

Université de Montréal

Les impacts du récepteur GPR55 sur les fonctions visuelles

Par

Ismaël Bachand

École d'optométrie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de la Maîtrise
en Sciences de la vision, option Sciences fondamentales, appliquées et cliniques

Décembre 2022

© Ismaël Bachand, 2022

Université de Montréal

Unité académique : École d'optométrie

Ce mémoire intitulé

Les impacts du récepteur GPR55 sur les fonctions visuelles

Présenté par

Ismaël Bachand

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Sergio Crespo-Garcia

Président-rapporteur

Jean-François Bouchard

Directeur de recherche

Elvire Vaucher

Membre du jury

Résumé

Il est connu que le cannabis, par son action sur le système endocannabinoïde, affecte de multiples paramètres de la vision. Les fonctions de GPR55, un récepteur associé au système endocannabinoïde, ont moins été étudiées que celles des récepteurs cannabinoïdes les plus importants, CB1 et CB2. Nous savons cependant que GPR55 est présent dans la rétine de la souris et qu'il module la croissance et le guidage axonal des cellules ganglionnaires rétiniennes durant le développement. Le but de cette étude est d'étudier les effets de GPR55 sur la vision en utilisant un modèle de souris avec une délétion du gène *Gpr55*. Des électrorétinographies (ERG) plein champ scotopique et photopique ont été effectuées dans le but d'étudier le rôle du récepteur sur les fonctions rétiniennes. Nous avons trouvé que les souris *Gpr55*^{-/-} ont, en ERG scotopique, une amplitude réduite de l'onde-b et des potentiels oscillatoires qui ont aussi une latence plus longue. Chez ces animaux, l'onde-a photopique a aussi une amplitude plus basse. Par la suite, pour vérifier les conséquences des déficits de fonction rétinienne sur les fonctions visuelles, le modèle de réflexe optomoteur a été utilisé sur des souris *knock-out* ou avec des injections systémiques d'un antagoniste et d'un agoniste de GPR55. L'absence de GPR55 retarde le développement de l'acuité visuelle, mais la délétion de *Gpr55* ou l'action pharmacologique sur le récepteur ne change pas l'acuité visuelle chez les adultes. La délétion de *Gpr55* et l'administration d'un antagoniste du récepteur diminuent la sensibilité au contraste. Ces observations suggèrent que GPR55 peut modifier l'activité des cônes, des cellules bipolaires et des cellules de la rétine interne avec des conséquences comportementales.

Mots-clés : système endocannabinoïde, GPR55, réflexe optomoteur, acuité visuelle, sensibilité au contraste, ERG, souris.

Abstract

The observations on how cannabis affects multiple properties of vision have fostered the interest in the study of the functions of cannabinoid receptors CB1 and CB2 in the visual system. However, other non-classical cannabinoid receptors are thought to be involved in mediating the actions of cannabinoid ligands in the eye. One of these candidate receptors is GPR55, a receptor that modulates the growth and axonal guidance of retinal ganglion cells during development in mice. The purpose of this study was to investigate the effects of the deletion of the *Gpr55* gene and the pharmacological modulation of GPR55 on retinal function and visual behavior. Full-field scotopic and photopic electroretinography (ERG) were used to functionally assess the state of the retina. Recordings obtained from *Gpr55*^{-/-} mice revealed a diminution of the scotopic b-wave and the photopic a-wave responses. These animals also had reduced and delayed oscillatory potentials. The optomotor reflex method was used to evaluate the consequences of *Gpr55* deletion on visual acuity and contrast sensitivity. The absence of GPR55 delayed the developmental trajectory of visual acuity in *Gpr55* knockout mice without affecting the maximum visual acuity reached in adulthood. Pharmacological manipulation of GPR55 in adult wild-type mice did not alter visual acuity. Both the deletion of *Gpr55* and the administration of a receptor antagonist decreased contrast sensitivity while an agonist of GPR55 increased contrast sensitivity. These observations suggest that GPR55 can modify the activity of cones, bipolar cells, and cells in the inner retina with behavioral consequences.

Keywords: endocannabinoid system, GPR55, optomotor response, visual acuity, contrast sensitivity, ERG, mouse.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des figures.....	8
Liste des sigles et abréviations.....	9
Remerciements	14
Chapitre 1 – Introduction à l'article	16
Les bases du système visuel.....	16
L'importance du système visuel.....	16
Anatomie et physiologie de l'œil	18
Structures principales de l'œil.....	18
Les couches de la rétine	20
Système vasculaire oculaire et rétinien	21
Transduction de la lumière	22
Les cellules bipolaires de la rétine	24
Modulation rétinienne du signal visuel.....	27
Les cellules ganglionnaires	28
Autres cellules rétiniennes.....	29
La sensibilité au contraste.....	30
Les voies visuelles.....	31
Système visuel en développement après la naissance	34
Méthodes utilisées pour analyser les fonctions visuelles.....	35

