

Université de Montréal

**Caractérisation de l'anatomie et de la fonction
du système endocannabinoïde dans la rétine adulte**

**par
Bruno Cécyre**

École d'optométrie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences de la vision
option sciences fondamentales et appliquées

Août 2013

© Bruno Cécyre, 2013

Ce mémoire intitulé :
Caractérisation de l'anatomie et de la fonction
du système endocannabinoïde dans la rétine adulte

Présenté par :
Bruno Cécyre

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Judith Renaud
Président-rapporteur

Dr. Jean-François Bouchard
Directeur de recherche

Dr. Christian Casanova
Codirecteur de recherche

Dre. Elvire Vaucher
Membre du jury

Résumé

Au cours des dernières années, un intérêt grandissant concernant les rôles physiologiques des endocannabinoïdes (eCBs) a été observé. Le système eCB est une cible attrayante pour la modulation du système immunitaire et de la douleur périphérique. Bien que le récepteur CB1 soit distribué dans le système nerveux, le récepteur CB2 est traditionnellement associé au système immunitaire. Ce dogme fait maintenant l'objet d'un débat depuis la découverte de l'expression du récepteur CB2 dans certains neurones. La rétine est un modèle important pour l'étude de processus neuronaux. La présence du récepteur CB1 y a été démontrée. Des études fonctionnelles rapportent que l'activation des récepteurs cannabinoïdes affecte le fonctionnement de plusieurs cellules rétinienne. À ce jour, aucune étude ne s'est intéressée au rôle global des récepteurs CB1 et CB2 dans la rétine.

Nous avons investigué les conséquences de l'élimination du récepteur CB1 (*cnr1^{-/-}*) ou du récepteur CB2 (*cnr2^{-/-}*) sur la fonction rétinienne mesurée par électrorétinographie. Nous avons également caractérisé la distribution du récepteur CB2 dans la rétine. Pour ce faire, nous avons comparé la spécificité de plusieurs anticorps dirigés contre le récepteur CB2. Seulement l'un des anticorps testés a montré une spécificité satisfaisante. Il a permis de détecter la présence du récepteur CB2 dans les cônes, les bâtonnets, les cellules horizontales, amacrines, bipolaires et ganglionnaires. Nos résultats d'électrorétinographie indiquent que seules les souris *cnr2^{-/-}* présentent une amplitude accrue de l'onde a des ERG, en conditions scotopiques. En conditions photopiques, l'amplitude de l'onde b des souris *cnr2^{-/-}* montre un schéma d'adaptation à la lumière différent des autres groupes. Aucun effet significatif n'a été observé chez les animaux *cnr1^{-/-}*.

Ces résultats permettent de conclure que les récepteurs CB1 et CB2 jouent des rôles différents dans le traitement visuel et que le récepteur CB2 semble être impliqué dans l'établissement des réponses rétinienne.

Mots-clés : Récepteurs aux cannabinoïdes, récepteur CB2, rétine, électrorétinographie, immunohistochimie, microscopie confocale, spécificité, anticorps, souris

Abstract

Cannabinoid receptors (CB1R and CB2R) are among the most abundant G-protein coupled receptors in the central nervous system. The endocannabinoid system is an attractive target for immune system modulation and peripheral pain management. While CB1R is distributed in the nervous system, CB2R has traditionally been associated to the immune system. This dogma is currently a subject of debate since the discovery of CB2R expression in neurons. The retina is an interesting model for neuronal processes' study. The activation of cannabinoid receptors modulates neurotransmitter release from photoreceptors and could also affect bipolar cell synaptic release. However, the impact of CB1r and CB2R on the retinal function as a whole is currently unknown.

In the present study, we investigated the function of cannabinoid receptors in the retina by recording electroretinographic responses (ERG) from mice lacking either CB1 or CB2 receptors (*cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-}, respectively). We also documented the precise distribution of CB2R by comparing the specificity of library of CB2R antibodies. One of the antibodies tested exhibited a valuable specificity and localized CB2R expression in cones and rods photoreceptors, horizontal cells, some amacrine cells, and bipolar and ganglion cells. In scotopic conditions, the amplitudes of the a-wave of the ERG were increased in *cnr2*^{-/-} mice, while they remained unchanged in *cnr1*^{-/-} mice. Under photopic conditions, b-wave amplitudes of *cnr2*^{-/-} mice required more light adaptation time to reach stable values. No effect was observed in *cnr1*^{-/-} mice.

These data indicate that CB2R is likely to be involved in shaping retinal responses to light and suggest that CB1 and CB2 receptors could have different roles in visual processing.

Keywords : Cannabinoid receptors, CB2 receptor, retina, electroretinography, immunohistochemistry, confocal microscopy, specificity, antibody, mouse

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et des abréviations	x
Remerciements	xii
1- Introduction	15
1.1- <i>La découverte des cannabinoïdes</i>	15
1.2- <i>Le système endocannabinoïde</i>	18
1.2.1- Les endocannabinoïdes majeurs	19
1.2.1.1- L'anandamide	20
1.2.1.1.1- Voies de synthèse de l'AEA	21
1.2.1.1.2 Voies de dégradation de l'anandamide	22
1.2.1.2- L'arachidonoylglycérol (2-AG)	22
1.2.1.2.1- Voies de synthèse du 2-AG	23
1.2.1.2.2- Voies de dégradation du 2-AG	23
1.2.1.3- Propriétés pharmacologiques de l'AEA et du 2-AG	24
1.2.2- Les récepteurs aux cannabinoïdes	26
1.2.2.1- Distribution des récepteurs aux cannabinoïdes	26
1.2.2.1.1- Distribution du récepteur CB1	26
1.2.2.1.2- Distribution du récepteur CB2	27
1.2.2.2- Voies de signalisation des récepteurs aux cannabinoïdes	27
1.2.2.2.1- Régulation de l'adénylate cyclase	28
1.2.2.2.2- Régulation des kinases activées par des agents mitogènes	29
1.2.2.2.3- Modulation des canaux ioniques	29
1.2.3- Les fonctions physiologiques du système eCB	30
1.2.4- Le système endocannabinoïde et le développement	31
1.2.4.1- Expression du système eCB au cours du développement	33
1.2.4.2- Effets des cannabinoïdes sur la neurotransmission	34

1.2.4.3- Migration neuronale _____	35
1.2.4.4- Guidage axonal et synaptogenèse _____	35
<i>1.3- Le système visuel _____</i>	<i>36</i>
1.3.1- La rétine _____	37
1.3.1.1- Anatomie de la rétine _____	37
1.3.1.1.1- Les photorécepteurs _____	39
1.3.1.1.2- Les cellules bipolaires _____	43
1.3.1.1.3- Les cellules ganglionnaires _____	45
1.3.1.1.4- Les cellules horizontales _____	45
1.3.1.1.5- Les cellules amacrines _____	45
1.3.1.2- La circuiterie de la rétine du rongeur _____	46
1.3.1.2.1- La transmission du signal des bâtonnets _____	47
1.3.1.2.2- La transmission du signal des cônes _____	50
1.3.1.2.3- La transmission du signal vers le cortex visuel _____	50
1.3.2- Évaluation de la fonction rétinienne _____	50
1.3.2.1- Les ondes obtenues par électrorétinographie _____	51
1.3.2.2- La spécification des ondes et leur provenance _____	52
1.3.2.2.1- L'onde a _____	52
1.3.2.2.2- L'onde b _____	53
1.3.2.2.3- Les potentiels oscillatoires _____	53
<i>1.4- Les cannabinoïdes et le système visuel _____</i>	<i>54</i>
1.4.1- Les cannabinoïdes et les tissus oculaires _____	54
1.4.2- Les cannabinoïdes et la vision _____	55
1.4.3- Les cannabinoïdes et les aires visuelles supérieures _____	55
1.4.4- Les cannabinoïdes et la rétine _____	56
1.4.4.1- Les eCBs et leurs enzymes de synthèse et de dégradation _____	56
1.4.4.2- Les récepteurs aux cannabinoïdes _____	57
1.4.4.3- La fonction des cannabinoïdes dans la rétine _____	58
<i>1.5- La validation des anticorps _____</i>	<i>60</i>
1.5.1- La synthèse d'un anticorps _____	61
1.5.1.1- La production des anticorps polyclonaux _____	61
1.5.1.2- Les anticorps monoclonaux _____	62
1.5.2- La spécificité d'un anticorps _____	63
1.5.2.1- L'utilisation des peptides d'immunisation _____	63
1.5.2.2- Les tissus « knockouts » _____	64

2- Objectifs de recherche	66
3- Article 1	68
3.1- Abstract	69
3.2- Introduction	70
3.3- Methods	72
<i>Animals and tissue preparation</i>	72
<i>Western blot</i>	72
<i>Immunohistochemistry</i>	73
<i>Antigen retrieval</i>	73
<i>Blocking peptides</i>	74
3.3- Results	74
<i>Western blot</i>	74
<i>Immunohistochemistry</i>	75
<i>Lot-to-lot variability</i>	76
3.5- Discussion	76
<i>Western blot</i>	77
<i>Immunohistochemistry</i>	78
<i>Lot-to-lot variability</i>	80
<i>Commercial GPCR antibodies' specificity</i>	81
<i>Conclusion</i>	81
3.6- Acknowledgements	83
3.7- Figures	84
4- Article 2	89
4.1- Abstract	90
4.2- Introduction	91
4.3- Methods	92
<i>Animals</i>	92
<i>Tissue Preparation</i>	93
<i>Western blot</i>	93
<i>Immunohistochemistry</i>	94
<i>Confocal microscopy</i>	94
<i>Electroretinography</i>	95

<i>Analysis</i>	95
<i>Quantification of retinal layer thickness</i>	96
4.4- <i>Results</i>	96
<i>Localization of CB2R in the mice retina</i>	96
<i>The dark-adapted retinal function</i>	97
<i>The light adapted retinal function</i>	98
<i>Retinal structure in <i>cnr1</i>^{-/-} and <i>cnr2</i>^{-/-} mice</i>	98
4.5- <i>Discussion</i>	99
<i>The CB2R is widely distributed in the mice retina</i>	99
<i>The CB1R removal does not affect the ERGs</i>	100
<i>The CB2R removal effects on the ERGs</i>	101
4.6- <i>Acknowledgements</i>	103
4.7- <i>Figures</i>	104
5- Discussion	118
5.1- <i>Résumé des résultats</i>	118
5.1.1- <i>Aspects de la validation des anticorps CB2</i>	118
5.1.2- <i>Aspects fonctionnels</i>	118
5.2- <i>Aspects méthodologiques</i>	119
5.2.1- <i>Justification du modèle</i>	119
5.3- <i>La spécificité des anticorps ciblant le récepteur CB2</i>	119
5.3.1- <i>Pourquoi la validation des anticorps est-elle essentielle?</i>	120
5.3.2- <i>L'utilisation des peptides d'immunisation comme contrôles</i>	120
5.3.3- <i>Les souris <i>cnr2</i>^{-/-}</i>	121
5.3.4- <i>Les études ayant investigué la spécificité des anticorps CB2</i>	121
5.3.5- <i>Applications et limites de l'étude</i>	123
5.4- <i>Rôles du système eCB dans la rétine adulte</i>	124
5.4.1- <i>La distribution du récepteur CB2</i>	124
5.4.2- <i>La fonction du récepteur CB1</i>	127
5.4.3- <i>La fonction du récepteur CB2</i>	128
5.5- <i>Synthèse globale</i>	129
5.6- <i>Futures directions</i>	130
5.6.1- <i>Les cannabinoïdes et la vision</i>	130

5.6.2- Le système eCB et le développement	131
5.6.3- La variabilité des réponses physiologiques inter-espèces	132
6- Conclusion	133
Bibliographie	i

Liste des tableaux

Table 3.1 Characteristics of antibodies tested	88
Table 4.1 Antibodies used in this study.....	116
Table 4.2 Amplitudes of Mixed V_{\max} as well as the light intensity evoking it.....	117

Liste des figures

Figure 1.1 Métabolisme des eCBs	25
Figure 1.2 Expression temporelle de composantes du système eCB au cours du développement du SNC	32
Figure 1.3 Structure de la rétine	38
Figure 1.4 Différences structurelles entre les cônes et les bâtonnets	40
Figure 1.5 L'étendue des valeurs de luminance percevables par le système visuel	43
Figure 1.6 Types de cellules bipolaires dans la rétine de souris	44
Figure 1.7 Structure des sous-compartiments de la rétine	48
Figure 1.8 La transmission du signal des bâtonnets dans la rétine	49
Figure 1.9 Les ondes caractéristiques de l'ERG	52
Figure 3.1 Western blots using different CB2R antibodies.....	84
Figure 3.2 Immunohistochemical labeling obtained from CB2R antibodies on mouse retinal sections	86
Figure 3.3 Lot to lot variability with CB2R antibodies.	87
Figure 4.1 Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB2R in the mouse retina.....	105
Figure 4.2 Example of scotopic ERGs in the different genotypes.....	106
Figure 4.3 Scotopic a- and b-wave as a function of flash luminance.....	108
Figure 4.4 Example of scotopic oscillatory potentials in the different groups	110
Figure 4.5 The amplitudes of photopic ERG b-wave by time.....	111
Figure 4.6 Deletion of <i>cnr1</i> or <i>cnr2</i> does not change retina morphology	112
Figure 4.7 Absence of CB1R or CB2R does not produce any morphological changes in retinal cells	114
Figure 4.8 Total retinal concentrations of proteins from the eCB system.....	115
Figure 5.1 Distribution schématisée du récepteur CB2 dans la rétine de souris.....	126

Liste des sigles et des abréviations

Δ^9 -THC : Δ^9 -tétrahydrocannabinol

2-AG : 2-arachidonoylglycérol

Abhd4 : α , β -hydrolase 4

Abhd6 : α , β -hydrolase 6

Abhd12 : α , β -hydrolase 12

AC : Adénylate cyclase

AEA : Arachidonoyléthanolamide

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

Ca²⁺ : Calcium

CGL : Corps genouillé latéral

CS : Colliculus supérieur

DAG : Diacylglycérol

DAGL : Diacylglycérol lipase

eCB : Endocannabinoïde

ERG : Électrorétinogramme

FAAH : Fatty acid amide hydrolase

GCL : Couche des cellules ganglionnaires (« ganglion cell layer »)

GIRK : Courant potassique rectifiant activé par les protéines G (« G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel »)

GPCR : Récepteur couplé à une protéine G (« G protein-coupled receptor »)

INL : Couche nucléaire interne (« inner nuclear layer »)

IPL : Couche plexiforme interne (« inner plexiform layer »)

LC/MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (« liquid chromatography tandem mass spectrometry »)

MGL : Monoacylglycérol lipase

MAPK : Protéine kinase activée par des agents mitogènes (« Mitogen activated protein kinase »)

NAPE : N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine

NAPE-PLD : N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine-phospholipase D

NAT : N-acyltransférase

ONL : Couche nucléaire externe (« outer nuclear layer »)

OP : Potentiel oscillatoire (« oscillatory potential »)

OPL : Couche plexiforme externe (« outer plexiform layer »)

qRT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel quantitative (« quantitative real-time polymerase chain reaction »)

RB : Cellule bipolaire liée aux bâtonnets (« rod bipolar cell »)

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (« real-time polymerase chain reaction »)

siRNA : Petit ARN interférent (« short interfering RNA »)

SNC : Système nerveux central

V1 : Aire visuelle primaire

Remerciements

Ce travail n'aurait pu être effectué sans le soutien et l'aide de plusieurs personnes. Je voudrais particulièrement remercier mes directeurs de recherche, Jean-François Bouchard et Christian Casanova. D'abord Jean-François, je voudrais te remercier de m'avoir accepté comme stagiaire à l'été 2009. À ce moment-là, je n'aurais jamais cru faire des études supérieures. Aujourd'hui, je ne me vois pas être dans un autre laboratoire de recherche. Merci d'être toujours aussi présent et prêt à rendre service, de faire confiance et d'être toujours aussi enthousiaste. Merci d'avoir su me déléguer certaines tâches du laboratoire et de m'avoir laissé présenter mes résultats en congrès un peu partout. J'espère pouvoir poursuivre les enseignements que Christian et toi m'avez si bien transmis et avoir l'honneur, tout comme vous, de gagner un jour le prestigieux prix Bacchus.

Christian, j'aimerais vous remercier d'avoir accepté d'être mon codirecteur. Je vous suis très reconnaissant de la confiance dont vous m'avez témoignée, que ce soit pour la supervision de stagiaires, la révision d'un article, pour gérer le microscope confocal ou encore pour magasiner votre prochaine voiture. Merci de votre soutien et de votre écoute et ce, malgré votre horaire plus que chargé.

Un merci tout particulier à Sébastien Thomas qui en plus d'être un assistant de recherche de grand talent, est aussi un extraordinaire humaniste. Toujours désireux de créer un esprit de corps entre toute l'équipe, tu as mis sur pied le FCECE (Fonds Casanovéen de l'Épanouissement du Cerveau Émotionnel). Voulant créer une chimie entre les membres de notre équipe, tu t'es amusé à taquiner certaines personnes, surtout moi-même, en leur faisant des tours avec les objets de leur bureau. Ta stratégie a visiblement porté fruit, puisque ton bureau fut aussitôt pris d'assaut par un mystérieux assaillant. Gageons que tu t'en rappelleras longtemps! Enfin, j'aimerais rendre hommage à ta très grande polyvalence et à ton intérêt marqué pour la recherche. Tes grandes connaissances dans plusieurs domaines de recherche m'ont énormément aidé.

J'aimerais également remercier Sophie, Florence et Geneviève. Vous avez toutes trois pris le temps de m'intégrer à la vie du laboratoire et m'avez permis d'effectuer mes recherches dans des conditions remarquables. Merci Sophie pour ta grande patience et ta grande générosité. Merci Florence pour m'avoir initié à plusieurs techniques et surtout, pour ton grand cœur. Merci Geneviève pour savoir comment tout faire, pour ton dévouement envers le laboratoire et pour la bière du vendredi où on attendait que ton Raoul s'en vienne sur sa péniche.

Toutes ces années au laboratoire n'auraient jamais été aussi marquantes si je n'avais pas été aussi bien entouré. J'aimerais remercier sincèrement Anteneh Argaw pour m'avoir aussi bien accueilli lors de mon premier stage, à l'été 2009. Ton encadrement et la confiance que tu m'as accordée m'ont fait adorer ce domaine de recherche et ce laboratoire. C'est en partie grâce à toi si j'ai choisi de poursuivre mes études à la maîtrise.

Je remercie Nawal Zabouri pour m'avoir enseigné les rudiments de plusieurs techniques qui m'ont été utiles lors de ma maîtrise. Merci à Hosni, Joseph, Pasha et Alex pour avoir été des coéquipiers de laboratoire très agréables et sur qui j'ai pu compter. Merci à tous les étudiants ayant séjourné au laboratoire de Christian, en espérant ne pas en oublier : Laurent, Marianne, Reza, (le bon) Bruno, Jimmy, Azadeh, Alexandre et Olivier. Un merci spécial à Laurent pour être aussi divertissant et pour tes blagues qui sont encore... très bizarres. Un autre merci spécial à Marianne pour toutes les discussions de bureau.

Je salue également les étudiantes dont j'ai eu la chance d'être le superviseur de stage. Merci Marjorie, ta bonne humeur, ton organisation et ton travail exemplaire m'ont rendu de précieux services. Merci Liza pour ton dévouement hors du commun. Ton aide m'a été indispensable.

Je remercie l'équipe du secteur académique pour l'excellent soutien dont j'ai bénéficié. Merci également à Denis Latendresse et Micheline Gloin pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Je tiens à remercier spécialement Fethy Mili pour m'avoir rendu de nombreux services au cours de mes études ainsi que pour les nombreux transports dans le Fethybus.

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance envers ma famille pour m'avoir encouragé dans mes études. Plus particulièrement, je remercie mes parents Lucie et Gaétan pour les fameux lunches qui faisaient la convoitise de bien du monde au laboratoire. Sans votre soutien, mes études auraient été beaucoup plus difficiles qu'elles ne l'ont été et certainement pas aussi agréables. Un merci spécial à mon chien Rouky, grâce à qui j'ai toujours plein d'histoires cocasses à raconter.

J'aimerais remercier les organismes subventionnaires qui ont été assez généreux pour financer mes recherches. Merci au réseau FRQS de recherche en santé de la vision, au Groupe de recherche en sciences de la vision et à l'école d'optométrie de l'Université de Montréal.

Un dernier merci à Maude. Ton support inconditionnel et ta grande compréhension m'ont aidé à venir à bout de mes études de maîtrise. Tu es une personne formidable et je suis fier et choyé que tu fasses partie de ma vie!

1- Introduction

1.1- La découverte des cannabinoïdes

La compétition prédateur-proie est l'une des caractéristiques importantes de l'évolution. Par exemple, la plupart des plantes ont développé des gammes de molécules chimiques afin d'empêcher leur consommation. Ces composés chimiques perturbent généralement les voies de signalisations endogènes du système nerveux. Ces défenses naturelles ont servi la médecine traditionnelle durant des milliers d'années et demeurent encore aujourd'hui des atouts majeurs pour la découverte de nouvelles thérapies (Li & Vederas, 2009).

Un exemple probant est le cannabis, aussi connu sous le nom latin de *cannabis sativa*, qui est une des plus vieilles plantes que l'homme ait cultivées. L'usage de cette plante remonte à plus de 4000 ans avant notre ère. Les Chinois se servaient notamment des fibres de cannabis pour confectionner des cordes, du tissu et même du papier (Zuardi, 2006). Elle est inscrite dans le « pen-ts'ao », la plus vieille pharmacopée du monde, d'origine chinoise datant du 27^e siècle av. J.-C. (Touw, 1981) et dans le Papyrus Eberts, un traité médical écrit en Égypte au 16^e siècle av. J.-C. (Hanus, 2009). Le cannabis était fortement utilisé en Chine comme en Inde pour soigner une grande étendue de problèmes médicaux tels que la douleur rhumatoïde, la malaria, les infections, les constipations intestinales et les inflammations (Zuardi, 2006). Il était également connu que lorsque consommé avec excès, le cannabis provoquait des apparitions « diaboliques » (Mechoulam, 1986) et qu'à long terme il « permettait aux gens de communiquer avec les esprits ».

Le cannabis fut introduit en Europe par les soldats de Napoléon Bonaparte de retour d'Égypte et par des médecins britanniques ayant séjourné en Inde. Le chanvre industriel, contenant des quantités négligeables de composés psychoactifs, était couramment utilisé auparavant, alors que sa forme psychotrope était jusqu'alors inconnue. Les effets psychologiques du cannabis ont été décrits en Europe principalement par les textes des membres du « Club des Hachichins », particulièrement Charles Baudelaire, Honoré de Balzac, Alexandre Dumas, Gustave Flaubert, Théophile Gautier et Jacques-Joseph Moreau (Mechoulam, 1986).

La première évaluation des effets thérapeutiques du cannabis a été réalisée par Sir William B. O'Shaughnessy, un médecin irlandais ayant travaillé à Calcutta (Di Marzo, 2006). Le cannabis a été introduit dans la médecine occidentale au 19^e siècle. Les effets bénéfiques du cannabis sur une variété de « maladies douloureuses » ont été rapportés par le médecin J. Russell Reynolds (Reynolds, 1890). L'usage médicinal du cannabis a atteint son apogée à la fin du 19^e siècle et s'est répandu à toute l'Europe et en Amérique du Nord. Plusieurs grandes compagnies pharmaceutiques commercialisaient des extraits de cannabis comme agents sédatifs, hypnotiques, analgésiques, ou pour stimuler l'appétit (Zuardi, 2006).

Au début du 20^e siècle, l'utilisation médicale du cannabis a significativement diminué en Occident. L'un des facteurs attribuables à cette baisse est la difficulté d'obtenir des effets reproductibles en raison de la grande disparité de l'efficacité selon l'espèce de cannabis utilisée. À cette époque, l'ingrédient actif du cannabis n'était toujours pas connu et l'efficacité de la préparation de cannabis dépendait de plusieurs facteurs dont l'origine, l'âge et le mode de préparation de l'extrait.

Étonnement, la recherche sur le cannabis avançait très lentement. Contrairement à la morphine et la cocaïne qui ont été isolées et largement étudiées au cours du 19^e siècle, les composants psychoactifs du cannabis n'ont été isolés que dans les années 1960. Au début du 20^e siècle, l'utilisation thérapeutique et récréative du cannabis a dramatiquement diminué. De surcroît, de sévères lois anti-cannabis ont rendu la recherche extrêmement ardue, particulièrement dans les institutions académiques. Le cannabis fut d'ailleurs retiré de la pharmacopée américaine en 1941 (Mikuriya, 1969). La consommation à des fins récréatives a connu une hausse fulgurante dans les années 1960 et ainsi fut l'intérêt de la recherche envers le cannabis.

Durant environ un siècle, plusieurs tentatives ont été réalisées afin d'isoler les constituants actifs de la marijuana et d'élucider leurs structures (Mechoulam & Hanus, 2000). Ces tentatives se sont soldées par des échecs successifs en grande partie parce que le cannabis renferme plus de 60 constituants possédant des structures et des propriétés physiques semblables, ce qui rend leur séparation extrêmement difficile. L'avènement de méthodes de séparation modernes a permis

d'isoler du haschich le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), le principal ingrédient actif du cannabis, par Yechiel Gaoni et Raphael Mechoulam en 1964 (Gaoni & Mechoulam, 1964). Peu après, le Δ^9 -THC a été synthétisé (Mechoulam, Braun, & Gaoni, 1967) et le même groupe de recherche a démontré que le Δ^9 -THC est responsable des effets psychotropes des préparations de cannabis administrées chez des singes rhésus (Mechoulam, Shani, Edery, & Grunfeld, 1970). Ces découvertes-clés ont certainement contribué à raviver l'intérêt de la communauté scientifique pour cette plante. Le nombre de publications sur le cannabis a littéralement explosé dans les années qui suivirent l'identification du Δ^9 -THC. Grâce à la découverte du Δ^9 -THC, les chercheurs étaient désormais en mesure d'obtenir des résultats reproductibles qualitativement et quantitativement, autant pour les études pharmacologiques, psychologiques ou comportementales.

Les premières données montrant que les cannabinoïdes devaient exercer leurs actions sur des récepteurs ont été publiées par Allyn Howlett. Elles démontrent que les cannabinoïdes inhibent la formation de l'adénylate cyclase (Howlett, Qualy, & Khachatryan, 1986). Le même groupe de recherche a ensuite démontré l'existence de sites de liaison aux cannabinoïdes dans le cerveau (Devane, Dysarz, Johnson, Melvin, & Howlett, 1988). La distribution de ces sites de liaison était cohérente avec les propriétés psychotropes des cannabinoïdes (Herkenham et al., 1990). La confirmation de l'existence des récepteurs aux cannabinoïdes vint de l'équipe de Tom Bonner, qui isola le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) à partir du cerveau de rat (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990). En 1993, l'équipe de Sean Munro parvint à isoler le récepteur aux cannabinoïdes de type 2 (CB2) à partir de cellules myélocytaires HL60 (Munro, Thomas, & Abu-Shaar, 1993).

Suite à l'identification et au clonage des récepteurs aux cannabinoïdes, un regain d'intérêt a été observé chez les scientifiques. En effet, cette découverte suggérait que des molécules endogènes, pouvant stimuler ou inhiber les récepteurs aux cannabinoïdes, étaient probablement présentes dans le corps des mammifères. La quête d'un ligand cannabinoïde endogène venait de commencer. En raison de la nature lipophile des phytocannabinoïdes, l'équipe de Raphael Mechoulam présuma

qu'une molécule cannabinoïde endogène serait également lipidique. C'est pourquoi leurs travaux portèrent sur les fractions lipidiques du cerveau de porc. Ils identifièrent le composé N-arachidonoyléthanolamide, qu'ils rebaptisèrent anandamide en référence au mot sanskrit « ananda » qui signifie « bonheur intérieur » et à « amide » en référence à sa structure chimique (Devane et al., 1992).

Puisque les propriétés pharmacologiques de l'anandamide ne correspondaient pas parfaitement aux effets comportementaux du Δ^9 -THC, l'existence d'un second ligand cannabinoïde endogène fut prédite. L'identification d'un second ligand nommé 2-arachidonoylglycérol (2-AG) fut accomplie en 1995 (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995).

Afin de rendre hommage à l'inspiration que les endorphines ont joué sur la découverte de ces nouveaux ligands endogènes cannabinoïdes, Vincenzo Di Marzo proposa le terme endocannabinoïdes (eCBs) pour désigner ces composés (Di Marzo & Fontana, 1995). De ce mot est né le terme « système endocannabinoïde » pour identifier l'ensemble des récepteurs cannabinoïdes, de leurs ligands endogènes et des enzymes régulant les concentrations de ces ligands.

Les pages qui suivent vont traiter du système endocannabinoïde (eCB) et des rôles fonctionnels qui lui sont attribués, du fonctionnement de la rétine, des principes de l'électrorétinographie ainsi que des méthodes de validations des anticorps. Dans un premier temps, nous allons décrire le système eCB et ses fonctions dans le système nerveux central (SNC) en général, puis plus précisément dans le système visuel. En second lieu, nous présenterons le modèle d'intérêt qui a été utilisé, soit la rétine avant de décrire le rôle et la distribution du système eCB dans cette structure.

1.2- Le système endocannabinoïde

Les cannabinoïdes agissent sur l'organisme par l'intermédiaire du système eCB. Ce système joue un rôle important dans la régulation de divers processus physiologiques fondamentaux comme l'inflammation, la cognition, le contrôle de l'alimentation et la nociception (Pertwee et al., 2010). Le système eCB est composé

de récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes, de ligands endogènes ainsi que des enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation de ces ligands.

Les récepteurs aux cannabinoïdes sont abondamment exprimés et ce, dans plusieurs régions du corps. Notamment, le récepteur CB1 est fortement exprimé dans le SNC alors que le récepteur CB2 est traditionnellement associé au système nerveux périphérique et le système immunitaire (Piomelli, 2003).

Le système eCB inclut également les ligands endogènes, aussi appelés eCBs. Les principaux eCBs caractérisés, l'anandamide et le 2-AG possèdent tous deux une structure lipidique, ont une demi-vie très courte et sont catabolisés par des enzymes. Ces ligands sont produits massivement à la suite d'une augmentation de calcium intracellulaire dans différents tissus, notamment dans le SNC, où ils vont moduler la libération de neurotransmetteurs (Di Marzo, 2009).

Les ligands exogènes naturels sont tous les composés produits par la plante *cannabis sativa*. On en dénombre plus de 60, dont le plus abondant et le plus actif est le Δ^9 -THC. D'autres ligands, moins nombreux, sont représentés par le Δ^8 -THC ainsi que le cannabinoïde et le cannabidiol (Pertwee et al., 2010).

1.2.1- Les endocannabinoïdes majeurs

Au cours des dernières décennies, les eCBs ont beaucoup intrigué les chercheurs par rapport à leur rôle dans la neurotransmission aussi bien chez l'adulte que durant le développement. Les principaux eCBs isolés à partir de tissus des systèmes nerveux central et périphérique sont l'anandamide (Devane et al., 1992) et le 2-AG (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Ces composés lipidiques sont les deux plus importantes molécules endogènes connues capables de se lier aux récepteurs aux cannabinoïdes et de mimer les effets pharmacologiques et comportementaux du Δ^9 -THC.

Les eCBs sont différents des neurotransmetteurs classiques. Ces derniers sont normalement synthétisés dans le cytoplasme des neurones puis stockés dans des vésicules synaptiques, à partir desquelles ils sont excrétés par exocytose dans la fente synaptique après une excitation de la terminaison nerveuse par des potentiels

d'action. Les eCBs, quant à eux, sont produits sur demande à partir de la membrane plasmique (Luchicchi & Pistis, 2012). Ils peuvent donc être libérés par la cellule immédiatement après leur production et ne sont donc pas stockés (Piomelli, Giuffrida, Calignano, & Rodriguez de Fonseca, 2000).

Les eCBs sont lipophiles et donc très peu solubles dans le milieu extracellulaire hydrophile (Devane et al., 1992). Conséquemment, leurs actions dans le SNC sont locales et dépendent directement du positionnement réciproque de leur site de production et de leurs récepteurs (Di Marzo, 2008).

Une fois relâchés, les eCBs voyagent de manière rétrograde vers la fente synaptique. Ils se lient alors aux récepteurs aux cannabinoïdes présents sur les terminaux pré-synaptiques (Freund, Katona, & Piomelli, 2003). Une fois leur action sur les récepteurs aux cannabinoïdes terminée, les eCBs sont récupérés par un processus rapide de transport membranaire qui n'est toujours pas pleinement caractérisé (Beltramo et al., 1997; Fu et al., 2012). Une fois à l'intérieur de la cellule, les eCBs sont dégradés par les enzymes qui leur sont spécifiques (Cravatt et al., 1996; Dinh et al., 2002).

Le processus de synthèse des eCBs peut être initié par deux mécanismes : la dépolarisation de la cellule suivi d'une entrée de calcium ou l'activation de récepteurs métabotropiques liés à $G_{q/11}$ tels que les récepteurs muscariniques ou les récepteurs métabotropiques glutamatergiques du groupe 1.

Il existe d'autres ligands qui pourraient être considérés comme des eCBs, dont le 2-arachidonoylglycéryl éther (noladin éther), le O-arachidonoyléthanolamine (virodhamine), le N-dihomo- γ -linolenoyléthanolamide, le N-docasatetraenoyl éthanolamide, le N-arachidonoyl dopamine (NADA) et le N-oleoyl dopamine (OLDA) (Pertwee, 2005). Dans ce mémoire, nous nous limiterons à ceux qui ont été caractérisés soit l'anandamide et le 2-AG.

1.2.1.1- L'anandamide

L'anandamide (AEA) est largement distribuée dans le cerveau et les tissus périphériques (Felder et al., 1993). Les niveaux d'AEA varient d'un facteur de 4 à 6 entre les différentes régions du cerveau. Les niveaux les plus élevés sont observés

dans le striatum et dans le tronc cérébral tandis que les concentrations les plus faibles sont présentes dans le cervelet et le cortex (voir Basavarajappa (2007) pour une revue). L'AEA est retrouvée dans des régions du cerveau de rat et d'humain qui sont riches en récepteurs CB1, tels que l'hippocampe et le striatum. Les niveaux d'AEA dans le cerveau sont équivalents à ceux de neurotransmetteurs tels que la dopamine et la sérotonine, mais au moins 10 fois inférieurs que les niveaux de GABA et de glutamate. L'AEA est également présente dans certains tissus périphériques comme la rate, où sont fortement exprimés les récepteurs CB2 (Felder et al., 1996).

L'AEA et le 2-AG ont des effets *in vivo* distincts même si tous deux agissent sur les mêmes récepteurs (Long et al., 2009). L'inhibition du métabolisme de l'AEA diminue la douleur, l'inflammation, la dépression et l'anxiété (revue par Alger et Kim (2011)). Les effets physiologiques de l'AEA et du 2-AG seront décrits plus en détails dans une section subséquente de cette introduction.

1.2.1.1.1- Voies de synthèse de l'AEA

La première hypothèse du mécanisme de synthèse de l'AEA a été rapportée par Di Marzo et al. (1994). Les auteurs de cette étude ont démontré que les neurones exposés à une forte concentration de calcium ou à une dépolarisation synthétisaient et sécrétaient de l'AEA. La synthèse de l'AEA commence donc en réponse à une élévation de calcium intracellulaire (Köfalvi, 2008). Le précurseur immédiat de l'AEA est le N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine (NAPE), qui est synthétisé à partir de phospholipides par l'enzyme N-acyltransférase (NAT). Ensuite, le NAPE est converti en anandamide par l'action de l'enzyme N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine-phospholipase D (NAPE-PLD) (Pertwee, 2005). La réaction catalysée par le NAT est l'étape limitante dans la synthèse de l'AEA. Les voies de synthèse de l'AEA sont présentées à la Figure 1.

Bien que l'activité de l'enzyme NAPE-PLD soit élevée dans le cerveau et semble influencée par le calcium, le développement d'une souris transgénique chez qui le gène codant pour cette enzyme a été inactivé ne démontre que très peu de changements dans la concentration en AEA (Leung, Saghatelian, Simon, & Cravatt, 2006). Plusieurs études soutiennent que la synthèse de l'AEA peut être accomplie

par plusieurs voies. En effet, trois autres voies de synthèse ont été découvertes à ce jour. Deux de ces voies incluent les enzymes phospholipases A1/A2 et α,β -hydrolase 4 (Abhd4), respectivement (Liu, Wang, et al., 2008; Sun et al., 2004). Une troisième voie implique l'hydrolyse du NAPE par l'enzyme phospholipase C, puis une déphosphorylation pour relâcher l'AEA (Liu, Wang, et al., 2008; Wang & Ueda, 2009). Une récente étude a montré que l'élimination de l'enzyme Abhd4 seule ne causait que peu de changement dans les niveaux d'AEA. Par contre, l'élimination conjointe des enzymes NAPE-PLD et Abhd4 causait une baisse significative dans la concentration de l'AEA (Simon & Cravatt, 2010).

1.2.1.1.2 Voies de dégradation de l'anandamide

L'anandamide est retirée de ses sites de liaison et est ensuite métabolisée dans la cellule par l'enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Pertwee, 2005). La réaction chimique catalysée par cette enzyme est l'hydrolyse de l'AEA et les produits obtenus sont l'acide arachidonique et l'éthanolamide. L'enzyme FAAH a été clonée à partir du foie de rat (Cravatt et al., 1996). Cette protéine est exprimée par les tissus du rat, de la souris et de l'humain et comporte 579 acides aminés (Kano, Ohno-Shosaku, Hashimotodani, Uchigashima, & Watanabe, 2009). Elle est détectée dans plusieurs organes dont le cerveau. Les mécanismes de dégradation de l'AEA sont détaillés à la Figure 1.

