way [27]. Although the initial collapse response to ephrins was not modified, the retraction of the AC1-KO RGC growth cone was arrested in comparison to controls, indicating an interaction with the cytoskeletal mechanisms involved in axon pruning. Other components of the ephrin-A5 signaling, such as effects on axon branching were not modified in the AC1-KO. Single axon reconstructions showed a normal branching complexity of terminal arbors [27, 80], although aberrant ectopic axonal branches were maintained, suggesting a main effect on the pruning back.

In addition to these local effects on axons, activity-triggered cAMP signals could have effects on gene transcription. Although such changes were not reported in the AC1-KO, other studies analyzing cAMP-response element binding protein (CREB) mutant mice showed an abnormal eye-

specific segregation [81]. However, the mechanisms underlying these changes remain to be clarified.

5.3. Retrograde signaling

Refinement of retinal projections likely involve retrograde signaling from the target cells to influence synaptic maintenance or removal of retinal terminals. Three potentially important candidates are listed below.

The endocannabinoids (CBs) are released by post-synaptic cells in an activity-dependent manner and activate pre-synaptic cannabinoid receptors (CB1R and CB2R). Interestingly, they can mediate short-term depression (STD) and long-term depression (LTD) [82, 83] that could lead to synapse elimination. The different components of the endocannabinoid system are expressed in the visual system and it has been shown by *in vitro* and *in vivo* experiments, that they could play a role in axon guidance and eye specific segregation of retinal projections in the SC and the dLGN [84-86].

Neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and their receptors such as TrkB are another class of important molecular signals regulated by activity. In the visual system, BDNF and TrkB are important to protect RGCs and target cells (SC and dLGN) from cell death and from retinal projection retraction [87-90]. BDNF/TrkB signaling modulates glutamatergic synapses through pre and post-synaptic mechanisms [91] [92]. However, both BDNF-KO mice [92] and TrkB KO mice [90] displayed normal eye specific segregation in the SC or the dLGN. Importantly, TrkB KO mice have an ectopic ipsilateral projection caudally in the SC [90].

Nitric oxide is another potential retrograde signal. Pharmacological inhibition of calcium sensitive nitric oxide synthase (NOS) in ferrets did not impair eye specific segregation dLGN [93]. In contrast, genetic approaches of NOS inhibition leads to ectopic ipsilateral projection caudally in the SC of NOS KO mice [16] and in the SC of NOS inhibitor treated rats [94], but without clear defects in eye specific segregation.

Overall, these retrograde signals seem to participate in the refinement of the ipsilateral projection but their precise role in the activity-dependent mechanisms is still in need of further investigation.

5.4. Serotonin

Serotonin (5-HT) neurotransmission has emerged as an important actor of activity-dependent refinement of retinotopic and eye-specific maps with effects that are essentially localized at the presynaptic level. The role of 5-HT was initially shown in hamsters with increased brain 5-HT level due to aberrant sprouting of 5-HT innervation after neonatal administration of the neurotoxic 5-7 DHT [95]. This treatment was shown to alter the organization of both the crossed and uncrossed retinotectal map with an enlargement of visual receptive fields [96]. More direct evidence for a

causal role of 5-HT came from genetic mouse models lacking monoamine oxidase A (MAOA), the degradation enzyme for monoamines, or the 5-HT transporter (SERT). [97-99] In these two genetic models, eye-specific segregation in the dLGN is altered and ipsilateral fibers in the SC do not cluster and extend beyond their normal territory [95 , 99, 100]. The overactivation of 5HT1B receptors by 5-HT excess is responsible for most defects as double-mutant for MAOA or SERT and 5-HT1B have a mostly rescued phenotype [100 , 101]. Interestingly, 5HT1B receptors are presynaptic, expressed in all RGCs [99, 102] and exert a strong inhibitory control on glutamatergic transmission [102]. Thus a main effect of overstimulation of the 5-HT1B receptors would be to inhibit neurotransmission at the retinotectal and retinogeniculate synapses. This leads to phenotypes that are very similar to the ones observed in the beta2-KO and the AC1-KO : at least as concerns the eye-specific segregation, and the lack of refinement of the ipsilateral retinal projections. Interestingly, 5HT1B KO mice have no defects in eye-specific segregation of topographic refinement, except for the refinement of ipsilateral axons in the SC [101] suggesting that this receptor is crucial for their proper refinement independently of the 5-HT levels.

Interestingly, features of the serotoninergic system are expressed transiently by glutamatergic neurons of sensory systems during development, in retinal axons [99]. These serotoninergic characteristics include the 5-HT transporter (SERT) and the vesicular monoamine transporter (VMAT2) but not the enzyme for 5HT synthesis [99]. Strikingly, SERT is transiently expressed in the ipsilateral but not contralateral RGCs located in the VT retina [99]. Although the specific function of SERT in these cells is still unknown, it has been demonstrated that SERT expression allows a high affinity uptake of serotonin in the ipsilaterally projecting RGCs [99]; yet SERT did not appear be required for axon guidance at the midline [103]. SERT-KO show visual map defects but it is difficult to assess SERT specific role in RGCs independently of its more general effects on brain 5-HT levels [100, 101]. A possible hypothesis is that SERT in ipsilateral RGCs locally modulates 5-HT concentration by clearing 5-HT from ipsilateral synapses. This could induce different local concentrations of 5-HT causing a difference in the neural activity/release properties of the ipsi/contralateral RGCs. However, 5-HT could also act directly on retinal axons, or through the modulation of response to guidance cues [104, 105], independent of neurotransmission. Even though serotonin and 5HT1B receptor are clearly important for visual map formation, the specific cellular aspects that are modulated by 5-HT signaling for retinal refinement remain to be determined.

5.5. Immune system molecules, glia and microglia

An interesting new family of molecules has gained strong interest recently, the major histocompatibility complex class I molecules (MHCI). They were initially discovered in a screen

for activity-regulated molecules in the dLGN [106]. Subsequent experiments involved different immune molecules, such as CD3zeta and beta2-microglobulin, TAP1 [107], H2Db and H2K(b) [108], immune-like proteins such as the neuronal pentraxins [109] and immune molecules from the complement cascade such as C1q , C3 [110], and the complement receptor CR3 [111]. All these molecules have been involved in the refinement of eye-specific segregation and more specifically in synapse elimination. Interestingly, CR3 is expressed at the microglial surface, thus eye specific segregation in the dLGN could at least in part be mediated by phagocytosis of mislocalized projections by microglial cells [111]. Furthermore, secretion of TGFbeta by astrocytes induces C1q expression in RGCs followed by microglia-mediated synapse phagocytosis [112]. Thus, these complement molecules could act as "tags" to identify synapses that need to be eliminated by microglia. Importantly, this process is activity dependent [111]. Recently, it has been demonstrated that astrocytes also are able to phagocyte retinal projections [113]. MEGF10 and MERTK are two important receptors for phagocytosis that are expressed in astrocytes. MEGF10 KO and MERTK KO mice show eye specific segregation defects and maintained multi-innervation of LGN neurons due to impairment of synapse elimination. Importantly, astrocyte-mediated synapse phagocytosis is activity-dependent [113].

Recently, some of the immune system molecules have been linked to alterations of neural plasticity. Mutants of the immune system molecules, H2Db, have impaired LTD after patterns of stimulation mimicking endogenous retinal waves [114]. Along similar lines, it was shown that neuronal pentraxins 1 and 2 (NP1/2) are required for the normal development of AMPAR-mediated transmission and could convert silent synapses during eye-specific refinement [115]. The discovery of all these immune system molecules that could be regulated by activity has gained more weight and has also implied new players such as microglia and astrocytes in synaptic refinement.

6. Specificity of ipsilateral projection

Many experiments highlight specific responses of the ipsilateral retinal projection to both guidance cues and activity. An interesting feature of the retinotopic organization is that ipsilateral axons are oriented with a different topography than the contralateral projection. Functional recordings in the ipsilateral SC show that ipsilateral inputs are oriented in a reverse manner [116] and anatomical tracing indicate that ventrotemporal RGCs project more caudally on the ipsilateral side compared to the contralateral side [117]. This differential projection site of RGCs despite a similar topographic origin suggests that mechanisms controlling retinotopy differ in the contralateral and ipsilateral RGCs. Although both ipsilateral and contralateral axons are affected in ephrin mutants, their response to these guidance molecules could be interpreted differently for their final positioning.

One interesting candidate is the molecule Ten_m3 which seems to affect specifically the organization of ipsilateral axons [11], however the underlying mechanisms are still mysterious.
Second, the ipsilateral projection in the SC is more sensitive to activity changes. This is particularly clear for late activity changes: in various models, recovery of normal retinal activity rescues eye-specific segregation or retinotopic defects but maintain defects in the refinement of the ipsilateral projection [41, 48, 101]. Furthermore, in models with a smaller ipsilateral projection [19, 118], there is a reduction in the eye-specific segregation suggesting that a balance between ipsilateral and contralateral inputs affect eye-specific segregation. In one of these models, EphB1-KO, the receptor guiding the retinal axons to the ispilateral side is missing, causing the misrouted axons to project contralaterally: these axons still project to the normal "ipsilateral" domain but on the contralateral side suggesting that specific factors are determining the position of the ipsilateral domain. Interestingly, the misrouted axons segregate from the rest of the contralateral projection and formed an "ectopic patch" that was eliminated by epibatidine treatment and thus, was activity-dependent [19]. Other experiments showed that the refinement of ipsilateral axons seem to rely on different mechanisms than the Hebbian competition based rules as the ipsilateral axons seem to target the appropriate region and refine properly even when their presynaptic release is perturbed [52]. In contrast, the contralateral axons that still have a normal release do not retract from the ipsilateral territory. These two experiments strongly suggest that activity associated with molecular factors specific of the ipsilateral RGCs underlies synapse selection for eye-specific segregation as well as topographic refinement. Some interesting candidates are molecules specifically affecting the ipsilateral projection such as teneurins [11, 119] or specifically expressed in the ipsilateral RGCs such as the serotonin transporter [99]. Hopefully, more insight will come from studying the molecular factors specific to the ipsilateral RGCs and how they can be affected by activity changes.