L'électrorétinographie.....	35
Le réflexe optomoteur	41
La famille des récepteurs couplés aux protéines G dans la fonction visuelle	43
Le système endocannabinoïde.....	46
Le cannabis dans la fonction visuelle	46
Les bases du système endocannabinoïde	49
Les lysophosphatidylinositols.....	53
Le récepteur 55 couplé aux protéines G	54
Le récepteur 55 couplé aux protéines G dans le système visuel	57
La souris comme modèle d'étude de la vision.....	58
Rationnel de l'étude	59
Chapitre 2 – Article scientifique : Functional and behavioral effects of GPR55 on vision in mice	61
Abstract	61
Introduction.....	62
Materials and methods	63
Animals	63
Drugs	64
Electroretinography	64
Optomotor Response	65
Statistics	66
Results	67
Dark-adapted electroretinography	67
Light-adapted electroretinography	70

Spatial Frequency Threshold	72
Contrast Sensitivity.....	74
Discussion	74
Effects of GPR55 on electroretinography	75
Alterations of the optomotor response	76
Relationship with previous studies	78
Cannabis and contrast sensitivity.....	80
Chapitre 3 – Discussion générale	82
Influence du récepteur 55 aux protéines G sur le système sanguin et liens avec la rétine	82
Effets métaboliques médiés par le récepteur 55 aux protéines G et potentiels effets sur la vision	84
L'évolution du système endocannabinoïde	84
L'importance de la sensibilité au contraste	85
Limitations de l'étude.....	86
Perspectives	87
Références bibliographiques.....	90

Liste des figures

Figure 1. –	Anatomie de l'œil.....	18
Figure 2. –	Les couches de la rétine.	20
Figure 3. –	Organisation simplifiée des connexions de la rétine.	25
Figure 4. –	Le système visuel basique du mammifère.	32
Figure 5. –	Les composantes de l'électrorétinogramme.	37
Figure 6. –	La structure de GPR55.....	44
Figure 7. –	Dark-adapted ERG responses are affected by <i>Gpr55</i> deletion.	68
Figure 8. –	The absence of GPR55 affects oscillatory potentials.	70
Figure 9. –	Light-adapted ERG is impacted by <i>Gpr55</i> deletion.	71
Figure 10. –	The deletion of <i>Gpr55</i> delays the development of visual acuity and GPR55 positively modulates contrast sensitivity.....	73

Liste des sigles et abréviations

Abn-CBD : cannabidiol anormal

2-AG : 2-arachidonoylglycérol

ABC : transporteurs à cassettes liant l'ATP

All : (cellule) amacrine de type II

ANOVA : analyse de variance

ARNm : acide ribonucléique messenger

CB1 : récepteur cannabinoïde de type 1

CB2 : récepteur cannabinoïde de type 2

CBC : cannabichromène

CBD : cannabidiol

CBDA : acide cannabidiolique

CBDV : cannabidivarine

CBE : cannabielsoin

CBG : cannabigérol

CBL : cannabicyclol

CBN : cannabinoïl

CBND : cannabinodiol

CBT : cannabitriol

CBV : cannabivarine

COX : cyclooxygénase

CRIP : cannabinoid receptor interacting protein

c-SRC : proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

CytP450 : (enzyme) cytochrome P450 monooxygénase

DAG : diacylglycérol

DAGL : diacylglycérol lipase

DHEA : docosahexaénoyléthanolamide

dihomo- γ -LEA : dihomo- γ -linolenoyléthanolamide

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTN : noyau terminal dorsal

DTEA : docosatétraténoyléthanolamide

EC50 : concentration efficace médiane

eCB : système endocannabinoïde

EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Edg : endothelial differentiation gene

En : jour embryonique n (n=nombre)

ENT-1: equilibrative nucleoside transporter-1

EPEA: eicosapentaénoyléthanolamide

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ERG : électrorétinogramme/électrorétinographie

FAAH : hydrolase des amides d'acides gras

GABA : acide γ -aminobutyrique

GCAPs : guanylyl cyclase-activating proteins

GCL : couche de cellules ganglionnaires

GMP/GMPc : guanosine monophosphate/guanosine monophosphate cyclique

GPCR : récepteurs liés à la protéine G

GRKs : kinases des récepteurs liés à la protéine G

GPI : glycérophosphoinositol

GPR55 : récepteur couplé aux protéines G 55

H₀ : hypothèse nulle

HI : (cellule) horizontales de type 1

HII : (cellule) horizontales de type 2

INL : couche nucléaire interne

IPL : couche plexiforme interne

i.p. : (injection) intrapéritonéale

Kca : canal à potassium dépendant du calcium

KO : knock-out

LERG : ERG local

LGN : corps genouillé latéral

LOX : lipoxygénase

LPA : acide lysophosphatidique

LPC : lysophosphatidylcholine

LPI : lysophosphatidylinositol

lyso-PL : lysophospholipase

lysoPtdGlc : lysophosphatidylglucoside

Lyso-PG : lysophosphatidylglycérol

MAGL : monoacylglycérol lipase

ML-193 : *N*-[4-[[[(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)amino]sulfonyl] phenyl]-6,8-dimethyl-2-(2-pyridinyl)-4-quinolinecarboxamide

MTN : noyau terminal médial

NADA : N-arachidonoyldopamine

NAPE : N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine

NAPE-PLD : N-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D

NBL : couche neuroblastique

NOT : noyau du tractus optique

O-1602: 5-methyl-4-[(1R,6R)-3-methyl-6-(1-cyclohexen-1-yl)-1,3-benzenediol

OCT : tomographie en cohérence optique

OEA: N-oléoyléthanolamine

OLDA: N-oléoyldopamine

OMR : réflexe optomoteur

ONL : couche nucléaire externe

OPL : couche plexiforme externe

OP : potentiel oscillatoire

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PEA: N-palmitoyléthanolamine