1.2.1.2- L'arachidonoylglycérol (2-AG)

Le 2-AG a été isolé de l'intestin de chien (Mechoulam et al., 1995) et du cerveau de rat (Sugiura et al., 1995). Cet eCB se lie aussi bien au récepteur CB1 qu'au récepteur CB2. Les concentrations du 2-AG dans le cerveau sont entre 200 et 1000 fois plus importantes que celles de l'AEA (Bisogno, Berrendero, et al., 1999). Le 2-AG est fortement exprimé dans le tronc cérébral, le striatum, dans le bulbe rachidien et dans l'hippocampe (Sugiura & Waku, 2002). Le 2-AG a également été détecté dans la rétine de rat et de bovins (Sugiura & Waku, 2002).

Étant donné que le 2-AG possède une courte demi-vie (Jarai et al., 2000) et que, tout comme les autres eCBs, il a une affinité relativement faible pour les

récepteurs aux cannabinoïdes (Sugiura & Waku, 2002), la liaison du 2-AG aux récepteurs aux cannabinoïdes nécessite la présence rapprochée de son enzyme de synthèse. Ainsi, l'expression de cette enzyme est un bon indicateur de la localisation du 2-AG, de même que sa fonction. L'inhibition du métabolisme du 2-AG induit l'hypothermie, l'hypomotilité et l'analgésie (Long et al., 2009).

1.2.1.2.1- Voies de synthèse du 2-AG

Tout comme pour l'AEA, il existe plus d'une voie de synthèse du 2-AG. Par contre, les chercheurs s'entendent pour dire que la voie décrite ci-dessous est la principale voie. Ainsi, le 2-AG peut être synthétisé à partir de phospholipides membranaires contenant de l'acide arachidonique par l'enzyme phospholipase C. La molécule obtenue est le diacylglycérol (DAG). Celle-ci est ensuite hydrolysée par l'enzyme diacylglycérol lipase (DAGL) pour former le 2-AG (Bisogno et al., 2003). L'enzyme DAGL existe en deux isoformes : DAGL α et DAGL β . Récemment, deux souris transgéniques dont le gène codant pour l'enzyme DAGL α ou DAGL β est inactif ont été développées (Gao et al., 2010; Tanimura et al., 2010). Une baisse significative des niveaux de 2-AG a été observée chez ces deux lignées de souris. Celle-ci atteint 80% dans le cerveau et la moelle épinière de souris DAGL $\alpha^{-/-}$ et 50% dans le cerveau de souris DAGL $\beta^{-/-}$ (Gao et al., 2010). La différence la plus notable entre les souris DAGL $\alpha^{-/-}$ et DAGL $\beta^{-/-}$ est au niveau de la régulation de la transmission synaptique. Chez l'animal DAGL $\alpha^{-/-}$, cette régulation est abolie tandis qu'elle est normale chez l'animal DAGL $\beta^{-/-}$ (Gao et al., 2010; Tanimura et al., 2010). Les souris DAGL $\alpha^{-/-}$ et DAGL $\beta^{-/-}$ sont fertiles et ont un comportement normal, mis à part que les animaux DAGL $\alpha^{-/-}$ ont une masse corporelle réduite, ce qui laisse croire que les eCBs sont impliqués dans le métabolisme énergétique (Gao et al., 2010). Les mécanismes de synthèse du 2-AG sont présentés à la Figure 1.1.

1.2.1.2.2- Voies de dégradation du 2-AG

Tout comme l'anandamide, le 2-AG est retiré de ses sites de liaison par recapture cellulaire, puis est métabolisé dans la cellule par l'enzyme

monoacylglycérol lipase (MGL) (Pertwee, 2005). Cette enzyme clive le 2-AG en acide arachidonique et en glycérol (Dinh et al., 2002; Schlosburg et al., 2010). Approximativement 85% du métabolisme du 2-AG est attribuable à l'enzyme MGL, tandis que le 15% restant est partagé entre les enzymes α,β -hydrolase 6 (Abhd6) et α,β -hydrolase 12 (Abhd12) (Blankman, Simon, & Cravatt, 2007). Ces deux enzymes sont exprimées dans les neurones en culture (Marrs et al., 2010) et dans le SNC (Blankman et al., 2007). L'enzyme Abhd6 est notamment présente dans la rétine (Hu et al., 2010). La réaction catalysée par les enzymes Abhd6 et Abhd12 engendre les mêmes produits que celle provoquée par l'enzyme MGL, soit de l'acide arachidonique et du glycérol. Les voies de dégradation du 2-AG sont détaillées à la Figure 1.

L'enzyme MGL est retrouvée dans tous les organes du rat (Karlsson, Contreras, Hellman, Tornqvist, & Holm, 1997). Sa distribution dans le cerveau du rat est hétérogène, elle est surtout exprimée dans les régions où le récepteur CB1 est abondant telles que l'hippocampe, le cortex et le cervelet (Dinh et al., 2002). Curieusement, l'enzyme MGL est exprimée sur les terminaux pré-synaptiques (Gulyas et al., 2004) ce qui laisse suggérer un rôle dans la terminaison de la signalisation rétrograde sur les neurones pré-synaptiques (Straiker & Mackie, 2005).

1.2.1.3- Propriétés pharmacologiques de l'AEA et du 2-AG

Pourquoi le cerveau a-t-il besoin (d'au moins) deux eCBs? Le portrait exact des interactions entre l'AEA et le 2-AG est très difficile à brosser. Ceux-ci peuvent collaborer ou compétitionner afin de moduler certaines fonctions spécifiques du SNC. Même lorsqu'ils coopèrent, l'AEA et le 2-AG prennent souvent part à des étapes distinctes d'une même fonction (pour revue, voir Luchicchi et Pistis (2012)). Le 2-AG est davantage impliqué dans le support fonctionnel et dans les modifications physiologiques nécessaires à l'homéostasie, au développement et au comportement. L'AEA jouerait quant à lui un rôle important dans la modulation de fonctions supérieures telles que l'apprentissage et la mémoire (voir pour revue, Katona et Freund (2012)).

On considère que le 2-AG est l'eCB le plus impliqué dans les processus de plasticité synaptique, tandis que l'AEA n'y jouerait qu'un rôle mineur (Kano et al., 2009; Robbe, Kopf, Remaury, Bockaert, & Manzoni, 2002). Le 2-AG exerce notamment ses activités de neuromodulation dans des régions du cerveau telles que l'hippocampe et le cervelet. En effet, plusieurs groupes de recherche ont rapporté, en utilisant des souris MGL « knockouts » ou encore en utilisant des inhibiteurs de l'enzyme MGL, ce qui provoque pour ces deux méthodes une élévation des niveaux cérébraux de 2-AG et une augmentation de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe (Pan et al., 2011; Straiker et al., 2009; Straiker & Mackie, 2005, 2009; Straiker et al., 2011).

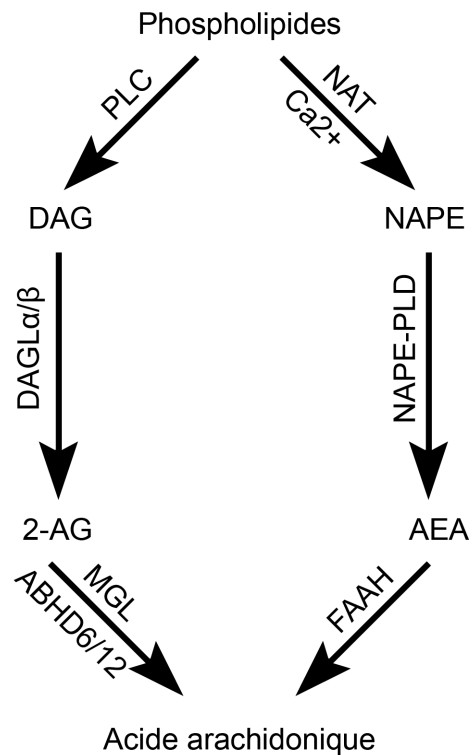


Figure 1.1 Métabolisme des eCBs

Principaux mécanismes de synthèse et de dégradation de l'AEA et du 2-AG

1.2.2- Les récepteurs aux cannabinoïdes

Le récepteur CB1 est certainement le récepteur aux cannabinoïdes le plus étudié dans le SNC étant donné que le récepteur CB2 a longtemps été catégorisé comme un récepteur « périphérique » (Pertwee et al., 2010). Cependant, un nombre croissant de chercheurs s'entendent sur le fait que le récepteur CB2 joue également un rôle dans le SNC (Svízenská, Dubový, & Sulcová, 2008). Les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 possèdent sept domaines transmembranaires et font partie de la famille des récepteurs liés à une protéine G (GPCR). Ils sont couplés à une protéine $G_{i/o}$ et aux *mitogen activated protein kinases* (MAPK). Dans les parties qui suivent, nous allons décrire la distribution de ces deux récepteurs et de leurs voies de signalisation.

1.2.2.1- Distribution des récepteurs aux cannabinoïdes

1.2.2.1.1- Distribution du récepteur CB1

Le récepteur CB1 est majoritairement exprimé dans le système nerveux central et périphérique, aussi bien dans les cellules nerveuses que dans les cellules gliales (Herkenham et al., 1991; Matsuda et al., 1990). Le récepteur CB1 est également présent dans les tissus périphériques tels que les poumons, les testicules, l'utérus, le système immunitaire, l'intestin, la vessie, la rétine et les cellules endothéliales (Sugiura & Waku, 2002); toutefois, le niveau d'expression y est beaucoup plus faible que dans le cerveau (Bouaboula et al., 1993).

Les premières études portant sur la distribution du récepteur CB1 dans le SNC ont relevé une forte expression dans l'hippocampe, les couches profondes du bulbe olfactif, la partie latérale du striatum, le globus pallidus, la substance noire et la couche moléculaire du cervelet (Herkenham et al., 1991; Herkenham et al., 1990). On dénote que l'expression du récepteur CB1 est uniforme dans le striatum, le thalamus, l'hypothalamus, le cervelet et la partie inférieure du tronc cérébral. L'expression est non-uniforme, c'est-à-dire qu'elle indique une présence préférentielle de CB1 dans une population cellulaire donnée, dans l'hippocampe et l'amygdale (Matsuda et al., 1990; Tsou, Brown, Sañudo-Peña, & Mackie, 1997). Le récepteur CB1 est également

exprimé dans certaines populations d'interneurones dans les aires somatosensorielles, motrices et visuelles primaires du cortex cérébral (Marsicano & Lutz, 1999). On retrouve également le récepteur CB1 dans les neurones pyramidaux (Egertova & Elphick, 2000) et dans la rétine de plusieurs mammifères. La distribution de ce récepteur dans la rétine fera l'objet d'une section subséquente de cette introduction.

1.2.2.1.2- Distribution du récepteur CB2

Le récepteur CB2 est exprimé essentiellement dans les cellules du système immunitaire, bien que son ARNm ait été détecté dans d'autres tissus (Galiegue et al., 1995). Ainsi, le récepteur CB2 a été localisé dans la rate, le thymus, les amygdales, la moelle osseuse, le pancréas, les leucocytes sanguins ainsi que les macrophages spléniques (pour revue, voir Pertwee et al. (2010)).

La concentration du récepteur CB2 dans le SNC est beaucoup plus faible que dans le système immunitaire. L'une des premières études à avoir décrit l'existence du récepteur CB2 dans les neurones révélait qu'il était présent dans les cellules granulaires en culture, ainsi que dans les cellules granulaires et de Purkinje du cervelet (Skaper et al., 1996). Depuis, plusieurs études ont révélé que le récepteur CB2 est présent en forte concentration dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, les tubercules olfactifs, le cortex cérébral, le striatum, les noyaux thalamiques, l'amygdale, la substance noire, les colliculi inférieurs ainsi que la rétine, qui sera décrite de façon détaillée ultérieurement (Atwood & Mackie, 2010; Gong et al., 2006; Lopez, Tagliaferro, Onaivi, & Lopez-Costa, 2011; Lu, Straiker, Lu, & Maguire, 2000; Van Sickle et al., 2005).

1.2.2.2- Voies de signalisation des récepteurs aux cannabinoïdes

Les récepteurs CB1 et CB2 sont tous deux des GPCRs et il est connu que les protéines G auxquelles ils sont couplés peuvent moduler plusieurs voies intracellulaires. Le mécanisme principal, commun à toutes les protéines G, inclut l'activation des sous-unités α , β et γ des protéines G. Cette activation cause

l'hydrolyse d'une molécule de GTP, déclenchant la séparation de la sous-unité α GTP des sous-unités β et γ . Chacune de ces sous-unités active par la suite différentes voies de signalisation. Les récepteurs CB1 et CB2 modulent les voies des MAPK, de l'adénylate cyclase (AC) et des canaux calciques et potassiques.

1.2.2.2.1- Régulation de l'adénylate cyclase

La régulation de l'activité de l'AC par le récepteur CB1 a été la première voie de signalisation décrite pour les récepteurs aux cannabinoïdes. Quelques années plus tard, il a été observé que le récepteur CB2 modulait également cette voie de signalisation. D'abord, il a été démontré que les agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes causaient l'inhibition de l'AC (Bouaboula & Dussossoy, 1999; Felder et al., 1995; Howlett et al., 1986). La conséquence de l'inhibition de l'AC est une diminution de la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire, ce qui entraîne une baisse de la phosphorylation de l'enzyme protéine kinase A (PKA), et donc d'inhiber son activité (Howlett, 1985).

Le récepteur CB1 possède un niveau de modulation supplémentaire puisqu'il est en mesure de se lier à une sous-unité $G_{i/o}$ ainsi qu'à une sous-unité G_s dans certaines conditions (Pertwee et al., 2010). Cela lui confère un contrôle plus fin des effets des eCBs sur les niveaux d'AMPC, ce qui influence énormément l'activité cellulaire. La voie de signalisation de l'AC est responsable de la régulation de plusieurs processus physiologiques dont l'expression de gènes, la croissance cellulaire, la plasticité synaptique et l'activité de canaux ioniques (Kano et al., 2009).

Les conséquences de l'activation du récepteur CB1 incluent une diminution de la relâche synaptique dans les neurones GABAergiques et glutamatergiques due à une modulation des canaux voltage-dépendants calciques et potassiques (Demuth & Molleman, 2006). Le récepteur CB1 est notamment impliqué dans plusieurs formes de plasticité, telles que la suppression de l'inhibition ou l'activation liée à la dépolarisation (Kano et al., 2009).

1.2.2.2- Régulation des kinases activées par des agents mitogènes

Les récepteurs CB1 et CB2 ont la capacité de réguler l'activité de la famille des MAPKs (Pertwee et al., 2010). Cette voie est souvent activée après une stimulation des GPCRs. Ils peuvent y moduler la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire. Cette voie de signalisation se caractérise par une organisation hiérarchique qui aboutit à l'activation d'une ou plusieurs protéines (ERK1/2, JNK, p38 MAPK ou ERK5) qui peuvent alors moduler l'expression des gènes immédiats (*immediate early genes*). Il a été démontré que le Δ^9 -THC provoque l'expression des produits de gènes immédiats, dont certains jouent un rôle important lors de la plasticité synaptique (Bouaboula et al., 1995). Ainsi, la régulation de l'expression génique par l'activation des MAPKs est un mécanisme physiologique par lequel les cannabinoïdes peuvent influencer la plasticité synaptique.

1.2.2.3- Modulation des canaux ioniques

Les cannabinoïdes modulent l'activité de plusieurs types de canaux ioniques, dont certains canaux calciques et potassiques. Les eCBs inhibent les canaux calciques voltage-dépendants de type L, N et P/Q (Mackie & Hille, 1992). Notamment, l'inhibition des canaux calciques de type L a été observée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules bipolaires de la rétine (Straiker, Stella, et al., 1999). Également, l'AEA bloque les canaux calciques voltage-dépendants de type N et P/Q, causant ainsi une baisse de l'influx calcique dans la synapse (Mackie, Devane, & Hille, 1993). La régulation de ces canaux calciques fait partie du mécanisme par lequel les cannabinoïdes diminuent la relâche de neurotransmetteurs (Mackie, Lai, Westenbroek, & Mitchell, 1995).

Les cannabinoïdes activent les canaux potassiques de type A et à courant entrant liés à une protéine G (GIRK) (Mackie et al., 1995). Ces derniers sont en mesure d'interagir avec les sous-unités β et γ des protéines G. L'activation des GIRKs est également un mécanisme par lequel les cannabinoïdes inhibent la libération de neurotransmetteurs et ce, par une voie de signalisation indépendante de l'AMPc (Robbe, Alonso, Duchamp, Bockaert, & Manzoni, 2001).

L'une des principales différences entre les récepteurs CB1 et CB2 est que ce dernier ne module pas les canaux calciques ou les GIRKs au niveau du SNC (Felder et al., 1995). Par contre, des récentes études ont démontré que le récepteur CB2 était en mesure de diminuer la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses centrales et périphériques, sans toutefois présenter de mécanismes possibles (Morgan, Stanford, & Woodhall, 2009; Mule, Amato, Baldassano, & Serio, 2007).

1.2.3- Les fonctions physiologiques du système eCB

Tel que montré précédemment, les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 sont très largement distribués dans le corps. Leur activation dans le SNC affecte donc un grand nombre de fonctions physiologiques. L'une des propriétés fondamentales des récepteurs aux cannabinoïdes est la diminution de la transmission synaptique (Kano et al., 2009).

La présence des récepteurs aux cannabinoïdes au niveau des éléments pré-synaptiques des neurones excitateurs et inhibiteurs leur permet de détecter les eCBs libérés par les neurones post-synaptiques. L'activation rétrograde des récepteurs aux cannabinoïdes leur permet de moduler l'activité des canaux calciques et potassiques synaptiques et donc la relâche synaptique. L'une des conséquences à court terme de l'activation des récepteurs CB1 et CB2 est une diminution de la relâche synaptique au niveau des neurones inhibiteurs et excitateurs qui les expriment (Demuth & Molleman, 2006). Cette fonction a été rapportée dans plusieurs régions du SNC dont le néocortex, l'hippocampe, le cervelet, les ganglions de la base et la rétine (Kano et al., 2009).

L'administration d'eCBs produit des effets pharmacologiques et comportementaux également associés à d'autres produits cannabimimétiques. Ces effets comprennent notamment l'analgésie, l'hypothermie ou une diminution de la mobilité. Au niveau neuronal, l'administration d'eCBs modifie les fonctions cognitives, anxiolytiques, motrices et perceptuelles ainsi que la division cellulaire. On dénote

également des effets au niveau gastrique, cardiaque, endocrinien, immunitaire et métabolique (Svízenská et al., 2008).

1.2.4- Le système endocannabinoïde et le développement

Le rôle des eCBs comme modulateurs de la transmission synaptique et de la plasticité neuronale est bien établi. Ce système de neuromodulation affecte également plusieurs processus développementaux. L'expression et l'activité de certains éléments du système eCB ont poussé les chercheurs à étudier le rôle de ce système dans le développement du SNC. Bien que certains aspects de ce rôle soient encore méconnus, plusieurs fonctions développementales semblent déjà émerger. Les eCBs et leurs récepteurs sont présents durant le développement du SNC. Durant la période fœtale, l'AEA est exprimée, mais sa concentration est 1000 fois inférieure à celle du 2-AG (Fernandez-Ruiz, Berrendero, Hernandez, & Ramos, 2000). De plus, le patron d'expression temporel des deux eCBs est très différent : alors que la concentration de l'AEA augmente progressivement jusqu'à l'âge adulte, le niveau de 2-AG observé durant la période fœtale augmente tranquillement, atteint son maximum immédiatement après la naissance et se stabilise au cours du développement postnatal (Berrendero, Sepe, Ramos, Di Marzo, & Fernandez-Ruiz, 1999; Fride, 2008). Cette différence d'expression entre les deux eCBs laisse croire que le 2-AG pourrait jouer un rôle plus important que l'AEA au cours du développement du cerveau. L'expression développementale de plusieurs composantes du système eCB est exposée à la Figure 1.2.

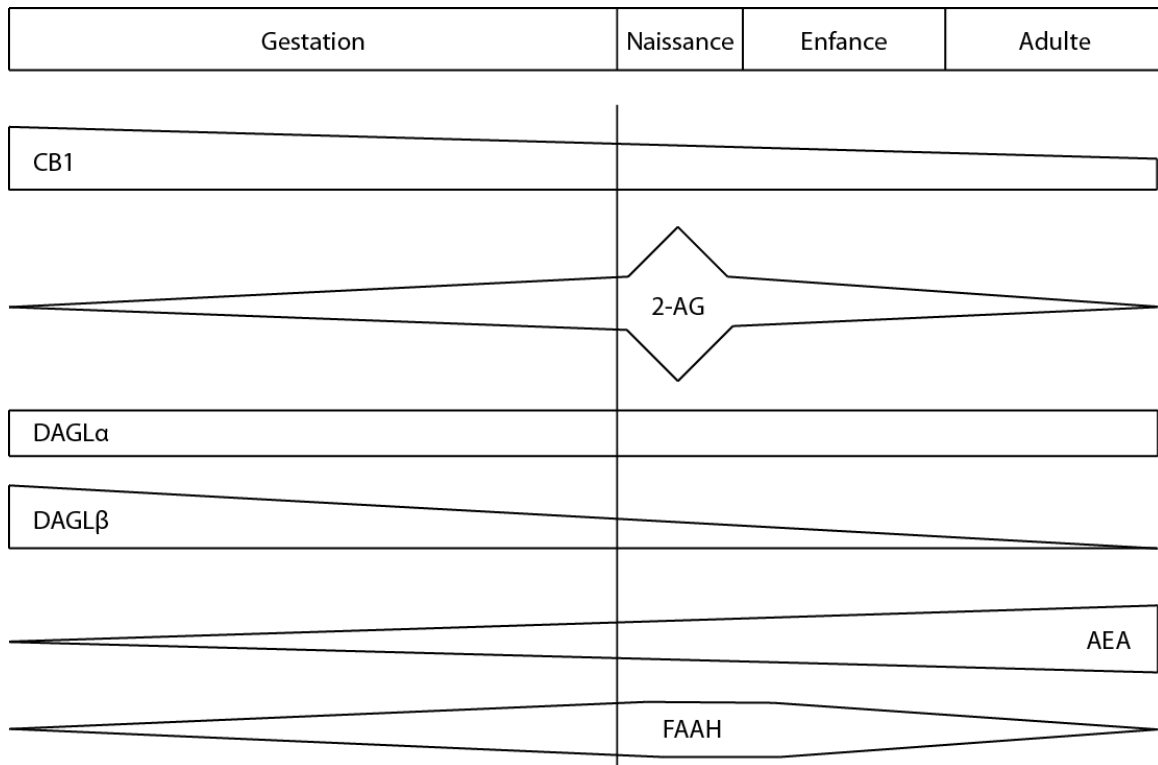


Figure 1.2 Expression temporelle de composantes du système eCB au cours du développement du SNC

Les changements temporels de l'expression des constituants du système eCB sont illustrés à différents stades développementaux. Les niveaux de récepteurs CB1 sont substantiellement plus élevés chez le fœtus que chez l'adulte. Les niveaux de 2-AG (nmol/g) excèdent ceux d'AEA (pmol/g) dans le cerveau en développement. Les niveaux de 2-AG atteignent un sommet juste après la naissance. Les deux isoformes de l'enzyme DAGL sont exprimées au cours du développement et chez l'adulte dans le SNC. L'expression de l'enzyme DAGL α est constante au cours du développement du cerveau, tandis que l'enzyme DAGL β est plus fortement exprimée au cours du développement embryonnaire. L'expression de FAAH est à son apogée au début du développement postnatal et diminue progressivement par la suite, ce qui correspond avec l'augmentation de l'AEA au même stade (schéma modifié de Anavi-Goffer et Mulder (2009)).

1.2.4.1- Expression du système eCB au cours du développement

L'existence de plusieurs composantes du système eCB a été démontrée dans le cerveau de fœtus et de rats nouveau-nés (Fernandez-Ruiz et al., 2000). Le système eCB subit des changements significatifs dans l'expression et l'activité de ses composantes au cours des différentes phases développementales.

L'expression développementale du récepteur CB1 a d'abord été étudiée à l'aide de l'hybridation *in situ*. Cette technique à faible résolution a révélé que l'ARNm du récepteur CB1 est présent chez le rat dès le 14^e jour gestationnel dans plusieurs régions du cerveau en développement telles que le néocortex, le bulbe olfactif, le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe, le colliculus supérieur, le cervelet, le pont de Varole et la moelle épinière (Buckley, Hansson, Harta, & Mezey, 1998). Le début de l'expression du récepteur CB1 à ce moment coïncide avec l'expression phénotypique de la plupart des neurotransmetteurs. Des études ayant une meilleure résolution ont confirmé que le récepteur CB1 est exprimé dans les premiers neurones du SNC (les interneurones du rhombencéphale) et dans les premiers neurones du système nerveux périphérique (les cellules des placodes trigéminées ophtalmiques) (Begbie, Doherty, & Graham, 2004). Les niveaux de récepteurs CB1 sont substantiellement plus élevés chez le fœtus que chez le rat adulte (Berrendero et al., 1999). Le cerveau humain en développement exprime également le récepteur CB1 à des niveaux substantiellement plus élevés que dans un cerveau adulte (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992).

Cependant, l'observation la plus intrigante concernant l'expression du récepteur CB1 dans le cerveau fœtal et néonatal est sa distribution atypique comparativement à l'animal adulte. Plus particulièrement, l'expression du récepteur CB1 dans la matière blanche (Romero et al., 1997) et dans les zones subventriculaires du prosencéphale (Berrendero et al., 1998; Berrendero et al., 1999) contraste par rapport au cerveau adulte dans lequel ce récepteur y est peu ou pas exprimé (Herkenham et al., 1991; Mailleux & Vanderhaeghen, 1992). Cette distribution irrégulière n'est qu'un phénomène transitoire puisque l'expression du récepteur CB1 atteint au cours du développement postnatal tardif son patron de distribution classique.

Plus récemment, des études anatomiques ont montré la localisation cellulaire précise du récepteur CB1, qui est exprimé dans les axones et les cônes de croissance d'une grande variété de neurones dans le cerveau en développement (Berghuis et al., 2007; Mulder et al., 2008; Wu et al., 2010). L'expression du récepteur CB1 augmente progressivement dans le cerveau au cours de la période postnatale (Jiang et al., 2007). D'autres études ont montré que les enzymes DAGL α et DAGL β sont exprimées dans les mêmes axones et les mêmes cônes de croissance que le récepteur CB1 (Berghuis et al., 2007; Bisogno et al., 2003). Enfin, les enzymes DAGL α et DAGL β sont surtout exprimées sur les axones en croissance de neurones pyramidaux au cours du développement (Mulder et al., 2008) tandis qu'elles sont présentes sur les dendrites chez l'adulte (Katona et al., 2006). Ceci indique que le rôle du système eCB pourrait être différent au cours du développement par rapport à l'animal adulte.

1.2.4.2- Effets des cannabinoïdes sur la neurotransmission

Une indication que les cannabinoïdes peuvent agir sur le développement du cerveau est l'exposition périnatale aux cannabinoïdes endogènes, synthétiques ou d'origine végétale. Ceux-ci modifient la maturation des systèmes de neurotransmission et leurs comportements associés (Fernandez-Ruiz et al., 2000; Garcia, de Miguel, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1996; Navarro, de Miguel, Rodriguez de Fonseca, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1996; Rodriguez de Fonseca, Hernandez, de Miguel, Fernandez-Ruiz, & Ramos, 1992).

De plus en plus d'études montrent que l'exposition aux cannabinoïdes au cours des périodes critiques de la maturation du cerveau affecte le développement de plusieurs systèmes de neurotransmission (Trezza, Cuomo, & Vanderschuren, 2008). En particulier, plusieurs études ont mis en évidence les effets des cannabinoïdes sur la maturation des systèmes catécholaminergique (Hernandez et al., 2000), sérotonergique (Molina-Holgado, Alvarez, Gonzalez, Antonio, & Leret, 1997; Molina-Holgado, Amaro, Gonzalez, Alvarez, & Leret, 1996), glutamatergique (Suarez et al., 2004) et opioïdérique (Ellgren, Spano, & Hurd, 2007).

1.2.4.3- Migration neuronale

Le système eCB joue un rôle dans la migration neuronale, notamment dans le cas de neurones immatures. Berghuis et al. (2005) ont démontré que les agonistes du récepteur CB1 provoquent la migration d'interneurones GABAergiques *in vitro*. Ces interneurones sont connus pour voyager sur de longues distances pour peupler des couches spécifiques du cortex et de l'hippocampe. Les eCBs contrôlent la migration en coopération avec le facteur neurotrophique BDNF, un élément important dans la régulation de la migration neuronale (Berghuis et al., 2005). Le récepteur CB1 est également impliqué dans la migration et la fasciculation des neurones pyramidaux durant le développement (Mulder et al., 2008). Cette fonction est en accord avec la localisation du récepteur CB1 dans la matière blanche au cours du développement (Berrendero et al., 1998; Berrendero et al., 1999).

1.2.4.4- Guidage axonal et synaptogenèse

L'une des caractéristiques fondamentales du système nerveux est la capacité de ses éléments (neurones) à communiquer entre eux. Cette communication se fait à l'aide d'une structure dédiée à cet emploi, nommée synapse. Bien que de nombreux éléments permettant l'établissement de ces synapses soient connus, il en reste beaucoup à découvrir. Pour établir leurs synapses, les axones voyagent sur des distances plus ou moins longues pour parvenir à leur(s) cible(s) et ce, dans un environnement très complexe. Plusieurs éléments récemment découverts permettent de penser que les eCBs sont impliqués dans les mécanismes de guidage axonal et de synaptogenèse.

Le récepteur CB1 est fortement exprimé dans les projections axonales au cours du développement neuronal d'embryons de poulet (Watson, Chambers, Hobbs, Doherty, & Graham, 2008), de souris (Mulder et al., 2008; Vitalis et al., 2008), de rat (Gomez et al., 2008) et dans la rétine de souris (Argaw et al., 2011).

Il a été démontré que les agonistes du récepteur CB1 abolissent la croissance des neurites dans les cultures d'interneurones GABAergiques embryonnaires (Berghuis et al., 2005) et des cellules ganglionnaires de la rétine embryonnaires (Argaw et al., 2011) alors qu'ils favorisent la croissance axonale des neurones

pyramidaux (Mulder et al., 2008). Ainsi, les cannabinoïdes modulent la croissance des axones des neurones différemment selon leur type neuronal. En fait, le 2-AG semble être le principal eCB qui module le développement des connexions réciproques entre le thalamus et le cortex (Wu et al., 2010).

En somme, de plus en plus de preuves montrent que les eCBs contrôlent la navigation des cônes de croissance dans le cerveau en développement. Les eCBs modulent la morphologie, la motilité et le guidage des cônes de croissance afin de permettre aux axones de rejoindre leurs cibles spécifiques.

Jusqu'à maintenant, une seule étude a évalué le rôle du récepteur CB1 dans la synaptogenèse. Kim et Thayer (2001) ont montré que les agonistes du récepteur CB1 inhibent la formation de synapses dans les cultures de neurones de l'hippocampe. Le récepteur CB1 est donc un régulateur négatif de la formation de nouvelles synapses.

1.3- Le système visuel

La voie visuelle est un bon exemple d'une série de connexions entre plusieurs structures cérébrales. La rétine est la porte d'entrée de l'information visuelle. Il s'agit d'un empilement de trois couches de cellules; l'une d'elles contient les cellules sensibles à la lumière, nommées cônes et bâtonnets. Le signal lumineux est converti par les photorécepteurs en signal électrique et est transmis jusqu'aux cellules ganglionnaires, qui forment la seule classe de neurones rétiniens projetant vers le reste du SNC. Les axones des cellules ganglionnaires quittent la rétine par le nerf optique, décussent au niveau du chiasme optique avant d'atteindre leurs cibles primaires : le corps genouillé latéral (CGL) et le colliculus supérieur (CS). Le CGL est un noyau thalamique de premier ordre qui effectue une analyse de bas niveau de l'information visuelle avant de la transférer au cortex visuel primaire. Le CS, quant à lui, est une structure multimodale qui se caractérise par une très grande sensibilité au mouvement et qui est impliqué dans le contrôle visuo-moteur (Hubel, 1994).

L'aire visuelle primaire est la première aire corticale à recueillir l'information visuelle; elle reçoit les afférences du CGL. Le signal visuel passe de couche en couche dans des neurones connectés par des synapses et atteint ensuite les aires

visuelles voisines, qui transmettent à leur tour des informations à plusieurs autres aires corticales. Chacune de ces aires contient trois ou quatre étapes de transmission synaptique entre les neurones.

1.3.1- La rétine

La rétine est une mince membrane tapissant le fond de l'œil. Elle constitue la partie sensible à la lumière qui transforme l'image de lumière projetée par le système optique de l'œil. Elle contient des cellules permettant de capter les rayons lumineux et de les transformer en influx nerveux. L'image lumineuse focalisée par l'œil est ainsi convertie en une série de potentiels d'action.

La rétine est un modèle intéressant et facilement accessible pour l'étude de la neurotransmission, tant chez l'animal adulte qu'au niveau du développement neuronal. Cette structure possède l'avantage de contenir six types de cellules neuronales et un type de cellule gliale, organisés en trois couches cellulaires et deux couches synaptiques. Bien que la microcircuiterie de la rétine soit assez complexe, il existe une littérature abondante et détaillée qui permet d'en avoir une très bonne compréhension.

1.3.1.1- Anatomie de la rétine

La rétine est une structure constituée de trois couches nucléaires et deux couches synaptiques. Il s'agit d'une part, des couches nucléaires interne et externe (INL, ONL) et de la couche des cellules ganglionnaires (GCL) et d'autre part, des couches plexiformes interne et externe (IPL, OPL). Les sept types cellulaires se répartissent dans ces couches selon le même schéma chez différentes espèces animales. La structure de la rétine est présentée à la Figure 1.3.

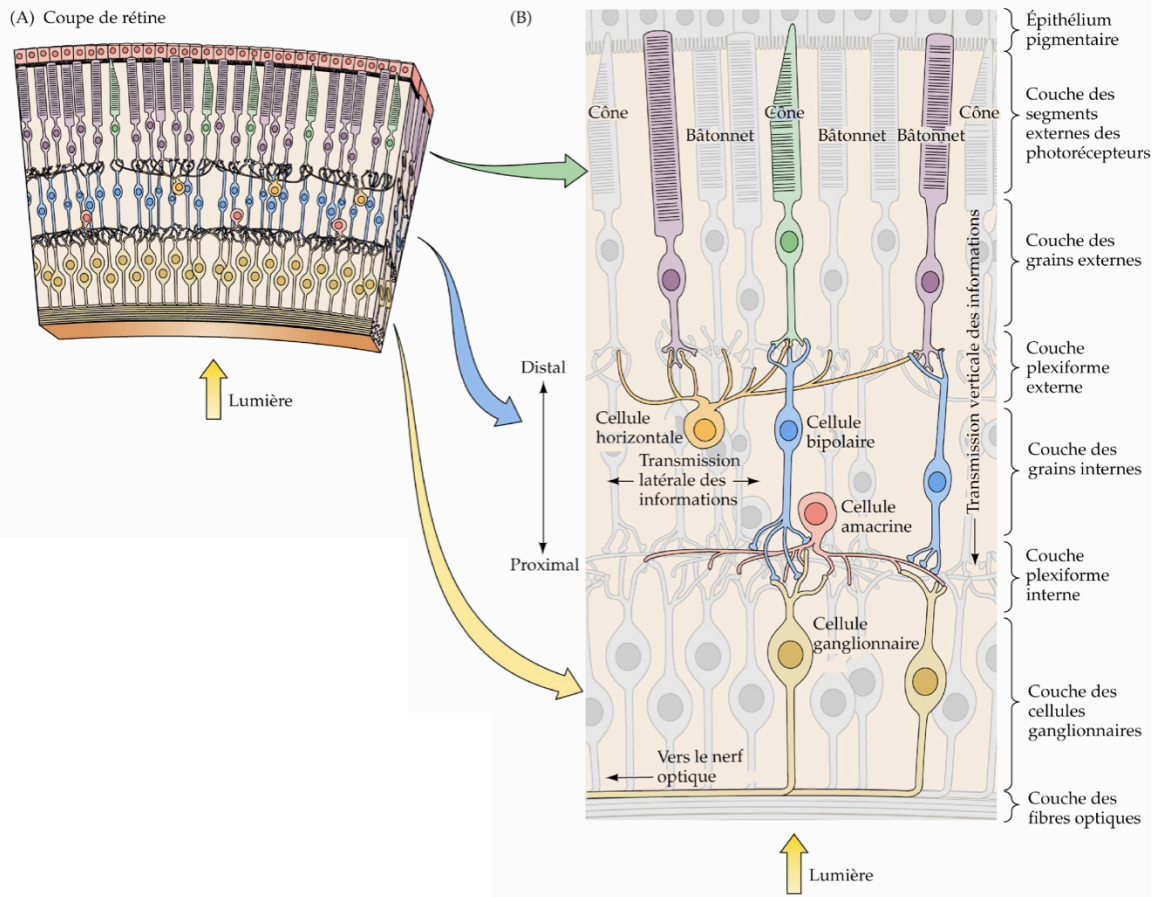


Figure 1.3 Structure de la rétine

A) Une section de la rétine montre l'arrangement des couches cellulaires et synaptiques. B) Diagramme de la circuiterie de la rétine. Une chaîne de trois neurones (photorécepteur – cellule bipolaire – cellule ganglionnaire) est la voie directe pour transmettre l'information visuelle au cerveau. Les cellules horizontales et amacrines relaient les interactions latérales dans les couches plexiformes externe et interne, respectivement. Les cellules ganglionnaires envoient l'information visuelle par leurs axones, qui composent le nerf optique (image tirée de Purves et al. (2008)).