7. Conclusions

More than twenty years after the discovery of spontaneous activity in the retina, we now clearly know that retinal waves are crucial for the refinement of visual maps and acts in an instructive manner on eye-specific maps, even though the critical characteristics of retinal activity needed are still unclear. The use of new genetic models and of optogenetic tools to manipulate activity at will in addition to the characterization of retinal waves in vivo will certainly uncover which exact features of retinal activity are necessary. Some experiments also point towards an interdependence of visual maps. For instance defects in eye-specific maps can secondarily affect retinotopic map, rendering interpretations difficult and stressing the need to study in detail all the visual maps in models with perturbed activity. Also, activity acts on refinement through both Hebbian and non

Hebbian based rules and we now need to decipher the underlying cellular mechanisms. For instance, whether presynaptic release is required or not remains to be determined. It is also now crucial to identify the downstream effectors of retinal activity. Interesting candidates such as adenylate cyclases, immune system molecules, retrograde signaling molecules have emerged in addition to factors such as 5-HT, that act to translate or to modulate the response to activity and thus contribute to the fine-tuning of the visual maps. In addition, an emerging field is the study of non-cell autonomous effects of axon circuit refinement, through synapse elimination by microglia or astrocytes. Deciphering the role of each of these factors and finding new molecular effectors needed for this conversion of activity into cellular effects such as axon branching or pruning will be an important direction in the future.

Acknowledgements:

We thank past and present members of the lab for their contributions to the work reviewed here. Work in the laboratory of P. Gaspar related to the topic of this review was supported by INSERM, Retina France, and the Fondation pour la Recherche Médicale and is currently funded by INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Fondation pour la Recherche Medicale. A. Assali was supported by a Ministry of Research doctoral fellowship and by a Retina France doctoral fellowship. A. Rebsam's work related to the topic of this review was funded by National Institutes of Health Grants EY012736 and EY015290, the Gatsby Initiative in Brain Circuitry and by postdoctoral fellowships from the Fondation pour la Recherche Medicale and the Human Frontier Science Program LT00399/2006-L, and is currently funded by the ANR #ANR-12-BSV4-0002, Genespoir and Fondation NRJ. The team is part of the Ecoles des Neurosciences de Paris training network and of the Labex Biopsy.

References

[1] Landmesser LT, O'Donovan MJ. Activation patterns of embryonic chick hind limb muscles recorded in ovo and in an isolated spinal cord preparation. The Journal of physiology 1984;347:189-204.
[2] Galli L, Maffei L. Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. Science 1988;242:90-1.
[3] Leinekugel X, Khazipov R, Cannon R, Hirase H, Ben-Ari Y, Buzsaki G. Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. Science 2002;296:2049-52.
[4] Khazipov R, Luhmann HJ. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. Trends Neurosci 2006;29:414-8.
[5] Meister M, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. Science 1991;252:939-43.
[6] Wong RO, Meister M, Shatz CJ. Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. Neuron 1993;11:923-38.
[7] Ackman JB, Burbridge TJ, Crair MC. Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. Nature 2012;490:219-25.
[8] Chalupa LM. Retinal waves are unlikely to instruct the formation of eye-specific retinogeniculate projections. Neural Dev 2009;4:25.
[9] Feller MB. Retinal waves are likely to instruct the formation of eye-specific retinogeniculate projections. Neural Dev 2009;4:24.
[10] Morin LP, Studholme KM. Retinofugal Projections in the Mouse. The Journal of Comparative Neurology 2014.
[11] Leamey CA, Merlin S, Lattouf P, Sawatari A, Zhou X, Demel N, et al. Ten_m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. PLoS Biol 2007;5:e241.
[12] Petros TJ, Rebsam A, Mason CA. Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. Annu Rev Neurosci 2008;31:295-315.
[13] Guillery RW, Mason CA, Taylor JS. Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. J Neurosci 1995;15:4727-37.
[14] Godement P, Salaun J, Imbert M. Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. J Comp Neurol 1984;230:552-75.
[15] Jaubert-Miazza L, Green E, Lo FS, Bui K, Mills J, Guido W. Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. Vis Neurosci 2005;22:661-76.
[16] Wu HH, Cork RJ, Mize RR. Normal development of the ipsilateral retinocollicular pathway and its disruption in double endothelial and neuronal nitric oxide synthase gene knockout mice. The Journal of Comparative Neurology 2000;426:651-65.
[17] Pfeiffenberger C, Yamada J, Feldheim DA. Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. J Neurosci 2006;26:12873-84.
[18] Lund RD, Lund JS, Wise RP. The organization of the retinal projection to the dorsal lateral geniculate nucleus in pigmented and albino rats. The Journal of Comparative Neurology 1974;158:383-403.
[19] Rebsam A, Petros TJ, Mason CA. Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. J Neurosci 2009;29:14855-63.
[20] Triplett JW, Feldheim DA. Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. Semin Cell Dev Biol 2011.
[21] Simon DK, O'Leary DD. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. J Neurosci 1992;12:1212-32.
[22] McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. Neuron 2003;40:1147-60.
[23] Chen C, Regehr WG. Developmental remodeling of the retinogeniculate synapse. Neuron 2000;28:955-66.
[24] Dhande OS, Hua EW, Guh E, Yeh J, Bhatt S, Zhang Y, et al. Development of single retinofugal axon arbors in normal and beta2 knock-out mice. J Neurosci 2011;31:3384-99.
[25] Dhande OS, Crair MC. Transfection of mouse retinal ganglion cells by in vivo electroporation. J Vis Exp 2011.
[26] Feldheim DA, O'Leary DD. Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a001768.

[27] Nicol X, Muzerelle A, Rio JP, Metin C, Gaspar P. Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. J Neurosci 2006;26:862-72.
[28] Wiesel TN, Hubel DH. Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. J Neurophysiol 1963;26:1003-17.
[29] Hirsch HV, Spinelli DN. Visual experience modifies distribution of horizontally and vertically oriented receptive fields in cats. Science 1970;168:869-71.
[30] Wong RO, Chernjavsky A, Smith SJ, Shatz CJ. Early functional neural networks in the developing retina. Nature 1995;374:716-8.
[31] Torborg CL, Feller MB. Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. Prog Neurobiol 2005;76:213-35.
[32] Wong RO. Retinal waves and visual system development. Annual review of neuroscience 1999;22:29-47.
[33] Bansal A, Singer JH, Hwang BJ, Xu W, Beaudet A, Feller MB. Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal waves in forming ON and OFF circuits in the inner retina. J Neurosci 2000;20:7672-81.
[34] Shatz CJ, Stryker MP. Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. Science 1988;242:87-9.
[35] Sretavan DW, Shatz CJ, Stryker MP. Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin. Nature 1988;336:468-71.
[36] Cook PM, Prusky G, Ramoa AS. The role of spontaneous retinal activity before eye opening in the maturation of form and function in the retinogeniculate pathway of the ferret. Vis Neurosci 1999;16:491-501.
[37] Fawcett JW, O'Leary DD, Cowan WM. Activity and the control of ganglion cell death in the rat retina. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81:5589-93.
[38] Thompson I, Holt C. Effects of intraocular tetrodotoxin on the development of the retinocollicular pathway in the Syrian hamster. The Journal of Comparative Neurology 1989;282:371-88.
[39] Penn AA, Riquelme PA, Feller MB, Shatz CJ. Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. Science 1998;279:2108-12.
[40] Rossi FM, Pizzorusso T, Porciatti V, Marubio LM, Maffei L, Changeux JP. Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:6453-8.
[41] Xu HP, Furman M, Mineur YS, Chen H, King SL, Zenisek D, et al. An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development. Neuron 2011;70:1115-27.
[42] Muir-Robinson G, Hwang BJ, Feller MB. Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers. J Neurosci 2002;22:5259-64.
[43] Huberman AD, Stellwagen D, Chapman B. Decoupling eye-specific segregation from lamination in the lateral geniculate nucleus. J Neurosci 2002;22:9419-29.
[44] Grubb MS, Rossi FM, Changeux JP, Thompson ID. Abnormal functional organization in the dorsal lateral geniculate nucleus of mice lacking the beta 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. Neuron 2003;40:1161-72.
[45] Blankenship AG, Ford KJ, Johnson J, Seal RP, Edwards RH, Copenhagen DR, et al. Synaptic and extrasynaptic factors governing glutamatergic retinal waves. Neuron 2009;62:230-41.
[46] Demas J, Sagdullaev BT, Green E, Jaubert-Miazza L, McCall MA, Gregg RG, et al. Failure to maintain eye-specific segregation in nob, a mutant with abnormally patterned retinal activity. Neuron 2006;50:247-59.
[47] Chapman B. Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus. Science 2000;287:2479-82.
[48] Zhang J, Ackman JB, Xu HP, Crair MC. Visual map development depends on the temporal pattern of binocular activity in mice. Nat Neurosci 2012;15:298-307.
[49] Godement P, Saillour P, Imbert M. The ipsilateral optic pathway to the dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus in mice with prenatal or postnatal loss of one eye. J Comp Neurol 1980;190:611-26.
[50] Stellwagen D, Shatz CJ. An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity. Neuron 2002;33:357-67.
[51] Mooney R, Penn AA, Gallego R, Shatz CJ. Thalamic relay of spontaneous retinal activity prior to vision. Neuron 1996;17:863-74.
[52] Koch SM, Dela Cruz CG, Hnasko TS, Edwards RH, Huberman AD, Ullian EM. Pathway-specific genetic attenuation of glutamate release alters select features of competition-based visual circuit refinement. Neuron 2011;71:235-42.