PI: phosphatidylinositol

PIP₂: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PLA_{1/2} : phospholipase A_{1/2}

PKA : protéine kinase A

Pn : jour postnatal n (n=nombre)

PPARS : récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes

RPE : épithélium pigmentaire rétinien

S1P : sphingosine-1-phosphate

SCP-2 : stérol Carrier Protein-2

SEM : erreur type de la moyenne

SNC : système nerveux central

Δ⁸-THC : Δ⁸-tétrahydrocannabinol

THC/Δ⁹-THC : Δ⁹-tétrahydrocannabinol

THCA : acide tétrahydrocannabinolique

THCV : Δ⁹-tétrahydrocannabivarine

TRP : transient receptor potential

V1 : aire visuelle primaire

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

WT : wild-type (sauvage)

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Jean-François. J'ai eu la chance d'être choisi pour un stage de recherche dans ton laboratoire dans le cadre de mon baccalauréat et c'est cette opportunité qui m'a permis de découvrir le merveilleux monde des neurosciences. Merci pour l'équilibre parfait dans ta supervision où tu es toujours présent pour nous, tout en nous laissant l'indépendance nécessaire pour essayer, échouer, réfléchir, retenter, réussir et, au final, beaucoup apprendre. Ton énergie sans bornes et ta passion hors du commun pour la recherche sont très inspirantes.

Dans ce stage précédant ma maîtrise, j'ai été supervisé par Bruno que j'aimerais aussi remercier et qui m'a beaucoup appris sur le domaine et sur l'électrorétinographie utilisée dans le projet de ce mémoire. Je remercie aussi Samuel de m'avoir enseigné le réflexe optomoteur et le reste des membres du laboratoire pour la bonne ambiance dans le laboratoire: Aurélie, Philippe, Catarina, Lucile, Guillaume et Catherine. Merci pour les belles discussions entre les expériences en prenant un café, pour l'aide que chacun d'entre vous m'avez offert et pour les activités en dehors du laboratoire.

Merci à mes stagiaires sans qui cette étude n'aurait pas été possible : Sabrina, Annik et Pierre. Merci pour votre excellent travail et belle présence dans le laboratoire.

Merci aux membres de l'association étudiante : Julie, Solenn, Ismaël, Lucile et Maxime pour la belle vie étudiante qui a été créée en ligne durant la pandémie et en personne par la suite. Je vous remercie aussi pour votre amitié et tous les beaux moments vécus en dehors de l'école.

J'aimerais aussi remercier tous les étudiants et membres du personnel des autres laboratoires qui auront rendu ma maîtrise plus agréable en particulier Geneviève, Véronique, Lamyae, Nelson, Romain, Menakshi, Fatima-Zahrae et Samuel.

Merci à Catarina pour tout!

Merci à mes parents de m'avoir accueilli en fin de rédaction et en cycle inversé, puis à mes grands-parents de m'avoir prêté leur réseau, suite à une panne d'électricité juste avant la remise.

Merci aux organismes subventionnaires : le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), le laboratoire du professeur Bouchard, les Études supérieures et postdoctorales (ESP), l'École d'optométrie et la fondation J.A. DeSève pour le financement de ma maîtrise et de ma subsistance.

Merci au jury qui prend le temps de corriger ce mémoire, votre temps est très apprécié.

J'aimerais aussi finalement remercier toutes les souris dont la vie aura servi à faire augmenter les connaissances scientifiques. J'espère que leur sacrifice servira à ajouter une pierre à une montagne de savoir qui, un jour, sera utile à l'humanité.

Chapitre 1 – Introduction à l'article

Ce mémoire portera sur les fonctions du récepteur 55 couplé aux protéines G (GPR55; *G protein-coupled receptor 55*) sur les fonctions visuelles de la souris. Leurs fonctions rétiniennes seront évaluées par électrorétinographie (ERG) et leur comportement visuel sera mesuré à l'aide du réflexe optomoteur.

Les bases du système visuel

Le présent chapitre expliquera la nécessité de comprendre les mécanismes fondamentaux à l'origine de la vision. Il traitera aussi des fondements de l'anatomie du système visuel et de sa physiologie cellulaire et moléculaire pour permettre d'analyser par la suite les processus par lesquels GPR55 peut moduler la vision.

L'importance du système visuel

Les bases du système visuel sont les mêmes pour tous les mammifères et c'est sur ces bases que se concentrera ce chapitre. Cependant les caractéristiques propres aux souris seront soulignées puisque c'est le modèle utilisé dans la présente étude. Les propriétés du système visuel primate et plus particulièrement celui de l'humain seront aussi discutées pour être en mesure de comparer ses différences avec celui de la souris et d'examiner les portées de l'étude sur des applications à l'humain.

La vision est le sens le plus important pour les humains. Presque la moitié du cortex humain est réservé au traitement des stimuli visuels et c'est avant tout par ce sens que nous explorons l'environnement. À cause de cette importance, le thème de la vision a fasciné dans l'histoire les religions, les philosophes et les scientifiques (1). Encore aujourd'hui, la complexité de l'œil humain est utilisée comme argument qui prouverait l'existence d'un dieu et les mécanismes de vision restent un sujet d'intérêt central des neurosciences et de la biologie évolutive.