1.3.1.1.1- Les photorécepteurs

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

Les deux types de photorécepteurs possèdent des structures morphologiques relativement similaires. Tous deux sont formés de quatre compartiments fonctionnels : le segment externe, le segment interne, le corps cellulaire et la terminaison synaptique.

Le segment externe est composé d'un empilement de disques qui contiennent une très grande concentration de pigments visuels. Chez les rongeurs, ces pigments sont la rhodopsine pour les bâtonnets, ainsi que les opsines M et S pour les cônes. Le segment interne est composé du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Le corps cellulaire contient essentiellement le noyau de la cellule. La terminaison synaptique est la structure en charge de la transmission de l'influx nerveux aux neurones de second ordre : les cellules bipolaires et horizontales (Fu & Yau, 2007). La structure schématisée des cônes et des bâtonnets est présentée à la Figure 1.4.

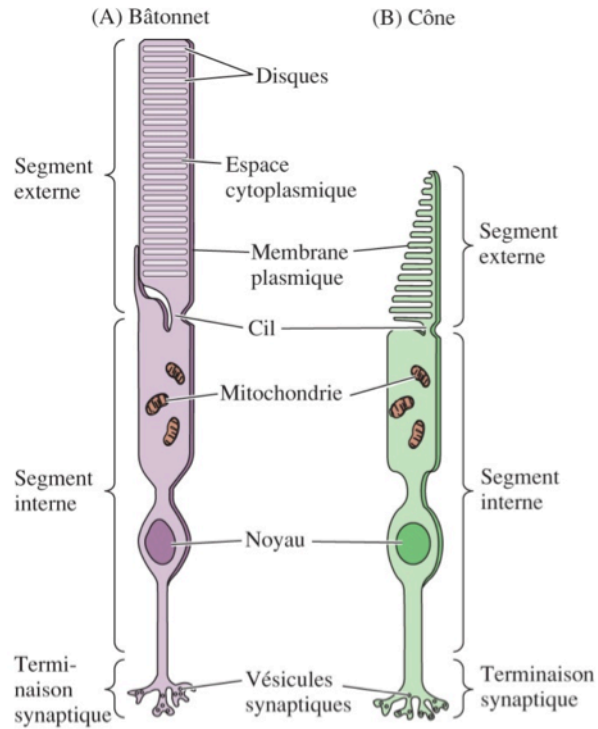


Figure 1.4 Différences structurelles entre les cônes et les bâtonnets

Bien qu'ils possèdent une structure similaire, les cônes et les bâtonnets diffèrent dans leur taille et dans leur forme, mais aussi dans l'organisation de leurs disques présents dans leur segment externe (image tirée de Purves et al. (2008)).

Les bâtonnets

En obscurité, les bâtonnets génèrent un courant électrique, nommé courant d'obscurité, passant du segment interne vers le segment externe. Un bâtonnet au repos possède un potentiel membranaire d'environ $-40 \mu\text{V}$ (Sterling & Demb, 2003). La cellule maintient cette charge en raison de l'entrée incessante de sodium par les canaux ioniques situés dans le segment externe à l'aide de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui est continuellement produite par l'enzyme guanylate cyclase. L'entrée de sodium est équilibrée par la sortie de potassium au niveau du segment interne, ce qui crée le courant d'obscurité. Les bâtonnets sont connectés aux cellules bipolaires de type ON. En conditions d'obscurité, les bâtonnets sont dépolarisés et libèrent du glutamate vers les cellules bipolaires, provoquant l'hyperpolarisation de ces dernières (Sterling & Demb, 2003).

La capture d'un photon cause la suppression locale du courant d'obscurité dans le segment externe par la fermeture de canaux ioniques. Les photons sont captés par la rhodopsine, ce qui cause son activation. La rhodopsine activée stimule ensuite plusieurs centaines de molécules de transducine, des protéines de la membrane du disque qui activent à leur tour des centaines de molécules de phosphodiesterase, une enzyme clivant le GMPc provoquant la fermeture des canaux sodiques. La fermeture de ces canaux empêche l'entrée de sodium dans la cellule et provoque une hyperpolarisation du photorécepteur et une diminution de la libération de glutamate. La diminution du glutamate provoque alors une dépolarisation des cellules bipolaires ON et des cellules ganglionnaires ON, ce qui engendre un influx nerveux. L'arrêt de la phototransduction se fait par la phosphorylation de la rhodopsine par la rhodopsine kinase qui provoque l'arrêt des mécanismes en cours, ce qui favorise la production de GMPc et ainsi la réouverture des canaux ioniques (Sterling & Demb, 2003).

Les cônes

Il existe trois types de cônes : les cônes S (*short wavelength*), les cônes M (*medium wavelength*) et les cônes L (*long wavelength*). Les cônes sont environ 1000 fois moins sensibles à la lumière que les bâtonnets mais leur réponse est beaucoup

plus rapide (Bear, Connors, & Paradiso, 2007; Kefalov, Fu, Marsh-Armstrong, & Yau, 2003). Tout comme les bâtonnets, les cônes génèrent un courant d'obscurité passant du segment interne vers le segment externe et présentant un courant d'environ $-40 \mu\text{V}$. Les cônes sont donc dépolarisés en conditions d'obscurité par l'entrée de sodium via les canaux ioniques des segments externes et sécrètent en conséquence du glutamate vers les cellules bipolaires (Yau, 1994).

Deux cellules bipolaires sont associés à chaque cône : une ON et une OFF. Les cellules bipolaires ON fonctionnent de la même manière avec les cônes qu'avec les bâtonnets : elles sont hyperpolarisées en présence de glutamate, soit en obscurité. Les cellules bipolaires OFF sont dépolarisées en présence de glutamate, signalant ainsi l'absence de lumière. Cette particularité des cellules bipolaires sera traitée dans une section subséquente de l'introduction.

Le spectre d'illumination à partir duquel les cônes et les bâtonnets sont activés est présenté à la Figure 1.5. L'exposition à la lumière après une adaptation complète à l'obscurité entraîne une saturation temporaire des cônes. L'adaptation complète à la lumière prend alors de cinq à dix minutes. En condition photopique, l'illumination prolongée fait chuter les taux de GMPc dans les bâtonnets jusqu'à un point de saturation alors que les cônes continuent à réagir en fonction de l'intensité du stimulus lumineux. Si on délivre un stimulus d'intensité lumineuse supérieure à l'intensité ambiante, les bâtonnets ne peuvent pas s'hyperpolariser davantage puisqu'ils fonctionnent en mode saturé. En revanche, les cônes présentent un supplément d'hyperpolarisation car ils ne sont pas saturés (Rigaudière & Le Gargasson, 2007).

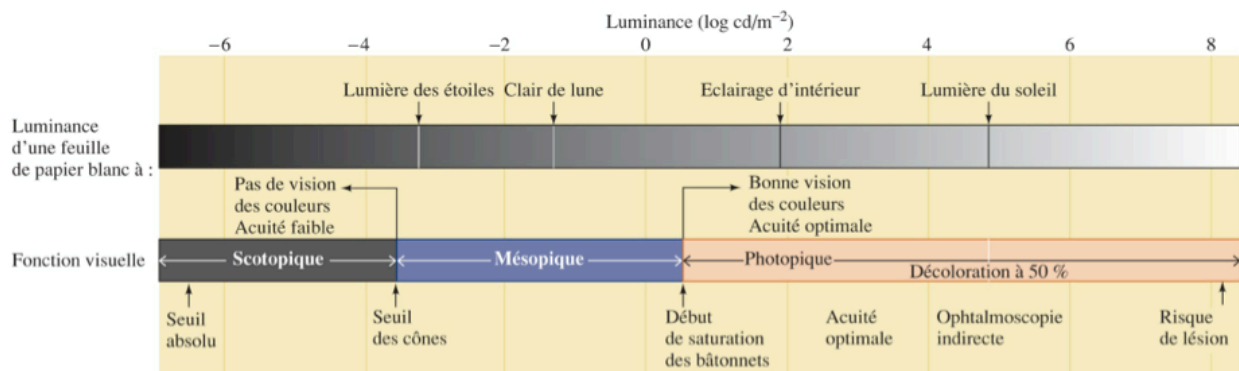


Figure 1.5 L'étendue des valeurs de luminance percevables par le système visuel. Lorsque les valeurs d'illumination sont très faibles, seuls les bâtonnets sont activés. Les cônes commencent à contribuer à la perception visuelle lorsque que le niveau de luminance est équivalent à celui de la lumière des étoiles. Les cônes sont les seuls photorécepteurs activés lorsque l'éclairage est relativement intense (image tirée de Purves et al. (2008)).

1.3.1.1.2- Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires sont des cellules de second ordre qui recueillent l'information des photorécepteurs et la transmettent aux cellules ganglionnaires. Cette population de cellules est très hétérogène et il en existe plusieurs types.

Si l'on compare les cellules bipolaires par leur fonction, on dénote deux groupes distincts: les cellules bipolaires ON et les OFF (Famiglietti & Kolb, 1976). Ces deux groupes de cellules répondent différemment à la lumière : les ON se dépolarisent alors que les OFF s'hyperpolarisent, créant ainsi des canaux parallèles de transfert d'information. Cette différence existe en raison de la présence de deux types de récepteurs glutamatergiques dans les dendrites des cellules bipolaires. Le glutamate hyperpolarise les cellules bipolaires ON par les récepteurs métabotropiques mGluR6 (Koyasu et al., 2008; Slaughter & Miller, 1985) tandis qu'il dépolarise les cellules bipolaires OFF par les récepteurs ionotropiques AMPA/kaïnate (DeVries, 2000). Les synapses des cellules bipolaires se stratifient à différents niveaux dans l'IPL : les OFF dans la strate a (la moitié supérieure de l'IPL) et les ON dans la strate b (la moitié inférieure de l'IPL).

Si l'on compare les cellules bipolaires par leur cellule pré-synaptique, on compte deux groupes : les cellules bipolaires liées aux bâtonnets et celles associées aux cônes (Masland, 2001). En utilisant des critères morphologiques, plusieurs chercheurs ont dénombré entre dix et douze types de cellules bipolaires selon les espèces animales (Ghosh, Bujan, Haverkamp, Feigenspan, & Wässle, 2004; Wässle, Puller, Müller, & Haverkamp, 2009). Bien que les cônes soient beaucoup moins nombreux que les bâtonnets, la majorité des cellules bipolaires leur sont associés (neuf types sur dix, chez le rat et la souris). Ceci est explicable par la grande sensibilité à la lumière de la voie des bâtonnets. Il existe une convergence de plusieurs bâtonnets pour une seule cellule bipolaire liée aux bâtonnets. Par ce mécanisme, la sensibilité d'une cellule bipolaire liée aux bâtonnets peut être jusqu'à vingt fois supérieure à celle d'un bâtonnet. À l'inverse, chaque cône fait synapse avec une cellule bipolaire liée aux cônes de chaque sous-type, formant ainsi des canaux parallèles de transmission et d'intégration de l'information (Wässle, 2004). Les différents types de cellules bipolaires de la souris sont présentés à la Figure 1.6.

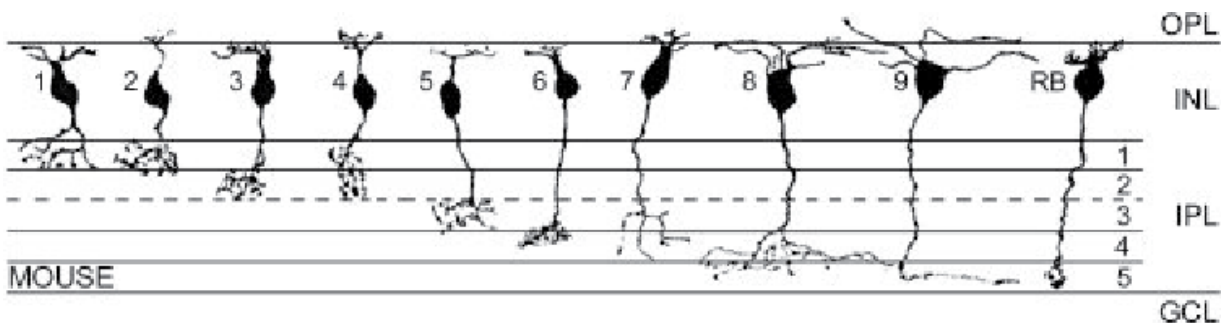


Figure 1.6 Types de cellules bipolaires dans la rétine de souris

La ligne pointillée représente la frontière entre les sous-couches OFF et ON de l'IPL, la couche ON étant la plus interne. Les cellules bipolaires dont les axones terminent au-dessus de cette ligne sont OFF et celles terminant en-dessous sont ON (figure tirée de Ghosh et al. (2004)).

1.3.1.1.3- Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires reçoivent l'information des cellules bipolaires et de certaines cellules amacrines. Elles sont responsables de la transmission de l'information visuelle aux structures sous-corticales, dont le CGL et le CS. Les cellules ganglionnaires varient en termes de taille, de connectivité et de réponses à une stimulation visuelle. Selon les critères morphologiques, il existe entre 15 et 22 types de cellules ganglionnaires (Volgyi, Chheda, & Bloomfield, 2009).

1.3.1.1.4- Les cellules horizontales

Il existe deux classes d'interneurones inhibiteurs rétiniens : les cellules horizontales et amacrines. Les cellules horizontales sont situées en-dessous de l'OPL, leurs dendrites s'étendant latéralement dans la couche synaptique de sorte que chaque cellule horizontale reçoive des afférences de plusieurs cônes. Elles modulent le transfert de l'information entre les cônes et les cellules bipolaires en agissant au niveau du pédicule du cône et des dendrites des cellules bipolaires. Les cellules horizontales jouent un rôle important dans l'adaptation rétinienne à la lumière, car grâce à leur rétroaction elles modulent la sensibilité des cônes et forment les champs récepteurs des cellules bipolaires et ganglionnaires (He, Weiler, & Vaney, 2000; Xin & Bloomfield, 1999).

1.3.1.1.5- Les cellules amacrines

Les cellules amacrines modulent le transfert de l'information entre les cellules bipolaires et ganglionnaires en agissant sur les terminaisons synaptiques des cellules bipolaires et les dendrites des ganglionnaires. Elles forment une population hétérogène jouant un rôle important dans l'analyse visuelle de la rétine interne en modulant les paramètres spatiaux et temporels du transfert de l'information visuelle (MacNeil & Masland, 1998). Certaines cellules amacrines ont des fonctions bien connues. C'est le cas des cellules amacrines AII qui forment un lien permettant le passage de l'information visuelle aux cellules ganglionnaires en condition de faible luminosité.

Les cellules amacrines occupent la moitié la plus profonde de l'INL, mais elles peuvent également se retrouver dans la couche des cellules ganglionnaires, elles sont alors appelées cellules amacrines déplacées.

1.3.1.1.6- Les cellules gliales de la rétine

En plus de contenir de la microglie, la rétine possède deux types de macroglie : les astrocytes et les cellules de Müller. Les astrocytes sont produits dans le cerveau et migrent à travers le nerf optique dans la couche des fibres des cellules ganglionnaires (Huxlin, Sefton, & Furby, 1992). Les cellules de Müller sont produites à partir des cellules progénitrices de la rétine et s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine. Ces cellules sont d'une grande utilité car, de par leur contact avec la totalité des neurones rétinien, elles sont en mesure d'échanger constamment avec toutes les cellules de la rétine. Elles fournissent notamment un soutien trophique aux neurones rétinien en plus d'être en charge de l'élimination des déchets métaboliques de la rétine. Les cellules de Müller sont les plus importantes cellules gliales de la rétine, car elles forment des éléments importants pour la défense immunitaire. Ces cellules jouent également un rôle homéostatique, car elles contrôlent la concentration des ions potassiques qui sont relâchés massivement dans le milieu extracellulaire par les neurones (Bringmann et al., 2000).

1.3.1.2- La circuiterie de la rétine du rongeur

Le nombre et les types d'interactions qui unissent les différents neurones de la rétine en font une structure très complexe. Chez les mammifères, les cônes et les bâtonnets sont le point de départ de deux voies d'analyse. Les bâtonnets sont responsables de la vision en condition de faible luminosité (vision scotopique) alors que les cônes répondent à des conditions de luminosité plus intense (vision photopique). Les cônes sont également responsables de la vision des couleurs. Lorsque les bâtonnets et les cônes font synapse avec les cellules bipolaires, celles-ci sont responsables de transférer l'information directement ou indirectement aux cellules ganglionnaires. La transmission du signal a été décrite par plusieurs auteurs, notamment par Wässle (2004).

1.3.1.2.1- La transmission du signal des bâtonnets

Dans l'obscurité, les bâtonnets relâchent du glutamate. Cette action est diminuée en présence de lumière. L'élément pré-synaptique, formé par la sphérule du bâtonnet, est en apposition avec deux dendrites de cellules horizontales et une à trois dendrites de cellules bipolaires liées aux bâtonnets. Les terminaisons synaptiques des cellules bipolaires liées aux bâtonnets sont dans l'IPL, mais directement connectées aux cellules ganglionnaires. Ces cellules bipolaires forment également des synapses avec les cellules amacrines de type All, qui sont alors dépolarisées à la lumière. Celles-ci intègrent l'information de plusieurs cellules bipolaires liées aux bâtonnets et la transfèrent aux terminaux des cellules bipolaires liées aux cônes ON et OFF grâce à des synapses électriques. Enfin, les cellules bipolaires liées aux cônes transfèrent l'information visuelle aux cellules ganglionnaires ON et OFF (voir pour revue Wässle (2004)). La structure des sous-compartiments des différents types cellulaires de la rétine est présentée à la Figure 1.7. La transmission du signal des bâtonnets est décrite à la Figure 1.8.

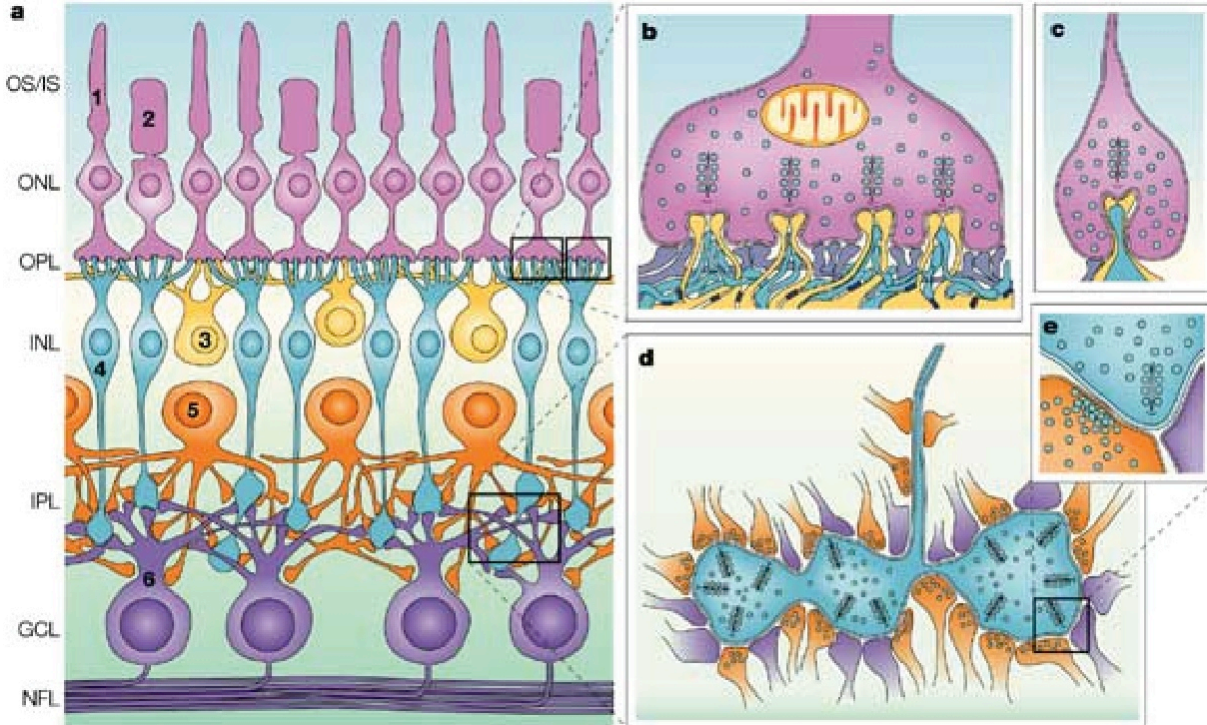


Figure 1.7 Structure des sous-compartiments de la rétine

a) Six classes de neurones composent la rétine : les bâtonnets (1), les cônes (2), les cellules horizontales (3), bipolaires (4), amacrines (5) et ganglionnaires (6). **b)** Structure du pédicule du cône, la terminaison synaptique des cônes. Quatre rubans présynaptiques sont placés face aux dendrites des cellules horizontales (jaune) et des cellules bipolaires des cônes ON (bleu). Cet arrangement synaptique est appelé « triade ». Les dendrites des cellules bipolaires des cônes forment des contacts avec la base du pédicule du cône (violet). **c)** Structure de la sphérule du bâtonnet, la terminaison synaptique des bâtonnets. Le ruban présynaptique est placé face aux axones des cellules horizontales (jaune) et aux dendrites des cellules bipolaires des bâtonnets (bleu). Les dendrites des cellules bipolaires des cônes (violet) forment des contacts à la base. **d-e)** La terminaison axonale d'une cellule bipolaire liée aux cônes contient jusqu'à 50 rubans présynaptiques et se connecte aux dendrites des cellules amacrines (orange) et ganglionnaires (violet). Les cellules amacrines forment également des synapses dans l'IPL avec les cellules ganglionnaires et d'autres cellules amacrines (figure tirée de Wässle (2004)).

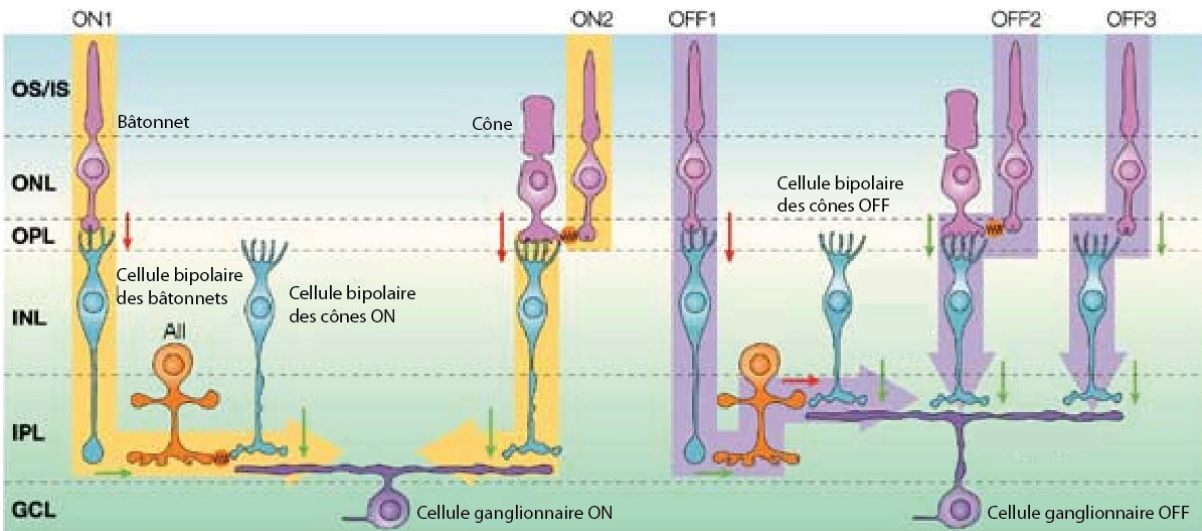


Figure 1.8 La transmission du signal des bâtonnets dans la rétine

Les chemins « traditionnels » de la transmission du signal sont ON1 et OFF1. Dans la voie ON1, les bâtonnets sont hyperpolarisés par la lumière et transfèrent leurs signaux aux dendrites des cellules bipolaires des bâtonnets. Étant donné que les cellules bipolaires des bâtonnets expriment le récepteur glutamatergique mGluR6, le signal est inversé à la synapse (flèche rouge), ce qui cause la dépolarisation de ces cellules. Elles transfèrent le signal par une synapse glutamatergique (flèche verte) aux cellules amacrines All. Celles-ci font des jonctions communicantes (« gap junctions ») avec les axones des cellules bipolaires des cônes, qui elles-mêmes font synapse (flèche verte) avec les cellules ganglionnaires ON. Dans la voie OFF1, la portion allant des bâtonnets aux cellules amacrines All est identique à la voie ON1. Les cellules All des synapses glycinergiques inverses (flèche rouge) avec les axones des cellules bipolaires des cônes OFF, qui elles-mêmes font synapse (flèche verte) avec les cellules ganglionnaires OFF. Dans la voie ON2, le signal des bâtonnets est transmis au pédicule des cônes et suit ensuite la voie des cônes jusqu'aux cellules ganglionnaires ON. La voie OFF2 est similaire à la voie ON2, avec la seule différence qu'elle passe par les cellules ganglionnaires OFF. Dans la voie OFF3, les cellules bipolaires des cônes OFF font synapse directement avec les sphérules des bâtonnets et transfèrent le signal directement aux cellules ganglionnaires OFF (figure tirée de Wässle (2004)).

1.3.1.2.2- La transmission du signal des cônes

Tout comme les bâtonnets, les cônes répondent à la lumière par une hyperpolarisation graduée et une diminution de la relâche glutamatergique au niveau de leur pédicule. Le pédicule est en contact avec huit types de cellules bipolaires liées aux cônes et avec les cellules horizontales. Les cellules horizontales et bipolaires OFF sont hyperpolarisées par la lumière alors que les cellules bipolaires ON sont dépolarisées. Les chemins de signalisation constitués par les cellules bipolaires sont donc regroupés en deux groupes : ON et OFF. Les cellules ON répondent à une augmentation de la lumière et font synapse avec les cellules ganglionnaires ON dans la partie inférieure de l'IPL. Les cellules bipolaires OFF réagissent à une diminution lumineuse et font synapse avec les cellules ganglionnaires OFF dans la partie supérieure de l'IPL (voir pour revue Wässle (2004)).

1.3.1.2.3- La transmission du signal vers le cortex visuel

Les axones des cellules ganglionnaires forment le nerf optique. L'influx nerveux se propage au-delà du chiasma optique par le tractus optique jusqu'aux corps genouillés latéraux. Chez les primates, les couches supérieures (3, 4, 5 et 6) servent à la voie parvocellulaire, les couches inférieures (1 et 2) participent à la voie magnocellulaire et les intercouches constituent les couches koniocellulaires. Par la suite, l'influx nerveux suivra les radiations optiques pour rejoindre le cortex occipital où il sera décodé.

1.3.2- Évaluation de la fonction rétinienne

L'activation des photorécepteurs et la transmission neuronale des signaux visuels se traduisent par des modifications du potentiel électrique de la rétine. L'électrorétinogramme (ERG) est une mesure de la modification du potentiel électrique de la rétine à la suite d'un stimulus lumineux. Il s'agit d'une technique permettant d'étudier facilement la fonction rétinienne et dont les enregistrements sont obtenus d'une manière non-invasive. Cette mesure est enregistrée sur la cornée en

référence à une électrode neutre posée sur les tempes. L'ERG représente la réponse globale de la rétine à une stimulation lumineuse (Hébert & Lachapelle, 2003).

L'ERG de type « full-field » permet d'enregistrer la variation du potentiel électrique de la rétine en condition scotopique, c'est-à-dire résultant de l'activité des bâtonnets en vision nocturne ou en vision photopique, c'est-à-dire résultant de l'activité des cônes en vision diurne et ce, en réponse à diverses intensités de stimuli lumineux. Ceux-ci sont transmis à l'aide d'un diffuseur (« Ganzfeld ») pour assurer la répartition égale de la lumière. L'ERG scotopique mixte est une mesure de l'activité de la rétine en vision nocturne où les cônes contribuent à la réponse en raison de l'activité plus élevée du stimulus lumineux.

1.3.2.1- Les ondes obtenues par électrorétinographie

Les composantes majeures de l'ERG sont les ondes a et b. L'onde a représente le premier potentiel négatif tandis que l'onde b correspond au premier potentiel positif. De plus, il est possible d'enregistrer des potentiels oscillatoires (OPs), soit des ondes de grande fréquence qui caractérisent la pente ascendante de l'onde b. Un enregistrement typique d'ERG est présenté à la Figure 1.9.

Afin d'étudier les ondes obtenues, le consensus est d'en mesurer l'amplitude et le temps nécessaire à l'atteinte de l'amplitude maximale (temps de culmination). L'amplitude de l'onde a se mesure à partir de l'amplitude enregistrée avant la stimulation lumineuse jusqu'au point le plus négatif. L'amplitude de l'onde b se mesure du creux de l'onde a jusqu'au point le plus élevé. L'amplitude de chaque OP se mesure du creux précédent jusqu'au point maximal de la déflexion positive qui suit, sauf pour le OP2 qui se mesure à partir du niveau de base jusqu'au point maximal. Le temps de culmination est la durée entre l'apparition du flash lumineux et l'amplitude maximale de la réponse (Hébert & Lachapelle, 2003; Rigaudière & Le Gargasson, 2007).

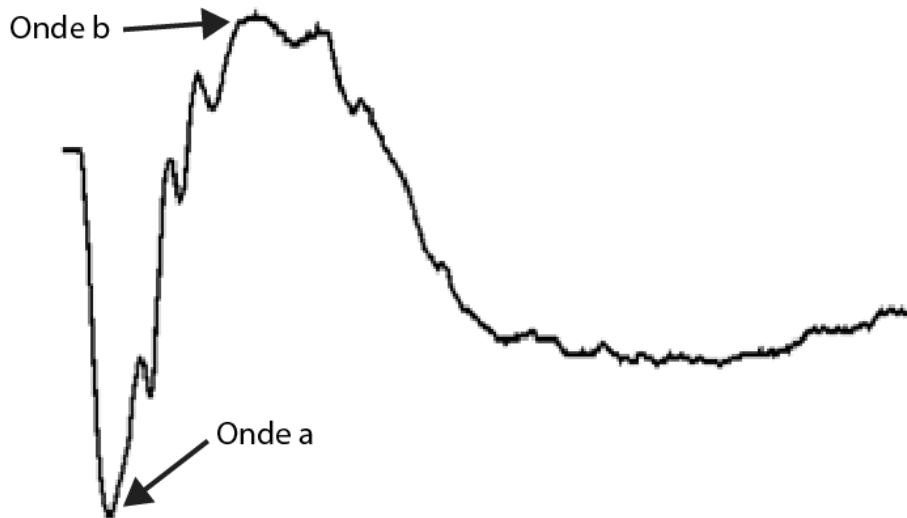


Figure 1.9 Les ondes caractéristiques de l'ERG

Réponse représentative à l'ERG d'une souris adulte C57BL/6J soumise à un flash lumineux intense.

1.3.2.2- La spécification des ondes et leur provenance

En condition scotopique pure, où la réponse est générée uniquement par les bâtonnets seule l'onde b est enregistrable. L'augmentation de l'intensité du flash lumineux augmente l'amplitude de l'onde b jusqu'à l'atteinte d'un plateau.

En condition scotopique mixte, la réponse est générée à la fois par les cônes et les bâtonnets. L'augmentation de l'intensité des flashes entraîne une élévation de l'amplitude des onde a et b.

En condition photopique, des flashes lumineux sont transmis contre un fond lumineux permettant de saturer les bâtonnets. La réponse obtenue est une réponse des cônes et les ondes a et b sont visibles.

1.3.2.2.1- L'onde a

L'onde a provient de l'activation des photorécepteurs. Elle est générée par les cônes seuls, ou par un couplage de cônes et de bâtonnets (Robson, Saszik, Ahmed, & Frishman, 2003). L'activation des photorécepteurs par un stimulus lumineux cause une hyperpolarisation de ces cellules en raison de la fermeture des canaux sodiques, ce qui explique la déflexion négative de l'onde a (Barraco, Bellomonte, Brai, &

Anastasi, 2006). En condition scotopique mixte, l'onde a provient de la somme des hyperpolarisations des cônes et des bâtonnets. Le temps de culmination de l'onde a diminue avec l'intensité des flashes.

1.3.2.2.2- L'onde b

Bien que les cellules bipolaires semblent être directement responsables de l'onde b (Stockton & Slaughter, 1989), certains auteurs croient que les cellules de Müller y sont également impliquées, dans la mesure où elles reflètent les courants extracellulaires dus au changement de potassium causé par l'activité de dépolarisation des cellules bipolaires et sont impliquées dans la synthèse du glutamate (Newman & Frishman, 1991).

En condition scotopique, l'hyperpolarisation des bâtonnets entraîne une dépolarisation des cellules bipolaires-ON associées aux bâtonnets ce qui explique la présence de l'onde b positive. En condition scotopique mixte, la dépolarisation combinée des cellules bipolaires-ON associées aux bâtonnets et aux cônes génère l'onde b. Les cellules de Müller contribueraient peu à l'onde b car les besoins en glutamate et les changements en potassium des cellules bipolaires sont restreints.

En condition photopique, l'onde b résulte de l'action concertée de la dépolarisation des cellules bipolaires-ON associées aux cônes et de l'hyperpolarisation des cellules bipolaires-OFF des cônes L et M (Rigaudière & Le Gargasson, 2007). Les cellules de Müller sont également impliquées dans la genèse de cette onde car elles servent de réservoir d'ions durant l'hyperpolarisation des photorécepteurs et reflètent les changements de concentrations de potassium lors de la dépolarisation des cellules bipolaires.

1.3.2.2.3- Les potentiels oscillatoires

Presque toutes les cellules, dont les cellules amacrines et les cellules formant la couche plexiforme interne ou même le nerf optique contribuent à la genèse des OPs, à l'exception des photorécepteurs et des cellules de Müller (Watchmeister, 1998). Certaines études démontrent même que chaque OP serait généré par une composante rétinienne différente et indépendante ou du moins, que les OPs

scotopiques et photopiques émergeraient de différents circuits (Hébert & Lachapelle, 2003).

1.4- Les cannabinoïdes et le système visuel

Le rôle des eCBs dans la fonction visuelle est de plus en plus étudié. La vaste majorité des études fonctionnelles qui existent portent sur la rétine. Néanmoins, certaines études permettent de croire que le système eCB pourrait avoir un rôle dans le système visuel ailleurs que dans la rétine.

1.4.1- Les cannabinoïdes et les tissus oculaires

Il est connu depuis longtemps que la consommation de marijuana cause la vasodilatation des vaisseaux sanguins de la conjonctive (reconnaissable par les yeux rouges) et une réduction de la pression intraoculaire (Adams, Brown, Haegerstrom-Portnoy, Flom, & Jones, 1978). Initialement, les chercheurs croyaient que la marijuana exerçait ses effets de manière systémique par le SNC. Il est maintenant clair que les effets du Δ^9 -THC et des autres cannabinoïdes réduisent entre autres la pression intraoculaire par une action locale sur les récepteurs CB1 présents dans l'œil (Straiker, Maguire, Mackie, & Lindsey, 1999). De plus, des études physiologiques et biochimiques montrent la présence des eCBs et de leurs effets dans certains tissus oculaires dont le corps ciliaire, l'iris, la choroïde et le trabéculum et ce chez le porc, le bovin, le primate et l'humain (Yazulla, 2008).

Également, les niveaux d'AEA et de 2-AG ont été mesurés dans certains tissus oculaires de l'humain (Chen et al., 2005). Il a été découvert que les concentrations d'eCBs varient dans certaines conditions de santé, ce qui laisse suggérer qu'ils pourraient être importants dans le maintien de l'homéostasie oculaire. Par exemple, les niveaux de 2-AG sont diminués dans le corps ciliaire de patients atteints de glaucome (Chen et al., 2005).

1.4.2- Les cannabinoïdes et la vision

Il existe peu de données sur l'effet du cannabis sur la perception visuelle. Il a été rapporté que le temps de rétablissement après un éblouissement pouvait être prolongé par la prise de Δ^9 -THC (Adams et al., 1978). La consommation aiguë de marijuana peut également causer une réduction de l'acuité visuelle et altérer la vision des couleurs (Dawson, Jimenez-Antillon, Perez, & Zeskind, 1977; Kiplinger, Manno, Rodda, & Forney, 1971). Une étude a rapporté des effets anecdotiques observés chez des pêcheurs jamaïcains consommant du cannabis afin d'améliorer leur vision nocturne (West, 1991). Ces résultats ont été corroborés par une autre étude ayant mesuré précisément la vision nocturne chez des pêcheurs marocains utilisant le cannabis pour mieux voir durant la nuit (Russo, Merzouki, Mesa, Frey, & Bach, 2004). Les auteurs ont noté des améliorations de la vision nocturne suite à l'administration de Δ^9 -THC ou de cannabis. Ils croient également que ces effets sont dose-dépendants et sont causés au niveau de la rétine.

1.4.3- Les cannabinoïdes et les aires visuelles supérieures

Des études récentes montrent l'effet de l'activation ou de l'inhibition du récepteur CB1 sur la plasticité durant le développement dans l'aire visuelle primaire (V1) (Jiang, Huang, et al., 2010; Jiang, Sohya, Sarihi, Yanagawa, & Tsumoto, 2010). Une autre étude a, pour la première fois, montré l'effet des cannabinoïdes sur l'activité du CGL (Dasilva, Grieve, Cudeiro, & Rivadulla, 2012). Les auteurs de cette étude ont démontré que le récepteur CB1 maintenait un effet modulateur sur l'information visuelle qui est envoyée vers l'aire V1. Tout récemment, une étude a montré la présence du récepteur CB1 dans les couches II/III de l'aire V1 de la souris (Yoneda et al., 2013). Les auteurs ont également déterminé que le récepteur CB1 y était plus exprimé au cours du développement et que la distribution laminaire du récepteur CB1 apparaissait vers le 20^e jour postnatal (P20) et demeurait la même jusqu'à l'âge adulte.