[53] Constantine-Paton M, Law MI. Eye-specific termination bands in tecta of three-eyed frogs. Science 1978;202:639-41.
[54] Ruthazer ES, Akerman CJ, Cline HT. Control of axon branch dynamics by correlated activity in vivo. Science 2003;301:66-70.
[55] Cline HT, Debski EA, Constantine-Paton M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:4342-5.
[56] Smetters DK, Hahm J, Sur M. An N-methyl-D-aspartate receptor antagonist does not prevent eye-specific segregation in the ferret retinogeniculate pathway. Brain research 1994;658:168-78.
[57] Colonnese MT, Constantine-Paton M. Chronic NMDA receptor blockade from birth increases the sprouting capacity of ipsilateral retinocollicular axons without disrupting their early segregation. J Neurosci 2001;21:1557-68.
[58] Cork RJ, Namkung Y, Shin HS, Mize RR. Development of the visual pathway is disrupted in mice with a targeted disruption of the calcium channel beta(3)-subunit gene. The Journal of Comparative Neurology 2001;440:177-91.
[59] Nicol X, Voyatzis S, Muzerelle A, Narboux-Neme N, Sudhof TC, Miles R, et al. cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. Nat Neurosci 2007;10:340-7.
[60] O'Leary DD, Fawcett JW, Cowan WM. Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cell death. J Neurosci 1986;6:3692-705.
[61] Benjumeda I, Escalante A, Law C, Morales D, Chauvin G, Muca G, et al. Uncoupling of EphA/ephrinA signaling and spontaneous activity in neural circuit wiring. J Neurosci 2013;33:18208-18.
[62] Chandrasekaran AR, Plas DT, Gonzalez E, Crair MC. Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. J Neurosci 2005;25:6929-38.
[63] Hooks BM, Chen C. Distinct roles for spontaneous and visual activity in remodeling of the retinogeniculate synapse. Neuron 2006;52:281-91.
[64] Simon DK, Prusky GT, O'Leary DD, Constantine-Paton M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:10593-7.
[65] Huang L, Pallas SL. NMDA antagonists in the superior colliculus prevent developmental plasticity but not visual transmission or map compression. Journal of neurophysiology 2001;86:1179-94.
[66] Butts DA, Kanold PO, Shatz CJ. A burst-based "Hebbian" learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement. PLoS Biol 2007;5:e61.
[67] Shah RD, Crair MC. Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retinal waves. J Neurosci 2008;28:292-303.
[68] Sun C, Speer CM, Wang GY, Chapman B, Chalupa LM. Epibatidine application in vitro blocks retinal waves without silencing all retinal ganglion cell action potentials in developing retina of the mouse and ferret. J Neurophysiol 2008;100:3253-63.
[69] Sun C, Warland DK, Ballesteros JM, van der List D, Chalupa LM. Retinal waves in mice lacking the beta2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:13638-43.
[70] Huberman AD, Wang GY, Liets LC, Collins OA, Chapman B, Chalupa LM. Eye-specific retinogeniculate segregation independent of normal neuronal activity. Science 2003;300:994-8.
[71] Speer CM, Sun C, Chapman B. Activity-dependent disruption of intersublaminar spaces and ABAKAN expression does not impact functional on and off organization in the ferret retinogeniculate system. Neural Dev 2011;6:7.
[72] Young RW. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. The Journal of Comparative Neurology 1984;229:362-73.
[73] Voyatzis S, Muzerelle A, Gaspar P, Nicol X. Modeling activity and target-dependent developmental cell death of mouse retinal ganglion cells ex vivo. PLoS One 2012;7:e31105.
[74] Yakura T, Fukuda Y, Sawai H. Effect of Bcl-2 overexpression on establishment of ipsilateral retinocollicular projection in mice. Neuroscience 2002;110:667-73.
[75] Herzog KH, von Bartheld CS. Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. J Neurosci 1998;18:2891-906.
[76] Isenmann S, Cellerino A, Gravel C, Bahr M. Excess target-derived brain-derived neurotrophic factor preserves the transient uncrossed retinal projection to the superior colliculus. Mol Cell Neurosci 1999;14:52-65.
[77] Nicol X, Gaspar P. Routes to cAMP: shaping neuronal connectivity with distinct adenylate cyclases. The European Journal of Neuroscience 2014;39:1742-51.

[78] Ravary A, Muzerelle A, Herve D, Pascoli V, Ba-Charvet KN, Girault JA, et al. Adenylate cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps. J Neurosci 2003;23:2228-38.
[79] Nicol X, Bennis M, Ishikawa Y, Chan GC, Reperant J, Storm DR, et al. Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections. Eur J Neurosci 2006;24:3401-14.
[80] Dhande OS, Bhatt S, Anishchenko A, Elstrott J, Iwasato T, Swindell EC, et al. Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development. The Journal of Comparative Neurology 2012;520:1562-83.
[81] Pham TA, Rubenstein JL, Silva AJ, Storm DR, Stryker MP. The CRE/CREB pathway is transiently expressed in thalamic circuit development and contributes to refinement of retinogeniculate axons. Neuron 2001;31:409-20.
[82] Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. Current opinion in neurobiology 2014;29C:1-8.
[83] Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. Physiological reviews 2009;89:309-80.
[84] Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. Mol Vis 2006;12:1160-6.
[85] Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cecyre B, Chaine N, Cherif H, et al. Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. J Neurosci 2011;31:1489-99.
[86] Duff G, Argaw A, Cecyre B, Cherif H, Tea N, Zabouri N, et al. Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance. PLoS One 2013;8:e70849.
[87] Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE, Frost DO. BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. J Neurosci 1998;18:2097-107.
[88] Caleo M, Menna E, Chierzi S, Cenni MC, Maffei L. Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. Current biology : CB 2000;10:1155-61.
[89] Menna E, Cenni MC, Naska S, Maffei L. The anterogradely transported BDNF promotes retinal axon remodeling during eye specific segregation within the LGN. Mol Cell Neurosci 2003;24:972-83.
[90] Rodger J, Frost DO. Effects of trkB knockout on topography and ocular segregation of uncrossed retinal projections. Experimental brain research 2009;195:35-44.
[91] Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. British journal of pharmacology 2008;153 Suppl 1:S310-24.
[92] Lyckman AW, Fan G, Rios M, Jaenisch R, Sur M. Normal eye-specific patterning of retinal inputs to murine subcortical visual nuclei in the absence of brain-derived neurotrophic factor. Vis Neurosci 2005;22:27-36.
[93] Cramer KS, Angelucci A, Hahm JO, Bogdanov MB, Sur M. A role for nitric oxide in the development of the ferret retinogeniculate projection. J Neurosci 1996;16:7995-8004.
[94] Vercelli A, Garbossa D, Biasiol S, Repici M, Jhaveri S. NOS inhibition during postnatal development leads to increased ipsilateral retinocollicular and retinogeniculate projections in rats. The European Journal of Neuroscience 2000;12:473-90.
[95] Rhoades RW, Bennett-Clarke CA, Lane RD, Leslie MJ, Mooney RD. Increased serotoninergic innervation of the hamster's superior colliculus alters retinotectal projections. The Journal of Comparative Neurology 1993;334:397-409.
[96] Ke M, Mooney RD, Rhoades RW. Increased serotonin in the developing superior colliculus affects receptive-field size of retinotectal afferents but not that of postsynaptic neurons. Vis Neurosci 1999;16:121-30.
[97] Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. Science 1995;268:1763-6.
[98] Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P. Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. Neuron 1996;16:297-307.
[99] Upton AL, Salichon N, Lebrand C, Ravary A, Blakely R, Seif I, et al. Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. J Neurosci 1999;19:7007-24.
[100] Salichon N, Gaspar P, Upton AL, Picaud S, Hanoun N, Hamon M, et al. Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. J Neurosci 2001;21:884-96.
[101] Upton AL, Ravary A, Salichon N, Moessner R, Lesch KP, Hen R, et al. Lack of 5-HT(1B) receptor and of serotonin transporter have different effects on the segregation of retinal axons in the lateral geniculate nucleus compared to the superior colliculus. Neuroscience 2002;111:597-610.

[102] Mooney RD, Shi MY, Rhoades RW. Modulation of retinotectal transmission by presynaptic 5-HT1B receptors in the superior colliculus of the adult hamster. J Neurophysiol 1994;72:3-13.
[103] Garcia-Frigola C, Herrera E. Zic2 regulates the expression of Sert to modulate eye-specific refinement at the visual targets. EMBO J 2010;29:3170-83.
[104] Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. Science 1984;226:561-4.
[105] Bonnin A, Torii M, Wang L, Rakic P, Levitt P. Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. Nat Neurosci 2007;10:588-97.
[106] Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. Neuron 1998;21:505-20.
[107] Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. Science 2000;290:2155-9.
[108] Datwani A, McConnell MJ, Kanold PO, Micheva KD, Busse B, Shamloo M, et al. Classical MHCI molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity. Neuron 2009;64:463-70.
[109] Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Renteria RC, Liu X, Xu W, et al. Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. J Neurosci 2006;26:6269-81.
[110] Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. Cell 2007;131:1164-78.
[111] Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron 2012;74:691-705.
[112] Bialas AR, Stevens B. TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. Nat Neurosci 2013;16:1773-82.
[113] Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. Nature 2013;504:394-400.
[114] Lee H, Brott BK, Kirkby LA, Adelson JD, Cheng S, Feller MB, et al. Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db. Nature 2014;509:195-200.
[115] Koch SM, Ullian EM. Neuronal pentraxins mediate silent synapse conversion in the developing visual system. J Neurosci 2010;30:5404-14.
[116] Haustead DJ, Lukehurst SS, Clutton GT, Bartlett CA, Dunlop SA, Arrese CA, et al. Functional topography and integration of the contralateral and ipsilateral retinocollicular projections of ephrin-A-/- mice. J Neurosci 2008;28:7376-86.
[117] Dharmaratne N, Glendining KA, Young TR, Tran H, Sawatari A, Leamey CA. Ten-m3 is required for the development of topography in the ipsilateral retinocollicular pathway. PLoS One 2012;7:e43083.
[118] Rebsam A, Bhansali P, Mason CA. Eye-specific projections of retinogeniculate axons are altered in albino mice. J Neurosci 2012;32:4821-6.
[119] Young TR, Bourke M, Zhou X, Oohashi T, Sawatari A, Fassler R, et al. Ten-m2 is required for the generation of binocular visual circuits. J Neurosci 2013;33:12490-509.