La vision et spécialement les pathologies qui l'affecte ont d'abord une grande importance sociétale. La perte de vision et la cécité sont des enjeux majeurs aux niveaux social, sanitaire et économique. Même si contrairement à d'autres types de pathologies, les maladies touchant les

yeux ne sont pas mortelles, elles peuvent entraver l'accès au travail, au loisir ou aux relations interpersonnelles. Elles peuvent aussi causer d'autres conséquences sur la santé mentale comme physiques, ainsi que de la stigmatisation pour les gens en souffrant. Au Canada en 2019, 1,2 million de Canadiens avaient des problèmes de perte de vision ou de cécité et ce nombre va en grandissant à cause du vieillissement de la population. Dans le pays, le coût total associé à cet enjeu s'élève à 32,9 milliards de dollars et pourrait monter à 56 milliards de dollars en 2050 (2). Les maladies les plus courantes causant une déficience visuelle sont en ordre d'incidence au Canada : la cataracte, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, le glaucome, puis la rétinopathie diabétique. Dans un rapport précédent, il était même noté que les coûts directs de la perte de la vision étaient les plus grands dépassant d'autres enjeux de santé comme les maladies cardiovasculaires ou le cancer (3).

De plus dû à son accessibilité relative comparativement au reste du système nerveux central, la rétine a été parmi les premiers systèmes neuronaux où la morphologie et la fonction des différentes cellules ont été élucidées (4, 5). Encore aujourd'hui la rétine est utilisée comme modèle de recherche sur les mécanismes fondamentaux de fonctionnement des neurones et de leurs comportements. Par exemple, en plus des maladies spécifiquement oculaires, l'étude des yeux permet d'étudier, diagnostiquer et suivre l'évolution de pathologies touchant le reste du système nerveux central (SNC). En effet, en raison de son accessibilité et de la transparence des tissus et humeurs antérieurs à la rétine, qui fait partie du SNC, on a donné aux yeux le titre de « fenêtres du cerveau ». Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il est possible de voir par tomographie en cohérence optique (OCT) un amincissement de la couche des fibres nerveuses de la rétine autour de la papille optique qui entraîne aussi des anomalies visuelles. Ces anomalies comme une réduction de l'acuité visuelle, de la sensibilité au contraste ou de la perception du mouvement peuvent être observés tôt dans la progression de la maladie(6). La dégénération du nerf optique est un autre exemple de modèle oculaire qui a permis d'en apprendre plus sur le reste du SNC. À cause de son accessibilité relative, la plupart des données sur la dégénération et la régénération des nerfs du SNC proviennent du nerf optique(7).

Il est donc d'une importance capitale de s'assurer de comprendre le plus possible les mécanismes fondamentaux à la base de la vision pour mieux traiter les pathologies qui y sont associées et accroître nos connaissances sur le reste du système nerveux central.

Anatomie et physiologie de l'œil

Structures principales de l'œil

La vision commence dans l'œil, un organe complexe dont j'effleurerais l'anatomie la plus élémentaire dans un premier temps (Fig. 1). L'œil est un organe situé dans l'orbite du crâne dont la forme est maintenue par la tunique externe composée de la sclère, un tissu conjonctif structural et de la cornée, un tissu transparent qui couvre la surface la plus antérieure de l'œil et permettant à la lumière d'entrer.

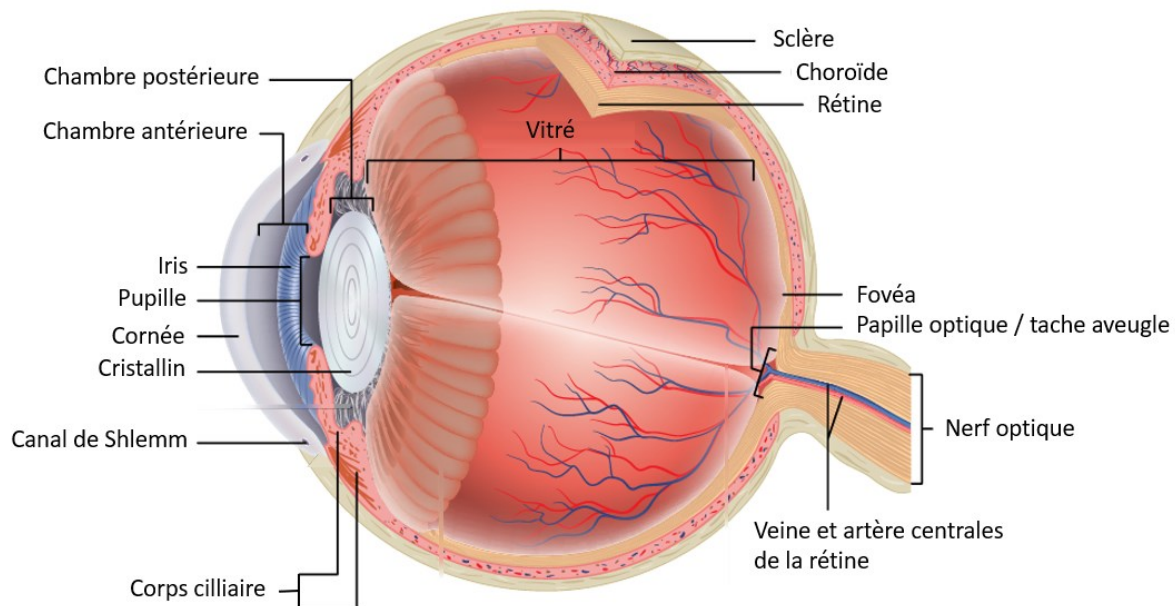


Figure 1. – Anatomie de l'œil

Schéma représentant un œil humain avec les principales structures anatomiques de l'œil des mammifères.