1.4.4- Les cannabinoïdes et la rétine

1.4.4.1- Les eCBs et leurs enzymes de synthèse et de dégradation

La présence des deux principaux eCBs a été rapportée par plusieurs études dans la rétine de bovins (Bisogno, Delton-Vandenbroucke, Milone, Lagarde, & Di Marzo, 1999), de rongeurs (Straiker, Stella, et al., 1999) et d'humains (Chen et al., 2005). Les quantités de 2-AG et d'AEA rapportées varient entre 1400 et 3000 pmol/g et 4,5 à 100pmol/g selon les espèces, respectivement.

La localisation des enzymes DAGL α et β a été effectuée par Hu et al. (2010) chez la souris. Les auteurs ont noté que l'enzyme DAGL α est présente dans les deux couches synaptiques de la rétine. Elle s'exprime intensément dans les dendrites de cellules bipolaires OFF liées aux cônes. Les auteurs rapportent que cette enzyme est aussi présente dans les dendrites d'autres cellules bipolaires, mais sans en préciser le type. L'enzyme DAGL α est également présente dans l'IPL, mais il n'est pas spécifié dans quels types de neurones elle est exprimée. Finalement, les auteurs ont établi que l'enzyme DAGL β est présente exclusivement dans les vaisseaux sanguins de la rétine.

L'enzyme FAAH a été localisée par plusieurs groupes de recherche dans la rétine de rongeurs (Hu et al., 2010; Yazulla, Studholme, McIntosh, & Deutsch, 1999; Zabouri, Ptito, Casanova, & Bouchard, 2011) et de primates (Bouskila et al., 2012). L'étude de Zabouri, Ptito, Casanova et Bouchard (2011) s'est intéressée à la distribution rétinienne de l'enzyme FAAH au cours du développement postnatal du rat. Les auteurs ont observé que l'enzyme est présente dans les cellules ganglionnaires et amacrines cholinergiques à P1. Au cours du développement, l'enzyme apparaît transitoirement dans les cônes, les cellules horizontales et bipolaires. Enfin, chez l'animal adulte, l'enzyme FAAH est présente dans les cônes, les cellules bipolaires des bâtonnets et quelques cellules ganglionnaires.

L'enzyme MGL a également été localisée dans la rétine par quelques groupes de recherche (Hu et al., 2010; Yazulla, 2008). L'étude de Yazulla (2008) conclut que l'enzyme MGL est exprimée dans les cellules bipolaires ainsi que dans certaines cellules ganglionnaires de la rétine de souris. L'étude de Hu et al. (2010) a également

été réalisée chez la souris et donne davantage de détails en localisant l'expression de l'enzyme MGL au niveau des sphérules des bâtonnets et des pédicules des cônes. Les auteurs notent également un marquage dans l'IPL formant deux strates qui ne colocalisent pas avec les synapses des cellules amacrines GABAergiques. Les cellules ganglionnaires expriment également l'enzyme MGL.

L'expression de l'enzyme Abhd6 a également été étudiée par Hu et al. (2010). Les auteurs ont localisé l'enzyme dans les cellules amacrines GABAergiques, les cellules ganglionnaires de même que leurs dendrites et dans les dendrites des cellules amacrines déplacées.

1.4.4.2- Les récepteurs aux cannabinoïdes

L'expression du récepteur CB1 a été étudiée chez plusieurs espèces animales à l'aide de plusieurs techniques telles que l'hybridation *in situ*, la réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-PCR), l'immunobuvardage et l'immunohistochimie. Buckley et al. (1998) ont été les premiers à montrer la présence de l'ARNm du récepteur CB1 dans la rétine de rats. Ils ont noté son expression dans le GCL et l'INL. D'autres équipes de chercheurs ont par la suite caractérisé l'expression du récepteur CB1 dans la rétine (Bouskila et al., 2012; Hu et al., 2010; Straiker, Maguire, et al., 1999; Straiker, Stella, et al., 1999; Straiker & Sullivan, 2003; Yazulla et al., 1999; Yazulla, Studholme, McIntosh, & Fan, 2000).

L'étude réalisée par Zabouri, Bouchard et Casanova (2001) s'est intéressée à l'expression et à la distribution du récepteur CB1 au cours du développement postnatal. Ces auteurs ont observé la présence du récepteur CB1 dans plusieurs types cellulaires à P1, dont les cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales et mitotiques. Le récepteur CB1 est également présent au cours du développement postnatal dans les cônes et les cellules bipolaires. Chez l'animal adulte, le récepteur CB1 est présent dans les cônes, les cellules horizontales, amacrines et ganglionnaires.

Les recherches portant sur la localisation du récepteur CB2 ont été moins nombreuses que celles portant sur le récepteur CB1. Dans un premier temps,

Buckley, Hansson, Hasta et Mezey (1998) rapportent que l'ARNm du récepteur CB2 n'est pas présent dans la rétine au cours du développement embryonnaire du rat.

Une étude subséquente découvre que l'ARNm du récepteur CB2 est présent dans la rétine de souris adulte (Lu et al., 2000). Les auteurs notent que le récepteur CB2 est distribué dans la GCL, l'INL et dans les segments internes des photorécepteurs.

Récemment, une étude s'est intéressée à la présence du récepteur CB2 dans la rétine de rat adulte, mais en utilisant plutôt la technique d'immunohistochimie (Lopez et al., 2011). L'expression du récepteur CB2 se retrouve dans la GCL, l'INL, l'IPL et l'ONL. En se basant sur la localisation et la morphologie des corps cellulaires, les auteurs avancent que le récepteur CB2 serait exprimé dans les segments internes des photorécepteurs, les cellules horizontales, amacrines, amacrines déplacées et ganglionnaires.

Le récepteur CB2 a également été étudié dans la rétine de primates par Bouskila, Javadi, Casanova, Ptito et Bouchard (2013). Les auteurs ont observé que le récepteur CB2 est exclusivement présent dans les cellules de Müller, chez le singe Vervet adulte.

Par contre, la majorité des études décrivant la distribution anatomique du récepteur CB2 sont ternies par le manque de contrôles appropriés pour vérifier la fiabilité des anticorps utilisés pour marquer ce récepteur. Ainsi, l'expression du récepteur CB2 dans le SNC fait l'objet d'un débat intense (Ashton, 2012; Atwood & Mackie, 2010). Les techniques utilisées afin d'analyser la validité des anticorps contre des protéines membranaires telles que le récepteur CB2 feront l'objet d'une section subséquente de cette introduction.

1.4.4.3- La fonction des cannabinoïdes dans la rétine

Fan et Yazulla (2003) rapportent un effet biphasique de la réponse des cônes suite à une exposition avec l'agoniste des récepteurs cannabinoïdes WIN55212-2. Ces auteurs mettent en évidence une augmentation des courants potassiques, chloriques et calciques dans les cônes lorsqu'ils sont exposés à une faible

concentration de cet agoniste. Par contre, lorsqu'exposés à des concentrations supérieures, ces mêmes courants sont inhibés.

Straiker et Sullivan (2003) ont obtenus des résultats similaires à ceux énumérés ci-dessus. Ces auteurs démontrent que la réponse des bâtonnets et des cônes au WIN55212-2 est différente. En effet, les courants calciques sont inhibés dans les cônes, alors qu'ils sont augmentés dans les bâtonnets. Les courants potassiques sont diminués dans les cônes et les bâtonnets. Les auteurs suggèrent également que l'effet opposé observé sur les courants calciques et potassiques dans les bâtonnets cause une augmentation de la relâche synaptique qui diminue la sensibilité rétinienne.

Fan et Yazulla (2007) notent une inhibition rétrograde de la relâche synaptique médiée par les cellules bipolaires, au niveau des cônes. De plus, leurs données suggèrent que ce mécanisme est dépendant du calcium et que les cellules bipolaires relâchent du 2-AG à partir de leurs dendrites. Cette relâche s'effectue par deux mécanismes différents : le premier étant dépendant du voltage puisqu'il est activé par la dépolarisation des cellules bipolaires ON en réponse à la lumière et le second impliquerait l'action du récepteur mGluR1.

Straiker et al. (1999) démontrent que l'agoniste WIN55212-2 inhibe les courants calciques provenant des canaux calciques de type L dans les cellules bipolaires. De plus, Yazulla, Studholme, McIntosh et Fan (2000) ont établi que les courants potassiques sont inhibés dans les cellules bipolaires ON suite à l'exposition avec l'agoniste WIN55212-2.

Warrier et Wilson (2007) rapportent que l'activation du récepteur CB1 cause une augmentation de la relâche synaptique spontanée dans certaines cellules amacrines GABAergiques embryonnaires. Lalonde, Jollimore, Stevens, Barnes et Kelly (2006) montrent que l'activation du récepteur CB1 cause une diminution des courants calciques dans les cellules ganglionnaires et diminue ainsi l'excitabilité de ces cellules. Enfin, Middleton et Protti (2011) rapportent que l'administration de l'agoniste WIN55212-2 altère la transmission synaptique spontanée émanant des cellules ganglionnaires.

Mises ensemble, ces études montrent que le système eCB est fortement impliqué dans la fonction rétinienne. Il agit sur plusieurs neurones de la rétine et sur plusieurs systèmes de neurotransmission. Ces résultats suggèrent notamment que le système eCB pourrait jouer un rôle dans la maturation développementale des connexions synaptiques de la rétine et que les cannabinoïdes exogènes semblent être en mesure de perturber l'activité rétinienne et ainsi modifier la vision.

Bien que plusieurs études se soient intéressées à la réponse des divers types cellulaires de la rétine en présence de composés cannabinoïdes, aucune d'entre elles n'a étudié l'apport du système endocannabinoïde au fonctionnement global de la rétine. C'est dans cette optique qu'une partie de ce mémoire s'est consacrée à l'étude de la fonction rétinienne chez des animaux dont les récepteurs CB1 ou CB2 ont été inactivés. Cette partie fera l'objet du Chapitre 4.

Étant donné que l'étude des récepteurs CB1 et CB2 dans la rétine nécessitait de caractériser leur distribution anatomique, et qu'un débat intense concernant la spécificité des anticorps utilisés pour localiser le récepteur CB2 règne dans la communauté scientifique, nous nous devons de prouver la spécificité des anticorps utilisés. C'est pourquoi, l'étude de l'apport du système eCB dans la fonction rétinienne est précédée par une étude comparant la spécificité de plusieurs anticorps ciblant le récepteur CB2 dans la rétine. Les principes théoriques de la validation des anticorps seront traités dans la prochaine partie de l'introduction.

1.5- La validation des anticorps

La distribution tissulaire et cellulaire d'une protéine peut fournir d'importantes indications sur son rôle fonctionnel. Étant donné que les niveaux d'ARNm ne reflètent pas nécessairement l'expression protéique et qu'ils n'indiquent pas la distribution subcellulaire d'une protéine donnée, les études anatomiques doivent inclure des techniques ciblant les protéines, telles que les immunoessais (de Sousa Abreu, Penalva, Marcotte, & Vogel, 2009). Les anticorps font maintenant partie des outils les plus utilisés en recherche, que ce soit pour effectuer un immunobuvardage, une immunoprécipitation, une méthode immuno-enzymatique ELISA, une

immunofluorescence quantitative ou une immunohistochimie. Ainsi, la spécificité des anticorps utilisés pour ces études devient un facteur prépondérant par rapport à la fiabilité de ces techniques.

1.5.1- La synthèse d'un anticorps

Les anticorps sont des protéines de la famille des immunoglobulines sécrétées par des lymphocytes B, après activation par un antigène étranger. Les anticorps sont caractérisés par leur habileté à se lier spécifiquement aux antigènes qui ont induit leur production. La réponse polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités épitopiques. Les anticorps polyclonaux reconnaissent donc des épitopes différents d'un même antigène. Inversement, les anticorps monoclonaux sont issus d'un même clone et sont donc spécifiques pour un seul épitope pour lequel ils ont une affinité déterminée.

1.5.1.1- La production des anticorps polyclonaux

La méthode courante pour produire les anticorps polyclonaux est l'immunisation de l'animal avec des préparations antigéniques, souvent combinées à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. On prélève des échantillons de sang pour évaluer le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, on effectue une saignée et on récupère l'antisérum à partir duquel on peut purifier les anticorps. Il n'existe pas une technique standardisée de production d'anticorps polyclonaux, mais des principes généraux bien établis fondés sur l'expérience (voir pour revue Walker (1984).

De courts peptides synthétiques sont utilisés afin de générer des anticorps polyclonaux spécifiques. Le principal avantage à l'utilisation des peptides synthétiques est qu'une quantité illimitée d'antigène pur peut être utilisée pour immuniser l'animal. Cette approche inclut la synthèse de courtes séquences peptidiques, à les coupler à une molécule transporteuse et à immuniser l'animal désiré avec cette molécule. L'avantage des anticorps produits à partir de peptides synthétiques est qu'ils peuvent être préparés rapidement, après avoir déterminé

quelle région de la protéine serait ciblée. Le principal désavantage de cette technique est que les anticorps produits risquent de ne pas être en mesure de reconnaître la protéine visée sous sa forme native (voir pour revue Dryer et Lata (1989)).

Les anticorps polyclonaux sont relativement peu coûteux à produire. Cependant, la spécificité de l'anticorps n'est pas nécessairement très forte. Pour éviter que cette préparation ne donne des réactions croisées, l'anticorps doit être purifié, notamment par chromatographie d'affinité. De plus, pour augmenter la spécificité de l'anticorps, il est primordial que l'antigène injecté soit le plus pur possible.

1.5.1.2- Les anticorps monoclonaux

À l'inverse, les anticorps monoclonaux sont produits par un clone unique de cellules, toutes les molécules d'anticorps appartenant ainsi au même isotype et possédant des sites de liaison antigénique identiques. Les anticorps monoclonaux sont produits à grande échelle à partir de cellules hybrides, dérivées d'une cellule productrice d'anticorps unique qui a été fusionnée avec une cellule tumorale. La lignée cellulaire d'hybridome ainsi obtenue peut être maintenue en culture indéfiniment, tout en servant de source d'anticorps (Parham & Janeway, 2009).

Lorsque les anticorps monoclonaux furent disponibles, plusieurs chercheurs ont cru qu'ils seraient hautement spécifiques et conséquemment, supérieurs aux anticorps polyclonaux. Par contre, la supériorité des anticorps monoclonaux dépend grandement de l'usage qui en découlera. Car non seulement les anticorps monoclonaux peuvent réagir face à des antigènes non-spécifiques, mais lorsqu'ils le font, cette réaction est majeure. De plus, une grande variété d'anticorps monoclonaux peut être nécessaire avant d'identifier celui qui s'avèrera efficace pour un antigène donné. En revanche, un anticorps polyclonal peut réagir face à des antigènes non-spécifiques, mais cette réaction peut être empêchée par absorption (voir pour revue Paul (2013)).

Dans un contexte d'expérimentation, un anticorps polyclonal pourrait être plus spécifique qu'un anticorps monoclonal. C'est pourquoi la majorité des anticorps

ciblant les protéines membranaires telles que les anticorps CB1 et CB2 sont des anticorps polyclonaux.

1.5.2- La spécificité d'un anticorps

La spécificité à l'égard de leurs antigènes respectifs représente une propriété essentielle des anticorps. La spécificité d'un anticorps est définie par son habileté à différencier l'antigène contre lequel il a été produit de tout autre antigène (voir pour revue Frank (2002b)).

L'immunobuvardage est couramment utilisé en tant que première étape afin d'établir la spécificité d'un anticorps. La première indication qu'un anticorps est spécifique pour une cible particulière est l'observation d'une seule bande au poids moléculaire connu de cette protéine. La présence de plusieurs bandes ou de bandes qui ne sont pas au poids moléculaire attendu pourrait représenter la même protéine à un autre état de modification post-traductionnelle, des produits de dégradation ou une toute autre protéine.

Bien que ce type de validation soit un bon point de départ, il ne garantit qu'un anticorps donné produit des résultats précis en immunobuvardage. Si au final, on désire tester la validité de cet anticorps en immunohistochimie, il faudra démontrer que cet anticorps est aussi spécifique pour cette application. Deux moyens sont couramment utilisés afin de tester la validité d'un anticorps en immunohistochimie : la pré-incubation avec les peptides d'immunisation et les tissus provenant d'animaux « knockouts » chez qui le gène codant pour la cible d'intérêt a été enlevé ou inactivé. Une alternative commune aux tissus provenant d'animaux « knockouts » est l'utilisation de *short interfering RNA* (siRNA). Cette technique permet de transfecter une variété de types cellulaires afin de réduire l'expression d'une protéine donnée (Mannsperger et al., 2010; Moore, Speckmann, & Herzig, 2007).

1.5.2.1- L'utilisation des peptides d'immunisation

La méthode conventionnelle pour tester la spécificité d'un anticorps est de le pré-absorber avec son peptide d'immunisation (aussi connu sous le nom de

immunizing peptide ou *blocking peptide*) (Bordeaux et al., 2010). Ce peptide d'immunisation est le même que celui qui a été synthétisé afin de produire l'anticorps. L'anticorps avec et sans le peptide d'immunisation est ensuite utilisé pour marquer un tissu connu pour exprimer la protéine d'intérêt. Si l'anticorps est spécifique, l'ajout du peptide d'immunisation résultera en une perte du signal sur le tissu.

Bien que cette méthode démontre qu'un anticorps donné est spécifique pour l'antigène contre lequel il a été généré, elle ne prouve pas la spécificité de l'anticorps étant donné que le marquage non-spécifique de l'anticorps est aussi inhibé par l'ajout de peptide d'immunisation. Ainsi, les peptides d'immunisation ne peuvent prouver qu'un anticorps est mauvais lorsque du marquage non-spécifique est observé en présence du peptide d'immunisation. Ils ne peuvent pas prouver qu'un anticorps est spécifique.

1.5.2.2- Les tissus « knockouts »

L'utilisation adéquate de contrôles est la clé pour prouver qu'un anticorps est spécifique. Un contrôle négatif, dans lequel l'anticorps primaire n'a pas été inclus est un contrôle valable pour prouver la spécificité d'un anticorps secondaire, mais insuffisant pour démontrer la spécificité d'un anticorps primaire en immunohistochimie. Le meilleur contrôle négatif consiste en une lignée cellulaire ou un tissu dans lesquels la protéine d'intérêt n'est pas exprimée. Les tissus provenant d'animaux « knockouts » représentent donc le contrôle négatif idéal. Chez ces animaux, la séquence codante pour la protéine d'intérêt a été génétiquement inactivée. Si un anticorps est spécifique, il détectera la protéine d'intérêt chez l'animal sauvage (« wild-type »), mais pas chez l'animal « knockout » (Lorincz & Nusser, 2008).

De telles approches de validation d'anticorps n'ont pas été utilisées afin de caractériser les anticorps contre le récepteur CB2. Ainsi, la vaste majorité des résultats obtenus dans la littérature reposent uniquement sur des techniques de validation vieillottes et possiblement erronées. C'est pourquoi, la première partie de ce mémoire se consacre à la caractérisation de plusieurs anticorps ciblant le

récepteur CB2. Nous tenterons alors de déterminer si un ou plusieurs de ces anticorps sont spécifiques ou non.

2- Objectifs de recherche

L'implication du système eCB dans la fonction neuronale de plusieurs structures cérébrales a été démontrée par plusieurs équipes de recherche. De plus en plus d'indications suggèrent que ce système est également impliqué dans les fonctions rétiniennes. La présence du récepteur CB1 a été observée dans la rétine de plusieurs espèces, des poissons aux primates (Yazulla, 2008). Notre laboratoire a récemment montré le patron d'expression et de distribution du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH dans la rétine de rat et de singe Vervet (Bouskila et al., 2012; Zabouri, Bouchard, et al., 2011; Zabouri, Ptito, et al., 2011).

Plusieurs études se sont attardées au rôle neuronal du récepteur CB1, par contre très peu ont évalué la fonction du récepteur CB2 dans le SNC. Bien que la rétine soit située en périphérie du SNC, elle en fait intégralement partie. C'est pourquoi l'objectif principal de cette étude était d'étudier la fonction du récepteur CB2 dans la rétine de rongeur.

À notre connaissance, il n'y a que deux études qui ont rapporté la présence du récepteur CB2 dans la rétine de rongeur. Dans la première, les auteurs ont noté la présence de son ARNm dans les cellules ganglionnaires, dans l'INL et dans les segments internes des photorécepteurs (Lu et al., 2000). La seconde étude a localisé le récepteur CB2, en se fiant uniquement à la morphologie de la rétine, dans les segments internes des photorécepteurs ainsi que dans les cellules horizontales, amacrines, amacrines déplacées et ganglionnaires de la rétine de rat adulte (Lopez et al., 2011). En dépit de ces découvertes, l'expression du récepteur dans le SNC reste le sujet d'un intense débat (Ashton, 2012). Étant donné l'importance physiologique de la présence du récepteur CB2 dans les neurones, la présente recherche a pour objectif général d'étudier ce récepteur dans la rétine de rongeur.

Plus spécifiquement, nous avons tenté de caractériser la distribution spatiale du récepteur CB2 dans la rétine. Pour ce faire, nous devons dans un premier temps démontrer la spécificité d'un anticorps contre le récepteur CB2. Nous avons également étudié la fonction des récepteurs CB1 et CB2 dans la fonction rétinienne.

Nous avons utilisé plusieurs approches dont l'étude anatomique des tissus rétiniens, la biologie moléculaire, la microscopie confocale et l'électrorétinographie.

3- Article 1

Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina

Bruno Cécyre, Sébastien Thomas, Maurice Ptito, Christian Casanova, and Jean-François Bouchard

B. Cécyre

Laboratoire de Neuropharmacologie
Laboratoire des Neurosciences de la vision

S. Thomas

Laboratoire des Neurosciences de la vision

M. Ptito

Chaire Harland Sanders

C. Casanova

Laboratoire des Neurosciences de la vision

J.-F. Bouchard (Corresponding author)

Laboratoire de Neuropharmacologie
École d'optométrie, Université de Montréal,
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7
Tel: (514) 343-6111 X4083
Fax: (514) 343-2382

Ce manuscrit est sous presse dans le journal "Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology". J'ai participé à l'élaboration de l'étude, à la cueillette et à l'analyse des résultats de même qu'à l'écriture du manuscrit.

Running title: Testing the specificity of CB2R antibodies

3.1- Abstract

Cannabinoid receptors (CB1R and CB2R) are among the most abundant G protein-coupled receptors in the central nervous system. The endocannabinoid system is an attractive therapeutic target for immune system modulation and peripheral pain management. While CB1R is distributed in the nervous system, CB2R has traditionally been associated to the immune system. This dogma is currently a subject of debate since the discovery of CB2R expression in neurons using antibody-based methods. The localization of CB2R in the Central Nervous System (CNS) could have a significant impact on drug development because it would mean that, in addition to its effects on the peripheral pain pathway, CB2R could also mediate some central effects of cannabinoids. In an attempt to clarify the debate over CB2R expression in CNS, we tested several commercial or academic produced CB2R antibodies using western blot and immunohistochemistry on retinal tissue obtained from wild-type mice and mice lacking CB2R (*cnr2^{-/-}*). One of the antibodies tested exhibited a valuable specificity, as it marked a single band near the predicted molecular weight in western blot and produced no staining in *cnr2^{-/-}* mice retinal sections. The other antibodies tested detected multiple bands in western blot, and labeled unidentified proteins when used with their immunizing peptide or on *cnr2^{-/-}* retinal sections. We conclude that many commonly used antibodies raised against CB2R are not specific for use in immunohistochemistry, at least in the context of the mouse retina. Moreover, some of them tested presented significant lot-to-lot variability. Hence, caution should be used when interpreting prior and future studies using CB2R antibodies.

Keywords: CB2R, Antibodies, CNS, Knockout, Specificity, Retina

3.2- Introduction

Accurate tissue and cellular distributions of a protein can provide insight on its functional role. Because mRNA levels are not always good predictors of protein expression and do not inform on cellular and subcellular distribution of proteins (de Sousa Abreu et al., 2009), localization studies must include protein targeted techniques, such as immunoassays. Thus, the specificity of antibodies becomes a critical factor governing the reliability of such assays. The most common strategy to generate antibodies against G-protein coupled receptors (GPCRs) consists in the selection of antigens of 10 to 40 amino acids, from peptide sequences in GPCRs domains excluding the cellular membrane (N or C-terminus domains or intracellular loops). This peptide is then synthesized and injected in a host animal, from which serum is collected and purified in order to obtain a GPCR antibody (Hanly, Artwohl, & Bennett, 1995). This strategy has proven successful for the study of some GPCRs and their function (Michel, Wieland, & Tsujimoto, 2009).

The conventional method to test the specificity of an antibody is to pre-adsorb it with its synthetic immunizing peptide and examine the remaining immunoreactivity. Although this method demonstrates the specificity of an antibody for its immunogen, it does not rule out the possibility of off-target labeling with “undesired” proteins that share sequence homology with the immunogen. Thus, an antibody that binds to its peptide antigen might not be specific to its target protein exclusively. Numerous reports have been published using antibodies that were validated with such an approach. Hence, many of these publications might have reported invalid information since peptide pre-adsorption was the sole confirmation method used to test for antibody specificity. Currently, the best way to test for the specificity of GPCR antibodies with high confidence is through the use of tissues from which the expression of the protein of interest has been silenced, either by RNAi technologies or by genetic mutations.

Of the many signaling systems involving GPCRs, one that would benefit from more cautious antibody testing is the endocannabinoid system. This complex neuromodulatory system consists of cannabinoid receptors, their endogenous

ligands, named endocannabinoids (eCBs), and enzymes responsible for their synthesis and degradation (Pertwee et al., 2010). The cannabinoid receptor type 1 (CB1R) has been extensively studied and its abundant distribution in the CNS has been extensively described (Herkenham et al., 1991). Since its discovery, the cannabinoid receptor type 2 (CB2R) was identified as the “peripheral cannabinoid receptor” because it had been first localized in many immune structures (Buckley et al., 2000; Munro et al., 1993). However, recent reports suggest that CB2R may be also expressed in neurons (Ashton, Friberg, Darlington, & Smith, 2006; Gong et al., 2006; Suárez et al., 2008; Van Sickle et al., 2005), although the extent of neuronal expression of CB2R is controversial since many of these studies lacked appropriate controls (Atwood & Mackie, 2010).

There is increasing indications that the eCB system is implicated in retinal functions, where its activation would likely generate most of the visual effects associated with cannabis consumption. The presence of CB1R was shown in several species from fishes to primates, (reviewed in Yazulla, 2008). Its activation affects several retinal process such as cone photoreceptors’ response to light and glutamate synaptic release (Fan & Yazulla, 2003, 2007; Straiker & Sullivan, 2003), inhibition of calcium and potassium rectifying currents in bipolar cells (Straiker, Stella, et al., 1999; Yazulla et al., 2000) and modulation of GABA release from amacrine cells (Warrier & Wilson, 2007). A few studies also reported the presence of CB2R in the rodent retina. Lu et al. (2000) observed the presence of CB2R mRNA in the ganglion cell layer, the inner nuclear layer and the inner segments of photoreceptor cells. Lopez et al. (2011), using immunohistochemistry techniques, localized CB2R in the inner segment of photoreceptors, horizontal, amacrine, displaced amacrine and ganglion cells of the adult rat retina. Despite these findings, CB2R expression in the CNS is subject to an intense debate (Ashton, 2012). Given the physiological importance of the presence of CB2R in neurons, we systematically tested the specificity of a library of antibodies raised against different epitopes of the CB2R for use in immunohistochemistry in the mouse retina.

3.3- Methods

Animals and tissue preparation

All procedures were performed in accordance with the guidelines set out by the Canadian Council on Animal Care and were approved by the ethics committee on animal research of the Université de Montréal. CB2R mutant (*cnr2^{-/-}*) and wild-type (*cnr2^{+/+}*) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). These colonies were maintained in-house and kept under a normal lighting environment (12 hours dark/12 hours light).

Mice were euthanized by isoflurane overdose. One eye was immediately removed for western blot analysis. The retina was dissected on ice, promptly frozen, and kept at -80°C until further processing. Subsequently, a transcardiac perfusion was conducted with phosphate-buffered 0.9% saline (PBS; 0.1M, pH 7.4), followed by phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (PFA), until the head was lightly fixed. Two small holes were made in the cornea, prior to a first postfixation in PFA for a period of 30 minutes. The cornea and lens were then removed and the eyecups were subsequently postfixed for 30 minutes in PFA. Several fixation times and protocols were tested, and this method provided the optimal signal-to-noise ratio. The eyecups were washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in Neg 50 tissue embedding medium (Fisher Scientific, Ottawa, ON), flash-frozen and kept at -80°C until processing. Sections (14 µm thick) were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Exton, PA) and mounted on slides coated with gelatin/chromium (double-frosted microscope slides, Fisher Scientific, Ottawa, ON).

Western blot

Retinas from wild-type mice were homogenized on ice in Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) lysis buffer (150mM NaCl, 20mM Tris, pH 8.0, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM EDTA), supplemented with a protease inhibitor mixture (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin - 1µg/ml- and Phenylmethylsulfonyl fluoride - 0.2mg/ml -; Roche Applied Science, Laval, QC). Thirty micrograms of protein/sample of the homogenate were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred

onto a nitrocellulose membrane. The blocking solution and antibody dilution solution were both 5% skim milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20. After blocking, membranes were incubated overnight with various affinity-purified CB2R antibodies at 4°C (see Table 1 for details). The following day, membranes were exposed to the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Detection was carried out using homemade enhanced chemiluminescent (ECL) western blot detection reagents (final concentrations: 2.5mM luminol, 0.4mM p-coumaric acid, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 0.018% H₂O₂).

Immunohistochemistry

Frozen sections from wild-type and *cnr2*^{-/-} mice were washed in PBS, postfixed for 10 minutes in cold acetone, rinsed in PBS with 0.03% Triton X-100, and blocked in 1% bovine serum albumin, 0.02% bovine gelatin and 0.5% Triton X-100 diluted in PBS for 1 hour. The sections were incubated overnight with antibodies directed against CB2R (see Table 1 for details). The sections were then washed in PBS, blocked for 30 minutes, and incubated for 1 hour with Alexa Fluor donkey anti-rabbit 647 secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR). After washes, the sections were mounted with a homemade PVA-Dabco mounting medium. The sections were examined with a confocal scanning microscope (TCS SP2, Leica Microsystems), with a 40X oil immersion objective (NA: 1.25). Image stacks (1,024 X 1,024 pixels x 0.5µm per stack) were captured using the LCS software (version 2.6.1; Leica Microsystems). Offline processing was done with the Fiji software (Schindelin et al., 2012). Gaussian noise from images was partially removed using the PureDenoise plugin for Fiji (Luisier & Blu, 2008) and stacks were collapsed by maximal intensity projection.

Antigen retrieval

Different tissue processing techniques were tested in order to get the best detection of the antigen in immunohistochemistry. A simple antigen-retrieval protocol for cryostat frozen sections was tried for all antibodies, based on the methods

described by Brown et al. (1996). Briefly, the sections were immersed in 1% SDS solution for 5 minutes at room temperature. Then, they were rinsed and the immunohistochemical staining steps were completed as described previously. We did not observe any enhancement in the immunoreactivity (data not shown).

Blocking peptides

When available, we used the supplier's blocking peptides. For one antibody (PA1-746), a custom peptide sequence was ordered from W.M. Keck Biotechnology Resource Laboratory (Yale University, New Haven, CT). The crude peptide was produced specifically to match the antibody's immunogen (amino acids 1 to 32 of rat CB2), with a N-terminus acetyl cap and a C-terminus CONH₂ cap.

3.3- Results

We have tested anti-CB2R commercial antibodies from Cayman Chemical (101550), Pierce Biotechnology (PA1-746), Alpha Diagnostic (CB22-A) and Sigma-Aldrich (SAB2500191), as well as two CB2R antibodies kindly provided by Pr. Ken Mackie (KMCB2-CT and KMCB2-NT, Indiana University, Bloomington, IN), for use in immunohistochemistry using *cnr2*^{-/-} mice. All antibodies used in this study were polyclonal raised against a portion of N-terminus or C-terminus epitopes of CB2R (Table 1).

Western blot

The potential selectivity of the various antibodies was first tested using western blot assays. The 101550 antibody, directed against the N-terminus epitope of the human CB2R, labeled a single band at around 45 kDa in wild-type mice retina homogenates (Fig. 1a). This labeling was lost when the antibody was pre-incubated with its immunizing peptide. However, a band at around 45 kDa was detected in *cnr2*^{-/-} retina lysate. The PA1-746 antibody, raised against the N-terminus portion of the rat CB2R, also detected two bands at around 30 and 45 kDa (Fig. 1b). No band was visible when this antibody was pre-adsorbed with its blocking peptide. The same two

bands were observed in *cnr2^{-/-}* tissues. No immunoreactivity was found when testing the CB22-A antibody, directed against the C-terminus fragment of the rat CB2R (Fig. 1c) and, expectedly, no band was observed when the antibody was pre-incubated with its blocking peptide and in *cnr2^{-/-}* tissues. The KMCB2-CT antibody, raised against the C-terminus part of the rat CB2R, labeled at least six bands ranging from 35 to 100 kDa (Fig. 1d) in both *cnr2^{+/+}* and *cnr2^{-/-}* retinas. The KMCB2-NT antibody, directed against the N-terminus epitope of the rat CB2R, detected six bands from 25 to 150 kDa (Fig. 1e) in both *cnr2^{+/+}* and *cnr2^{-/-}* tissues. The SAB2500191 antibody, raised against the C-terminus epitope of the human CB2R, marked six bands from 28 to 45 kDa (Fig. 1f) in both *cnr2^{+/+}* and *cnr2^{-/-}* retina lysates. Thus, of all antibodies tested, only the 101550 antibody resulted in the detection of a single band on wild-type mice retina homogenates. However, all antibodies showed immunoreactivity when tested against *cnr2^{-/-}* retinal tissue extracts.

Immunohistochemistry

Although western blot assays gave some insights on the antibodies' specificity on retinal extracts towards highly denatured proteins, the ultimate goal of this study was to find an adequate antibody to perform immunohistochemistry on retinal tissue sections. Immunohistochemistry performed with the 101550 antibody using wild-type (*cnr2^{+/+}*) mice retina labeled the outer nuclear layer (ONL), outer plexiform layer (OPL), inner nuclear layer (INL), inner plexiform layer (IPL) and ganglion cell layer (GCL; Fig. 2a). When this antibody was pre-adsorbed with its blocking peptide, no immunoreactivity was visible (Fig. 2b). Furthermore, no staining was observed with *cnr2^{-/-}* tissues (Fig. 2c). The PA1-746 antibody labeled the ONL, OPL and IPL in wild-type mice (Fig. 2d). However, we observed the same distribution pattern when the antibody was used with its immunizing peptide (Fig. 2e). No signal was detected in the *cnr2^{-/-}* mice (Fig. 2f). The CB22-A antibody failed to detect CB2R in wild-type mice (Fig. 2g), showed weak unspecific signal when pre-incubated with its blocking peptide (Fig. 2h) and did not label CB2R in *cnr2^{-/-}* mice (Fig. 2i). The KMCB2-CT antibody marked the ONL, OPL and the IPL in wild-type mice (Fig. 2j). When applied with its

immunizing peptide, no staining was visible (Fig. 2k). However, a strong staining was observed in the *cnr2*^{-/-} mice (Fig. 2l). The KMCB2-NT antibody labeled the ONL, INL, IPL and GCL in wild-type mice (Fig. 2m). Immunoreactivity was detected when this antibody was pre-adsorbed with its blocking peptide (Fig. 2n) or tested in *cnr2*^{-/-} mice (Fig. 2o). The SAB2500191 antibody labeled the external segments of photoreceptor cells, the ONL, OPL, INL, IPL and GCL in wild-type mice (Fig. 2p). The same immunoreactivity was detected when this antibody was tested in *cnr2*^{-/-} mice (Fig. 2q). Note that the blocking peptide is not commercially available for this antibody. Thus, of all antibodies, only the 101550 did not detect CB2R when incubated with its immunizing peptide and when tested against *cnr2*^{-/-} mice retinal sections.

Lot-to-lot variability

An important aspect for antibody validation is reproducibility. Under our protocols, we noticed that some commercially available antibodies showed inconsistent results in western blot. For example, a lot of 101550 antibody detected two bands at around 50 and 150 kDa (Fig. 3a) instead of a single band at around 45 kDa, as shown in Fig. 1a. We noted only one inconsistent lot of 101550 antibody out of 10 different lots ordered since 2006. Moreover, a lot of PA1-746 antibody labeled 6 bands ranging from 30 to 90 kDa approximately (Fig. 3b) rather than two bands at around 30 and 45 kDa, previously shown in Fig. 1b. These results highlight the importance of testing the specificity of every new antibody lot.

3.5- Discussion

We have tested the specificity of several CB2R antibodies that are currently available from commercial or academic sources using their specific immunizing peptides and *cnr2*^{-/-} mice as negative controls. We have chosen to test these antibodies in the context of the rodent retina because the eCB system is known to exert its effects in this structure and because the presence of CB2R in CNS neurons is controversial (Ashton, 2012). We report that many frequently used antibodies

raised against CB2R are not specific for use in immunohistochemistry, at least in the context of the mouse retina.

The main objective of this study was to compare different CB2R antibodies in the context of the mouse retina. It has to be noted that none of the antibodies tested was generated against mouse CB2R protein as they were either generated against rat or human CB2R. To our knowledge, there is no antibody generated against mouse CB2R protein. However, rat and mouse CB2R share more than 83% homology while human and mouse share 82% (Shire et al., 1996). Furthermore, rat and mouse CB2R share 86% amino acid identity and 92% similarity in their N-terminus, while they share 81% identity and 88% similarity in their C-terminus (Brown, Wager-Miller, & Mackie, 2002). Moreover, the overlap between the target region in mouse and the immunogen for each antibody are shown in Table 2. Most of the antibodies share more than 85% in homology with the mouse CB2R protein. For these reasons, we believe that the antibodies used in this study had the potential to label adequately CB2R protein in the mouse retina.