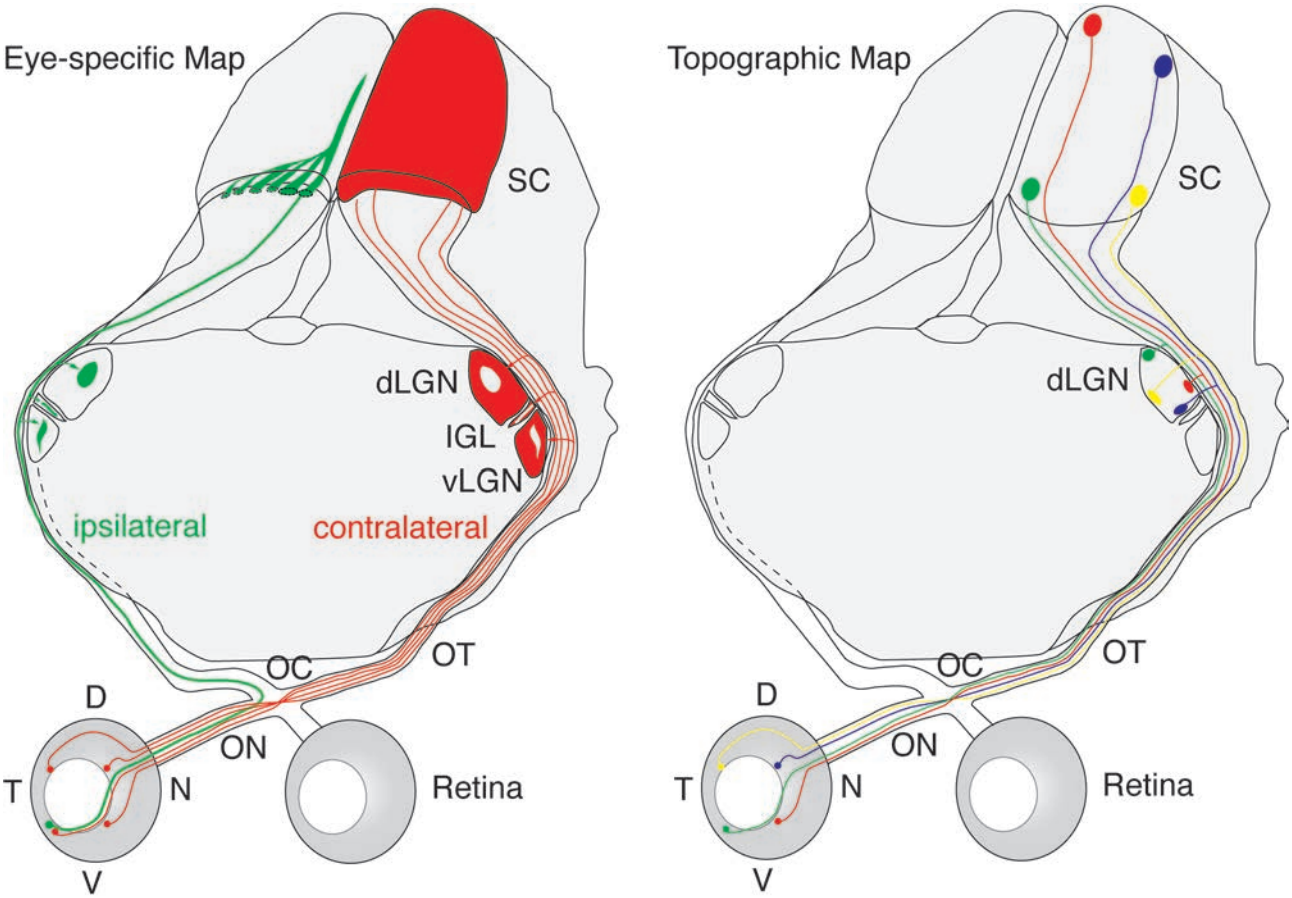


Fig. 1: Organization of retinal projections into eye specific and topographic maps in the mouse visual system. ON: optic nerve, OC: optic chiasm, OT: optic tract, vLGN: ventral lateral geniculate nucleus, dLGN: dorsal lateral geniculate nucleus, IGL: intergeniculate leaflet; SC: superior colliculus, D: dorsal, N: nasal, V: ventral, T: temporal.

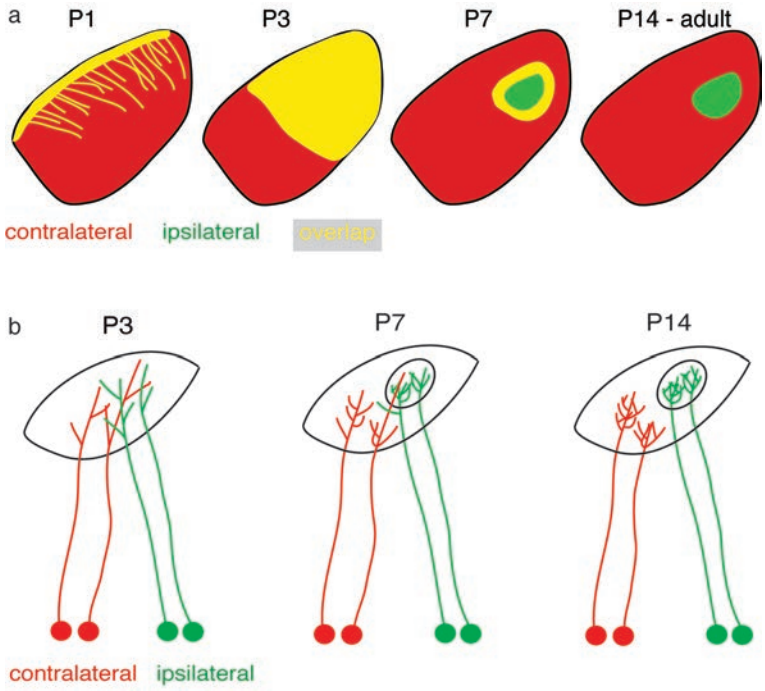


Fig. 2: Eye-specific refinement of retinal axons during development.
a) Developmental sequence of eye-specific retinogeniculate map formation. At P1, contralateral axons are distributed in the entire dLGN and ipsilateral axons start to invade the dLGN. At P3, ipsilateral and contralateral axons overlap on a large portion of the dLGN. At P7, contralateral axons have started to retract from the ipsilateral region, leaving a gap that is innervated by ipsilateral axons. Eye-specific segregation is thus visible. At P14, contralateral and ipsilateral axons are clearly segregated into different domains and show an adult-like pattern. b) Developmental sequence of axonal refinement in the dLGN based on single axon reconstruction of ventrotemporal axons. At P3, ipsilateral and contralateral axons are intermingled and their arbors are simple. At P7, ipsilateral and contralateral axons have more elaborated branches and start to arborize preferentially in a distinct domain. By P14, ipsilateral and contralateral axons have a very dense arborization and no ectopic branches are visible.

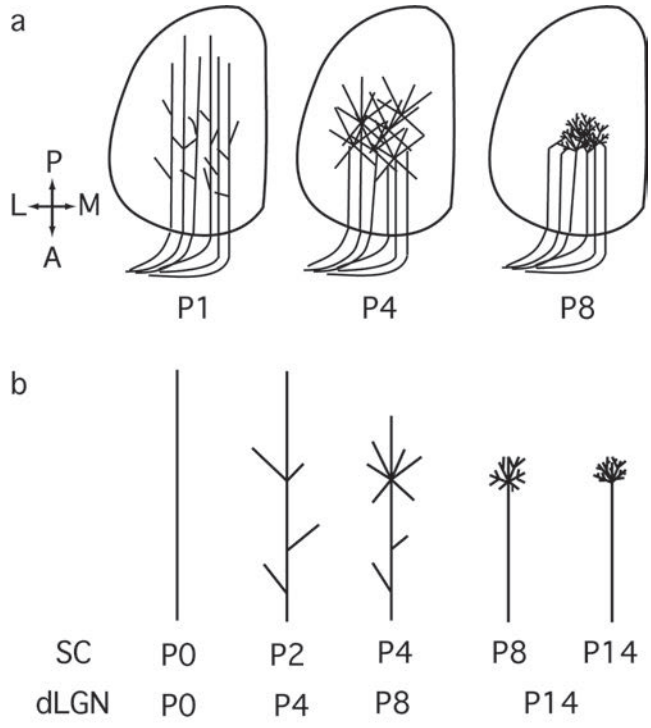
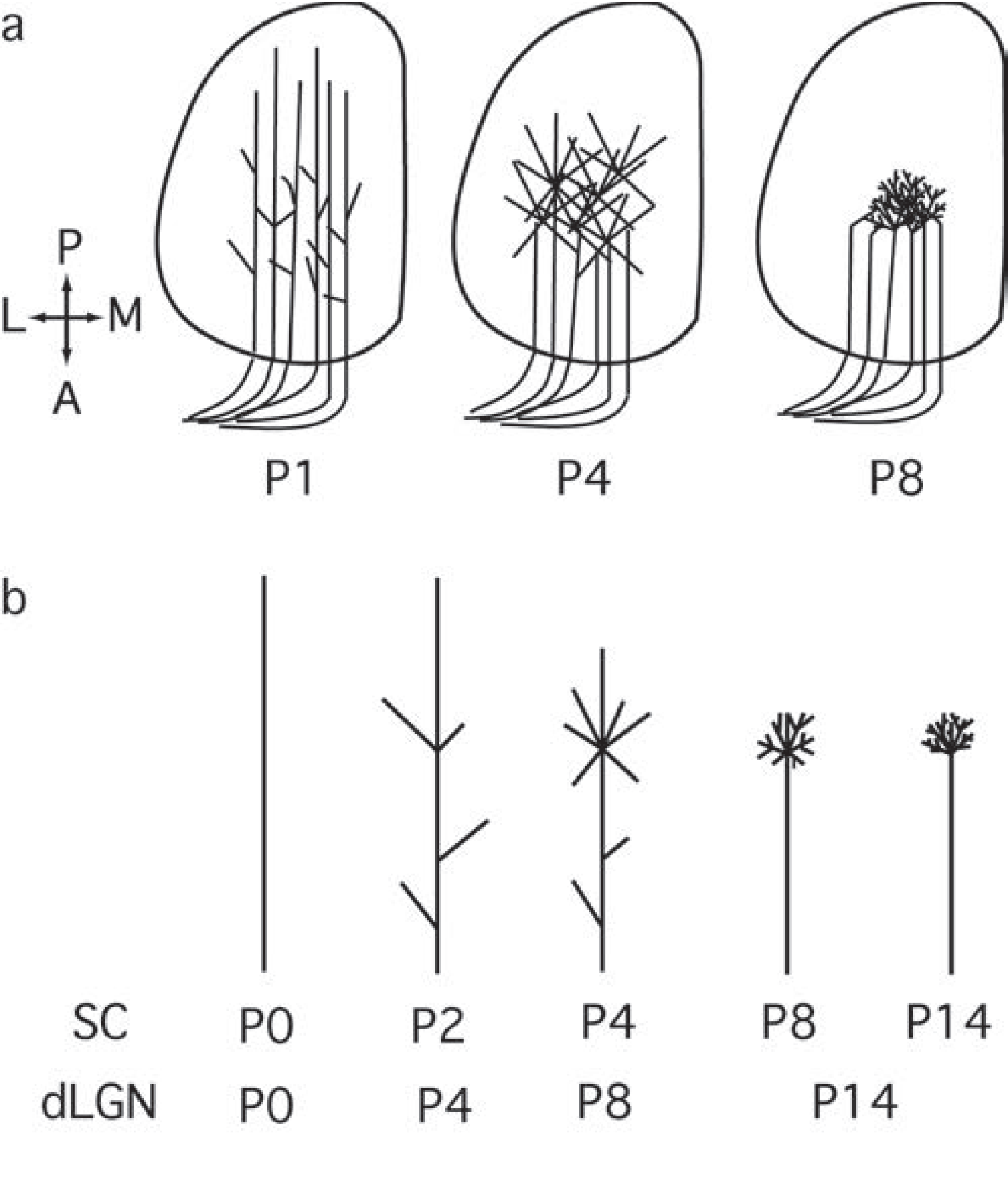