L'uvée est composée, de la partie la plus antérieure à la plus postérieure, de l'iris, du corps ciliaire et de la choroïde. L'iris sépare la chambre antérieure et la chambre postérieure de l'œil remplie d'humeur aqueuse. Le trou au milieu de l'iris, la pupille, contrôle la quantité de lumière qui pénètre l'œil grâce aux réflexes de constriction ou la dilatation des feuillets de muscles lisses de l'iris. Une luminosité forte ou la fixation d'un objet proche resserrent la pupille, alors qu'une faible lumière ou la fixation d'un objet éloigné augmente son diamètre. Derrière l'iris, le corps ciliaire sécrète l'humeur aqueuse par ses capillaires et est un anneau de muscles lisses maintenant le cristallin et changeant sa courbure. Le cristallin quant à lui est une lentille biconvexe fibreuse et transparente qui sert de lentille pour converger la lumière vers la rétine. Lors de la mise au point sur un objet éloigné, les muscles ciliaires sont relâchés permettant au cristallin d'être aplati et d'avoir sa puissance de réfraction minimale. En regardant un objet proche, les muscles ciliaires doivent se contracter pour bomber le cristallin et augmenter la puissance de réfraction permettant l'accommodation. Le cristallin divise aussi le segment antérieur contenant l'humeur aqueuse et le segment postérieur contenant le vitré. L'humeur aqueuse est un liquide renouvelé en permanence et contribuant à la pression intraoculaire de l'œil. Elle circule à travers le segment antérieur où elle est drainée par le canal de Schlemm et diffuse à travers le vitré où elle contribue à fournir du glucose et de l'oxygène à la cornée, au cristallin et aux cellules les plus antérieures de la rétine. Le vitré est un gel qui transmet la lumière et contribue à la forme de l'œil et à la pression intraoculaire (8).

La choroïde, tapissant l'intérieur de la sclère, contient des vaisseaux sanguins, dont des capillaires fenestrés contenant des pores. Ces pores rendent les capillaires de la choroïde très perméables aux échanges de fluides (Fig. 2). La choroïde est tout comme l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE; *retinal pigment epithelium*) un tissu brun riche en mélanocytes qui absorbe la lumière et l'empêche d'être réfléchi vers la rétine. Antérieur à la rétine neurosensorielle se trouve le RPE relié à la choroïde par la matrice extracellulaire appelée membrane de Bruch (Fig. 2). Les cellules du RPE sont liées entre-elles par des jonctions serrées, ce qui oblige les métabolites de la choroïde à passer à travers le tissu pour atteindre la rétine. Ceci donne au RPE la fonction de barrière hématorétinienne interne. D'autres fonctions du RPE sont de phagocyter les segments

externes des photorécepteurs qui se renouvellent continuellement et de recycler le rétinol dont la photoisomérisation est la base moléculaire de la vision (9, 10).

Les couches de la rétine

La rétine, la structure photosensible de l'œil, comporte une structure générale commune à tous les mammifères (Fig. 2 et 3). C'est un tissu stratifié de neurones spécialisés d'à peu près 200 µm d'épaisseur.