Western blot

Western blot is typically the first validation step to establish an antibody's specificity for immunochemistry purposes. The first sign that an antibody is specific for a particular target would be the observation of a single band at the protein's known molecular weight. The 101550 antibody generated promising results in western blot as it detected a single band at around 45 kDa near the predicted molecular weight of CB2R (40 kDa). A few reports raise the presence of a glycosylated form of CB2R at around 46 kDa and a non-glycosylated form of CB2R at around 41 kDa (Filppula et al., 2004). Thus, the 45 kDa band observed with the 101550 antibody under our conditions could represent a glycosylated form of CB2R. The other antibodies either failed to detect CB2R (CB22-A) or labeled several bands (PA1-746, KMCB2-CT, KMCB2-NT and SAB2500191). The presence of multiple bands or a band at an incorrect molecular weight could represent totally different proteins, degradation products or the desired target at different post-translational modification steps

(Bordeaux et al., 2010). However, to our knowledge, no post-translational modification has been reported for CB2R that could give rise to the multi-bands western blot profiles observed.

Additionally, consistent molecular weight for CB2R has been reported across many tissues and species: the rat brain and spinal cord (Cox, Haller, & Welch, 2007; Gong et al., 2006; Ramirez et al., 2012) (Merriam, Wang, Guerios, & Bjorling, 2008; Walczak, Pichette, Leblond, Desbiens, & Beaulieu, 2005, 2006), the human or mice cultured podocytes (Barutta et al., 2011) and in the vervet monkey retina (Bouskila et al., 2013).

Surprisingly, all the antibodies tested showed immunoreactivity with *cnr2*^{-/-} retinal extracts. This implies that none of these antibodies is specific for CB2R in western blot. These results support the idea that the specificity of an antibody highly depends on the experimental context in which it is being used ((Cernecka, Ochodnický, Lamers, & Michel, 2012).. For example, an antibody could be suitable for immunohistochemistry while it may completely lack specificity for western blot. This could be explained by differences in the conformation of the epitopes under various experimental conditions, resulting in different antibody specificities.

Immunohistochemistry

While the western blot is a crucial first step in antibody characterization, it does not establish antibody specificity for immunohistochemistry. Indeed, detection of the denatured, linearized protein in western blot does not guarantee the same reaction with the protein in its native configuration.

In immunohistochemistry, only the 101550 antibody yielded a strong staining in wild-type mice, as well as no unspecific signal when used with its blocking peptide or on *cnr2*^{-/-} mouse retinas. Therefore, we would only recommend the use of this antibody for immunochemistry purposes. This recommendation is supported by the fact that the retinal cellular distribution of CB2R we observed using this antibody is in agreement with CB2R mRNA expression in the GCL, the INL and in the inner segments of photoreceptors (Lu et al., 2000). It is also strengthened by the fact that

this antibody has also been validated on renal tissues from *cnr2^{-/-}* mice (Barutta et al., 2011).

Furthermore, a recent report testing different CB2R antibodies, including the 101550, in the brain using the knockout control test concluded that none of the antibodies tested are specific (Baek, Darlington, Smith, & Ashton, 2013). An important factor can explain the differences between this study and ours: Baek et al. (2013) tested the CB2R antibodies in the context of the brain. The brain is a complex and heterogeneous cellular composition relatively to other tissues, such as the retina. Thus, non-specific interactions and background issues are more important in the brain. These results suggest that the 101550 antibody is only specific to the mouse retina.

It is evident that relying only the loss of signals with immunizing peptide or the presence of a single band in western blot are not the best methods to prove the specificity of an antibody (Michel et al., 2009). Blocking peptides do not demonstrate exclusive specificity of an antibody since off-target binding activity of the antibody to an irrelevant epitope that is structurally similar to the desired epitope will also be inhibited by pre-adsorption with the immunizing peptide. Thus, blocking peptides can show that an antibody is unspecific, when staining is seen in their presence, but they cannot prove that an antibody is specific (see for review Bordeaux *et al.*, 2010). Knockout models, in which the coding sequence of the protein of interest has been genetically deleted, thus provide very good negative controls (Lorincz & Nusser, 2008), although attention needs to be given to the portion of the gene that has been deleted.

The *cnr2^{-/-}* mouse used in this study was developed by Deltagen Inc. (San Mateo, CA, USA) and distributed by The Jackson Laboratory. It was generated by the insertion of a Neomycin coding sequence in the *cnr2* gene, leading to the deletion of sequences encoding the first 3 transmembrane domains (amino acids 26 to 140 of the mouse *cnr2* cDNA). While the coding sequence for amino acids 1 to 25 remains, it is not known if this sequence is actually translated (Monory & Lutz, 2009). Interestingly, the immunogens used to generate PA1-746 and KMCB2-NT antibodies corresponded to amino acids 1 to 32 and 1 to 30, respectively. Consequently, these

antibodies could still bind to amino acids 1 to 25 of the native protein sequence in the *cnr2*^{-/-}. 101550 antibody's immunogen is from amino acids 20 to 33. When used with *cnr2*^{-/-} sections, this antibody could bind with amino acids 20 to 25. However, studies have revealed that about 15 to 22 amino acids on the surface on the antigen make contact with a similar number of residues on the antibody's binding site (Alberts et al., 2002; Frank, 2002a; Goldsby, Kindt, Kuby, & Osbourne, 2002). Therefore, there is virtually no chance that the 101550 antibody is able to react with only six amino acids in native confirmation of the CB2R. This is exactly what was observed, as no immunoreactivity was detected in *cnr2*^{-/-} sections with the 101550 antibody. After the PGK-Neo cassette insertion, the rest of the CB2R coding region was still present in the genome. We cannot eliminate the possibility that there could be a splicing over the PGK-Neo cassette, even if it is reported to be unlikely (Monory & Lutz, 2009).

A second *cnr2* knockout mice line is also available, characterized by the ablation of C-terminus amino acids positions 217 to 347 of CB2R (Buckley et al., 2000). Because the first 216 amino acids coding for the first 5 transmembrane domains of the CB2R protein were unaffected, this mouse line could only be useful for testing antibodies raised against C-terminus epitopes of CB2R. This mouse strain was analyzed using quantitative RT-PCR and it was discovered that the promoters of *cnr2* knockout mice were still active and that a truncated version of CB2R mRNA was expressed, indicating that this mouse was an incomplete *cnr2* knockout (Liu et al., 2009).

Lot-to-lot variability

Finally, we would also recommend testing CB2R antibodies from lot to lot. Our experience is that one lot of an antibody may work fine; the next may not. This was the case for 101550 and PA1-746 antibodies, which displayed inconsistent results from one batch to another. Lot to lot inconsistency could also explain the absence of immunoreactivity of the CB22-A antibody, an antibody that was otherwise validated in C-terminus epitope *cnr2*^{-/-} mice on brainstem neurons (Van Sickle et al., 2005). This

potential discrepancy between cerebral and retinal tissues highlights the importance of thoroughly testing antibodies in the cellular context in which they will be used.

Commercial GPCR antibodies' specificity

Recently, an increasing number of studies raised concerns regarding the specificity of GPCR antibodies (Baek et al., 2013; Beermann, Seifert, & Neumann, 2012; Bodei, Arrighi, Spano, & Sigala, 2009; Cernecka et al., 2012; Grimsey et al., 2008a; Hamdani & van der Velden, 2009; Jensen, Swigart, & Simpson, 2009; Seifert et al., 2013). Since, four criteria have been proposed to demonstrate receptor antibody specificity, of which at least one of them must be met to consider an antibody to be specific (Michel et al., 2009). Firstly, the reactivity of a specific antibody must be lost upon analysis of tissues obtained from animals genetically deficient in expression of the receptor of interest. Secondly, the reactivity of a specific antibody must clearly decrease after genetic knockdown of the expression of the receptor of interest. Thirdly, the reactivity of a specific antibody must be present when analyzing cells recombinantly expressing the receptor of interest, but must be absent when analyzing closely related receptor subtypes. Finally, the reactivity of a specific antibody must be comparable to that of other antibodies recognizing different epitopes of the same receptor. The 101550 antibody meets correctly the first of these criteria, as its staining disappears in immunohistochemical studies of tissues from animals genetically engineered to lack CB2 receptor. We fully agree with some reports stating that it would be helpful to have “certified” commercial antibodies that fulfill at least one of the criteria to demonstrate sufficient specificity (Beermann et al., 2012; Michel et al., 2009; Pradidarcheep, Labruyere, Dabhoiwala, & Lamers, 2008).

Conclusion

Given that many studies using CB2R antibodies did not test their antibodies against KO tissues (Ashton et al., 2006; Benito et al., 2005; Brusco, Tagliaferro, Saez, & Onaivi, 2008; den Boon et al., 2012; Gong et al., 2006; Lopez et al., 2011; Schmidt, Schafer, Striggow, Frohlich, & Striggow, 2012; Suárez et al., 2008), their

interpretation becomes somewhat debatable given the data presented in this paper. We conclude that, at present, there is no perfectly reliable antibody-based method for CB2R detection in adult mice retina for immunohistochemistry, and a great deal of caution, together with appropriate concurrent controls must be employed in any study using CB2R antibodies. In this study, the 101550 antibody shows the most valuable specificity despite some lot to lot variability. Consequently, we suggest that this antibody can be used, with concurrent knockout controls, for immunohistochemistry expression studies.

3.6- Acknowledgements

We would like to thank Dr. Ken Mackie for kindly providing the CB2R antibodies, and constructive comments on this manuscript. This work was supported by a NSERC grant (194670-2009) to C.C., a CIHR grant (MOP 177796) and a NSERC grant (311892-2010) to J.-F.B. B.C. was supported by a Réseau Fonds de recherche Québec-Santé (FQRS) de recherche en santé de la vision studentship and J.-F.B. by a Chercheur-Boursier Junior 2 from the FRQS.

3.7- Figures

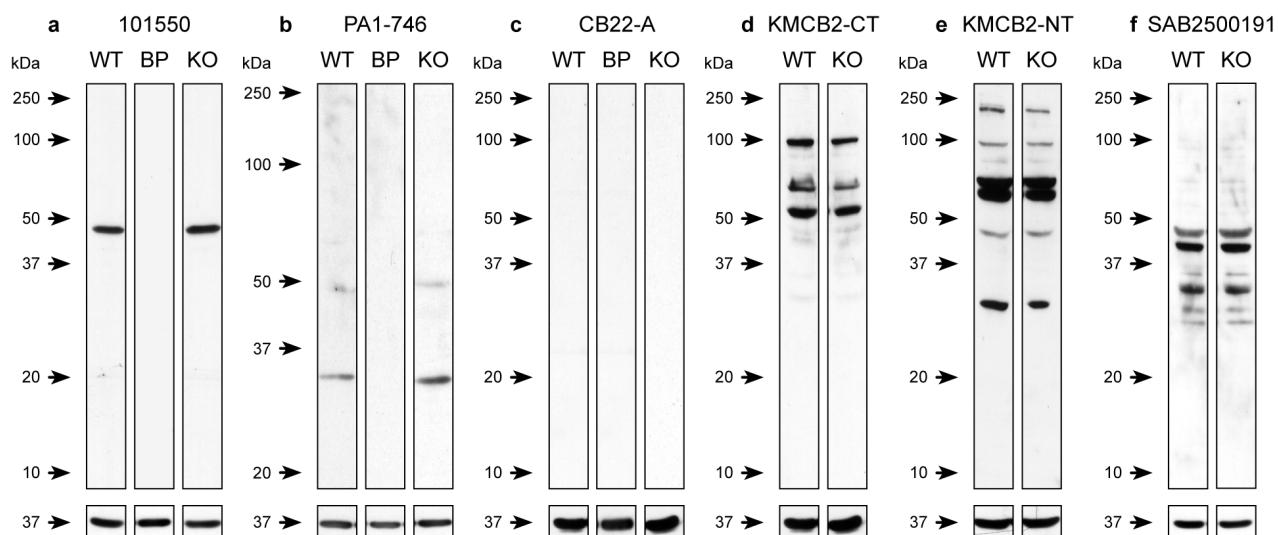


Figure 3.1 Western blots using different CB2R antibodies

101550 (a), PA1-746 (b), CB22-A (c), KMCB2-CT (d), KMCB2-NT (e), and SAB2500191 (f) antibodies were tested against retina lysate from wild-type (WT) mice with and without pre-adsorption with its blocking peptide (BP; when available) and from *cnr2^{-/-}* (KO) mice. Lower lane represents GAPDH antibody, which was used as a loading control. The arrows indicate the position of molecular weight markers.

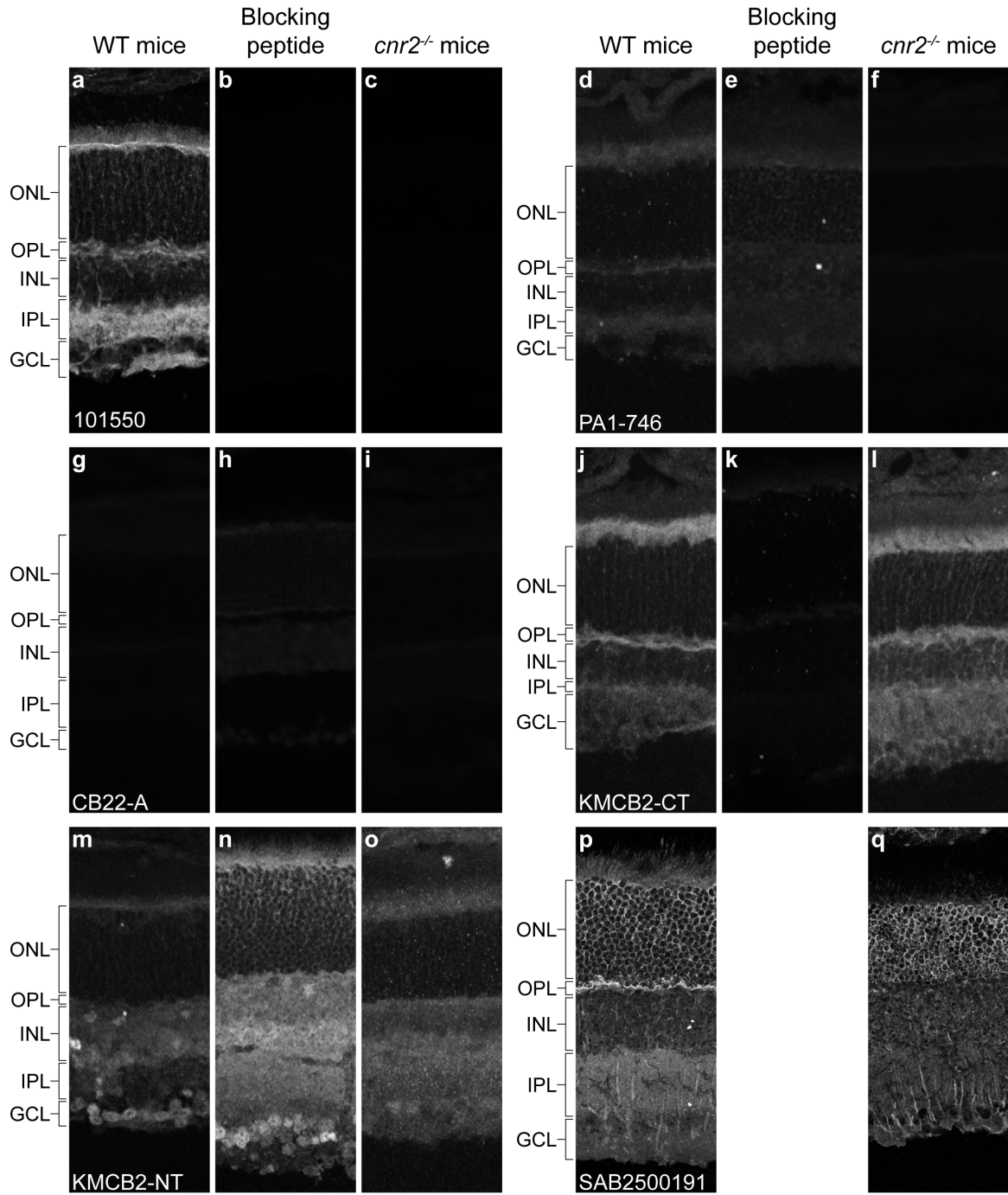


Figure 3.2 Immunohistochemical labeling obtained from CB2R antibodies on mouse retinal sections

101550 (**a-c**), PA1-746 (**d-f**), CB22-A (**g-i**), KMCB2-CT (**j-l**), KMCB2-NT (**m-o**) and SAB2500191 (**p-q**) antibodies were tested against retinal sections from wild-type mice, pre-incubated with their immunizing peptide and tested against sections from *cnr2^{-/-}* mice. (ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; scale bar = 50µm).

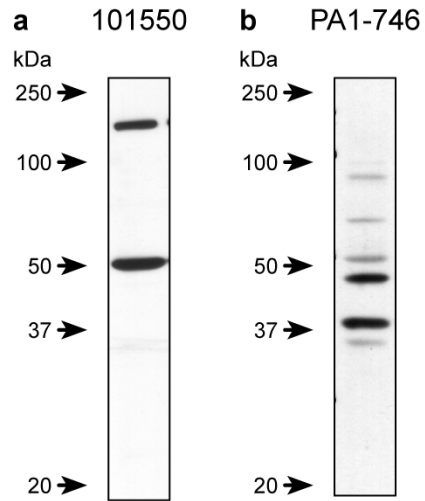


Figure 3.3 Lot to lot variability with CB2R antibodies.

The immunoreactivity of 101550 (a) and PA1-746 (b) antibodies is different from the one presented in Figure 1a-b. The arrows indicate the position of molecular weight markers.

Table 3.1 Characteristics of antibodies tested

Antibodies	Supplier	Lot number	Host species	Reactive species	Epitope	Immunogen	Dilution IB	Dilution IHC
101550	Cayman Chemical Ann Arbor, MI	0424681-1	Rabbit	Human	N-terminus	AA 20-33 (NPMKDYMILSGPQK)	1: 3,000	1: 200
PA1-746	Pierce Biotechnology Rockford, IL	ME154351	Rabbit	Rat	N-terminus	AA 1-32 (MAGCRELELTNGSNGGLEFNPMKEYMILSDAQ)	1: 1,000	1: 500
CB22-A	Alpha Diagnostic San Antonio, TX	549596A3.2	Rabbit	Rat	C-terminus	AA 328-345 (GKEEAPKSSVTETEAQVK)	1: 1,000	1: 200
KMCB2-CT	Ken Mackie Indiana University, IN	3/16/07	Rabbit	Rat	C-terminus	AA 328-342 (GKEEAPKSSVTETEA)	1: 1,000	1: 1,000
KMCB2-NT	Ken Mackie	7/29/09	Rabbit	Rat	N-terminus	AA 1-30 (MAGCRELELTNGSNGGLEFNPMKEYMILSD)	1: 1,000	1: 1,000
SAB2500191	Sigma-Aldrich Oakville, ON	6946P1	Goat	Human	C-terminus	AA 337-351 (VTETeadgKITPwPD)	1: 1,000	1: 1,000
GAPDH	Sigma-Aldrich	080M4806	Mouse	Rabbit	-	The full-length rabbit muscle GAPDH protein	1: 20,000	-

This table is based upon information provided by the respective supplier

4- Article 2

Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice

Cécyre, B.^{1, 2}, Zabouri, N.^{1, 2}, Huppé-Gourgues, F.³, Bouchard, J.-F.², Casanova, C.¹

¹Laboratoire des Neurosciences de la vision, ²Laboratoire de Neuropharmacologie,
³Laboratoire de neurobiologie de la cognition visuelle, École d'optométrie, Université
de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running Title: Role of CB1R and CB2R in the retina

Keywords: Endocannabinoids, CB1R, CB2R, ERG, Retina

Correspondence should be addressed to:

Jean-François Bouchard
Laboratoire de Neuropharmacologie
École d'optométrie, Université de Montréal,
C.P. 6128 Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-6111 X4083
Fax: (514) 343-2382

Ce manuscrit est actuellement en révision mineure par le journal "Investigative Ophthalmology & Visual Science". J'ai participé à l'élaboration de l'étude, à la cueillette et à l'analyse des résultats de même qu'à l'écriture du manuscrit.

4.1- Abstract

Endocannabinoids are important modulators of synaptic transmission and plasticity throughout the CNS. The cannabinoid receptor type 1 (CB1R) is extensively expressed in the adult retina of rodents while CB2R mRNA and protein expressions have been only recently demonstrated in retinal tissue. The activation of cannabinoid receptors modulates neurotransmitter release from photoreceptors and could also affect bipolar cell synaptic release. However, the impact of CB1R and CB2R on the retinal function as a whole is currently unknown. In the present study, we investigated the function of cannabinoid receptors in the retina by recording electroretinographic responses (ERG) from mice lacking either CB1 or CB2 receptors (*cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-}, respectively). We also documented the precise distribution of CB2R. Our results show that CB2R is localized in cones and rods photoreceptors, horizontal cells, some amacrine cells, and bipolar and ganglion cells. In scotopic conditions, the amplitudes of the a-wave of the ERG were increased in *cnr2*^{-/-} mice, while they remained unchanged in *cnr1*^{-/-} mice. Upon analysis of the velocity time profile of the a-wave, we observed that the increased amplitude was due a slower deceleration of the waveform rather than an increase in acceleration. Under photopic conditions, b-wave amplitudes of *cnr2*^{-/-} mice required more light adaptation time to reach stable values. No effect was observed in *cnr1*^{-/-} mice. These data indicate that CB2R is likely to be involved in shaping retinal responses to light and suggest that CB1 and CB2 receptors could have different roles in visual processing.

4.2- Introduction

Cannabinoids (CBs) are the principal psychoactive components of marijuana plant (*Cannabis sativa*). The endocannabinoid (eCB) system is involved in a variety of neurobiological functions such as signal processing, nociception, learning and memory, and motor coordination. eCBs are generally associated with the modulation of neuronal transmission and, more recently, with developmental processes. Over the last decade, several studies have shown that CB receptors (CBRs) are present in the retina of most mammals including humans (Straiker, Maguire, et al., 1999), suggesting that the eCB system could be involved in some aspects of visual processing.

The cannabinoid receptor type 1 (CB1R) is ubiquitously expressed in the nervous system. In the retina, its presence was shown in several species, ranging from fishes to primates (Bouskila et al., 2012; Hu et al., 2010; Lalonde et al., 2006; Leonelli, Britto, Chaves, & Torrao, 2005; Straiker, Stella, et al., 1999; Warriar & Wilson, 2007; Yazulla et al., 1999; Zabouri, Bouchard, et al., 2011), see (Yazulla, 2008) for review. Briefly, CB1R is present in cones, horizontal cells, some bipolar cells, amacrine and ganglion cells. Patch-clamp studies have demonstrated that CB1R activation impacts cone photoreceptors' response to light and glutamate synaptic release (Fan & Yazulla, 2003, 2007; Straiker & Sullivan, 2003). In bipolar cells, CB1R activation was shown to inhibit calcium (Straiker, Stella, et al., 1999) and potassium rectifying (Yazulla et al., 2000) currents. Functionally, these effects could lead to a decreased synaptic release and changes in the temporal aspects of the bipolar cell response upon activation of CB1R in the retina. In addition, CB1R activation can also modulate GABAergic release from amacrine cells (Warriar & Wilson, 2007) and inhibit high-voltage-activated calcium channel cultured ganglion cells, which impacts the cells' excitability (Lalonde et al., 2006). It is not known how the reported effects are reflected at the global functional level.

Although cannabinoid receptor type 2 (CB2R) expression in neurons remains controversial, several authors have reported a sparse expression in neurons in several structures such as the cerebellum, brainstem, hippocampus, and prefrontal cortex see (Atwood & Mackie, 2010) for review. Only two studies (Lopez et al., 2011; Lu et al., 2000) have demonstrated the presence of CB2R in the rodent retina. Based on its

mRNA distribution, Lu *et al.*(2000) localized CB2R in photoreceptors, inner nuclear and ganglion cell layers, in the adult rat retina. While this study provides valuable information, the results did not confirm the presence of CB2R in the retina, since GPCR mRNA and protein expression at the cell surface do not necessarily correlate (de Sousa Abreu *et al.*, 2009). Using cells' morphology and position, CB2R protein was more precisely localized by Lopez *et al.*(2011) in the same animal model: it was found in the inner segment of photoreceptors and in horizontal, amacrine, and ganglion cells. However, the CB2R antibody used by these authors was not fully characterized. Thus, the exact localisation of CB2R in retinal cells remains an open question. To our knowledge, no studies investigated the effect of CB2R activation at the retinal level.

The objective of this study was to evaluate the role(s) of CBRs in the retinal function in a mammalian *in vivo* model. To achieve this goal, electroretinograms (ERGs, representing the global evoked response of the retina) of mice lacking CB1 or CB2 receptors (*cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} respectively) and their wild-type (WT) controls were compared under different light conditions. Given that the exact expression of CB2R in the retina remains debatable, the presence of CB2R in the mice retina was confirmed and precisely assessed with a specific CB2R antibody and specific retinal markers. Our results indicate that CB2R is largely expressed by retinal neurons of mice and suggest that this receptor is likely to play a greater role in retinal processing than CB1R.

4.3- Methods

Animals

All procedures were performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and were approved by the Ethics committee on animal research of the Université de Montréal. The *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} transgenic mice were obtained from Beat Lutz (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Germany) and Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), respectively. Both strains were on a C57BL/6 genetic background, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice were obtained from Charles Rivers and Jackson Laboratory, respectively. The *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} transgenic mice were compared to background and age matched

WT controls from separate colonies. All animals were maintained in-house, under a 12 hours dark/light cycle. Male and female adult mice (3-4 months old) were used for the experiments.

Tissue Preparation

Mice were euthanized by an overdose of isoflurane. One eye was immediately removed for Western blot analysis. The retina was dissected on ice, promptly frozen, and kept at -80°C until further processing. Simultaneously, a transcardiac perfusion was conducted with phosphate-buffered 0.9% saline (PBS; 0.1M, pH 7.4), followed by phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (PFA), until the head was lightly fixed. The nasal part of the second eye was marked with a suture and removed. Two small holes were made in the cornea prior to a first post-fixation in 4% PFA for a period of 30 minutes. The cornea and lens were removed and the eyecups were post fixed for 30 minutes in 4% PFA. The eyecups were then washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in Neg 50 tissue Embedding Media (Fisher Scientific, Ottawa, ON), flash-frozen and kept at -80°C. Sections (14 µm thick) were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Concord, ON) and placed on gelatin/chromium coated slides.

Western blot

Retinas were homogenized in RIPA buffer (150mM NaCl, 20mM Tris, pH 8.0, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM EDTA), supplemented with a protease inhibitor mixture (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin (1µg/ml) and Phenylmethylsulfonyl fluoride (0.2mg/ml); Roche Applied Science, Laval, QC). Thirty micrograms of protein/sample of the homogenate were resolved by electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane, blocked with 5% skim milk and incubated overnight with antibodies directed against CB2R, CB1R, NAPE-PLD, DAGL α , FAAH, MGL or GAPDH, the latter serving as a loading control. The blots were exposed to the appropriate HRP-coupled secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Detection was carried out using homemade ECL

Western blotting detection reagents (final concentrations: 2.5mM luminol, 0.4mM p-coumaric acid, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 0.018% H₂O₂).

Immunohistochemistry

Frozen sections were washed in PBS, post fixed for 10 minutes in cold acetone, washed, and then blocked in 1% bovine serum albumin, bovine gelatin and 0.5% Triton X-100 in PBS for 1 hour. Some sections from WT animals were incubated overnight in rabbit anti-CB2R solution with an antibody against various retinal markers. In addition, sections from the three genotypes were incubated with retinal markers (see Table 1) in order to compare the distribution and morphology of retinal cells. The sections were then washed in PBS, blocked for 30 minutes, incubated for 1 hour with Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit for CB2R and Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit or Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse for cell type markers (Molecular Probes, Eugene, OR). After washes, the sections were mounted with PVA-Dabco mounting medium. The CB2R/recoverin, CB2R/cone-arrestin (Nikonov et al., 2008; Zhu et al., 2003; Zhu et al., 2002) and CB2R/calbindin combinations required serial incubations, as the retinal marker host was rabbit, as previously performed on retinal tissues (Zabouri, Bouchard, et al., 2011). The dilution factors, the immunogens, and provenance of the antibodies are provided in Table 1. The CB2R antibody (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) has been previously characterized in mice renal (Barutta et al., 2011) and retinal tissue (Cécyre, Thomas, Casanova, & Bouchard, 2013).

Confocal microscopy

Images of the central retina (within 200 µm of the optic nerve head) were taken using a laser scanning confocal microscope (TCS SP2, Leica Microsystems), with a 40X oil immersion objective. Images stack (1,024 X 1,024 pixels x 0.5 µm per stack) were captured using the LCS software (version 2.6.1; Leica Microsystems). Offline processing was done with the Fiji software (version 1.47g) (Schindelin et al., 2012). The stack images were taken sequentially to ensure no “bleed-through” between channels. Gaussian noise from images was partially removed using the PureDenoise plugin for Fiji (Luisier & Blu, 2008) and stacks were collapsed to projection images.

Electroretinography

The ERG recordings were performed as previously reported (Plaziac, Lachapelle, & Casanova, 2003). Briefly, after an overnight dark adaptation (at least 12 hours of complete darkness), mice were anaesthetized (ketamine 85mg/kg, xylazine 5mg/kg). Pupils were dilated with a drop of 1% cyclopentolate hydrochloride. The mice were then positioned in a Ganzfeld dome that housed a photostimulator (PS33plus, Grass Instruments). The ERGs were recorded with a silver wire electrode inserted in a custom-made corneal lens adapted for mice (Sagdullaev, DeMarco, & McCall, 2004). Reference and ground electrodes (E2 subdermal electrode; Grass Instruments) were inserted subcutaneously at the base of the head and in the tail. Broadband ERGs (bandwidth, 1–1,000 Hz; 10,000x; P511, Grass, West Warwick, RI) and oscillatory potentials (bandwidth, 100-1000 Hz; 50,000x) were recorded simultaneously. Signals were fed to an analog-digital interface (1401, CED, Cambridge, UK) and were acquired using the software Signal (v.3.01x, CED, Cambridge UK). Scotopic luminance-response functions were obtained in response to progressively brighter stimuli spanning a 3.97 log-unit range (interstimulus interval: 10s; average: 5 flashes; luminance interval -2.3 to 1.67 log scot.cd.s.m⁻²). The photopic (cone-mediated) signal was recorded thereafter: ERGs were recorded every 5 min for 20 minutes under a photopic background of 30 cd.m⁻² (flash luminance: 1.36 log photo.cd.s.m⁻²; interstimulus interval: 1s, averaged over 20 flashes).

Analysis

Analysis of the ERG waveforms was performed according to standard practice (Marmor et al., 2009). The amplitude of the a-wave was measured from baseline to the most negative trough, whereas the b-wave amplitude was measured from the trough of the a-wave to the highest positive peak of the retinal response. The kinetics of the a-wave were also analysed by calculating the velocity-time profile at a photoreceptor saturating luminance (Weymouth & Vingrys, 2008). The latter was computed by calculating the derivative of the waveform. All the points of the a-wave were taken into account. The last point of the waveform was set as the first derivative value equal or superior to 0. Implicit times were measured from flash onset to the peak of the waves.

Scotopic luminance-response function curves were obtained by plotting the amplitude of the b-wave against the luminance of the flash used to evoke each response.

The mixed V-max referred to the highest evoked amplitude of the b-wave. The amplitude of oscillatory potentials (OPs) was measured and reported as the sum of the OPs ($OP_{1/2} + OP_3 + OP_4 + OP_5$ in scotopic conditions and $OP_1 + OP_2 + OP_3$ in photopic conditions). In a randomly chosen subgroup of animals, a fast Fourier transform analysis was performed with Matlab (The Mathworks, Nattick, MA) to confirm that no changes occurred in the power/frequency distribution of the ERG waveform. Statistical analysis was performed using repeated measures ANOVA followed by one-way ANOVA and Dunnett post hoc test (SPSS 20, IBM, Somers, NY).

Quantification of retinal layer thickness

Frozen sections were washed in PBS, and their nuclei were labelled with Sytox Green Nucleic Acid Stain (1:100,000, Molecular Probes, Eugene, OR) for 1 hour. The thickness of each retinal layer was measured at 40X magnification, including the outer nuclear layer (ONL), the outer plexiform layer (OPL), the inner nuclear layer (INL), the inner plexiform layer (IPL) and the ganglion cell layer (GCL). The thickness of each layer was measured with LCS software (version 2.6.1) and was normalised with respect to the total thickness of the retina to correct for local and inter-animal variations. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

4.4- Results

Localization of CB2R in the mice retina

Our data indicate that the CB2 receptor is widely distributed in the retina. CB2R immunoreactivity in the photoreceptor layer was mostly found in cones, but rods were also labeled. CB2R was present in the outer and inner segments, in the cell body but not in the pedicles of cones (Fig 2A). It was also expressed in the inner and outer segments and cell body of rod photoreceptors (Fig 2B).

Horizontal cells showed expression of CB2R at the membrane of the soma and in their dendrites (Fig 2C). Both rod and cone bipolar cells were CB2R immunoreactive at

the membrane of the soma (Fig 2D-E). Rod bipolar cells also expressed CB2R at their presynaptic dendrites and axons (Fig 2E-F). Some amacrine cells showed also CB2R immunoreactivity at the membrane of the soma (Fig 2G).

CB2R staining was detected in the GCL, and was present in the ganglion cells soma (Fig 2H). CB2R was not expressed at the membrane of the Müller cells soma nor in their inner and outer processes (Fig 2I).

The dark-adapted retinal function

We recorded dark-adapted retinal responses in WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice at different light intensities. Representative examples of scotopic ERGs from WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice are shown in Figure 3. The averaged a- and b-waves amplitudes are presented as a function of flash luminance in Figure 4A and B, respectively. A significant change in the a-wave amplitude was observed in *cnr2*^{-/-} but not in *cnr1*^{-/-} mice (repeated measures ANOVA with Dunnett posthoc, for intensities 0.13 to 1.67 log scot.cd.s.m⁻², p=0.798 for *cnr1*^{-/-} and p=0.037 for *cnr2*^{-/-} mice). The amplitude of the b-wave (panel C) was not significantly altered in *cnr1*^{-/-} or *cnr2*^{-/-} mice. In order to better understand the change the in a-wave, the velocity-time profile was calculated at a saturating luminance (1.3 log scot.cd.s.m⁻²). The averaged a-wave for all three groups is presented in panel C. One can observe that the earliest part of the waveforms overlay and only separate in the latest segment. The averaged velocity-time profiles for all three groups are presented in panel D. No differences were found in the accelerating (descending) portion of the curve (repeated measures ANOVA with Dunnett posthoc from 0 to 7.4ms). We confirmed those results by analysing the a-wave amplitude at a 7ms (Heckenlively & Arden, 2006) and found to significant differences between the groups. The deceleration (ascending) portion however showed significant changes between WT and *cnr2*^{-/-} groups as *cnr2*^{-/-} mice maintained higher velocities than WT animals (repeated measures ANOVA with Dunnett posthoc from 7.4 to 15ms, p=0.729 for *cnr1*^{-/-} and p=0.018 for *cnr2*^{-/-} mice). Fourier analysis was also performed on both a- and b-waves and revealed no other significant changes (data not shown).

Furthermore, the maximal ERG response evoked scotopic conditions (the mixed rod-cone response) was also analyzed. The amplitude of the b-wave at maximal b-wave

amplitude remained unchanged in all experimental groups (Table 2). No changes were observed in the luminance needed to evoke the maximal response in either group. No differences were observed in the latency of the a- and b-waves in both KO groups suggesting no involvement of CBRs in the kinetics of the response onset (data not shown).

The oscillatory potentials (OPs) were also analyzed and representative examples of recordings for WT and *cnr2*^{-/-} groups are presented in Figure 5A. The sum of all dark-adapted OPs was computed and compared. The averaged total amplitude is presented as a function of flash luminance in Figure 5B. We observed a tendency for the amplitude of the OPs to be larger between -0.13 to 1.30 log scot.cd.s.m⁻² in *cnr2*^{-/-} when compared to WT animals. However, this tendency did not reach statistical significance. No changes were observed in the response of the *cnr1*^{-/-} or *cnr2*^{-/-} mice (repeated measures ANOVA, for intensities 0.13 to 1.67 log scot.cd.s.m⁻², p=0.345). Fourier analysis was also performed and revealed no differences between the three genotypes (data not shown). No differences were observed in the latency of any of the analyzed OPs for either mice strain (results not shown).

The light adapted retinal function

In order to evaluate the adaptation abilities of the retina, the ERG was recorded under photopic conditions at different time points. The averaged amplitude ± SEM of the photopic b-wave is displayed as a function of time in Figure 6. While the responses observed in *cnr1*^{-/-} and WT mice are comparable, those in *cnr2*^{-/-} mice have higher amplitudes at intermediate time points (one-way ANOVA. p=0.021 and p=0.018 for 10 and 15 min, respectively). The latency of the photopic b-wave did not vary across groups (data not shown). Light-adapted OPs were also analyzed and no significant changes were observed for any of the experimental groups (summed amplitude values; results not shown).