Fig. 3: Topographic refinement of retinal axons during development.
a) Developmental sequence of topographic retinocollicular map formation. Temporal axons are distributed along the entire SC at P1, then form branches around the appropriate topographic location in the rostral part of the SC with some overshooting axons already retracted at P4. At P8, temporal axons are branching specifically in the terminal zone and all ectopic axons are pruned. b) Developmental sequence of axonal refinement in the dLGN and SC based on single axon reconstruction of ventrotemporal axons. In both cases, retinal axons in their target are initially poorly or not branched at all. They subsequently start to arborize around their retinotopic position and prune overshooting branches. Finally, retinal axons increase branch density and number at the precise termination zone and retract exuberant branches to form a restricted and dense arbor. To note, the developmental sequence is delayed in the dLGN compared to the SC, with mature arbors at P8 in the SC and only P14 in the dLGN.


a
P
L
M
A
P1
P4
P8
b
SC
P0
P2
P4
P8
P14
dLGN
P0
P4
P8
P14

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Majid RM, Leong WL, Schalkwyk LC, Smallman DS, Wong ST, Storm DR, Fine A, Dobson MJ, Guernsey DL, Neumann PE (1998) Loss of adenylyl cyclase I activity disrupts patterning of mouse somatosensory cortex. Nat Genet 19:289-291.

Ackman JB, Crair MC (2014) Role of emergent neural activity in visual map development. Curr Opin Neurobiol 24:166-175.

Ackman JB, Burbridge TJ, Crair MC (2012) Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. Nature 490:219-225.

Ahmed AK, Dong K, Setsu T, Yamadori T (1996) Correlation between different types of retinal ganglion cells and their projection pattern in the albino rat. Brain Res 706:163-168.

Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. Nat Rev Neurosci 8:128-140.

Antoni FA, Smith SM, Simpson J, Rosie R, Fink G, Paterson JM (1998) Calcium control of adenylyl cyclase: the calcineurin connection. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 32:153-172.

Arcelli P, Frassoni C, Regondi MC, De Biasi S, Spreafico R (1997) GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity? Brain Res Bull 42:27-37.

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

Bansal A, Singer JH, Hwang BJ, Xu W, Beaudet A, Feller MB (2000) Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal waves in forming ON and OFF circuits in the inner retina. J Neurosci 20:7672-7681.

Ben Fredj N, Hammond S, Otsuna H, Chien CB, Burrone J, Meyer MP (2010) Synaptic activity and activity-dependent competition regulates axon arbor maturation, growth arrest, and territory in the retinotectal projection. J Neurosci 30:10939-10951.

Benjumeda I, Escalante A, Law C, Morales D, Chauvin G, Muca G, Coca Y, Marquez J, Lopez-Bendito G, Kania A, Martinez L, Herrera E (2013) Uncoupling of EphA/ephrinA signaling and spontaneous activity in neural circuit wiring. J Neurosci 33:18208-18218.

Betz A, Thakur P, Junge HJ, Ashery U, Rhee JS, Scheuss V, Rosenmund C, Rettig J, Brose N (2001) Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. Neuron 30:183-196.

Bialas AR, Stevens B (2013) TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. Nat Neurosci 16:1773-1782.

Bickford ME, Slusarczyk A, Dilger EK, Krahe TE, Kucuk C, Guido W (2010) Synaptic development of the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. J Comp Neurol 518:622-635.

Binns KE, Salt TE (1997) Post eye-opening maturation of visual receptive field diameters in the superior colliculus of normal- and dark-reared rats. Brain Res Dev Brain Res 99:263-266.

Blankenship AG, Hamby AM, Firl A, Vyas S, Maxeiner S, Willecke K, Feller MB (2011) The role of neuronal connexins 36 and 45 in shaping spontaneous firing patterns in the developing retina. J Neurosci 31:9998-10008.

Bouhelal R, Smounya L, Bockaert J (1988) 5-HT1B receptors are negatively coupled with adenylate cyclase in rat substantia nigra. Eur J Pharmacol 151:189-196.

Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F (2011) Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. Cell Signal 23:1257-1266.

Brown A, Yates PA, Burrola P, Ortuno D, Vaidya A, Jessell TM, Pfaff SL, O'Leary DD, Lemke G (2000) Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. Cell 102:77-88.

Bruses JL, Chauvet N, Rutishauser U (2001) Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. J Neurosci 21:504-512.

Bundey RA, Insel PA (2004) Discrete intracellular signaling domains of soluble adenylyl cyclase: camps of cAMP? Sci STKE 2004:pe19.

Butts DA, Kanold PO, Shatz CJ (2007) A burst-based "Hebbian" learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement. PLoS Biol 5:e61.

Calaghan S, Kozera L, White E (2008) Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling by caveolae in the adult cardiac myocyte. J Mol Cell Cardiol 45:88-92.

Caleo M, Menna E, Chierzi S, Cenni MC, Maffei L (2000) Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. Current biology : CB 10:1155-1161.

Cang J, Renteria RC, Kaneko M, Liu X, Copenhagen DR, Stryker MP (2005) Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. Neuron 48:797-809.

Cantrell AR, Tibbs VC, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA (1999) Dopaminergic modulation of voltage-gated Na+ current in rat hippocampal neurons requires anchoring of cAMP-dependent protein kinase. J Neurosci 19:RC21.

Carnegie GK, Scott JD (2003) A-kinase anchoring proteins and neuronal signaling mechanisms. Genes Dev 17:1557-1568.

Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB (2008) Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. British journal of pharmacology 153 Suppl 1:S310-324.

Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Sudhof TC, Malenka RC (2002) RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. Nature 415:327-330.

Chandrasekaran AR, Shah RD, Crair MC (2007) Developmental homeostasis of mouse retinocollicular synapses. J Neurosci 27:1746-1755.

Chandrasekaran AR, Plas DT, Gonzalez E, Crair MC (2005) Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. J Neurosci 25:6929-6938.

Chapman B (2000) Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus. Science 287:2479-2482.

Chen C, Regehr WG (2000) Developmental remodeling of the retinogeniculate synapse. Neuron 28:955-966.

Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G, Iyengar R (1997) Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A 94:14100-14104.

Cheung R, Erclik MS, Mitchell J (2005) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated protein kinase C phosphorylation of type VI adenylyl cyclase inhibits parathyroid hormone signal transduction in rat osteoblastic UMR 106-01 cells. J Cell Biochem 94:1017-1027.

Chevaleyre V, Heifets BD, Kaeser PS, Sudhof TC, Castillo PE (2007) Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. Neuron 54:801-812.

Choi EJ, Xia Z, Storm DR (1992) Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. Biochemistry 31:6492-6498.

Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, Joung J, Foo LC, Thompson A, Chen C, Smith SJ, Barres BA (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. Nature 504:394-400.

Cline HT, Constantine-Paton M (1989) NMDA receptor antagonists disrupt the retinotectal topographic map. Neuron 3:413-426.

Cline HT, Debski EA, Constantine-Paton M (1987) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. Proc Natl Acad Sci U S A 84:4342-4345.

Colonnese MT, Constantine-Paton M (2001) Chronic NMDA receptor blockade from birth increases the sprouting capacity of ipsilateral retinocollicular axons without disrupting their early segregation. J Neurosci 21:1557-1568.

Cook PM, Prusky G, Ramoa AS (1999) The role of spontaneous retinal activity before eye opening in the maturation of form and function in the retinogeniculate pathway of the ferret. Vis Neurosci 16:491-501.

Cooper DM, Karpen JW, Fagan KA, Mons NE (1998) Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 32:23-51.

Cork RJ, Namkung Y, Shin HS, Mize RR (2001) Development of the visual pathway is disrupted in mice with a targeted disruption of the calcium channel beta(3)-subunit gene. The Journal of Comparative Neurology 440:177-191.

Corredor RG, Trakhtenberg EF, Pita-Thomas W, Jin X, Hu Y, Goldberg JL (2012) Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth. J Neurosci 32:7734-7744.

Cramer KS, Angelucci A, Hahm JO, Bogdanov MB, Sur M (1996) A role for nitric oxide in the development of the ferret retinogeniculate projection. J Neurosci 16:7995-8004.