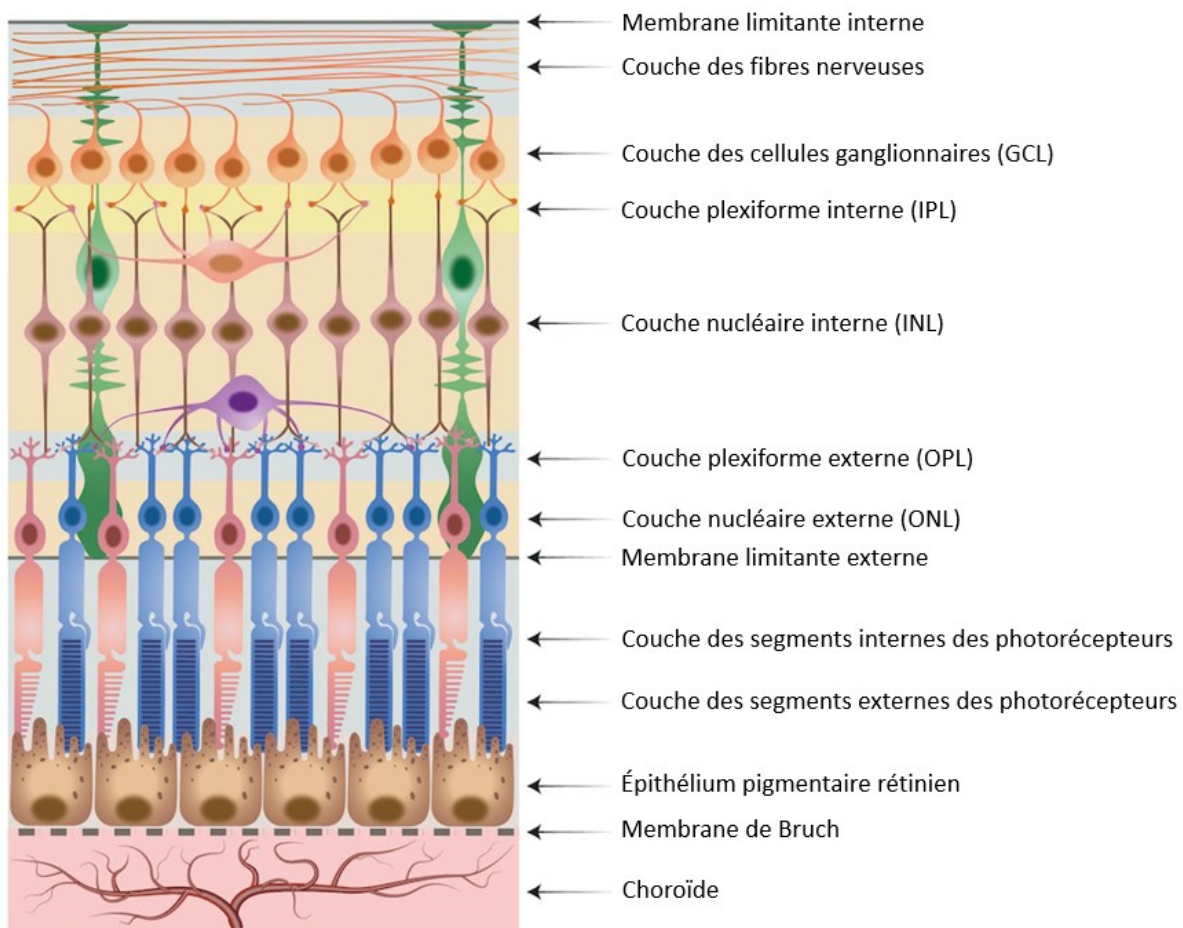


Figure 2. – Les couches de la rétine (adaptée de Ferrara, M. et collab., 2021(11)).

La rétine est un tissu complexe comportant plusieurs cellules dont l'organisation en couches distinctes est conservée chez les mammifères. La lumière est captée et transformée en signal électrique dans les couches des photorécepteurs. Le signal est ensuite transmis à différents neurones. Les corps cellulaires de ces cellules neuronales se trouvent dans les couches ONL, INL et

GCL qui forment des synapses aux couches plexiformes OPL et IPL. Les axones des cellules ganglionnaire forment la couche des fibres nerveuse et se rejoignent au nerf optique pour transmettre l'information visuelle au cerveau.

Les couches nerveuses de la rétine sont les suivantes en commençant par le plus près de la choroïde (Fig. 2). La couche des segments externes et internes des photorécepteurs contient la partie photosensible de ces derniers. La membrane limitante externe est la couche où les cellules de Müller sont connectées avec les photorécepteurs et où ceux-ci sont connectés ensemble avec des jonctions serrées et adhérentes. La couche nucléaire externe (ONL; *outer nuclear layer*) est formée des noyaux des photorécepteurs. La couche plexiforme externe (OPL; *outer plexiform layer*) contient les synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires et des synapses ces dernières avec les cellules horizontales. La couche nucléaire interne (INL; *inner nuclear layer*) comporte les noyaux des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et de Müller. La couche plexiforme interne (IPL; *inner plexiform layer*) est formée des synapses entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. La couche de cellules ganglionnaires (GCL; *ganglion cell layer*) contient les corps cellulaires de celles-ci. La couche des fibres nerveuses est celle des axones des cellules ganglionnaires qui forment le nerf optique au niveau de la tache aveugle. La membrane limitante interne est la frontière entre le vitré et la rétine composée d'astrocytes et des pieds internes des cellules de Müller (12).

Système vasculaire oculaire et rétinien

La rétine est parmi les tissus les plus exigeants au niveau métabolique avec le reste du système nerveux central et les fonctions de ses cellules sont affectées par une carence en métabolites ou en oxygène (13).

La majorité de l'apport en sang de l'œil provient de l'artère ophtalmique, la première branche de l'artère carotide interne, qui passe par le canal optique avec le nerf optique. Les artères issues de l'artère ophtalmique apportent le sang aux différentes structures du globe et à ses structures connexes comme les glandes lacrymales, les paupières ou les muscles oculomoteurs avec une contribution mineure de vaisseaux issus de l'artère carotide externe (14).

La circulation sanguine de la rétine est assurée par l'artère centrale de la rétine, une des branches de l'artère ophtalmique et par la choriocapillaire. L'artère centrale de la rétine forme trois couches de capillaires (les plexus vasculaires superficiel, intermédiaire et profond) dans la rétine interne dont elle assure l'apport sanguin des cellules qui y sont situées (15). La choriocapillaire provient des artères ciliaires postérieures courtes, des branches de l'artère ophtalmique et par diffusion distribue l'oxygène et les nutriments au RPE et à la couche des photorécepteurs qui est avasculaire (16).

Les veines rétinienne déchargent le sang dans la veine centrale de la rétine qui transporte le sang hors de l'œil en suivant le nerf optique comme l'artère centrale de la rétine. Elle termine dans la veine ophtalmique supérieure ou dans le sinus caverneux. Les veines choroïdiennes pour leur part passent par les veines vortiqueuses pour atteindre aussi les veines ophtalmiques et le sinus caverneux (14).