*Retinal structure in *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice*

In order to ensure that there were no major structural changes in KO mice, we compared the basic retinal anatomy across groups by examining retinal layering and

thickness. Figure 7A shows the typical retinal layering in all genotypes. First-look observations of the retinas showed no obvious changes in retinal structures. Then, the total retinal thickness (panel B), the thickness of each layer (panel C) and the number of cell rows for each nuclear layer (results not shown) were precisely measured. No significant differences were found for all parameters. The overall retinal layering was thus preserved in all genotypes. In addition, the distribution and morphology of retinal cells were compared for all genotypes to verify if they were affected. No obvious changes were observed in any retinal cell type for all genotypes (Fig 8A-X).

Furthermore, we wanted to establish if the elimination of one receptor affected other elements of the eCB system. We measured the total amounts of CB2R, CB1R, synthesis enzymes N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), diacylglycerol lipase alpha (DAGL α) as well as degradative enzymes fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MGL) proteins in the WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice retina. No differences were found in the total amount of those proteins across groups (Fig 9A-D).

4.5- Discussion

This study investigated the functional and anatomical consequences of knocking out CB1R or CB2R in the mouse retina. Using ERG, we showed that under scotopic conditions, the removal of CB1R did not change the response, while the absence of the CB2R affected the amplitude of the a-wave, without affecting the b-wave or OPs amplitude and latency. Under photopic conditions, removal of CB1R did not affect the retinal response but the elimination of CB2R yielded a different light adaptation pattern. This study is the first evidence that CB2R affects global retinal function.

The CB2R is widely distributed in the mice retina

The present results confirm the expression of CB2R in the rodent retina. To our knowledge, this study is the first to precisely localize CB2R in the mice retina using an antibody controlled for specificity. Barutta *et al.*(2011) also used the same CB2R antibody and verified its specificity in *cnr2*^{-/-} mice renal sections. Our results are in agreement with a study using RT-PCR and *in situ* hybridization, which showed that

CB2R is present in the retinal ganglion cell layer, the INL and the inner segments of photoreceptors cells (Lu et al., 2000). A recent study reported a similar distribution in the rat retina; CB2R being localized in retinal pigmentary epithelium, inner photoreceptor segments, horizontal and amacrine cells, neurons in ganglion cell layer and fibres of the IPL (Lopez et al., 2011). Our results provide further confirmation of CB2R expression in mammalian retina. More specifically our data show the presence of CB2R in cone and rod photoreceptors, horizontal cells, cone and rod bipolar cells, some amacrine cells and ganglion cells.

The CB1R removal does not affect the ERGs

Our data indicate that CB1R deletion does not have an impact on the retinal activity as measured with the ERG. This absence of functional changes observed in *cnr1^{-/-}* mice was unexpected, given the wide distribution of CB1R expression in the rodent retina (Hu et al., 2010; Yazulla et al., 1999; Zabouri, Bouchard, et al., 2011). In addition, several authors reported that CBRs activation differentially modulates calcium and potassium currents in rod and cone photoreceptors (Fan & Yazulla, 2003, 2007; Straiker & Sullivan, 2003). These authors suggest that the net effect of CBRs activation on calcium and potassium currents in rod photoreceptors would be a decrease in the light sensitivity. Based on these findings, we expected to observe in mice lacking CB1 receptor increased amplitude in the a-wave. As no effects were detected, this could indicate that the modulation of these currents by CB1R is too weak to be measured with the ERG.

The overall effect of CBRs activation on cones is difficult to predict, as changes in ionic currents would lead to opposing outcomes (Straiker & Sullivan, 2003). Our data do not provide any more cues about this since we did not observe an effect of CB1R removal on cone response.

ERG recordings reflect essentially the activity of photoreceptors and bipolar cells (Heckenlively & Arden, 2006). Consequently, our data do not preclude a role for CB1R in the response of other retinal neurons such as horizontal, amacrine, and ganglion cells. The latter is further supported by several studies demonstrating that CB1R activity modulates the excitability of amacrine and ganglion cells (Lalonde et al., 2006;

Middleton & Protti, 2011; Warriar & Wilson, 2007). Nevertheless, altogether, our results suggest that the absence of CB1R does not affect the global response of the retina. However this receptor could still affect other visual structures than the retina as we recently reported that CB1R exerts a regulatory action on the neurovascular coupling and functional organization of the mice visual cortex along the azimuth axis (Abbas Farishta et al., 2010).

The CB2R removal effects on the ERGs

Under scotopic conditions, our data indicate that the amplitude of the a-wave is larger in *cnr2^{-/-}* than in WT mice at several intensities. The a-wave is thought to originate from photoreceptors; hence this effect may reflect the consequences of CB2R removal on these cells. The activation of CBRs by the administration of an agonist can decrease the sensitivity of rod photoreceptors (Straiker & Sullivan, 2003). Provided that we report no changes in the a-wave of *cnr1^{-/-}* mice and an increased a-wave of *cnr2^{-/-}* mice, we suggest that the alteration of rod sensitivity reported in Straiker and Sullivan (2003) could be mediated by CB2R rather than CB1R. Analysis of the velocity-time profile at saturating luminance revealed no differences in the accelerating segment of the a-wave (the leading edge) between groups. However, this analysis indicated that the *cnr2^{-/-}* mice maintained higher velocities than WT counterparts in the decelerating segment of the a-wave. One may propose that CB2R deletion decreases the post-receptor contribution to the a-wave. This hypothesis is unlikely as it was shown that the a-wave profile is not modified by the pharmacological elimination of the b-wave at saturating intensities (Lei, 2012). Since it was shown that the decelerating segment could be caused by the recovery of the a-wave (Kang Derwent & Linsenmeier, 2001), our results may indicate that photoreceptors recuperate slower in *cnr2^{-/-}* mice.

Anatomical studies showed that CB2R was expressed in the bipolar cells of mice (this paper, (Lu et al., 2000)). Moreover, Yazulla et al. (2000) demonstrated that CBRs modulate potassium currents in retinal bipolar cells. Based on these findings and given that bipolar cells contribute, in part, to the genesis of the b-wave, one can expect that CB2R elimination will affect the b-wave amplitude and/or latency. Our present results show only a trend in which all the b-wave data points have higher amplitude in *cnr2^{-/-}*

than WT or *cnr1*^{-/-} mice. No such tendencies were observed for the b-wave latency. These results indicate a limited effect of CB2R on the b-wave, while the effect on the a-wave is larger.

Under photopic conditions, an enhanced b-wave was observed at intermediate recording time points (10 and 15 min) in *cnr2*^{-/-} mice. Among the roles most commonly attributed to CB1R and CB2R are adaptive mechanisms such as long-term-depression (Huang, Yasuda, Sarihi, & Tsumoto, 2008; Liu, Heynen, Shuler, & Bear, 2008; Sjostrom, Turrigiano, & Nelson, 2003) and down-regulation of synaptic release (Fan & Yazulla, 2007) in the visual system and elsewhere. Thus, these results suggest that CBRs are likely to be involved in mechanisms subtending retinal adaptation.

We showed that functional changes observed in *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice are not due to abnormal retinal cell distribution or compensation of the eCB system activity. Previous studies showed that the eCB system interacts with GABA, glutamate and dopamine systems (Chan, Chan, & Yung, 1998; Romero, de Miguel, Ramos, & Fernandez-Ruiz, 1998; Schlicker, Timm, & Gothert, 1996; Shen, Piser, Seybold, & Thayer, 1996). For example, CB1R agonists stimulate dopamine release from the guinea pig retina (Schlicker et al., 1996). Hence the changes in retinal response in *cnr2*^{-/-} mice and/or lack thereof in *cnr1*^{-/-} mice could be partly due to compensation mechanisms in GABA, glutamate or dopamine systems.

In conclusion, this study demonstrated that CB2R is expressed in several cell types in the mice retina. Our results also suggest that CB1R and CB2R contribute differently to visual functions: CB1R does not seem to be involved in neuronal retinal responses while CB2R appears to be implicated in rods and cones sensitivity and light adaptation.

4.6- Acknowledgements

We would like to thank Dr. Pierre Lachapelle (McGill University, Montréal, QC) for his constructive comments on this manuscript, and Dr Vasil Diaconu (University of Montreal, Montréal, QC) for light measurements. This work was supported by a joint Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) Vision Network grant – Fondation des maladies de l'oeil to J.-F.B. and C.C. and by a NSERC grant (194670-2009) to C.C., a CIHR (MOP 177796) and a NSERC grant (311892-2010) to J.-F.B. N.Z. was supported by a CIHR-E.A. Baker Foundation studentship, B.C. by a Réseau FRQS de recherche en santé de la vision studentship and J.-F.B. by a Chercheur-Boursier Junior 2 from the FRQS. We would like to thank the Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, Doheny Eye Institute and Dr. Cheryl M. Craft for generously supplying the antibody against cone arrestin. We also would like to thank Alexandra Gagné and Dr. Sébastien Thomas for their excellent assistance.

4.7- Figures

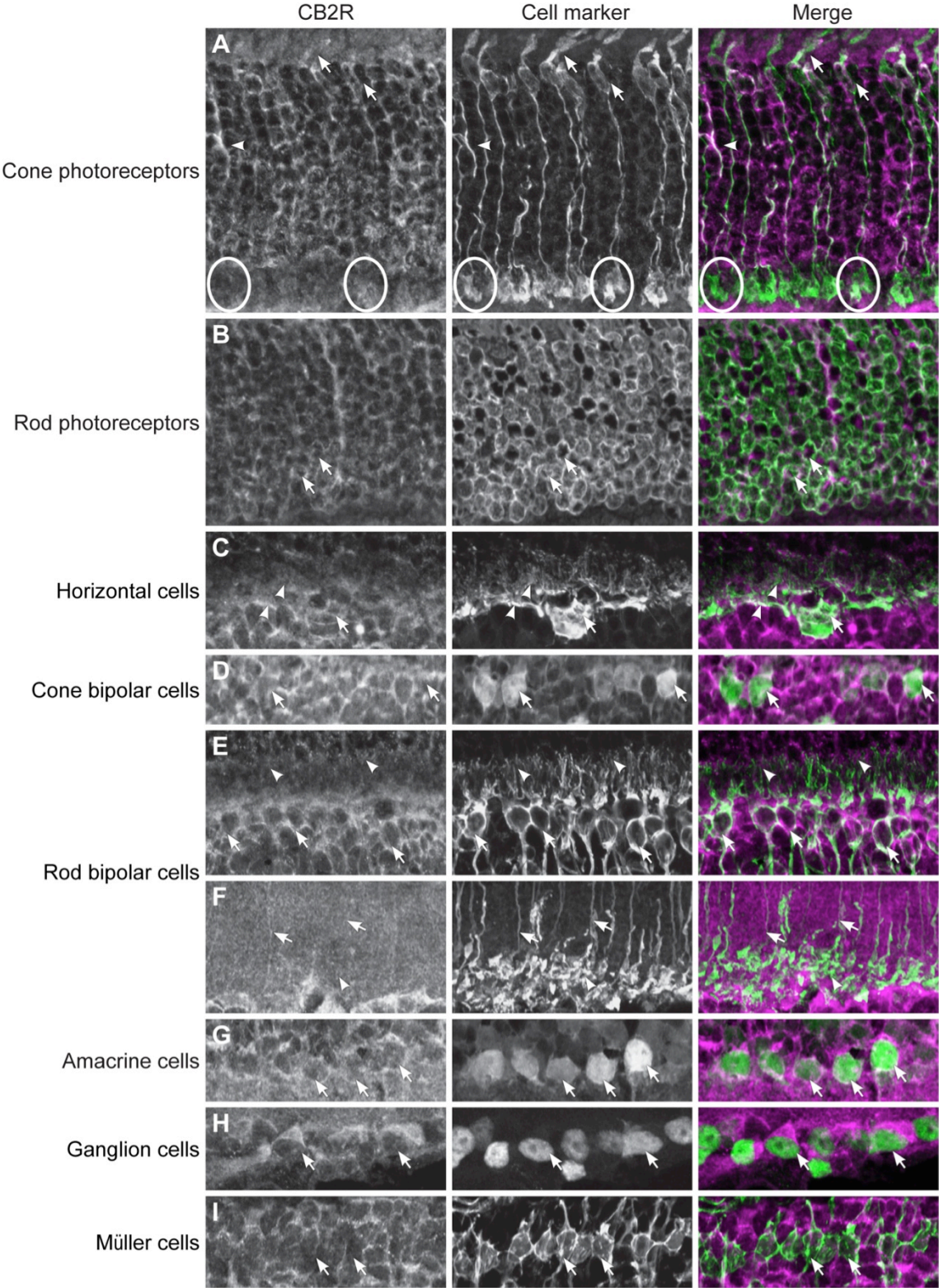


Figure 4.1 Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB2R in the mouse retina

CB2R (magenta) is present in inner (arrowheads) and outer (arrows) segments of cones (mouse cone-arrestin), however it is not present in pedicles (circles; **A**). CB2R expression is also visible in rod photoreceptors (recoverin; **B**), horizontal cells (calbindin; arrows) and their dendrites (arrowheads; **C**), cone (recoverin; **D**) and rod (PKC) bipolar cells soma (arrows; **E**), their presynaptic connections (arrowheads; **E**) and axons (arrows) but not in postsynaptic connections (arrowheads, **F**), amacrine cells (syntaxin; **G**), ganglion cells (Brn-3a; **H**) and Müller cells (glutamine synthetase; **I**). Scale bar = 10µm.

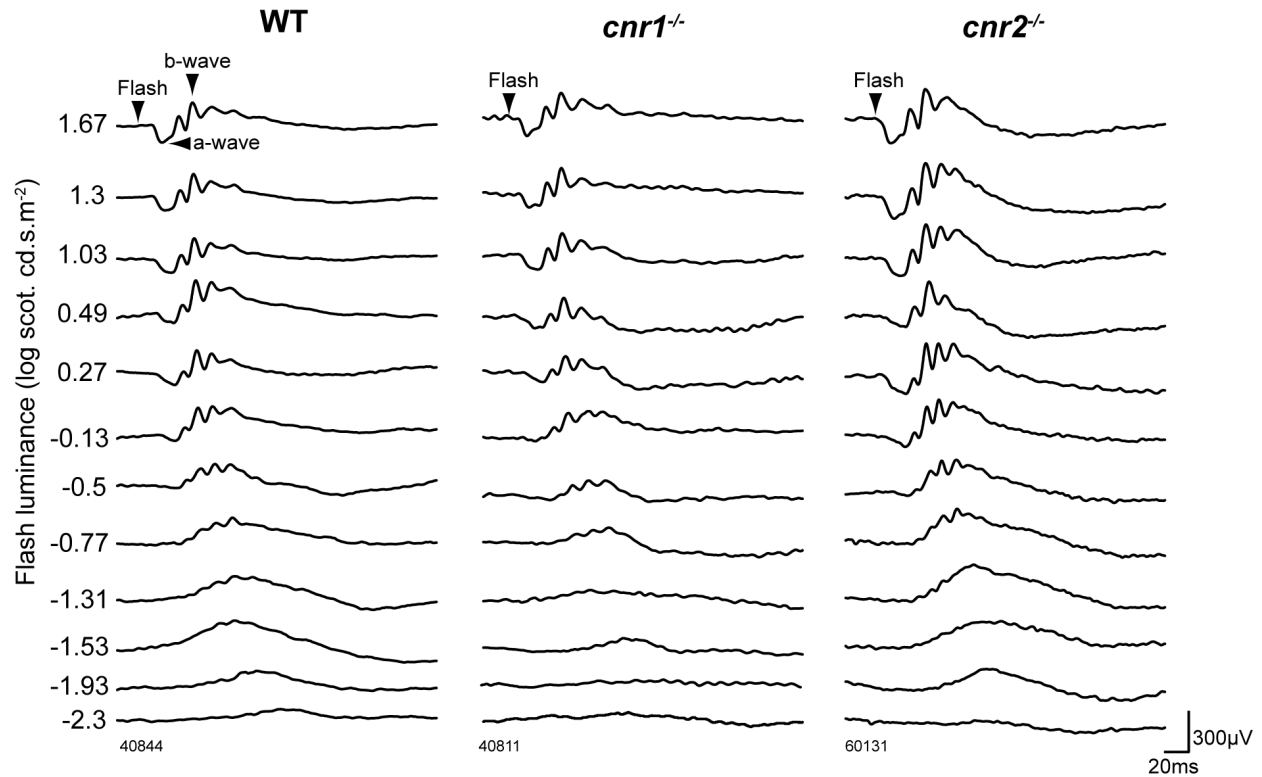


Figure 4.2 Example of scotopic ERGs in the different genotypes

Representative ERGs recorded in WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice. The luminance-response function of each animal was established by presenting progressively brighter flashes (*bottom* to *top*) indicated to the right of the traces as the log luminance (scot.cd.s.m⁻²).

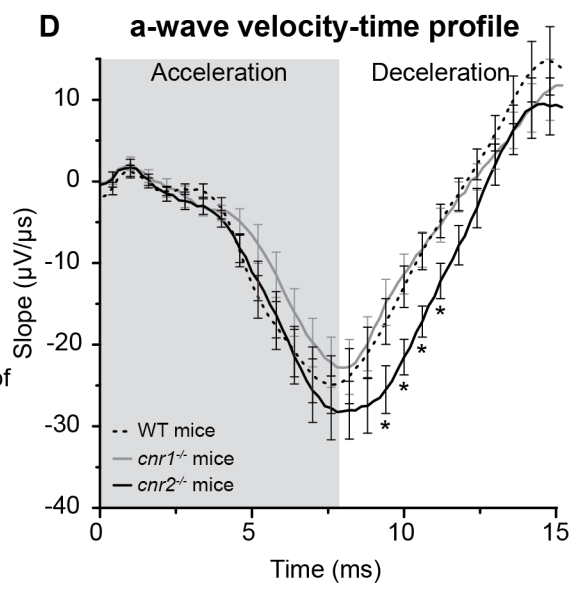
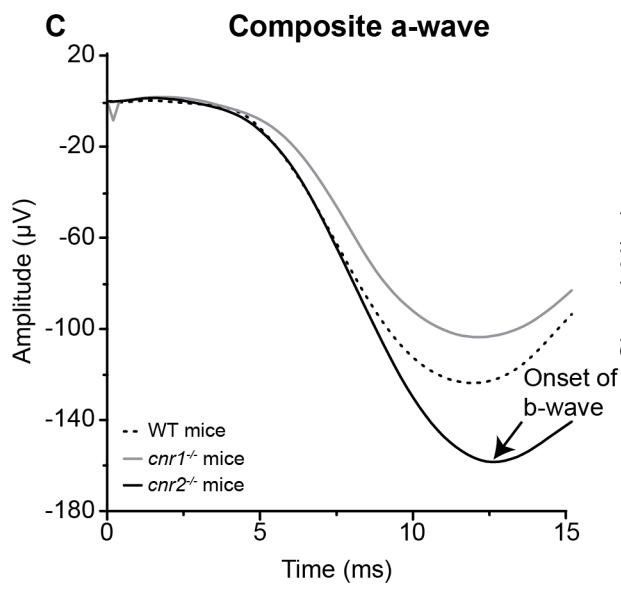
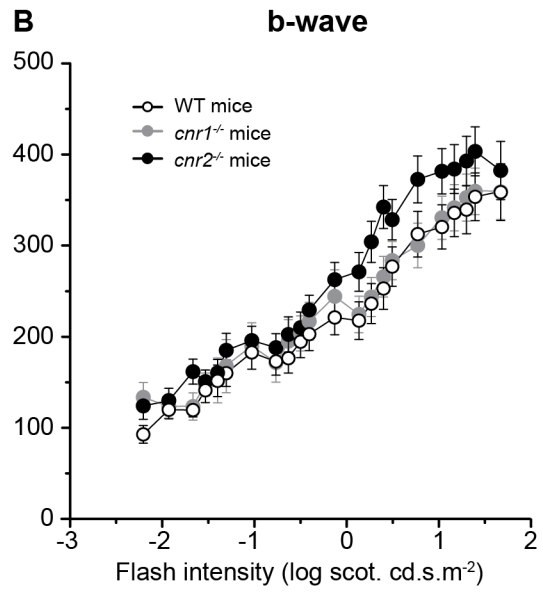
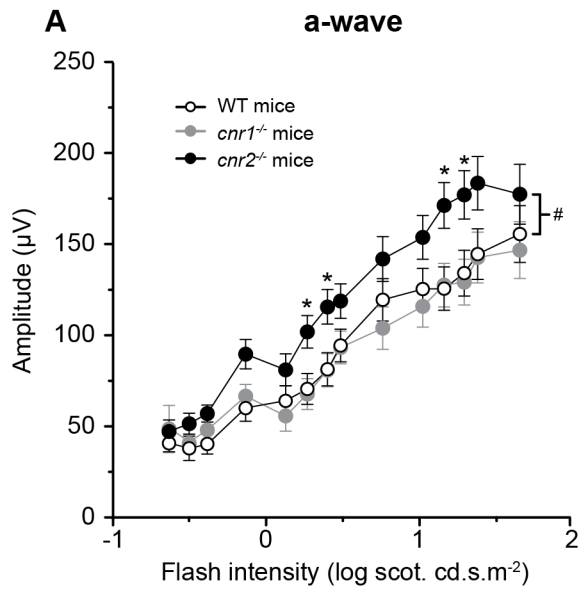


Figure 4.3 Scotopic a- and b-wave as a function of flash luminance

ERGs amplitude as a function of flash luminance for scotopic ERG a- (**A**) and b- (**B**) waves are displayed by genotype. The values are means \pm SEM from all animals in each group (WT: open circles, n=20; *cnr1*^{-/-}: grey circles, n=20; *cnr2*^{-/-}: closed circles, n=18; # repeated measures ANOVA $p \leq 0.05$, * one-way ANOVA with Dunnett post hoc test $p \leq 0.05$). The averaged a-wave for each group is presented in **C**. The time-velocity profile of the a-wave for each group is displayed in **D**. The accelerating section of the waveform showed no difference (repeated measures ANOVA). Differences between *cnr2*^{-/-} and WT were only found in the deceleration segment on the waveform (repeated measures ANOVA, $p \leq 0.05$) and individual values were compared with one-way ANOVA with Dunnett post hoc test ($p \leq 0.05$). For readability, we only depict one out three points in the plot.

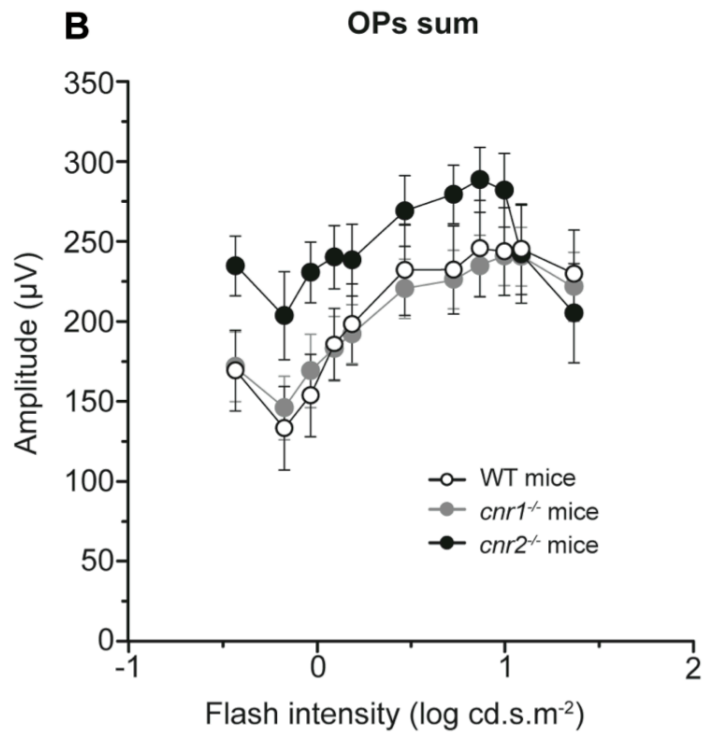
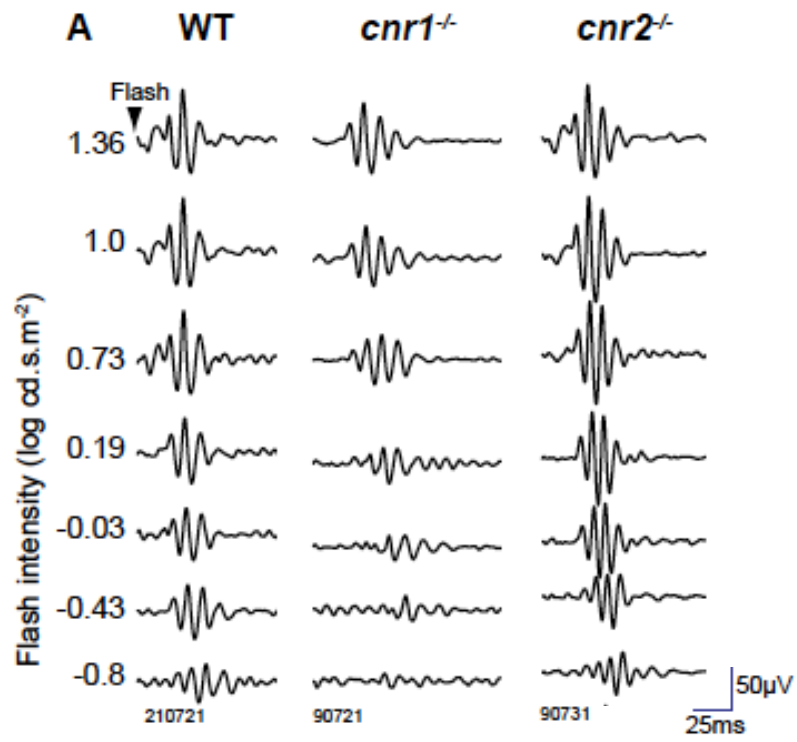


Figure 4.4 Example of scotopic oscillatory potentials in the different groups

(A) Representative oscillatory potentials recorded in WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice. (B) The total sum of the amplitudes of all oscillatory potentials is plotted as a function of flash intensity to compute the luminance-response function curve. The values are means ± SEM from all animals in each group (WT: open circles, n=17; *cnr1*^{-/-}: grey circles, n=19; *cnr2*^{-/-}: closed circles, n=12).

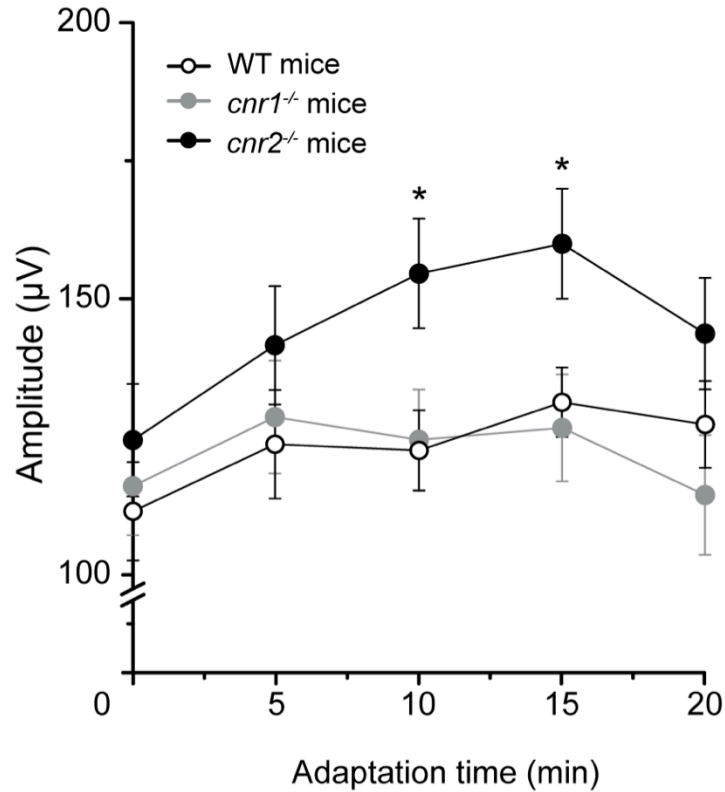


Figure 4.5 The amplitudes of photopic ERG b-wave by time

Repeated ERGs were taken at different time points and were used to evaluate the retina ability to adapt to light from a dark-adapted state. The *cnr2*^{-/-} mice displayed significantly higher amplitudes at 10 and 15 minutes time points (means ± SEM, WT: open circles, n=19; *cnr1*^{-/-}: grey circles, n=18; *cnr2*^{-/-}: closed circles, n=18; * one-way ANOVA with Dunnett post hoc test p <0.05).

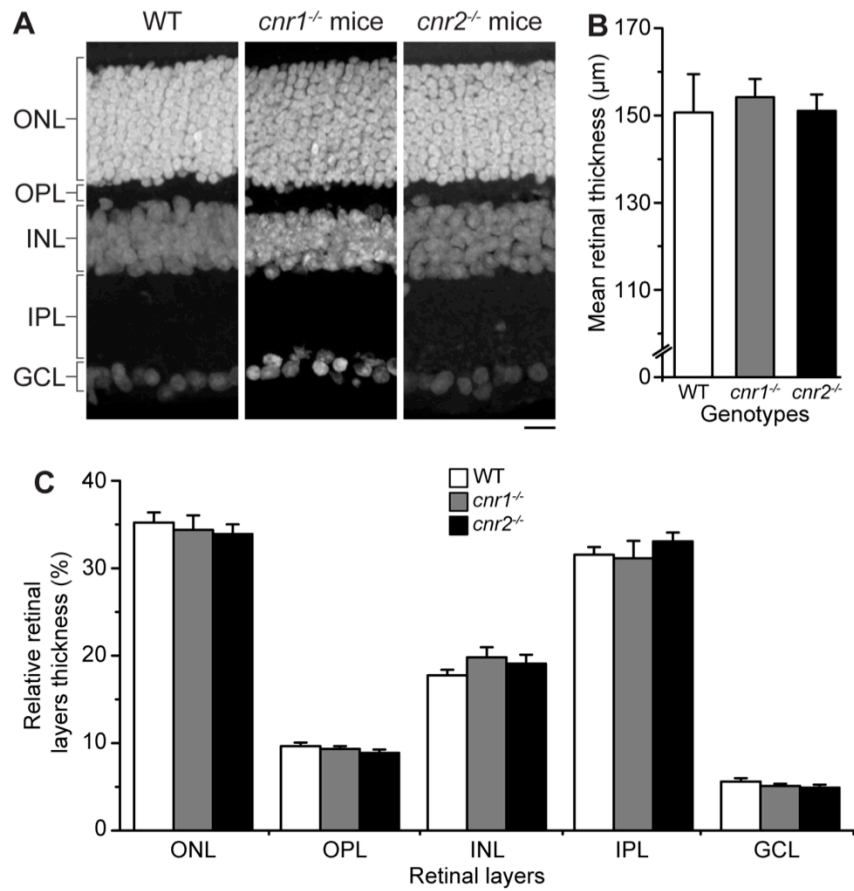


Figure 4.6 Deletion of *cnr1* or *cnr2* does not change retina morphology

(A) Nuclei staining of retinas of WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice with Sytox. Normal retinal layer structures were preserved in all mice. Scale bar = 20µm. (B) Total thickness calculated from ONL-GCL in the three genotypes. (C) Mean thickness of each retinal layer in the three genotypes. (ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; White, grey and black bars correspond to the WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice, respectively).

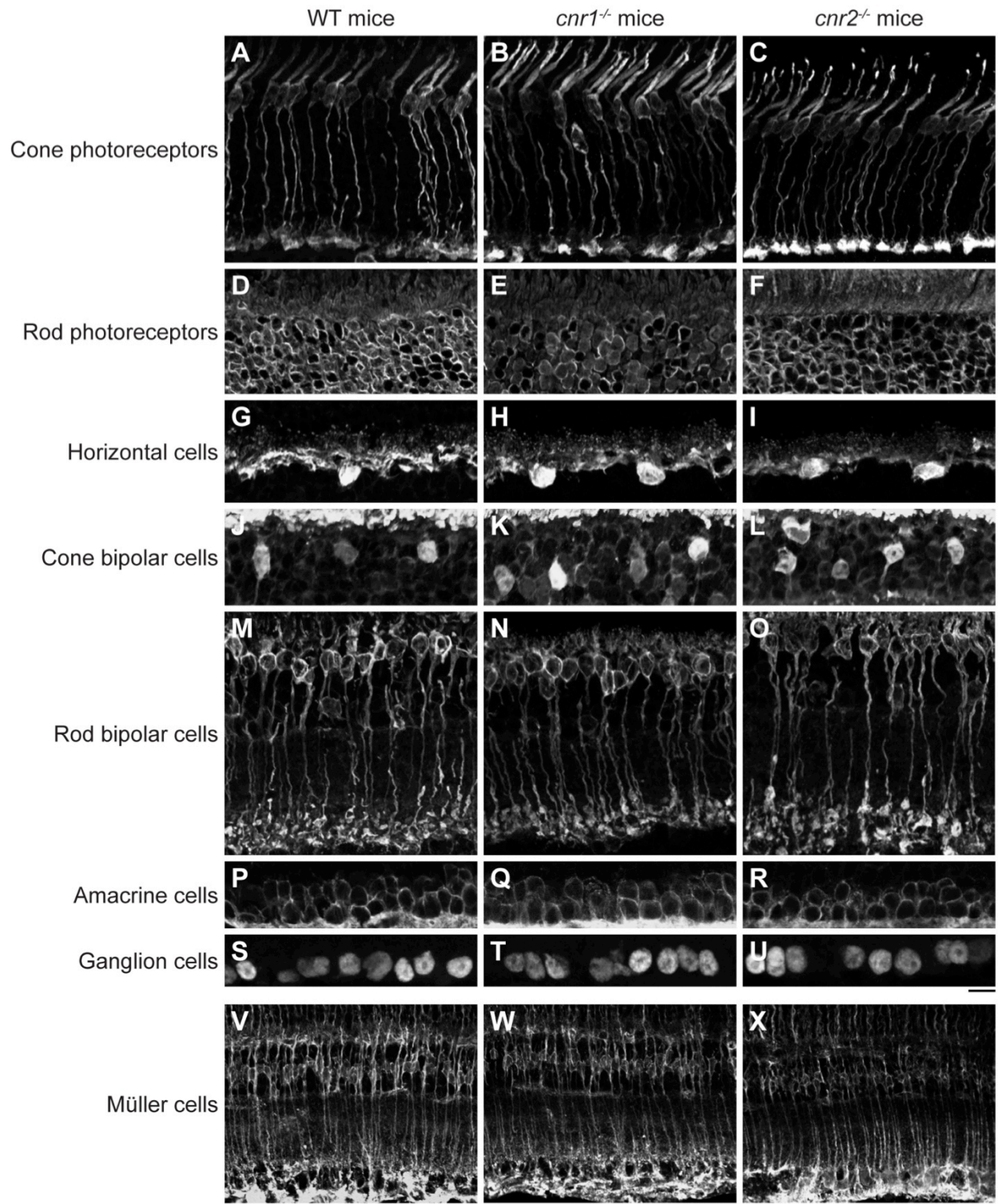


Figure 4.7 Absence of CB1R or CB2R does not produce any morphological changes in retinal cells

No obvious changes in the distribution and morphology of cone photoreceptors (mouse cone-arrestin; **A-C**), rod photoreceptors (recoverin; **D-F**), horizontal cells (calbindin; **G-I**), cone bipolar cells (recoverin; **J-L**), rod bipolar cells (PKC; **M-O**), amacrine cells (syntaxin; **P-R**), ganglion cells (Brn-3a; **S-U**) and Müller cells (glutamine synthetase; **V-X**) were observed in WT, *cnr1*^{-/-} and *cnr2*^{-/-} mice. Normal morphology and distribution of every retinal cell types were preserved in all mice. Scale bars = 10µm.

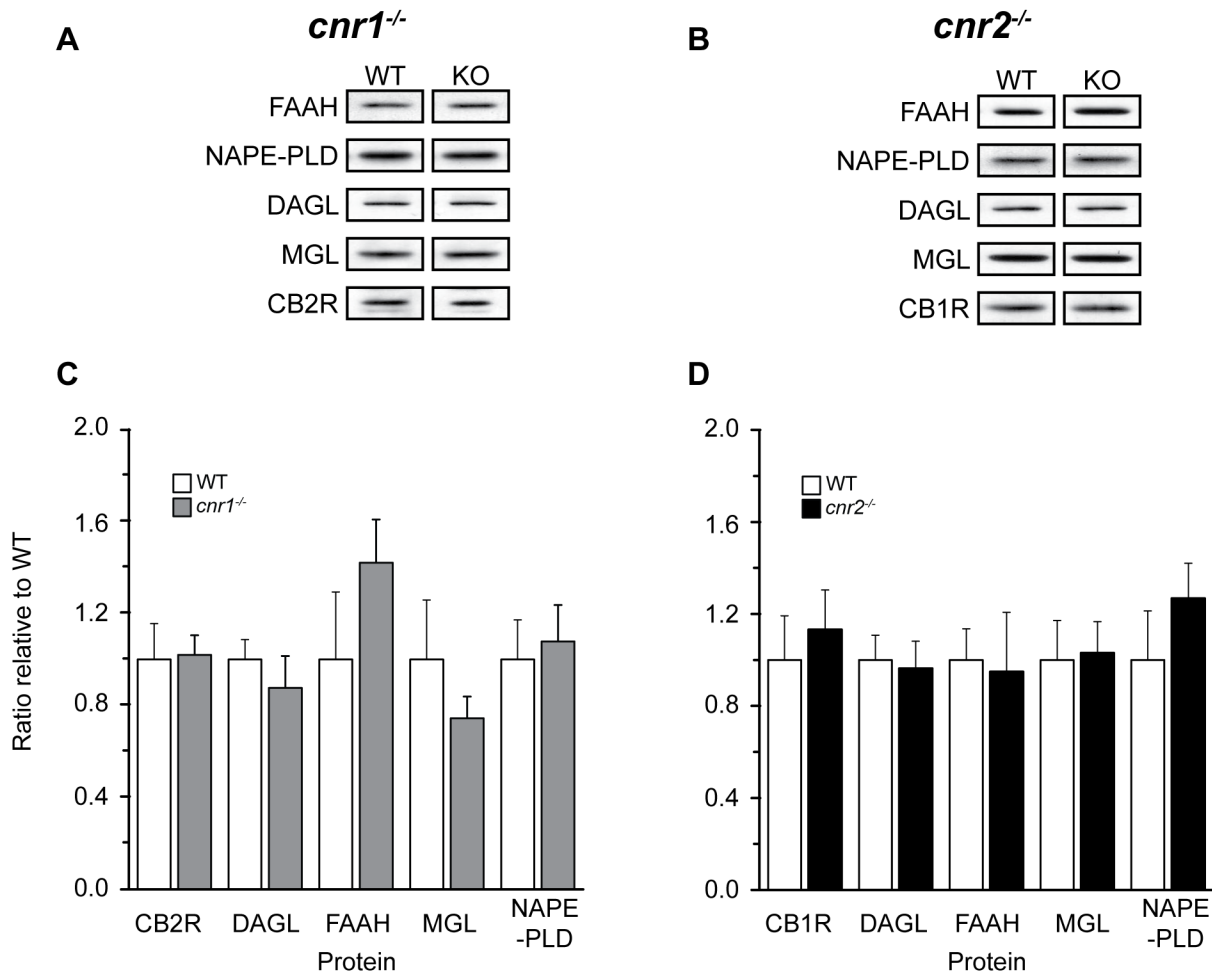


Figure 4.8 Total retinal concentrations of proteins from the eCB system.