Cumbay MG, Watts VJ (2004) Novel regulatory properties of human type 9 adenylate cyclase. J Pharmacol Exp Ther 310:108-115.

Datwani A, McConnell MJ, Kanold PO, Micheva KD, Busse B, Shamloo M, Smith SJ, Shatz CJ (2009) Classical MHCI molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity. Neuron 64:463-470.

Demas J, Eglen SJ, Wong RO (2003) Developmental loss of synchronous spontaneous activity in the mouse retina is independent of visual experience. J Neurosci 23:2851-2860.

Demas J, Sagdullaev BT, Green E, Jaubert-Miazza L, McCall MA, Gregg RG, Wong RO, Guido W (2006) Failure to maintain eye-specific segregation in nob, a mutant with abnormally patterned retinal activity. Neuron 50:247-259.

Deng L, Kaeser PS, Xu W, Sudhof TC (2011) RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. Neuron 69:317-331.

Dhande OS, Hua EW, Guh E, Yeh J, Bhatt S, Zhang Y, Ruthazer ES, Feller MB, Crair MC (2011) Development of single retinofugal axon arbors in normal and beta2 knock-out mice. J Neurosci 31:3384-3399.

Dhande OS, Bhatt S, Anishchenko A, Elstrott J, Iwasato T, Swindell EC, Xu HP, Jamrich M, Itohara S, Feller MB, Crair MC (2012) Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development. The Journal of Comparative Neurology 520:1562-1583.

Dharmaratne N, Glendining KA, Young TR, Tran H, Sawatari A, Leamey CA (2012) Ten-m3 is required for the development of topography in the ipsilateral retinocollicular pathway. PLoS One 7:e43083.

Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS, Zaccolo M (2008) Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. Circ Res 103:836-844.

Drager UC, Hubel DH (1975) Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. J Neurophysiol 38:690-713.

Drager UC, Hubel DH (1976) Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. J Neurophysiol 39:91-101.

Duff G, Argaw A, Cecyre B, Cherif H, Tea N, Zabouri N, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF (2013) Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance. PLoS One 8:e70849.

Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Sudhof TC, Rizo J (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. EMBO J 18:4372-4382.

Dunn TA, Storm DR, Feller MB (2009) Calcium-dependent increases in protein kinase-A activity in mouse retinal ganglion cells are mediated by multiple adenylate cyclases. PLoS One 4:e7877.

Dunn TA, Wang CT, Colicos MA, Zaccolo M, DiPilato LM, Zhang J, Tsien RY, Feller MB (2006) Imaging of cAMP levels and protein kinase A activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades. J Neurosci 26:12807-12815.

Emptage NJ, Carew TJ (1993) Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons. Science 262:253-256.

Erisir A, Van Horn SC, Sherman SM (1997a) Relative numbers of cortical and brainstem inputs to the lateral geniculate nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A 94:1517-1520.

Erisir A, Van Horn SC, Bickford ME, Sherman SM (1997b) Immunocytochemistry and distribution of parabrachial terminals in the lateral geniculate nucleus of the cat: a comparison with corticogeniculate terminals. J Comp Neurol 377:535-549.

Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M, Gossen JA (2004) Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2993-2998.

Fagan KA, Mahey R, Cooper DM (1996) Functional co-localization of transfected Ca(2+)-stimulable adenylyl cyclases with capacitative Ca2+ entry sites. J Biol Chem 271:12438-12444.

Fagan KA, Graf RA, Tolman S, Schaack J, Cooper DM (2000) Regulation of a Ca2+-sensitive adenylyl cyclase in an excitable cell. Role of voltage-gated versus capacitative Ca2+ entry. J Biol Chem 275:40187-40194.

Fawcett JW, O'Leary DD, Cowan WM (1984) Activity and the control of ganglion cell death in the rat retina. Proc Natl Acad Sci U S A 81:5589-5593.

Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG (2000) Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. Neuron 25:563-574.

Feldheim DA, Vanderhaeghen P, Hansen MJ, Frisen J, Lu Q, Barbacid M, Flanagan JG (1998) Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. Neuron 21:1303-1313.

Feldheim DA, Nakamoto M, Osterfield M, Gale NW, DeChiara TM, Rohatgi R, Yancopoulos GD, Flanagan JG (2004) Loss-of-function analysis of EphA receptors in retinotectal mapping. J Neurosci 24:2542-2550.

Feller MB, Wellis DP, Stellwagen D, Werblin FS, Shatz CJ (1996) Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. Science 272:1182-1187.

Fertuzinhos S, Li M, Kawasawa YI, Ivic V, Franjic D, Singh D, Crair M, Sestan N (2014) Laminar and temporal expression dynamics of coding and noncoding RNAs in the mouse neocortex. Cell Rep 6:938-950.

Fraser ID, Cong M, Kim J, Rollins EN, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Scott JD (2000) Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. Curr Biol 10:409-412.

Frisen J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DD, Barbacid M (1998) Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. Neuron 20:235-243.

Furman M, Xu HP, Crair MC (2013) Competition driven by retinal waves promotes morphological and functional synaptic development of neurons in the superior colliculus. J Neurophysiol 110:1441-1454.

Galli L, Maffei L (1988) Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. Science 242:90-91.

Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca2+ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. Neuron 19:185-196.

Garcia-Frigola C, Carreres MI, Vegar C, Mason C, Herrera E (2008) Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. Development 135:1833-1841.

Godement P, Saillour P, Imbert M (1980) The ipsilateral optic pathway to the dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus in mice with prenatal or postnatal loss of one eye. J Comp Neurol 190:611-626.

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.

Grider MH, Park D, Spencer DM, Shine HD (2009) Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively. J Neurosci Res 87:3033-3042.

Grubb MS, Rossi FM, Changeux JP, Thompson ID (2003) Abnormal functional organization in the dorsal lateral geniculate nucleus of mice lacking the beta 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. Neuron 40:1161-1172.

Guirland C, Suzuki S, Kojima M, Lu B, Zheng JQ (2004) Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. Neuron 42:51-62.

Han J, Han L, Tiwari P, Wen Z, Zheng JQ (2007) Spatial targeting of type II protein kinase A to filopodia mediates the regulation of growth cone guidance by cAMP. J Cell Biol 176:101-111.

Haupt C, Langhoff J, Huber AB (2010) Adenylate Cyclase 1 modulates peripheral nerve branching patterns. Mol Cell Neurosci 45:439-448.

Haustead DJ, Lukehurst SS, Clutton GT, Bartlett CA, Dunlop SA, Arrese CA, Sherrard RM, Rodger J (2008) Functional topography and integration of the contralateral and ipsilateral retinocollicular projections of ephrin-A-/- mice. J Neurosci 28:7376-7386.

Hendricks T, Fyodorov D, Wegman L, Lelutiu N, Pehek E, Yamamoto B, Silver J, Weeber E, Sweatt J, Deneris E (2003) Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. Neuron 37:233-247.

Hepp R, Tricoire L, Hu E, Gervasi N, Paupardin-Tritsch D, Lambolez B, Vincent P (2007) Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. J Neurochem 102:1875-1886.

Herincs Z, Corset V, Cahuzac N, Furne C, Castellani V, Hueber AO, Mehlen P (2005) DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. J Cell Sci 118:1687-1692.

Hering H, Lin CC, Sheng M (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. J Neurosci 23:3262-3271.

Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA (2003) Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. Cell 114:545-557.

Higenell V, Han SM, Feldheim DA, Scalia F, Ruthazer ES (2012) Expression patterns of Ephs and ephrins throughout retinotectal development in Xenopus laevis. Dev Neurobiol 72:547-563.

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

Hofbauer A, Drager UC (1985) Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. J Comp Neurol 234:465-474.

Hooks BM, Chen C (2006) Distinct roles for spontaneous and visual activity in remodeling of the retinogeniculate synapse. Neuron 52:281-291.

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

Hruska M, Dalva MB (2012) Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. Mol Cell Neurosci 50:35-44.

Hu B, Nikolakopoulou AM, Cohen-Cory S (2005) BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. Development 132:4285-4298.

Hua JY, Smear MC, Baier H, Smith SJ (2005) Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. Nature 434:1022-1026.

Huang L, Pallas SL (2001) NMDA antagonists in the superior colliculus prevent developmental plasticity but not visual transmission or map compression. J Neurophysiol 86:1179-1194.

Huberman AD, Stellwagen D, Chapman B (2002) Decoupling eye-specific segregation from lamination in the lateral geniculate nucleus. J Neurosci 22:9419-9429.

Huberman AD, Feller MB, Chapman B (2008) Mechanisms Underlying Development of Visual Maps and Receptive Fields. Annu Rev Neurosci 31:479-509.

Huberman AD, Wang GY, Liets LC, Collins OA, Chapman B, Chalupa LM (2003) Eye-specific retinogeniculate segregation independent of normal neuronal activity. Science 300:994-998.

Inan M, Lu HC, Albright MJ, She WC, Crair MC (2006) Barrel map development relies on protein kinase A regulatory subunit II beta-mediated cAMP signaling. J Neurosci 26:4338-4349.

Insausti R, Blakemore C, Cowan WM (1984) Ganglion cell death during development of ipsilateral retino-collicular projection in golden hamster. Nature 308:362-365.

Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, Ishikawa Y (1995) Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. J Biol Chem 270:12481-12484.

Iwasato T, Inan M, Kanki H, Erzurumlu RS, Itohara S, Crair MC (2008) Cortical adenylyl cyclase 1 is required for thalamocortical synapse maturation and aspects of layer IV barrel development. J Neurosci 28:5931-5943.

Jacobs EC, Campagnoni C, Kampf K, Reyes SD, Kalra V, Handley V, Xie YY, Hong-Hu Y, Spreur V, Fisher RS, Campagnoni AT (2007) Visualization of corticofugal projections during early cortical development in a tau-GFP-transgenic mouse. Eur J Neurosci 25:17-30.

Jaiswal BS, Conti M (2003) Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. Proc Natl Acad Sci U S A 100:10676-10681.

Jaubert-Miazza L, Green E, Lo FS, Bui K, Mills J, Guido W (2005) Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. Vis Neurosci 22:661-676.