Transduction de la lumière

Quand la lumière arrive à la rétine, elle traverse toutes les couches et atteint la couche des segments extérieurs des photorécepteurs où elle est absorbée. La rétine contient près de 70% des récepteurs sensoriels chez l'humain. Il existe deux types de photorécepteurs dans la rétine des mammifères : les cônes et les bâtonnets. Les cônes sont responsables de la vision photopique, c'est-à-dire la vision diurne à forte luminosité. Ce sont aussi les photorécepteurs responsables de la vision de couleur et ceux avec la meilleure résolution temporelle. Les bâtonnets quant à eux sont spécialisés pour la vision scotopique ou vision de nuit. La configuration de segment externe et de son opsine permet la transduction d'un signal à la suite de l'absorption d'un seul photon, donc ils ont une grande sensibilité (17). Leur réponse est en revanche plus lente. Chez la souris, seulement 3% des photorécepteurs sont des cônes, ce qui est logique considérant que ce sont des animaux nocturnes (18). Chez l'humain, ce pourcentage est d'environ 5% (19), mais la présence de la fovéa leur permet des fonctions supérieures. La fovéa étant une dépression au milieu de la rétine sans vascularisation et ne contenant que des cônes qui permet la vision centrale avec une grande acuité visuelle par rapport à la périphérie. Au centre de la fovéa se trouve la fovéola où la lumière n'a pas à traverser les couches de neurones plus antérieurs à cause de leur inclinaison et peut arriver directement aux cônes (20).

Les segments externes des photorécepteurs sont adaptés pour augmenter leur surface d'exposition à la lumière avec des disques sous forme d'invaginations dans la membrane plasmique (21). Ils contiennent des pigments visuels (en plus grand nombre dans les bâtonnets que dans les cônes) qui sont la rhodopsine dans les bâtonnets et des opsines spécifiques à des longueurs d'onde précises de lumière dans les cônes. Ce sont des récepteurs liés à la protéine G (GPCR; *G protein-coupled receptors*) qui lient par une liaison covalente le rétinal, un dérivé de la vitamine A (voir le chapitre sur les GPCR pour plus d'informations sur ce type de récepteur). Le rétinal sous sa forme non activée contient un alcène cis au 11^e carbone. L'absorption de la lumière par ce chromophore permet une rotation du double lien 11-cis et permet la formation de son isomère plus stable où tous les alcènes sont sous forme trans. Ceci cause une reconformation de la protéine qui est internalisée et active les transducines ou protéines Gt qui elles activent les phosphodiésthérases qui transforment le guanosine monophosphate cyclique (GMPc) en guanosine monophosphate (GMP). La transduction du signal d'une de ces étapes à une autre est amplifiée par l'activation d'un nombre croissant de molécules. Dans l'obscurité, il y a des canaux à cations dépendant du GMPc ouverts, laissant surtout passer du sodium, dans le segment externe et des canaux potassiques ouverts dans le segment interne qui créent un courant maintenu constamment par des pompes Na⁺/K⁺ du segment interne. Les canaux sodiques ouverts font en sorte que les photorécepteurs sont plus dépolarisés à l'état basal que les autres neurones avec un potentiel de membrane d'environ -40 mV. À la suite de l'activation des transducines et à la diminution de GMPc, les canaux à sodium dépendants du GMPc se ferment alors, causant une hyperpolarisation de la cellule avec les canaux potassiques restés ouverts entre -50 et -70 mV dépendamment de la force de la lumière. Les photorécepteurs, dépolarisés de base dans l'obscurité ont des canaux calciques dépendant du voltage, ouverts dans les boutons synaptiques et libèrent du glutamate dans la synapse avec les cellules bipolaires par une exocytose calcium-dépendante libérant du glutamate. Après l'activation de la lumière, les canaux calciques se ferment, arrêtant alors la libération de glutamate (22-25).

Comme la plupart des mammifères, les souris ont deux types d'opsine. Ce sont ceux à courte longueur d'onde (S) avec une longueur d'onde maximale dans les UV et ceux avec une longueur d'onde moyenne (M) dans le vert(26). Ils n'ont pas de cône qui perçoit le rouge comme les

humains et sont donc dichromates. La partie ventrale de la rétine ne contient que des récepteurs S, alors que les récepteurs M sont surreprésentés dans la partie dorsale (26). Si les cônes de la région ventrale ne contiennent que des opsines S, la majorité des cônes coexpriment les deux opsines (27), contrairement aux humains où les cônes n'expriment qu'une sorte de pigment visuel par cellule. Une lumière rouge/orange n'est pas perceptible chez les souris et en ERG ne déclenche pas de réponse (28).

Les cellules bipolaires de la rétine

Les cellules bipolaires sont classifiées comme étant ON ou OFF en fonction de l'effet qu'a sur elles les variations de luminosité. Les cellules bipolaires ON sont hyperpolarisées (par un processus semblable aux photorécepteurs) en présence de glutamate libéré par les photorécepteurs dans l'obscurité. Le récepteur au glutamate métabotrope mGluR6 (29, 30) via sa protéine G active aussi une phosphodiesterase diminuant la concentration intracellulaire de GMPc, ce qui garde fermés des canaux à cations non sélectifs principalement sodique (23, 31) (se référer au chapitre sur les GPCRs pour plus d'information sur les récepteurs métabotropiques). Des canaux potassiques toujours ouverts hyperpolarisent la cellule quand les canaux sodiques sont fermés. Donc en présence de lumière, il y a moins d'activation de mGluR6 par le glutamate et ainsi la concentration de GMPc augmente en ouvrant les canaux et dépolarisant la cellule. Quand les cellules bipolaires sont dépolarisées, ils excrètent aussi du glutamate à leur bouton synaptique.