(A) Representative examples of FAAH, NAPE-PLD, DAGL α , MGL and CB2R expression in wild type and *cnr1*^{-/-} mice retina lysate. (B) Representative examples of FAAH, NAPE-PLD, DAGL α , MGL and CB1R expression in wild type and *cnr2*^{-/-} mice retina lysate. (C) Averaged ratio \pm SEM relative to WT of FAAH, NAPE-PLD, DAGL α , MGL and CB2R expression in wild type (white) and *cnr1*^{-/-} mice (grey). (D) Averaged ratio \pm SEM relative to WT of FAAH, NAPE-PLD, DAGL α , MGL and CB1R expression in wild type (white) and *cnr2*^{-/-} mice (grey). Specific bands were seen at around 53 kDa for CB1R, 45 kDa for CB2R, 120 kDa for DAGL α , 66 kDa for FAAH, 37 kDa for MGL and 46 kDa for NAPE-PLD.

Table 4.1 Antibodies used in this study

Antibody	Target	Immunogen	Dilution*	Host	Provenance
CB2R	Cannabinoid receptor type 2	N-terminus 14 aa of human CB2R (20-33 residues)	I: 1/200 W: 1/2,000	Rabbit	101550, Cayman Chemical
CB1R	Cannabinoid receptor type 1	N-terminus 77 aa of rat CB1R (1-77 residues)	W: 1/1,000	Rabbit	C1233, Sigma-Aldrich
NAPE-PLD	N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D	N-terminus 13 aa of mouse NAPE-PLD (9-21 residues)	W: 1/500	Rabbit	NB110-80070, Novus Biologicals
DAGL α	Diacylglycerol lipase alpha	C-terminus 42 amino aa of mouse DAGL α (1003-1044 residues)	W: 1/200	Rabbit	DGLa-Rb-Af380, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan
FAAH	Fatty acid amide hydrolase	C-terminus 19 aa rat FAAH (561-579 residues)	W: 1/3,000	Rabbit	101600, Cayman Chemical
MGL	Monoacylglycerol lipase	N-terminus 35 aa of mouse MGL (1-35 residues)	W: 1/200	Rabbit	MGL-Rb-Af200, Frontier Institute
GAPDH	Loading control	The full-length rabbit muscle GAPDH protein	W: 1/20,000	Mouse	G8795, Sigma-Aldrich
Mouse cone-arrestin (LUMj)	Cone photoreceptors	C-terminus 13 aa of the mCAR protein (369-381 residues)	I: 1/1,000	Rabbit	Dr. Cheryl M. Craft, Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, Doheny Eye Institute, USC, Los Angeles, CA
Recoverin	Rod photoreceptors, and ON and OFF cone bipolar cells	The full-length recombinant human recoverin	I: 1/2,000	Rabbit	AB5585, Chemicon
Calbindin (D-28K)	Horizontal and amacrine cells	Recombinant rat calbindin D-28k full length	I: 1/1,000	Rabbit	CB-38a, Swant
PKC (clone H7)	Rod bipolar cells	C-terminus 28 aa of human protein (645-672 residues)	I: 1/500	Mouse	Sc-8393, Santa Cruz Biotechnology
Syntaxin, (clone HPC1)	Amacrine cells	Synaptosomal plasma fraction of rat hippocampus	I: 1/500	Mouse	S0664, Sigma-Aldrich
Brn-3a (Clone 5A3.2)	Ganglion cells	Amino acids 186-224 of Brn3a fused to the T7 gene 10 protein	I: 1/100	Mouse	MAB1585, Chemicon
Glutamine synthetase (GS, clone GS-6)	Müller cells	The full protein purified from sheep brain	I: 1/3,000	Mouse	MAB302, Chemicon

*I, Immunohistochemistry; W, Western blot

Table 4.2 Amplitudes of Mixed V_{\max} as well as the light intensity evoking it

	WT	cnr1^{-/-}	cnr2^{-/-}
Mixed V_{\max} (μV)	369 \pm 29	371 \pm 26	446 \pm 22
Light luminance Mixed V_{\max} (log cd.s.m⁻²)	1.27 \pm 0.04	1.13 \pm 0.05	1.06 \pm 0.09

5- Discussion

5.1- Résumé des résultats

5.1.1- Aspects de la validation des anticorps CB2

Le but de ce mémoire était d'étudier la distribution anatomique et la fonction des récepteurs aux cannabinoïdes dans la rétine de souris. En raison d'un débat intense ayant cours dans le domaine des eCBs, une attention particulière a été portée à la spécificité des anticorps dirigés contre le récepteur CB2. Nous avons donc testé plusieurs anticorps contre le récepteur CB2, dont quelques-uns qui ont déjà servi à des études anatomiques.

Nos résultats montrent que plusieurs anticorps ne sont pas spécifiques parce qu'ils détectent plusieurs bandes en immunobuvardage. Nous avons aussi démontré qu'un des anticorps testés montrait une spécificité valable pour le récepteur CB2 dans la rétine de souris.

5.1.2- Aspects fonctionnels

Plusieurs études portant sur les aspects fonctionnels et anatomiques nous laissent croire que le récepteur CB1 pourrait moduler la réponse rétinienne. Cependant, il n'existe pas d'étude fonctionnelle ou anatomique traitant du rôle du récepteur CB2 dans la rétine. Nous avons donc évalué les conséquences fonctionnelles de l'élimination des récepteurs CB1 et CB2 sur la réponse rétinienne en plus d'étudier l'expression détaillée du récepteur CB2 dans la rétine.

Nos résultats montrent que le récepteur CB2 est présent dans les cônes et les bâtonnets, les cellules horizontales, certaines cellules amacrines ainsi que dans les cellules bipolaires et ganglionnaires. En conditions scotopiques, les amplitudes de l'onde a de l'ERG sont augmentées chez les animaux *cnr2^{-/-}*, tandis qu'elles demeurent inchangées chez les animaux *cnr1^{-/-}*. En conditions photopiques, les souris *cnr2^{-/-}* ont requis plus de temps pour s'adapter à la lumière. Aucun effet n'a été observé chez les souris *cnr1^{-/-}*.

5.2- Aspects méthodologiques

5.2.1- Justification du modèle

Le choix de la rétine comme sujet d'étude est basé sur plusieurs raisons. D'une part, cette structure est utilisée comme un modèle du SNC et elle présente l'avantage d'être bien connue et bien caractérisée anatomiquement et fonctionnellement. L'existence de marqueurs permettant l'identification aisée des différents types cellulaires de la rétine rend possible une bonne caractérisation de la distribution du récepteur CB2. D'autre part, l'organisation de la rétine est assez similaire chez tous les mammifères, de sorte qu'il est possible de faire des comparaisons et des extrapolations. Enfin, la rétine est facilement accessible et manipulable d'un point de vue technique.

Également, le choix de la souris comme modèle animal nous confère quelques avantages. D'abord, la rétine de souris est très similaire à celle des autres mammifères. Les observations effectuées chez la souris sont donc transposables à d'autres espèces de mammifères. Ensuite, la souris nous donne l'avantage des manipulations génétiques qui nous permettent de caractériser la fonction des récepteurs CB1 et CB2 et qui nous donnent un outil supplémentaire pour vérifier la spécificité des anticorps dirigés contre le récepteur CB2.

5.3- La spécificité des anticorps ciblant le récepteur CB2

Nous démontrons que la plupart des anticorps visant le récepteur CB2 disponibles pour la recherche, qu'ils proviennent d'une source commerciale ou académique, ne sont pas spécifiques. Le seul anticorps montrant une spécificité satisfaisante est le 101550 de la compagnie Cayman Chemical. En effet, cet anticorps a reconnu une seule bande, au poids moléculaire attendu, à l'immunobuvardage. De plus, il a également produit un marquage intense sur une section de rétine provenant d'une souris de souche sauvage alors qu'en présence d'une section de rétine de souris KO pour le récepteur CB2, aucun marquage ne fut observé.

5.3.1- Pourquoi la validation des anticorps est-elle essentielle?

Étant donné que les anticorps sont conçus à partir de courtes séquences peptidiques pouvant être partiellement homologues avec plus d'une protéine, il est toujours possible qu'une réaction croisée se produise entre un anticorps et un antigène non-spécifique. La vérification de la validité des anticorps est ainsi une nécessité afin de pouvoir interpréter de manière fiable les résultats provenant de techniques immunologiques. Ce contrôle est d'autant plus important pour les anticorps polyclonaux pour qui la chance d'obtenir un marquage non-spécifique est supérieure aux anticorps monoclonaux (Rhodes & Trimmer, 2006). C'est pourquoi la validation des anticorps ciblant le récepteur CB2 est essentielle, car ceux-ci sont tous polyclonaux et nécessitent donc d'être caractérisés avant d'interpréter les résultats provenant de leur utilisation.

Enfin, une des approches permettant d'obtenir des résultats concordants et qui est suggérée par Rhodes et Trimmer (2006) est de comparer les patrons d'expression d'une même protéine par immunohistochimie et par hybridation *in situ*. Une telle convergence de données obtenues de deux méthodes indépendantes fournit une confirmation extrêmement puissante du signal d'un anticorps. C'est pourquoi nous considérons que nos résultats d'immunohistochimie avec l'anticorps 101550 sont valides. Ils concordent avec les données de Lu et al. (2000), qui montrent que le récepteur CB2 est présent dans la CGL, l'INL et les segments internes des photorécepteurs.

5.3.2- L'utilisation des peptides d'immunisation comme contrôles

La spécificité des anticorps a souvent été testée avec l'aide des peptides d'immunisation. Ceux-ci étaient alors pré-incubés avec l'anticorps CB2 correspondant. Bien que de nombreux auteurs considèrent l'absence de signal en présence d'un peptide d'immunisation comme une preuve de spécificité, il est impératif de spécifier que cela signifie seulement que l'anticorps est spécifique au peptide pour lequel il a été conçu. Tel que décrit dans la section 6.2.2 de

l'introduction, les tissus provenant d'animaux KO représentent les meilleurs outils pouvant démontrer la spécificité d'un anticorps (Lorincz & Nusser, 2008).

5.3.3- Les souris *cnr2*^{-/-}

Deux lignées de souris mutantes pour le récepteur CB2 ont été développées. La première fut créée par Buckley et al. et elle est caractérisée par l'ablation des acides aminés 217 à 347 de la partie C-terminale de la protéine (Buckley et al., 2000). Étant donné que les 216 premiers acides aminés codant pour les cinq premiers domaines transmembranaires n'ont pas été affectés, cette lignée de souris ne pourrait être utile que pour l'étude des anticorps ciblant la portion C-terminale du récepteur CB2. Cette lignée de souris a d'ailleurs été analysée par réaction en chaîne par polymérase en temps réel quantitative (qRT-PCR) et il a été montré que les promoteurs étaient toujours actifs et qu'une version tronquée de l'ARNm du récepteur CB2 était toujours exprimée, ce qui indique que cette souris est un KO incomplet (Liu et al., 2009).

L'autre lignée a été développée par Deltagen Inc. et est distribuée par The Jackson Laboratory. Elle a été générée par l'insertion de la séquence codante de la néomycine dans le gène *cnr2*, engendrant la délétion des séquences codantes pour les trois premiers domaines transmembranaires (correspondants aux acides aminés 26 à 140). Bien que la séquence codante pour les acides aminés 1 à 25 demeure, il n'est pas connu si cette portion est traduite (Monory & Lutz, 2009). Après l'insertion de la cassette de néomycine, la séquence codante restante du gène *cnr2* est toujours présente dans le génome. On ne peut éliminer hors de tout doute la possibilité qu'un repliement se produise, bien que cela semble hautement improbable (Monory & Lutz, 2009). C'est justement cette lignée de souris qui a été utilisée dans nos études.

5.3.4- Les études ayant investigué la spécificité des anticorps CB2

Le récepteur CB2 fait l'objet d'une controverse par rapport à son expression dans le SNC (Ashton, 2012; Atwood & Mackie, 2010). Contrairement au récepteur CB1 (Grimsey et al., 2008b; Hajos et al., 2000; Jelsing, Larsen, & Vrang, 2008), la

spécificité des anticorps visant le récepteur CB2 utilisés lors d'études immunohistochimiques n'a pas été rigoureusement vérifiée. Plusieurs études ont d'ailleurs rappelé l'importance de contrôler et de valider les méthodes immunohistochimiques pour chaque anticorps et pour chaque tissu (Goldstein, Hunter, Forbes, Odish, & Tehrani, 2007; Lorincz & Nusser, 2008).

Les problèmes associés aux anticorps visant le récepteur CB2 soulèvent des doutes sérieux quant à la spécificité des anticorps utilisés lors d'études antérieures s'intéressant à la présence de ce récepteur dans le SNC. Par exemple, deux groupes de recherche ont montré la présence du récepteur CB2 dans le cerveau au moyen d'un anticorps que nous avons testé (KMxCB2-CT) et dont nous avons démontré son manque de spécificité en immunohistochimie (Gong et al., 2006; Suárez et al., 2008; Suarez et al., 2009). Bien que l'équipe de Suarez et al. ait employé un contrôle KO pour valider l'anticorps utilisé, ce même contrôle fut fortement mis en doute parce que le marquage n'était apparemment que réduit chez les animaux KO. On s'attend normalement à observer une redistribution complète du marquage chez ce type de contrôle (Ashton, 2012).

Tout récemment, une étude s'est intéressée tout comme nous à la spécificité de certains anticorps visant le récepteur CB2, mais en les testant dans le cerveau (Baek et al., 2013). Par contre, leurs résultats sont bien différents des nôtres. En effet, Baek et al. montrent que les anticorps visant le récepteur CB2 qui sont les plus utilisés et qui ont été testés par certaines études détectent un marquage chez l'animal KO. Cet article a testé plusieurs des mêmes anticorps que nous avons testé, dont celui que nous avons jugé spécifique (101550). Par contre, il existe plusieurs facteurs pouvant expliquer une telle divergence entre leurs résultats et les nôtres.

D'abord, ils ont testé leurs anticorps dans le cerveau alors que les nôtres furent testés dans la rétine. Il faut comprendre que les immunohistochimies dans le cerveau ont davantage de limites méthodologiques que la plupart des autres méthodes biochimiques (Rhodes & Trimmer, 2006). La composition cellulaire et moléculaire du cerveau est relativement complexe et hétérogène comparativement à d'autres tissus. Ainsi, les chances qu'un anticorps se lie de manière non-spécifique sont grandement augmentées.

Ensuite, les techniques d'immunohistochimie sont particulièrement complexes, surtout lorsque la protéine d'intérêt est possiblement présente, mais en très petite quantité. Il est en effet possible que la présence d'une protéine telle que le récepteur CB2 soit si faible dans un tissu que le signal recueilli soit inférieur au seuil de détection de l'appareil utilisé pour en faire l'étude. Concrètement, il se pourrait fort bien que le récepteur CB2 soit présent dans le SNC, mais à des quantités si faibles que même un microscope confocal ne saurait détecter. Dans ce contexte, il est essentiel de contrôler plusieurs paramètres pouvant affecter la qualité de l'immunohistochimie. Parmi ceux-ci, notons les paramètres affectant la présentation de l'antigène (le pH de l'agent fixatif utilisé, la concentration en aldéhyde du fixatif, le mode de fixation, la durée de la fixation, la présence ou non de post-fixation, l'application de techniques d'*antigen-retrieval*, la méthode de congélation, le type de résine utilisée pour la congélation) et les conditions d'incubation de l'anticorps primaire (la concentration de l'anticorps primaire, le pH et la composition chimique du tampon de dilution de l'anticorps, la durée et la température de l'incubation) (voir pour revue Lorincz et Nusser (2008)). De notre propre expérience, la qualité de la fixation est l'un des facteurs affectant le plus la qualité des immunohistochimies, surtout lorsque celles-ci impliquent le récepteur CB2.

5.3.5- Applications et limites de l'étude

Les résultats de l'étude de validation des anticorps ciblant le récepteur CB2 peuvent être utiles de plusieurs manières. D'abord, ils relancent le débat de la présence ou non du récepteur CB2 dans les neurones du SNC. Ces résultats apportent en effet un éclairage nouveau, avec des tests de spécificité plus poussés que toute autre étude s'étant intéressée à la présence du récepteur CB2 dans la rétine.

Par contre, cette étude ne peut s'appliquer à toutes les situations. Elle indique que l'anticorps 101550 de Cayman Chemical est spécifique dans la rétine de souris en immunohistochimie. L'étude ne démontre aucunement la spécificité de cet anticorps en immunobuvardage.

De plus, les résultats montrent la spécificité de l'anticorps 101550 et le manque de spécificité des autres anticorps dans la rétine de souris. Il ne faut surtout pas comprendre que ces résultats sont applicables à tous les tissus du SNC. Tel que décrit auparavant, la rétine est une structure possédant sept types cellulaires alors que le cerveau est une structure hétérogène en contenant plus de 200. Pour qu'un anticorps puisse être considéré comme spécifique dans le cerveau, il est impératif qu'il soit validé dans ce tissu.

5.4- Rôles du système eCB dans la rétine adulte

Dans la littérature, plusieurs données relatives à l'expression du système eCB suggèrent que ce dernier aurait un rôle dans la fonction rétinienne adulte. Certaines données fonctionnelles démontrent une implication des récepteurs aux cannabinoïdes dans la réponse des cônes et des bâtonnets (Fan & Yazulla, 2003; Straiker & Sullivan, 2003). Cependant, ces études ont été faites *in vitro* en isolant la réponse d'un type cellulaire bien précis. Il est donc difficile d'en extrapoler un effet global sur la rétine. Nous avons donc entrepris d'étudier les rôles des récepteurs CB1 et CB2 dans la fonction de la rétine adulte et la distribution du récepteur CB2.

5.4.1- La distribution du récepteur CB2

Nous avons analysé le patron d'expression du récepteur CB2 dans la rétine de souris adulte, en effectuant des colocalisations avec des marqueurs spécifiques aux différents types cellulaires composant la rétine. Nos données nous ont permis de constater que le récepteur s'exprime dans toutes les couches de la rétine. Nous avons localisé précisément ce récepteur dans le corps cellulaire et les segments internes des cônes et des bâtonnets, dans le soma et les dendrites des cellules horizontales, dans la membrane du soma des cellules bipolaires des cônes et des bâtonnets et dans le soma des cellules ganglionnaires. Ces données, schématisées à la Figure 5.1, sont en accord avec les résultats de Lopez et al. (2011) qui, en se basant uniquement sur la morphologie et le positionnement des cellules rétinienne, ont conclu que le récepteur CB2 s'exprime dans les cellules horizontales, amacrines

et ganglionnaires. Nos données sont également en accord avec les résultats de Lu et al. (2000) qui ont montré que le récepteur CB2 est présent dans les segments internes des photorécepteurs, dans l'INL et dans la GCL.

Par contre, nos résultats vont à l'encontre d'une autre étude publiée par notre propre laboratoire et selon laquelle le récepteur CB2 est localisé exclusivement dans les cellules de Müller du singe Vervet (Bouskila et al., 2013). Quels facteurs pourraient expliquer cette différence? Cette étude, tout comme la nôtre, a utilisé l'anticorps 101550 de Cayman Chemical et les techniques d'immunohistochimie sont identiques. Nous croyons que la raison pouvant expliquer cette différence de distribution est la faible homologie entre les séquences d'ADNc des récepteurs CB2 de l'humain et de la souris. Contrairement au récepteur CB1, qui est conservé entre plusieurs espèces parmi les mammifères, les amphibiens, les oiseaux et les poissons (Soderstrom & Johnson, 2000; Soderstrom, Leid, Moore, & Murray, 2000; Yamaguchi, Macrae, & Brenner, 1996), le récepteur CB2 est très divergent. En fait, les récepteurs CB2 humains et murins ne partagent que 81% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés (Brown et al., 2002; Griffin, Tao, & Abood, 2000). Cette différence pourrait être à l'origine d'une pharmacologie distincte du récepteur CB2 entre plusieurs espèces animales (Mukherjee et al., 2004). D'ailleurs, de telles divergences inter-espèces ont déjà été rapportées pour d'autres GPCRs comme la bradykinine (Hess et al., 1994) et le récepteur histaminergique H3 (Yao et al., 2003).

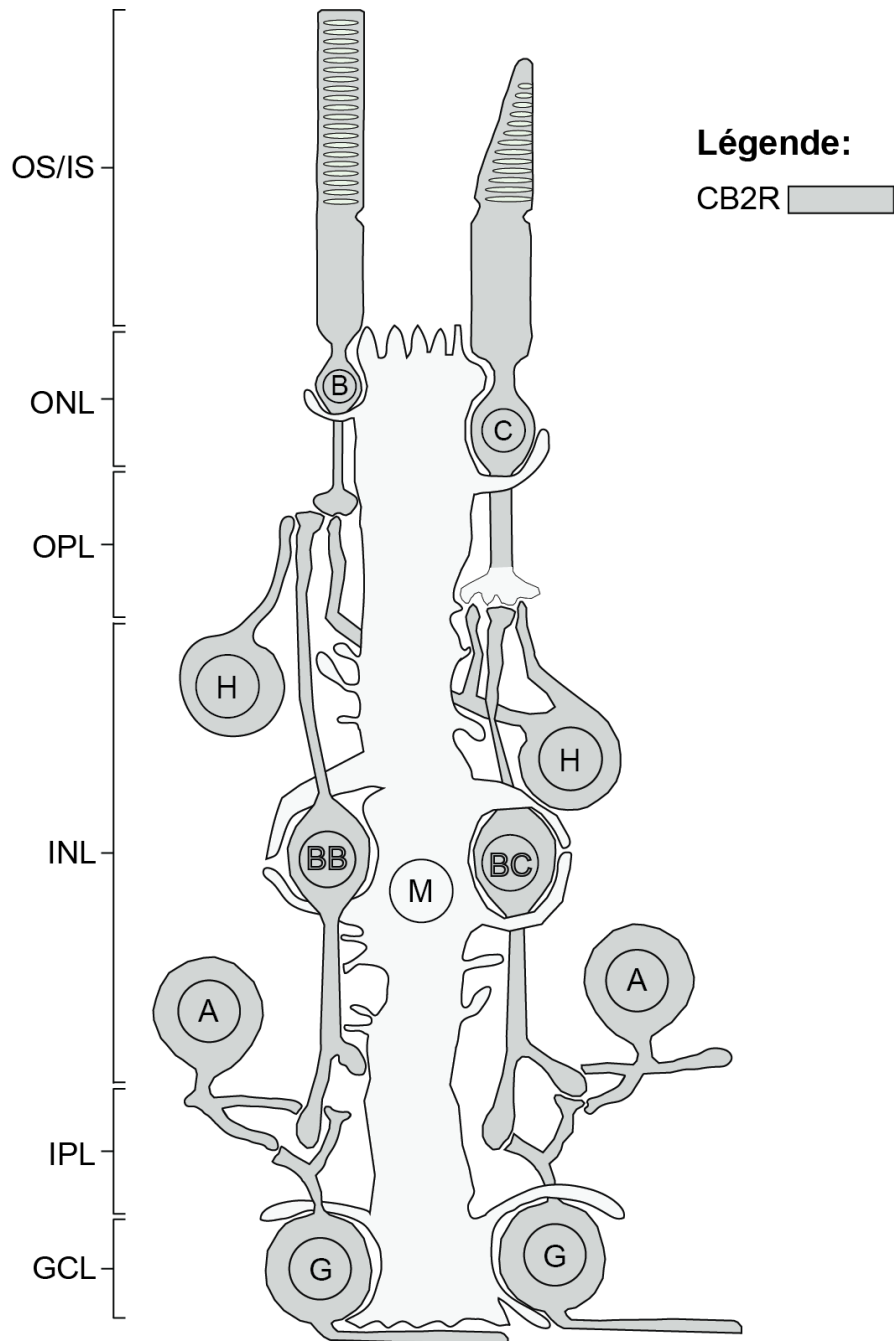


Figure 5.1 Distribution schématisée du récepteur CB2 dans la rétine de souris

Le récepteur CB2 est présent dans tous les types cellulaires de la rétine, à l'exception des cellules de Müller et des pédicules des cônes (B : bâtonnet, C : cône, H : cellule horizontale, BB : cellule bipolaire liée aux bâtonnets, BC : cellule bipolaire liée aux cônes, M : cellule de Müller, A : cellule amacrine, G : cellule ganglionnaire; figure adaptée de Bouskila et al. (2013)).

5.4.2- La fonction du récepteur CB1

Nos données indiquent que l'élimination du récepteur CB1 n'a pas causé un impact sur l'activité rétinienne telle que mesurée par l'ERG. L'absence de changements fonctionnels est surprenante étant donné que le récepteur CB1 est grandement distribué dans la rétine de rongeur (Hu et al., 2010; Yazulla et al., 1999; Zabouri, Bouchard, et al., 2011). De plus, certains auteurs ont rapporté que l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes module différemment les courants calciques et potassiques dans les cônes et les bâtonnets (Fan & Yazulla, 2003, 2007; Straiker & Sullivan, 2003).

Ces auteurs suggèrent notamment que l'effet net de l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes sur les courants calciques et potassiques des bâtonnets serait une diminution de la sensibilité à la lumière. En nous basant sur ces résultats, nous nous attendions à observer une augmentation de l'amplitude de l'onde a chez les animaux *cnr1*^{-/-}. Étant donné qu'aucun effet ne fut détecté chez ces souris, cela pourrait indiquer que la modulation de ces courants par le récepteur CB1 est trop faible pour être mesurée par l'ERG.

L'effet global de l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes sur les cônes est plus difficile à déduire, puisque les variations des courants ioniques engendrent des conséquences différentes (Straiker & Sullivan, 2003). Nos résultats ne fournissent aucune indication supplémentaire par rapport à cette situation puisque l'élimination du récepteur CB1 n'a causé aucun effet sur la réponse des cônes.

L'électrorétinogramme ne reflète que l'activité des photorécepteurs, des cellules bipolaires et de Müller (Smith, 2002). Conséquemment, nos données ne peuvent statuer quant à la participation du récepteur dans l'activité d'autres neurones rétiniens tels que les cellules horizontales, amacrines ou ganglionnaires. Cette hypothèse est supportée par le fait que plusieurs études ont démontré que l'activation du récepteur CB1 module l'excitabilité des cellules amacrines et ganglionnaires (Lalonde et al., 2006; Middleton & Protti, 2011; Warrier & Wilson, 2007).

Néanmoins, nos résultats suggèrent que l'absence du récepteur CB1 n'affecte pas la réponse globale de la rétine. Par contre, ce récepteur pourrait toujours affecter

d'autres structures du système visuel comme nous avons rapporté que le récepteur CB1 exerce une action régulatrice sur le couplage neurovasculaire et l'organisation fonctionnelle du cortex visuel de la souris (Abbas Farishta et al., 2010).

5.4.3- La fonction du récepteur CB2

En conditions scotopiques, nos résultats indiquent que l'amplitude de l'onde a est augmentée chez les animaux *cnr2^{-/-}* à plusieurs intensités de stimulation lumineuse. Étant donné qu'il est accepté que l'onde a reflète la réponse des photorécepteurs, cet effet pourrait représenter les conséquences de l'élimination du récepteur CB2 sur ces cellules. Tel que mentionné dans l'introduction, l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes par un agoniste diminue la sensibilité des bâtonnets (Straiker & Sullivan, 2003). Puisque nos résultats n'indiquent aucun changement de l'onde a chez les animaux *cnr1^{-/-}* et une augmentation de l'onde a chez les souris *cnr2^{-/-}*, nous suggérons que l'altération de la sensibilité des bâtonnets rapportée par Straiker et Sullivan (2003) pourrait être médiée par le récepteur CB2 plutôt que le récepteur CB1.

Notre étude a montré que le récepteur CB2 est exprimé dans les cellules bipolaires de la souris. De plus, Yazulla et al. (2000) ont démontré que les récepteurs aux cannabinoïdes modulent les courants potassiques dans les cellules bipolaires. En nous basant sur ces résultats et sur le fait que les cellules bipolaires contribuent en partie à l'onde b, nous nous attendions à ce que l'élimination du récepteur CB2 affecte l'amplitude ou la latence de l'onde b. Nos résultats montrent seulement que l'amplitude de l'onde b suit une tendance de telle sorte qu'elle est légèrement plus élevée chez les animaux *cnr2^{-/-}*, quoique cette tendance n'est pas statistiquement significative. Aucune tendance n'a été observée pour la latence de l'onde b.

En conditions photopiques, l'amplitude de l'onde b était supérieure chez les animaux *cnr2^{-/-}* aux temps intermédiaires (10 et 15 minutes). Parmi les rôles attribués aux récepteurs aux cannabinoïdes, on dénote les mécanismes d'adaptation tels que ceux de la dépression à long terme (Huang et al., 2008; Liu, Heynen, et al., 2008; Sjostrom et al., 2003) et la diminution de la relâche synaptique (Fan & Yazulla, 2007)

dans le système visuel et ailleurs dans le SNC. Enfin, ces résultats suggèrent que les récepteurs aux cannabinoïdes pourraient être impliqués dans des mécanismes participant à l'adaptation rétinienne.

Finalement, nous avons montré que les changements fonctionnels observés dans cette étude ne sont pas dus à une distribution anormale des cellules rétiniennes ou à une compensation de l'activité du système eCB. Plusieurs études ont montré que le système eCB interagit avec les systèmes GABAergique, glutamatergique et dopaminergique (Chan et al., 1998; Romero et al., 1998; Schlicker et al., 1996; Shen et al., 1996). Il serait théoriquement possible que les changements observés dans l'activité rétinienne chez les animaux *cnr2^{-/-}* et/ou que l'absence de changements des souris *cnr1^{-/-}* soient dus à des mécanismes de compensation des systèmes GABAergiques, glutamatergiques ou dopaminergiques. Mais ceci reste à être prouvé expérimentalement.

5.5- Synthèse globale

À notre connaissance, notre étude est la première à localiser, avec une grande précision, le récepteur CB2 dans la rétine de rongeur. La vaste distribution du récepteur CB2 dans la rétine de souris suggère que les cannabinoïdes pourraient influencer plusieurs fonctions physiologiques de l'œil. Certaines études ont démontré que la consommation de cannabis peut améliorer la vision nocturne (Russo et al., 2004; West, 1991). Ces découvertes sont en accord avec nos résultats puisque nous avons noté une augmentation de l'amplitude de l'onde a en conditions scotopiques chez les animaux *cnr2^{-/-}*. Notre étude est la première à corroborer, avec des techniques avancées, les conclusions de l'étude de Russo et al. (2004).

De nos jours, de nombreuses pathologies, telles que l'anorexie, les vomissements, la douleur, l'inflammation, la sclérose en plaques, certains troubles dégénératifs, l'épilepsie, le glaucome, l'ostéoporose, la schizophrénie, certains troubles cardiovasculaires, l'obésité et les troubles liés au syndrome métabolique, pour n'en nommer que quelques-unes, sont traitées ou pourraient être traitées par des agonistes ou des antagonistes des cannabinoïdes (voir pour revue Kogan et

Mechoulam (2007). En raison de leur très faible toxicité et des effets indésirables généralement bénins de cette classe de produits, on ne peut nier leur potentiel clinique. Par contre, les résultats de notre étude montrant la présence du récepteur CB2 dans les tissus neuronaux laissent croire que les effets indésirables de futurs médicaments cannabinoïdes pourraient être plus étendus que l'on ne croit. Dans ce cas, il sera essentiel de bien évaluer l'impact des composés sur les régions exprimant des récepteurs CB1 et CB2 afin d'éviter de graves effets indésirables.

5.6- Futures directions

5.6.1- Les cannabinoïdes et la vision

Après que nous ayons démontré l'impact des récepteurs aux cannabinoïdes dans la fonction rétinienne, il serait extrêmement intéressant de poursuivre de nouvelles expériences. Dans un premier temps, nous croyons qu'il serait utile d'étudier l'impact des récepteurs aux cannabinoïdes sur les aires visuelles supérieures (CS, LGN, cortex visuel primaire et secondaires). Pour se faire, nous pourrions utiliser les techniques d'électrophysiologie et d'imagerie optique pour observer l'effet de l'administration d'un ligand cannabinoïde sur ces régions.

Bien que nos résultats aient mis en évidence un rôle du récepteur CB2 dans le fonctionnement de la rétine adulte, la méthode utilisée (l'électrorétinographie) ne permet pas une compréhension détaillée de ce rôle. En outre, il est difficile de connaître la fonction exacte du récepteur CB2 pour un type cellulaire précis. Il serait intéressant de poursuivre l'investigation en effectuant des enregistrements *in vivo* sur des rétines exposées à des ligands cannabinoïdes spécifiques au récepteur CB2.

Ensuite, on pourrait explorer l'impact des eCBs sur la fonction rétinienne et/ou des aires visuelles supérieures. Une alternative à l'étude des effets chroniques ou aigus des eCBs est d'utiliser des souris KO dont les niveaux en eCBs sont anormaux. Ces animaux fournissent une occasion d'étudier l'effet de la suppression chronique de certaines protéines sur la plasticité synaptique, la neuroprotection et certains processus compensatoires qui pourraient se produire lors d'un traitement thérapeutique chronique. Pour se faire, on pourrait comparer les réponses de souris

dagl^{-/-} et *mg1*^{-/-} afin d'étudier l'impact du 2-AG ou des souris *faah*^{-/-} et *nape-pld*^{-/-} pour observer l'effet de l'AEA. Enfin, étant donné qu'il existe plusieurs similarités dans les rôles des récepteurs CB1 et CB2, il serait intéressant d'évaluer la fonction rétinienne chez des souris transgéniques n'ayant ni récepteurs CB1, ni CB2.

Une autre avenue intéressante serait l'injection locale ou systémique d'un ligand cannabinoïde. Par exemple, on pourrait injecter ce ligand par voie intrapéritonéale ou intra-vitréale et effectuer ensuite un électrorétinogramme de l'animal pour évaluer l'impact sur sa fonction rétinienne.

5.6.2- Le système eCB et le développement

Notre laboratoire a déjà observé l'expression et la distribution du récepteur CB1 et de l'enzyme de dégradation FAAH au cours du développement rétinien du rat. Maintenant qu'un anticorps ciblant le récepteur CB2 est caractérisé, il semble réalisable d'étudier le patron d'expression temporel et spatial de ce récepteur au cours du développement de la rétine de rat. Cette étude permettrait de savoir si le récepteur CB2 est exprimé de manière constante ou transitoire au cours du développement postnatal et dans quels types cellulaires il est localisé.

Un autre élément du système eCB méritant d'être davantage étudié est le 2-AG. Il serait facilement réalisable d'observer le patron d'expression spatial et temporel des enzymes participant à la synthèse (DAGL α) et à la dégradation (MGL) du 2-AG. On pourrait également doser précisément la quantité de 2-AG présente dans la rétine à chaque stade du développement postnatal grâce à la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS).

De plus, de récentes études provenant de notre laboratoire ont démontré que le système eCB est impliqué dans l'établissement de la voie rétino-thalamique (Argaw et al., 2011). L'étude de la fonction du système eCB dans la synaptogenèse pourrait être réalisée en utilisant certains types de souris transgéniques dont diverses cellules rétinienne sont fluorescentes. En les exposant à divers ligands cannabinoïdes, il serait possible d'évaluer leur impact sur la synaptogenèse.

5.6.3- La variabilité des réponses physiologiques inter-espèces

Une meilleure compréhension des différences inter-espèces du récepteur CB2 fournirait des informations essentielles sur l'action des composés cannabinoïdes sur des modèles *in vivo* et aiderait à extrapoler les effets observés des modèles animaux aux êtres humains. Ainsi, une étude s'intéressant précisément aux acides aminés qui sont responsables de cette différence serait d'une grande utilité.

On pourrait également utiliser d'autres modèles animaux tels que le singe, le rat, le chat et même chez l'humain afin d'étudier l'effet de ligands cannabinoïdes modulant le récepteur CB2 sur certaines fonctions physiologiques du système visuel. Que ces fonctions soient rétiniennes ou des aires visuelles supérieures, de telles données provenant de plusieurs espèces permettraient certainement d'approfondir la littérature scientifique sur le récepteur CB2.

6- Conclusion

Les recherches composant ce mémoire ont permis de mieux comprendre le rôle du système eCB dans la rétine. D'abord, nous avons validé la spécificité d'un anticorps visant le récepteur CB2 dans le but d'établir le patron d'expression de ce récepteur à l'aide de techniques d'immunohistochimie. Ce fait marquant pourrait permettre la réalisation d'études permettant la localisation précise de ce récepteur dans d'autres régions du SNC.