Jaworski J, Mioduszewska B, Sanchez-Capelo A, Figiel I, Habas A, Gozdz A, Proszynski T, Hetman M, Mallet J, Kaczmarek L (2003) Inducible cAMP early repressor, an endogenous antagonist of cAMP responsive element-binding protein, evokes neuronal apoptosis in vitro. J Neurosci 23:4519-4526.

Kaeser PS, Kwon HB, Chiu CQ, Deng L, Castillo PE, Sudhof TC (2008) RIM1alpha and RIM1beta are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions. J Neurosci 28:13435-13447.

Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Sudhof TC (2011) RIM proteins tether Ca2+ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. Cell 144:282-295.

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. Physiological reviews 89:309-380.

Kasai H, Petersen OH (1994) Spatial dynamics of second messengers: IP3 and cAMP as long-range and associative messengers. Trends Neurosci 17:95-101.

Kawabe J, Ebina T, Toya Y, Oka N, Schwencke C, Duzic E, Ishikawa Y (1996) Regulation of type V adenylyl cyclase by PMA-sensitive and -insensitive protein kinase C isoenzymes in intact cells. FEBS Lett 384:273-276.

Kelly MP, Adamowicz W, Bove S, Hartman AJ, Mariga A, Pathak G, Reinhart V, Romegialli A, Kleiman RJ (2014) Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. Cell Signal 26:383-397.

Kim M, Park AJ, Havekes R, Chay A, Guercio LA, Oliveira RF, Abel T, Blackwell KT (2011) Colocalization of protein kinase A with adenylyl cyclase enhances protein kinase A activity during induction of long-lasting long-term-potentiation. PLoS Comput Biol 7:e1002084.

Klussmann E, Maric K, Wiesner B, Beyermann M, Rosenthal W (1999) Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. J Biol Chem 274:4934-4938.

Koch SM, Dela Cruz CG, Hnasko TS, Edwards RH, Huberman AD, Ullian EM (2011) Pathway-specific genetic attenuation of glutamate release alters select features of competition-based visual circuit refinement. Neuron 71:235-242.

Koushika SP, Richmond JE, Hadwiger G, Weimer RM, Jorgensen EM, Nonet ML (2001) A post-docking role for active zone protein Rim. Nat Neurosci 4:997-1005.

Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. Science 244:1558-1564.

Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME (2006) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. Mol Vis 12:1160-1166.

Laurent A, Goaillard JM, Cases O, Lebrand C, Gaspar P, Ropert N (2002) Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. J Neurosci 22:886-900.

Leamey CA, Merlin S, Lattouf P, Sawatari A, Zhou X, Demel N, Glendining KA, Oohashi T, Sur M, Fassler R (2007) Ten_m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. PLoS Biol 5:e241.

Ledesma MD, Simons K, Dotti CG (1998) Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. Proc Natl Acad Sci U S A 95:3966-3971.

Lee H, Brott BK, Kirkby LA, Adelson JD, Cheng S, Feller MB, Datwani A, Shatz CJ (2014) Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db. Nature 509:195-200.

Lee R, Petros TJ, Mason CA (2008) Zic2 regulates retinal ganglion cell axon avoidance of ephrinB2 through inducing expression of the guidance receptor EphB1. J Neurosci 28:5910-5919.

Li H, Fertuzinhos S, Mohns E, Hnasko TS, Verhage M, Edwards R, Sestan N, Crair MC (2013) Laminar and columnar development of barrel cortex relies on thalamocortical neurotransmission. Neuron 79:970-986.

Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR (2003) Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. J Biol Chem 278:15922-15926.

Lopez-Medina A, Bueno-Lopez JL, Reblet C (1989) Postnatal development of the occipito-tectal pathway in the rat. Int J Dev Biol 33:277-286.

Lu HC, She WC, Plas DT, Neumann PE, Janz R, Crair MC (2003) Adenylyl cyclase I regulates AMPA receptor trafficking during mouse cortical 'barrel' map development. Nat Neurosci 6:939-947.

Lu HC, Butts DA, Kaeser PS, She WC, Janz R, Crair MC (2006) Role of efficient neurotransmitter release in barrel map development. J Neurosci 26:2692-2703.

Lugnier C (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. Pharmacol Ther 109:366-398.

Lyckman AW, Fan G, Rios M, Jaenisch R, Sur M (2005) Normal eye-specific patterning of retinal inputs to murine subcortical visual nuclei in the absence of brain-derived neurotrophic factor. Vis Neurosci 22:27-36.

Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE, Frost DO (1998) BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. J Neurosci 18:2097-2107.

Marquardt T, Gruss P (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. Trends Neurosci 25:32-38.

McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD (2003) Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. Neuron 40:1147-1160.

Meister M, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ (1991) Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. Science 252:939-943.

Menna E, Cenni MC, Naska S, Maffei L (2003) The anterogradely transported BDNF promotes retinal axon remodeling during eye specific segregation within the LGN. Mol Cell Neurosci 24:972-983.

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 (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. Neuron 21:681-693.

Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R (2012) PDEs create local domains of cAMP signaling. J Mol Cell Cardiol 52:323-329.

Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. Neuron 19:1225-1235.

Mittelstaedt T, Alvarez-Baron E, Schoch S (2010) RIM proteins and their role in synapse function. Biol Chem 391:599-606.

Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M (2004) Fluorescence resonance energy transfer-based

analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. Circ Res 95:67-75.
Montero VM, Scott GL (1981) Synaptic terminals in the dorsal lateral geniculate nucleus from neurons of the thalamic reticular nucleus: a light and electron microscope autoradiographic study. Neuroscience 6:2561-2577.
Mooney R, Penn AA, Gallego R, Shatz CJ (1996) Thalamic relay of spontaneous retinal activity prior to vision. Neuron 17:863-874.
Mooney RD, Shi MY, Rhoades RW (1994) Modulation of retinotectal transmission by presynaptic 5-HT1B receptors in the superior colliculus of the adult hamster. J Neurophysiol 72:3-13.
Muir-Robinson G, Hwang BJ, Feller MB (2002) Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers. J Neurosci 22:5259-5264.
Nait Taleb Ali H, Morel MP, Doulazmi M, Scotto-Lomassese S, Gaspar P, Dusart I, Bennis M (2014) Lack of adenylate cyclase 1 (AC1): consequences on corticospinal tract development and on locomotor recovery after spinal cord injury. Brain Res 1549:1-10.
Narboux-Neme N, Pavone LM, Avallone L, Zhuang X, Gaspar P (2008) Serotonin transporter transgenic (SERTcre) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). Neuropharmacology 55:994-1005.
Narboux-Neme N, Evrard A, Ferezou I, Erzurumlu RS, Kaeser PS, Laine J, Rossier J, Ropert N, Sudhof TC, Gaspar P (2012) Neurotransmitter release at the thalamocortical synapse instructs barrel formation but not axon patterning in the somatosensory cortex. J Neurosci 32:6183-6196.
Narboux-Neme N, Sagne C, Doly S, Diaz SL, Martin CB, Angenard G, Martres MP, Giros B, Hamon M, Lanfumey L, Gaspar P, Mongeau R (2011) Severe serotonin depletion after conditional deletion of the vesicular monoamine transporter 2 gene in serotonin neurons: neural and behavioral consequences. Neuropsychopharmacology 36:2538-2550.
Nicol X, Hong KP, Spitzer NC (2011) Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. Proc Natl Acad Sci U S A 108:13776-13781.
Nicol X, Muzerelle A, Bachy I, Ravary A, Gaspar P (2005) Spatiotemporal localization of the calcium-stimulated adenylate cyclases, AC1 and AC8, during mouse brain development. J Comp Neurol 486:281-294.
Nicol X, Muzerelle A, Rio JP, Metin C, Gaspar P (2006a) Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. J Neurosci 26:862-872.
Nicol X, Bennis M, Ishikawa Y, Chan GC, Reperant J, Storm DR, Gaspar P (2006b) Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections. Eur J Neurosci 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.
Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J (2010) Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. Science 327:1653-1657.
O'Leary DD, Fawcett JW, Cowan WM (1986) Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cell death. J Neurosci 6:3692-3705.
Oddi S, Spagnuolo P, Bari M, D'Agostino A, Maccarrone M (2007) Differential modulation of type 1 and type 2 cannabinoid receptors along the neuroimmune axis. Int Rev Neurobiol 82:327-337.
Ohara PT, Sefton AJ, Lieberman AR (1980) Mode of termination of afferents from the thalamic reticular nucleus in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat. Brain Res 197:503-506.
Pak W, Hindges R, Lim YS, Pfaff SL, O'Leary DD (2004) Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. Cell 119:567-578.
Penn AA, Riquelme PA, Feller MB, Shatz CJ (1998) Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. Science 279:2108-2112.

Petros TJ, Rebsam A, Mason CA (2008) Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. Annu Rev Neurosci 31:295-315.

Pfeiffenberger C, Yamada J, Feldheim DA (2006) Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. J Neurosci 26:12873-12884.

Pfeiffenberger C, Cutforth T, Woods G, Yamada J, Renteria RC, Copenhagen DR, Flanagan JG, Feldheim DA (2005) Ephrin-As and neural activity are required for eye-specific patterning during retinogeniculate mapping. Nat Neurosci 8:1022-1027.

Pham TA, Rubenstein JL, Silva AJ, Storm DR, Stryker MP (2001) The CRE/CREB pathway is transiently expressed in thalamic circuit development and contributes to refinement of retinogeniculate axons. Neuron 31:409-420.

Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. J Lipid Res 44:655-667.

Plas DT, Visel A, Gonzalez E, She WC, Crair MC (2004) Adenylate Cyclase 1 dependent refinement of retinotopic maps in the mouse. Vision Res 44:3357-3364.

Rashid T, Upton AL, Blentic A, Ciossek T, Knoll B, Thompson ID, Drescher U (2005) Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. Neuron 47:57-69.

Ravary A, Muzerelle A, Herve D, Pascoli V, Ba-Charvet KN, Girault JA, Welker E, Gaspar P (2003) Adenylate cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps. J Neurosci 23:2228-2238.

Raymond ID, Vila A, Huynh UC, Brecha NC (2008) Cyan fluorescent protein expression in ganglion and amacrine cells in a thy1-CFP transgenic mouse retina. Mol Vis 14:1559-1574.

Rebsam A, Petros TJ, Mason CA (2009) Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. J Neurosci 29:14855-14863.

Renteria RC, Constantine-Paton M (1999) Nitric oxide in the retinotectal system: a signal but not a retrograde messenger during map refinement and segregation. J Neurosci 19:7066-7076.

Rhoades RW, Bennett-Clarke CA, Lane RD, Leslie MJ, Mooney RD (1993) Increased serotoninergic innervation of the hamster's superior colliculus alters retinotectal projections. The Journal of Comparative Neurology 334:397-409.

Rodger J, Frost DO (2009) Effects of trkB knockout on topography and ocular segregation of uncrossed retinal projections. Experimental brain research 195:35-44.

Rossi FM, Pizzorusso T, Porciatti V, Marubio LM, Maffei L, Changeux JP (2001) Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. Proc Natl Acad Sci U S A 98:6453-6458.

Ruthazer ES, Akerman CJ, Cline HT (2003) Control of axon branch dynamics by correlated activity in vivo. Science 301:66-70.

Salichon N, Gaspar P, Upton AL, Picaud S, Hanoun N, Hamon M, De Maeyer E, Murphy DL, Mossner R, Lesch KP, Hen R, Seif I (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. J Neurosci 21:884-896.

Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B (2013) The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. Glia 61:24-36.

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron 74:691-705.

Schallmach E, Steiner D, Vogel Z (2006) Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implications for acute and chronic opioid exposure. Neuropharmacology 50:998-1005.

Schmitt AM, Shi J, Wolf AM, Lu CC, King LA, Zou Y (2006) Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. Nature 439:31-37.

Schoch S, Mittelstaedt T, Kaeser PS, Padgett D, Feldmann N, Chevaleyre V, Castillo PE, Hammer RE, Han W, Schmitz F, Lin W, Sudhof TC (2006) Redundant functions of RIM1alpha and RIM2alpha in Ca(2+)-triggered neurotransmitter release. EMBO J 25:5852-5863.

Shah RD, Crair MC (2008) Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retinal waves. J Neurosci 28:292-303.

Shatz CJ, Stryker MP (1988) Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. Science 242:87-89.

Simon DK, O'Leary DD (1992) Responses of retinal axons in vivo and in vitro to position-encoding molecules in the embryonic superior colliculus. Neuron 9:977-989.

Simon DK, Prusky GT, O'Leary DD, Constantine-Paton M (1992) N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. Proc Natl Acad Sci U S A 89:10593-10597.

Singer JH, Mirotznik RR, Feller MB (2001) Potentiation of L-type calcium channels reveals nonsynaptic mechanisms that correlate spontaneous activity in the developing mammalian retina. J Neurosci 21:8514-8522.

Skalhegg BS, Tasken K (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression,regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. Front Biosci 5:D678-693.

Smetters DK, Hahm J, Sur M (1994) An N-methyl-D-aspartate receptor antagonist does not prevent eye-specific segregation in the ferret retinogeniculate pathway. Brain research 658:168-178.

Speer CM, Sun C, Chapman B (2011) Activity-dependent disruption of intersublaminar spaces and ABAKAN expression does not impact functional on and off organization in the ferret retinogeniculate system. Neural Dev 6:7.

Sretavan DW, Shatz CJ, Stryker MP (1988) Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin. Nature 336:468-471.

Stellwagen D, Shatz CJ (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. Neuron 24:673-685.

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 (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. Cell 131:1164-1178.

Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. Annu Rev Neurosci 27:509-547.

Suetterlin P, Marler KM, Drescher U (2012) Axonal ephrinA/EphA interactions, and the emergence of order in topographic projections. Semin Cell Dev Biol 23:1-6.

Sun C, Warland DK, Ballesteros JM, van der List D, Chalupa LM (2008) Retinal waves in mice lacking the beta2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 105:13638-13643.

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:461-480.

Tabakoff B, Nelson E, Yoshimura M, Hellevuo K, Hoffman PL (2001) Phosphorylation cascades control the actions of ethanol on cell cAMP signalling. J Biomed Sci 8:44-51.

Tasken K, Aandahl EM (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. Physiol Rev 84:137-167.

Terman JR, Kolodkin AL (2004) Nervy links protein kinase a to plexin-mediated semaphorin repulsion. Science 303:1204-1207.

Thompson I, Holt C (1989) Effects of intraocular tetrodotoxin on the development of the retinocollicular pathway in the Syrian hamster. The Journal of Comparative Neurology 282:371-388.

Thong IG, Dreher B (1986) The development of the corticotectal pathway in the albino rat. Brain Res 390:227-238.

Torborg CL, Feller MB (2005) Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. Prog Neurobiol 76:213-235.

Triplett JW, Feldheim DA (2012) Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. Semin Cell Dev Biol 23:7-15.

Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. Trends Neurosci 25:412-417.

Upton AL, Salichon N, Lebrand C, Ravary A, Blakely R, Seif I, Gaspar P (1999) Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. J Neurosci 19:7007-7024.

Upton AL, Ravary A, Salichon N, Moessner R, Lesch KP, Hen R, Seif I, Gaspar P (2002) Lack of 5-HT(1B) receptor and of serotonin transporter have different effects on the segregation of retinal axons in the lateral geniculate nucleus compared to the superior colliculus. Neuroscience 111:597-610.

Vercelli A, Garbossa D, Biasiol S, Repici M, Jhaveri S (2000) NOS inhibition during postnatal development leads to increased ipsilateral retinocollicular and retinogeniculate projections in rats. Eur J Neurosci 12:473-490.

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Sudhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. Science 287:864-869.

Vincent P, Castro LR, Gervasi N, Guiot E, Brito M, Paupardin-Tritsch D (2012) PDE4 control on cAMP/PKA compartmentation revealed by biosensor imaging in neurons. Horm Metab Res 44:786-789.

Visel A, Alvarez-Bolado G, Thaller C, Eichele G (2006) Comprehensive analysis of the expression patterns of the adenylate cyclase gene family in the developing and adult mouse brain. J Comp Neurol 496:684-697.

Voyatzis S, Muzerelle A, Gaspar P, Nicol X (2012) Modeling activity and target-dependent developmental cell death of mouse retinal ganglion cells ex vivo. PLoS One 7:e31105.

Wang Y, Sudhof TC (2003) Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins. Genomics 81:126-137.

Wang Y, Sugita S, Sudhof TC (2000) The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. J Biol Chem 275:20033-20044.

Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. Nature 388:593-598.

Wayman GA, Impey S, Storm DR (1995) Ca2+ inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. J Biol Chem 270:21480-21486.

Wayman GA, Wei J, Wong S, Storm DR (1996) Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. Mol Cell Biol 16:6075-6082.

Welker E, Armstrong-James M, Bronchti G, Ourednik W, Gheorghita-Baechler F, Dubois R, Guernsey DL, Van der Loos H, Neumann PE (1996) Altered sensory processing in the somatosensory cortex of the mouse mutant barrelless. Science 271:1864-1867.

Westby GW, Keay KA, Redgrave P, Dean P, Bannister M (1990) Output pathways from the rat superior colliculus mediating approach and avoidance have different sensory properties. Exp Brain Res 81:626-638.

Whitaker CM, Cooper NG (2009) The novel distribution of phosphodiesterase-4 subtypes within the rat retina. Neuroscience 163:1277-1291.

Wiegert JS, Oertner TG (2013) Long-term depression triggers the selective elimination of weakly integrated synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 110:E4510-4519.

Williams SE, Grumet M, Colman DR, Henkemeyer M, Mason CA, Sakurai T (2006) A Role for Nr-CAM in the Patterning of Binocular Visual Pathways. Neuron 50:535-547.

Williams SE, Mann F, Erskine L, Sakurai T, Wei S, Rossi DJ, Gale NW, Holt CE, Mason CA, Henkemeyer M (2003) Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. Neuron 39:919-935.

Willoughby D, Cooper DM (2007) Organization and Ca2+ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. Physiol Rev 87:965-1010.

Wong RO, Meister M, Shatz CJ (1993) Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. Neuron 11:923-938.

Wong RO, Chernjavsky A, Smith SJ, Shatz CJ (1995) Early functional neural networks in the developing retina. Nature 374:716-718.

Wong W, Scott JD (2004) AKAP signalling complexes: focal points in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol 5:959-970.

Wu HH, Cork RJ, Mize RR (2000) Normal development of the ipsilateral retinocollicular pathway and its disruption in double endothelial and neuronal nitric oxide synthase gene knockout mice. The Journal of Comparative Neurology 426:651-665.

Wu KY, Zippin JH, Huron DR, Kamenetsky M, Hengst U, Buck J, Levin LR, Jaffrey SR (2006) Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. Nat Neurosci 9:1257-1264.

Xiao RP, Lakatta EG (1993) Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca2+, and Ca2+ current in single rat ventricular cells. Circ Res 73:286-300.

Xiao RP, Hohl C, Altschuld R, Jones L, Livingston B, Ziman B, Tantini B, Lakatta EG (1994) Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca2+ dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. J Biol Chem 269:19151-19156.

Xu HP, Furman M, Mineur YS, Chen H, King SL, Zenisek D, Zhou ZJ, Butts DA, Tian N, Picciotto MR, Crair MC (2011) An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development. Neuron 70:1115-1127.

Yakura T, Fukuda Y, Sawai H (2002) Effect of Bcl-2 overexpression on establishment of ipsilateral retinocollicular projection in mice. Neuroscience 110:667-673.

Yamadori T, Nakamura T, Takami K (1989) A study of the retinal ganglion cell which has an uncrossed bifurcating axon in the albino rat. Brain Res 488:143-148.

Young RW (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. The Journal of Comparative Neurology 229:362-373.

Zhang J, Ackman JB, Dhande OS, Crair MC (2011) Visualization and manipulation of neural activity in the developing vertebrate nervous system. Front Mol Neurosci 4:43.