Ensuite, nous avons montré que les récepteurs aux cannabinoïdes ont des rôles différents dans la fonction rétinienne. Le récepteur CB2 est impliqué dans la réponse des photorécepteurs de même qu'au cours de l'adaptation à la lumière, alors que le récepteur CB1 ne semble pas impliqué dans la fonction rétinienne.

Étant donné que les neurones rétiniens sont des acteurs essentiels de la régulation des informations visuelles, la modulation du système eCB à ce niveau constitue une cible thérapeutique intéressante. Il est possible d'imaginer des thérapies basées sur le contrôle de ce système, permettant des avancées dans la recherche pour le traitement des maladies de la rétine.

Comme toujours, l'avènement de nouvelles découvertes provoque davantage de questions qu'elle n'apporte de réponses. C'est dans cet état d'esprit que les chercheurs s'intéressant au système eCB seront certainement occupés au cours des prochaines années.

Bibliographie

- Abbas Farishta, R., Robert, C., Vanni, M. P., Minville, K., Bouchard, J. F., & Casanova, C. (2010). *Effects of cannabinoid CB1 receptor on hemodynamic responses and functional organization of the primary visual cortex*. Communication présenté 2010 Neuroscience Meeting Planner, San Diego, CA.
- Adams, A. J., Brown, B., Haegerstrom-Portnoy, G., Flom, M. C., & Jones, R. T. (1978). Marijuana, alcohol, and combined drug effects on the time course of glare recovery. *Psychopharmacology (Berl)*, 56(1), 81-86.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (4th edition^e éd.). New York: Garland Science.
- Alger, B. E., & Kim, J. (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci*, 34(6), 304-315.
- Anavi-Goffer, S., & Mulder, J. (2009). The polarised life of the endocannabinoid system in CNS development. *Chembiochem*, 10(10), 1591-1598.
- Argaw, A., Duff, G., Zabouri, N., Cecyre, B., Chaine, N., Cherif, H., . . . Bouchard, J. F. (2011). Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. *J Neurosci*, 31(4), 1489-1499.
- Ashton, J. C. (2012). The use of knockout mice to test the specificity of antibodies for cannabinoid receptors. *Hippocampus*, 22(3), 643-644.
- Ashton, J. C., Friberg, D., Darlington, C. L., & Smith, P. F. (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett*, 396(2), 113-116.

- Atwood, B. K., & Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*, *160*(3), 467-479.
- Baek, J. H., Darlington, C. L., Smith, P. F., & Ashton, J. C. (2013). Antibody testing for brain immunohistochemistry: Brain immunolabeling for the cannabinoid CB2 receptor. *J Neurosci Methods*, *216*(2), 87-95.
- Barraco, R., Bellomonte, L., Brai, M., & Anastasi, M. (2006). Analysis of the human a-wave ERG component. *Physiol Meas*, *27*(9), 881-899.
- Barutta, F., Piscitelli, F., Pinach, S., Bruno, G., Gambino, R., Rastaldi, M. P., . . . Gruden, G. (2011). Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes*, *60*(9), 2386-2396.
- Basavarajappa, B. S. (2007). Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, *14*(3), 237-246.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience. Exploring the Brain*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Beermann, S., Seifert, R., & Neumann, D. (2012). Commercially available antibodies against human and murine histamine H(4)-receptor lack specificity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *385*(2), 125-135. doi: 10.1007/s00210-011-0700-4
- Begbie, J., Doherty, P., & Graham, A. (2004). Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. *J Anat*, *205*(3), 213-218.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, *277*(5329), 1094-1097.

- Benito, C., Kim, W. K., Chavarria, I., Hillard, C. J., Mackie, K., Tolon, R. M., . . . Romero, J. (2005). A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis. *J Neurosci*, *25*(10), 2530-2536.
- Berghuis, P., Dobszay, M. B., Wang, X., Spano, S., Ledda, F., Sousa, K. M., . . . Harkany, T. (2005). Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(52), 19115-19120.
- Berghuis, P., Rajnicek, A. M., Morozov, Y. M., Ross, R. A., Mulder, J., Urban, G. M., . . . Harkany, T. (2007). Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science*, *316*(5828), 1212-1216.
- Berrendero, F., Garcia-Gil, L., Hernandez, M. L., Romero, J., Cebeira, M., de Miguel, R., . . . Fernandez-Ruiz, J. J. (1998). Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*, *125*(16), 3179-3188.
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J. A., Di Marzo, V., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*, *33*(3), 181-191.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J. J., & Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*, *256*(2), 377-380.
- Bisogno, T., Delton-Vandenbroucke, I., Milone, A., Lagarde, M., & Di Marzo, V. (1999). Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Arch Biochem Biophys*, *370*(2), 300-307.

- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M., Ligresti, A., . . . Doherty, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *The Journal of cell biology*, 163(3), 463-468.
- Blankman, J. L., Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 14(12), 1347-1356.
- Bodei, S., Arrighi, N., Spano, P., & Sigala, S. (2009). Should we be cautious on the use of commercially available antibodies to dopamine receptors? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379(4), 413-415. doi: 10.1007/s00210-008-0384-6
- Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., . . . Rimm, D. (2010). Antibody validation. *Biotechniques*, 48(3), 197-209.
- Bouaboula, M., & Dussossoy, D. (1999). Regulation of Peripheral Cannabinoid Receptor CB2 Phosphorylation by the Inverse Agonist SR 144528. *Journal of Biological Chemistry*.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., . . . Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, 312 (Pt 2), 637-641.
- Bouaboula, M., Rinaldi, M., Carayon, P., Carillon, C., Delpech, B., Shire, D., . . . Casellas, P. (1993). Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem*, 214(1), 173-180.
- Bouskila, J., Burke, M. W., Zabouri, N., Casanova, C., Pfitz, M., & Bouchard, J. F. (2012). Expression and localization of the cannabinoid receptor type 1 and the

enzyme fatty acid amide hydrolase in the retina of vervet monkeys. *Neuroscience*, 202, 117-130.

Bouskila, J., Javadi, P., Casanova, C., Ptito, M., & Bouchard, J. F. (2013). Muller cells express the cannabinoid CB2 receptor in the vervet monkey retina. *J Comp Neurol*, 521(11), 2399-2415.

Bringmann, A., Francke, M., Pannicke, T., Biedermann, B., Kodal, H., Faude, F., . . . Reichenbach, A. (2000). Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Muller cells. *Glia*, 29(1), 35-44.

Brown, D., Lydon, J., McLaughlin, M., Stuart-Tilley, A., Tyszkowski, R., & Alper, S. (1996). Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochem Cell Biol*, 105(4), 261-267.

Brown, S. M., Wager-Miller, J., & Mackie, K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1576(3), 255-264.

Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T., & Onaivi, E. (2008). Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse (New York, N.Y.)*, 62(12), 944-949.

Buckley, N. E., Hansson, S., Harta, G., & Mezey, E. (1998). Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*, 82(4), 1131-1149.

Buckley, N. E., McCoy, K. L., Mezey, E., Bonner, T., Zimmer, A., Felder, C. C., . . . Zimmer, A. (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol*, 396(2-3), 141-149.

- Cécyre, B., Thomas, S., Casanova, C., & Bouchard, J.-F. (2013). Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*.
- Cernecka, H., Ochodnicky, P., Lamers, W. H., & Michel, M. C. (2012). Specificity evaluation of antibodies against human beta3-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 385(9), 875-882. doi: 10.1007/s00210-012-0767-6
- Chan, P. K., Chan, S. C., & Yung, W. H. (1998). Presynaptic inhibition of GABAergic inputs to rat substantia nigra pars reticulata neurones by a cannabinoid agonist. *Neuroreport*, 9(4), 671-675.
- Chen, J., Matias, I., Dinh, T., Lu, T., Venezia, S., Nieves, A., . . . Di Marzo, V. (2005). Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 330(4), 1062-1067.
- Cox, M. L., Haller, V. L., & Welch, S. P. (2007). The antinociceptive effect of Delta9-tetrahydrocannabinol in the arthritic rat involves the CB(2) cannabinoid receptor. *Eur J Pharmacol*, 570(1-3), 50-56.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604), 83-87.
- Dasilva, M., Grieve, K., Cudeiro, J., & Rivadulla, C. (2012). Endocannabinoid CB1 receptors modulate visual output from the thalamus. *Psychopharmacology*, 219(3), 835-845.
- Dawson, W. W., Jimenez-Antillon, C. F., Perez, J. M., & Zeskind, J. A. (1977). Marijuana and vision--after ten years' use in Costa Rica. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16(8), 689-699.

- de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M., & Vogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*, 5(12), 1512-1526.
- Demuth, D. G., & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sci*, 78(6), 549-563.
- den Boon, F., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., van Aken, W., Bari, M., Oddi, S., . . . Werkman, T. (2012). Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3534-3539.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34(5), 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., . . . Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.
- DeVries, S. H. (2000). Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron*, 28(3), 847-856.
- Di Marzo, V. (2006). A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci*, 27(3), 134-140.
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*, 7(5), 438-455.

- Di Marzo, V. (2009). The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res*, 60(2), 77-84.
- Di Marzo, V., & Fontana, A. (1995). Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 53(1), 1-11.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), 686-691.
- Dinh, T., Carpenter, D., Leslie, F., Freund, T., Katona, I., Sensi, S., . . . Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10819-10824.
- Dryer, R. L., & Lata, G. F. (1989). *Experimental biochemistry*. New York: Oxford University Press.
- Egertova, M., & Elphick, M. R. (2000). Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol*, 422(2), 159-171.
- Ellgren, M., Spano, S. M., & Hurd, Y. L. (2007). Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 32(3), 607-615.
- Famiglietti, E. V., Jr., & Kolb, H. (1976). Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science*, 194(4261), 193-195.

- Fan, S. F., & Yazulla, S. (2003). Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci*, 20(2), 177-188.
- Fan, S. F., & Yazulla, S. (2007). Retrograde endocannabinoid inhibition of goldfish retinal cones is mediated by 2-arachidonoyl glycerol. *Vis Neurosci*, 24(3), 257-267.
- Felder, C., Joyce, K., Briley, E., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., . . . Mitchell, R. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular pharmacology*, 48(3), 443-450.
- Felder, C. C., Briley, E. M., Axelrod, J., Simpson, J. T., Mackie, K., & Devane, W. A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16), 7656-7660.
- Felder, C. C., Nielsen, A., Briley, E. M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., . . . Becker, G. W. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*, 393(2-3), 231-235.
- Fernandez-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernandez, M. L., & Ramos, J. A. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci*, 23(1), 14-20.
- Filppula, S., Yaddanapudi, S., Mercier, R., Xu, W., Pavlopoulos, S., & Makriyannis, A. (2004). Purification and mass spectroscopic analysis of human CB2 cannabinoid receptor expressed in the baculovirus system. *J Pept Res*, 64(6), 225-236. doi: 10.1111/j.1399-3011.2004.00188.x

- Frank, S. A. (2002a). *Immunology and Evolution of Infectious Disease*. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Frank, S. A. (2002b). *Immunology and evolution of infectious disease*. Princeton,: Princeton University Press.
- Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, 83(3), 1017-1066.
- Fride, E. (2008). Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 75-81.
- Fu, J., Bottegoni, G., Sasso, O., Bertorelli, R., Rocchia, W., Masetti, M., . . . Piomelli, D. (2012). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci*, 15(1), 64-69.
- Fu, Y., & Yau, K. W. (2007). Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch*, 454(5), 805-819.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., . . . Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232(1), 54-61.
- Gao, Y., Vasilyev, D., Goncalves, M., Howell, F., Hobbs, C., Reisenberg, M., . . . Doherty, P. (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(6), 2017-2024.

- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, *86*, 1646-1647.
- Garcia, L., de Miguel, R., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1996). Perinatal delta 9-tetrahydrocannabinol exposure in rats modifies the responsiveness of midbrain dopaminergic neurons in adulthood to a variety of challenges with dopaminergic drugs. *Drug Alcohol Depend*, *42*(3), 155-166.
- Ghosh, K., Bujan, S., Haverkamp, S., Feigenspan, A., & Wässle, H. (2004). Types of bipolar cells in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, *469*(1), 70-82.
- Goldsby, R., Kindt, T. J., Kuby, J., & Osbourne, B. A. (2002). *Immunology*. (5th edition^e éd.).
- Goldstein, N. S., Hunter, S., Forbes, S., Odish, E., & Tehrani, M. (2007). Estrogen receptor antibody incubation time and extent of immunoreactivity in invasive carcinoma of the breast: the importance of optimizing antibody avidity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *15*(2), 203-207.
- Gomez, M., Hernandez, M. L., Pazos, M. R., Tolon, R. M., Romero, J., & Fernandez-Ruiz, J. (2008). Colocalization of CB1 receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development: evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance. *Neuroscience*, *153*(3), 687-699.
- Gong, J.-P., Onaivi, E., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P., Brusco, A., & Uhl, G. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research*, *1071*(1), 10-23.

- Griffin, G., Tao, Q., & Abood, M. E. (2000). Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(3), 886-894.
- Grimsey, N., Goodfellow, C., Scotter, E., Dowie, M., Glass, M., & Graham, E. (2008a). Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *Journal of neuroscience methods*, 171(1), 78-86. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.02.014
- Grimsey, N. L., Goodfellow, C. E., Scotter, E. L., Dowie, M. J., Glass, M., & Graham, E. S. (2008b). Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *J Neurosci Methods*, 171(1), 78-86.
- Gulyas, A. I., Cravatt, B. F., Bracey, M. H., Dinh, T. P., Piomelli, D., Boscia, F., & Freund, T. F. (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20(2), 441-458.
- Hajos, N., Katona, I., Naiem, S. S., MacKie, K., Ledent, C., Mody, I., & Freund, T. F. (2000). Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*, 12(9), 3239-3249.
- Hamdani, N., & van der Velden, J. (2009). Lack of specificity of antibodies directed against human beta-adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379(4), 403-407. doi: 10.1007/s00210-009-0392-1
- Hanly, W. C., Artwohl, J. E., & Bennett, B. T. (1995). Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR J*, 37(3), 93-118.
- Hanus, L. O. (2009). Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med Res Rev*, 29(2), 213-271.

- He, S., Weiler, R., & Vaney, D. I. (2000). Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *J Comp Neurol*, 418(1), 33-40.
- Hébert, M., & Lachapelle, P. (2003). Evaluation of Retinal Function: Electroretinography. Dans L. A. L. a. A. DiPolo (dir.), *Ocular Neuroprotection* (p. 249-272). New York: Marcel Dekker.
- Heckenlively, J. R., & Arden, G. B. (2006). *Principles and practice of clinical electrophysiology of vision*. (2nd^e éd.). Cambridge, Mass.: MIT Press.
- Herkenham, M., Lynn, A., Johnson, M., Melvin, L., de Costa, B., & Rice, K. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11(2), 563-583.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(5), 1932-1936.
- Hernandez, M., Berrendero, F., Suarez, I., Garcia-Gil, L., Cebeira, M., Mackie, K., . . . Fernandez-Ruiz, J. (2000). Cannabinoid CB(1) receptors colocalize with tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons and their activation increases the levels of this enzyme. *Brain Res*, 857(1-2), 56-65.
- Hess, J. F., Borkowski, J. A., Macneil, T., Stonesifer, G. Y., Fraher, J., Strader, C. D., & Ransom, R. W. (1994). Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Mol Pharmacol*, 45(1), 1-8.
- Howlett, A. C. (1985). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, 27(4), 429-436.

- Howlett, A. C., Qualy, J. M., & Khachatrian, L. L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, 29(3), 307-313.
- Hu, S. S., Arnold, A., Hutchens, J. M., Radicke, J., Cravatt, B. F., Wager-Miller, J., . . . Straiker, A. (2010). Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J Comp Neurol*, 518(18), 3848-3866.
- Huang, Y., Yasuda, H., Sarihi, A., & Tsumoto, T. (2008). Roles of endocannabinoids in heterosynaptic long-term depression of excitatory synaptic transmission in visual cortex of young mice. *J Neurosci*, 28(28), 7074-7083.
- Hubel, D. (1994). *L'oeil, le cerveau et la vision. Les étapes cérébrales du traitement visuel.* (Traduit par P. This). Paris: Pour la Science.
- Huxlin, K. R., Sefton, A. J., & Furby, J. H. (1992). The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *J Neurocytol*, 21(7), 530-544.
- Jarai, Z., Wagner, J. A., Goparaju, S. K., Wang, L., Razdan, R. K., Sugiura, T., . . . Kunos, G. (2000). Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension*, 35(2), 679-684.
- Jelsing, J., Larsen, P. J., & Vrang, N. (2008). Identification of cannabinoid type 1 receptor expressing cocaine amphetamine-regulated transcript neurons in the rat hypothalamus and brainstem using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroscience*, 154(2), 641-652.
- Jensen, B. C., Swigart, P. M., & Simpson, P. C. (2009). Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379(4), 409-412. doi: 10.1007/s00210-008-0368-6

- Jiang, B., Huang, S., de Pasquale, R., Millman, D., Song, L., Lee, H. K., . . . Kirkwood, A. (2010). The maturation of GABAergic transmission in visual cortex requires endocannabinoid-mediated LTD of inhibitory inputs during a critical period. *Neuron*, *66*(2), 248-259.
- Jiang, B., Sohya, K., Sarihi, A., Yanagawa, Y., & Tsumoto, T. (2010). Laminar-specific maturation of GABAergic transmission and susceptibility to visual deprivation are related to endocannabinoid sensitivity in mouse visual cortex. *J Neurosci*, *30*(42), 14261-14272.
- Jiang, S., Fu, Y., Williams, J., Wood, J., Pandarinathan, L., Avraham, S., . . . Avraham, H. K. (2007). Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS One*, *2*(7), e641.
- Kang Derwent, J. J., & Linsenmeier, R. A. (2001). Intraretinal analysis of the a-wave of the electroretinogram (ERG) in dark-adapted intact cat retina. *Vis Neurosci*, *18*(3), 353-363.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, *89*(1), 309-380.
- Karlsson, M., Contreras, J. A., Hellman, U., Tornqvist, H., & Holm, C. (1997). cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*, *272*(43), 27218-27223.
- Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*, *35*, 529-558.

- Katona, I., Urban, G. M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K. M., Piomelli, D., . . . Freund, T. F. (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, *26*(21), 5628-5637.
- Kefalov, V., Fu, Y., Marsh-Armstrong, N., & Yau, K. W. (2003). Role of visual pigment properties in rod and cone phototransduction. *Nature*, *425*(6957), 526-531.
- Kim, D., & Thayer, S. A. (2001). Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, *21*(10), RC146.
- Kiplinger, G. F., Manno, J. E., Rodda, B. E., & Forney, R. B. (1971). Dose-response analysis of the effects of tetrahydrocannabinol in man. *Clin Pharmacol Ther*, *12*(4), 650-657.
- Köfalvi, A. (2008). *Cannabinoids and the Brain*. New York: Springer.
- Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2007). Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci*, *9*(4), 413-430.
- Koyasu, T., Kondo, M., Miyata, K., Ueno, S., Miyata, T., Nishizawa, Y., & Terasaki, H. (2008). Photopic electroretinograms of mGluR6-deficient mice. *Curr Eye Res*, *33*(1), 91-99.
- Lalonde, M. R., Jollimore, C. A., Stevens, K., Barnes, S., & Kelly, M. E. (2006). Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis*, *12*, 1160-1166.
- Lei, B. (2012). Rod-driven OFF pathway responses in the distal retina: dark-adapted flicker electroretinogram in mouse. *PLoS One*, *7*(8), e43856. doi: 10.1371/journal.pone.0043856
- Leonelli, M., Britto, L. R., Chaves, G. P., & Torrao, A. S. (2005). Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Brain Res Dev Brain Res*, *156*(2), 176-182.

- Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2006). Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry*, *45*(15), 4720-4726.
- Li, J. W., & Vederas, J. C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, *325*(5937), 161-165.
- Liu, C. H., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2008). Cannabinoid receptor blockade reveals parallel plasticity mechanisms in different layers of mouse visual cortex. *Neuron*, *58*(3), 340-345.
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B. X., Kim, H. Y., Luquet, S., . . . Kunos, G. (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*, *54*(1), 1-7.
- Liu, Q. R., Pan, C. H., Hishimoto, A., Li, C. Y., Xi, Z. X., Llorente-Berzal, A., . . . Uhl, G. (2009). Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, brain, and behavior*, *8*(5), 519-530.
- Long, J. Z., Li, W., Booker, L., Burston, J. J., Kinsey, S. G., Schlosburg, J. E., . . . Cravatt, B. F. (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*, *5*(1), 37-44.
- Lopez, E. M., Tagliaferro, P., Onaivi, E. S., & Lopez-Costa, J. J. (2011). Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse*, *65*(5), 388-392.
- Lorincz, A., & Nusser, Z. (2008). Specificity of immunoreactions: the importance of testing specificity in each method. *J Neurosci*, *28*(37), 9083-9086.
- Lu, Q., Straiker, A., Lu, Q., & Maguire, G. (2000). Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci*, *17*(1), 91-95.

- Luchicchi, A., & Pistis, M. (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Mol Neurobiol*, 46(2), 374-392.
- Luisier, F., & Blu, T. (2008). SURE-LET multichannel image denoising: interscale orthonormal wavelet thresholding. *IEEE Trans Image Process*, 17(4), 482-492.
- Mackie, K., Devane, W. A., & Hille, B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol*, 44(3), 498-503.
- Mackie, K., & Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 3825-3829.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., & Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15(10), 6552-6561.
- MacNeil, M. A., & Masland, R. H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron*, 20(5), 971-982.
- Mailleux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992). Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett*, 148(1-2), 173-176.
- Mannsperger, H. A., Uhlmann, S., Schmidt, C., Wiemann, S., Sahin, O., & Korf, U. (2010). RNAi-based validation of antibodies for reverse phase protein arrays. *Proteome Sci*, 8, 69.
- Marmor, M. F., Fulton, A. B., Holder, G. E., Miyake, Y., Brigell, M., Bach, M., & International Society for Clinical Electrophysiology of, V. (2009). ISCEV

- Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol*, 118(1), 69-77.
- Marrs, W., Blankman, J., Horne, E., Thomazeau, A., Lin, Y., Coy, J., . . . Stella, N. (2010). The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nature neuroscience*, 13(8), 951-957.
- Marsicano, G., & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*, 11(12), 4213-4225.
- Masland, R. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Current opinion in neurobiology*.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564.
- Mechoulam, R. (1986). *Cannabinoids As Therapeutic Agents*. CRC Press.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., . . . et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50(1), 83-90.
- Mechoulam, R., Braun, P., & Gaoni, Y. (1967). A stereospecific synthesis of (-)-delta 1- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *J Am Chem Soc*, 89(17), 4552-4554.
- Mechoulam, R., & Hanus, L. (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*, 108(1-2), 1-13.
- Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., & Grunfeld, Y. (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science*, 169(3945), 611-612.

- Merriam, F. V., Wang, Z. Y., Guerios, S. D., & Bjorling, D. E. (2008). Cannabinoid receptor 2 is increased in acutely and chronically inflamed bladder of rats. *Neurosci Lett*, *445*(1), 130-134.
- Michel, M., Wieland, T., & Tsujimoto, G. (2009). How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, *379*(4), 385-388.
- Middleton, T., & Protti, D. (2011). Cannabinoids modulate spontaneous synaptic activity in retinal ganglion cells. *Visual neuroscience*, *28*(5), 393-402.
- Mikuriya, T. H. (1969). Marijuana in medicine: past, present and future. *Calif Med*, *110*(1), 34-40.
- Molina-Holgado, F., Alvarez, F. J., Gonzalez, I., Antonio, M. T., & Leret, M. L. (1997). Maternal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) alters indolamine levels and turnover in adult male and female rat brain regions. *Brain Res Bull*, *43*(2), 173-178.
- Molina-Holgado, F., Amaro, A., Gonzalez, M. I., Alvarez, F. J., & Leret, M. L. (1996). Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *Eur J Pharmacol*, *316*(1), 39-42.
- Monory, K., & Lutz, B. (2009). Genetic models of the endocannabinoid system. *Curr Top Behav Neurosci*, *1*, 111-139.
- Moore, K. G., Speckmann, W., & Herzig, R. P. (2007). The use of siRNA to validate immunofluorescence studies. *Methods Mol Biol*, *356*, 245-251.
- Morgan, N., Stanford, I., & Woodhall, G. (2009). Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*, *57*(4), 356-368.

- Mukherjee, S., Adams, M., Whiteaker, K., Daza, A., Kage, K., Cassar, S., . . . Yao, B. B. (2004). Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol*, *505*(1-3), 1-9.
- Mulder, J., Aguado, T., Keimpema, E., Barabas, K., Ballester Rosado, C. J., Nguyen, L., . . . Harkany, T. (2008). Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(25), 8760-8765.
- Mule, F., Amato, A., Baldassano, S., & Serio, R. (2007). Involvement of CB1 and CB2 receptors in the modulation of cholinergic neurotransmission in mouse gastric preparations. *Pharmacol Res*, *56*(3), 185-192.
- Munro, S., Thomas, K., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61-65.
- Navarro, M., de Miguel, R., Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1996). Perinatal cannabinoid exposure modifies the sociosexual approach behavior and the mesolimbic dopaminergic activity of adult male rats. *Behav Brain Res*, *75*(1-2), 91-98.
- Newman, E. A., & Frishman, L. J. (1991). The b-wave. Dans J. R. H. a. G. B. Arden (dir.), *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision* (p. 101-111). St-Louis: Mo: Mosby Year Book.
- Nikonov, S. S., Brown, B. M., Davis, J. A., Zuniga, F. I., Bragin, A., Pugh, E. N., Jr., & Craft, C. M. (2008). Mouse cones require an arrestin for normal inactivation of phototransduction. *Neuron*, *59*(3), 462-474.
- Pan, B., Wang, W., Zhong, P., Blankman, J., Cravatt, B., & Liu, Q.-s. (2011). Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 31(38), 13420-13430.

Parham, P., & Janeway, C. (2009). *The immune system*. (3rd^e éd.). London ; New York: Garland Science.

Paul, W. E. (2013). *Fundamental immunology*. (7th^e éd.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Pertwee, R. (2005). The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *The AAPS journal*.

Pertwee, R., Howlett, A., Abood, M., Alexander, S., Di Marzo, V., Elphick, M., . . . Ross, R. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological reviews*, 62(4), 588-631.

Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(11), 873-884.

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., & Rodriguez de Fonseca, F. (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci*, 21(6), 218-224.

Plaziac, C., Lachapelle, P., & Casanova, C. (2003). Effects of methanol on the retinal function of juvenile rats. *Neurotoxicology*, 24(2), 255-260.

Pradidarcheep, W., Labruyere, W. T., Dabhoiwala, N. F., & Lamers, W. H. (2008). Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J Histochem Cytochem*, 56(12), 1099-1111. doi: 10.1369/jhc.2008.952101

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & White, L. E. (2008). *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Ramirez, S. H., Hasko, J., Skuba, A., Fan, S., Dykstra, H., McCormick, R., . . . Persidsky, Y. (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J Neurosci*, *32*(12), 4004-4016.
- Reynolds, J. R. (1890). Therapeutic Uses and Toxic Effects of Cannabis Indica. *Lancet*, *135*, 637-638.
- Rhodes, K. J., & Trimmer, J. S. (2006). Antibodies as valuable neuroscience research tools versus reagents of mass distraction. *J Neurosci*, *26*(31), 8017-8020.
- Rigaudière, F., & Le Gargasson, J.-F. (2007). Électrorétinogramme, électro-oculogramme, potentiels évoqués visuels. Dans E. M. SAS (dir.), *Explorations électrophysiologiques sensorielles* (Vol. 21-045-A-10). Paris.
- Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci*, *21*(1), 109-116.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(12), 8384-8388.
- Robson, J. G., Saszik, S. M., Ahmed, J., & Frishman, L. J. (2003). Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque. *J Physiol*, *547*(Pt 2), 509-530.

- Rodriguez de Fonseca, F., Hernandez, M. L., de Miguel, R., Fernandez-Ruiz, J. J., & Ramos, J. A. (1992). Early changes in the development of dopaminergic neurotransmission after maternal exposure to cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav*, 41(3), 469-474.
- Romero, J., de Miguel, R., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1998). The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci*, 62(4), 351-363.
- Romero, J., Garcia-Palomero, E., Berrendero, F., Garcia-Gil, L., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1997). Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse*, 26(3), 317-323.
- Russo, E., Merzouki, A., Mesa, J., Frey, K., & Bach, P. (2004). Cannabis improves night vision: a case study of dark adaptometry and scotopic sensitivity in kif smokers of the Rif mountains of northern Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 99-104.
- Sagdullaev, B. T., DeMarco, P. J., & McCall, M. A. (2004). Improved contact lens electrode for corneal ERG recordings in mice. *Doc Ophthalmol*, 108(3), 181-184.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682.
- Schlicker, E., Timm, J., & Gothert, M. (1996). Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354(6), 791-795.
- Schlosburg, J., Blankman, J., Long, J., Nomura, D., Pan, B., Kinsey, S., . . . Cravatt, B. (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional

antagonism of the endocannabinoid system. *Nature neuroscience*, 13(9), 1113-1119.

Schmidt, W., Schafer, F., Striggow, V., Frohlich, K., & Striggow, F. (2012). Cannabinoid receptor subtypes 1 and 2 mediate long-lasting neuroprotection and improve motor behavior deficits after transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 227, 313-326.

Seifert, R., Strasser, A., Schneider, E. H., Neumann, D., Dove, S., & Buschauer, A. (2013). Molecular and cellular analysis of human histamine receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci*, 34(1), 33-58. doi: 10.1016/j.tips.2012.11.001

Shen, M., Piser, T. M., Seybold, V. S., & Thayer, S. A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci*, 16(14), 4322-4334.

Shire, D., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Oustric, D., Pessègue, B., Bonnin-Cabanne, O., . . . Ferrara, P. (1996). Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochimica et biophysica acta*, 1307(2), 132-136.

Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2010). Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol Biosyst*, 6(8), 1411-1418.

Sjostrom, P. J., Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2003). Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron*, 39(4), 641-654.

Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., & Leon, A. (1996). The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic

- death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), 3984-3989.
- Slaughter, M. M., & Miller, R. F. (1985). Characterization of an extended glutamate receptor of the on bipolar neuron in the vertebrate retina. *J Neurosci*, 5(1), 224-233.
- Smith, R. S. (2002). *Systematic evaluation of the mouse eye : anatomy, pathology, and biomethods*. Boca Raton: CRC Press.
- Soderstrom, K., & Johnson, F. (2000). CB1 cannabinoid receptor expression in brain regions associated with zebra finch song control. *Brain Res*, 857(1-2), 151-157.
- Soderstrom, K., Leid, M., Moore, F. L., & Murray, T. F. (2000). Behavioral, pharmacological, and molecular characterization of an amphibian cannabinoid receptor. *J Neurochem*, 75(1), 413-423.
- Sterling, P., & Demb, J. B. (2003). Retina. Dans G. M. Shepherd (dir.), *The Synaptic Organization of the Brain* (p. 217-269). Oxford: Oxford University Press.
- Stockton, R. A., & Slaughter, M. M. (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol*, 93(1), 101-122.
- Straiker, A., Hu, S. S., Long, J. Z., Arnold, A., Wager-Miller, J., Cravatt, B. F., & Mackie, K. (2009). Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*, 76(6), 1220-1227.
- Straiker, A., & Mackie, K. (2005). Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol*, 569(Pt 2), 501-517.
- Straiker, A., & Mackie, K. (2009). Cannabinoid signaling in inhibitory autaptic hippocampal neurons. *Neuroscience*, 163(1), 190-201.

- Straiker, A., Maguire, G., Mackie, K., & Lindsey, J. (1999). Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(10), 2442-2448.
- Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H. J., & Maguire, G. (1999). Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25), 14565-14570.
- Straiker, A., & Sullivan, J. M. (2003). Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander. *J Neurophysiol*, 89(5), 2647-2654.
- Straiker, A., Wager-Miller, J., Hu, S. S., Blankman, J. L., Cravatt, B. F., & Mackie, K. (2011). COX-2 and fatty acid amide hydrolase can regulate the time course of depolarization-induced suppression of excitation. *Br J Pharmacol*, 164(6), 1672-1683.
- Suarez, I., Bodega, G., Fernandez-Ruiz, J., Ramos, J. A., Rubio, M., & Fernandez, B. (2004). Down-regulation of the AMPA glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 in the rat cerebellum following pre- and perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure. *Cerebellum*, 3(2), 66-74.
- Suárez, J., Bermúdez-Silva, F., Mackie, K., Ledent, C., Zimmer, A., Cravatt, B., & de Fonseca, F. (2008). Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *The Journal of comparative neurology*, 509(4), 400-421.
- Suarez, J., Llorente, R., Romero-Zerbo, S. Y., Mateos, B., Bermudez-Silva, F. J., de Fonseca, F. R., & Viveros, M. P. (2009). Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus*, 19(7), 623-632.

- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., . . . Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215(1), 89-97.
- Sugiura, T., & Waku, K. (2002). Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem*, 132(1), 7-12.
- Sun, Y. X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., & Ueda, N. (2004). Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J*, 380(Pt 3), 749-756.
- Svíženská, I., Dubový, P., & Sulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 90(4), 501-511.
- Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., . . . Kano, M. (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron*, 65(3), 320-327.
- Touw, M. (1981). The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs*, 13(1), 23-34.
- Trezza, V., Cuomo, V., & Vanderschuren, L. J. M. (2008). Cannabis and the developing brain: insights from behavior. *European journal of pharmacology*, 585(2-3), 441-452.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M., & Mackie, K. (1997). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*.

- Van Sickle, M., Duncan, M., Kingsley, P., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., . . . Sharkey, K. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5746), 329-332.
- Vitalis, T., Laine, J., Simon, A., Roland, A., Leterrier, C., & Lenkei, Z. (2008). The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *Eur J Neurosci*, 28(9), 1705-1718.
- Volgyi, B., Chheda, S., & Bloomfield, S. A. (2009). Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol*, 512(5), 664-687.
- Walczak, J. S., Pichette, V., Leblond, F., Desbiens, K., & Beaulieu, P. (2005). Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 132(4), 1093-1102.
- Walczak, J. S., Pichette, V., Leblond, F., Desbiens, K., & Beaulieu, P. (2006). Characterization of chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes. *J Neurosci Res*, 83(7), 1310-1322.
- Walker, J. M. (1984). *Proteins*. Clifton, N.J.: Humana Press.
- Wang, J., & Ueda, N. (2009). Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3-4), 112-119.
- Warrier, A., & Wilson, M. (2007). Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Vis Neurosci*, 24(1), 25-35.
- Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(10), 747-757.

- Wässle, H., Puller, C., Müller, F., & Haverkamp, S. (2009). Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(1), 106-117.
- Watchmeister, L. L. (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res*, 17, 485-521.
- Watson, S., Chambers, D., Hobbs, C., Doherty, P., & Graham, A. (2008). The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci*, 38(1), 89-97.
- West, M. E. (1991). Cannabis and night vision. *Nature*, 351(6329), 703-704.
- Weymouth, A. E., & Vingrys, A. J. (2008). Rodent electroretinography: methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. *Prog Retin Eye Res*, 27(1), 1-44. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.09.003
- Wu, C. S., Zhu, J., Wager-Miller, J., Wang, S., O'Leary, D., Monory, K., . . . Lu, H. C. (2010). Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci*, 32(5), 693-706.
- Xin, D., & Bloomfield, S. A. (1999). Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol*, 405(1), 75-87.
- Yamaguchi, F., Macrae, A. D., & Brenner, S. (1996). Molecular cloning of two cannabinoid type 1-like receptor genes from the puffer fish *Fugu rubripes*. *Genomics*, 35(3), 603-605.
- Yao, B. B., Hutchins, C. W., Carr, T. L., Cassar, S., Masters, J. N., Bennani, Y. L., . . . Hancock, A. A. (2003). Molecular modeling and pharmacological analysis of species-related histamine H(3) receptor heterogeneity. *Neuropharmacology*, 44(6), 773-786.

- Yau, K. W. (1994). Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(1), 9-32.
- Yazulla, S. (2008). Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog Retin Eye Res*, 27(5), 501-526.
- Yazulla, S., Studholme, K. M., McIntosh, H. H., & Deutsch, D. G. (1999). Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol*, 415(1), 80-90.
- Yazulla, S., Studholme, K. M., McIntosh, H. H., & Fan, S. F. (2000). Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings. *Vis Neurosci*, 17(3), 391-401.
- Yoneda, T., Kameyama, K., Esumi, K., Daimyo, Y., Watanabe, M., & Hata, Y. (2013). Developmental and visual input-dependent regulation of the CB1 cannabinoid receptor in the mouse visual cortex. *PLoS One*, 8(1).
- Zabouri, N., Bouchard, J. F., & Casanova, C. (2011). Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina. *J Comp Neurol*, 519(7), 1258-1280.
- Zabouri, N., Ptito, M., Casanova, C., & Bouchard, J. F. (2011). Fatty acid amide hydrolase expression during retinal postnatal development in rats. *Neuroscience*, 195, 145-165.
- Zhu, X., Brown, B., Li, A., Mears, A. J., Swaroop, A., & Craft, C. M. (2003). GRK1-dependent phosphorylation of S and M opsins and their binding to cone arrestin during cone phototransduction in the mouse retina. *J Neurosci*, 23(14), 6152-6160.

Zhu, X., Li, A., Brown, B., Weiss, E. R., Osawa, S., & Craft, C. M. (2002). Mouse cone arrestin expression pattern: light induced translocation in cone photoreceptors. *Mol Vis*, 8, 462-471.

Zuardi, A. W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr*, 28(2), 153-157.