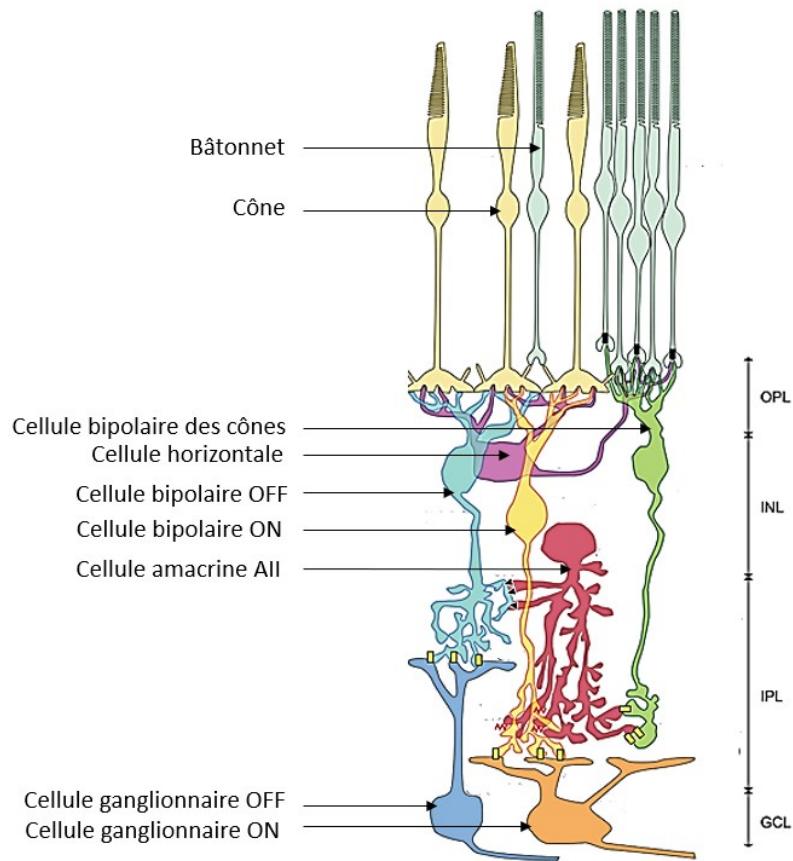


Figure 3. – Organisation simplifiée des connexions de la rétine (adaptée de Tsukamoto, Y. et collab., 2017 (32)).

Les cellules neuronales de la rétine forment plusieurs synapses les unes aux autres dans une organisation complexe. La transduction de l'information lumineuse en signal électrique est exécutée dans les photorécepteurs et le signal est envoyé aux cellules bipolaires. Les bâtonnets forment des synapses avec une cellule bipolaire des cônes et ont des jonctions avec les cônes. Les cônes forment des synapses avec des cellules bipolaires ON et OFF, ainsi qu'avec des cellules horizontales qui relient plusieurs cônes. Les cellules horizontales forment des jonctions entreselles. Les cellules bipolaires des cônes font synapses avec des cellules amacrines AII qui elles-mêmes forment des synapses avec les cellules bipolaires ON et OFF à la fois. Via des synapses, les cellules bipolaires ON et OFF envoient leur signal vers les cellules ganglionnaires ON et OFF respectivement.

Les cellules bipolaires OFF sont dépolarisées par le glutamate grâce à leurs récepteurs ionotropes à cation et sont quant à elles hyperpolarisées à la lumière sans le glutamate venant des photorécepteurs (20).

Des cellules bipolaires spécifiques sont associées aux cônes ou aux bâtonnets. Les bâtonnets ont un type unique de cellules bipolaires ON qui reçoit l'input de 20 à 100 bâtonnets (33). La voie principale de transmission de signal des bâtonnets est vers une cellule bipolaire des bâtonnets qui elle fait synapse avec une cellule amacrine de type II (AII) qu'elle peut activer par la sécrétion de glutamate. Les cellules AII font synapse avec le bouton de cellules bipolaires ON et OFF des cônes et envoie un signal aux deux à la fois (34). Les cellules AII font synapse avec les cellules bipolaires OFF des cônes où elles libèrent de la glycine (35). La glycine joue un rôle inhibiteur et inversant le signal des cellules amacrines par une médiation par un récepteur à la glycine qui est un canal chlorique ligand-dépendant (36). Les cellules AII et les cellules bipolaires ON des cônes sont connectés à l'aide de jonctions communicantes qui conservent l'état dépolarisant des cellules amacrines (37). Les cellules AII avoisinantes sont aussi connectées entre-elles de la même façon (37), ce qui aiderait à amplifier le signal lumineux à basse intensité comme le fait le couplage des bâtonnets à plusieurs cellules bipolaires (38).

Une deuxième voie de transmission du signal par les bâtonnets est par la transmission du signal des bâtonnets aux cônes par des jonctions communicantes entre les deux (39). Il existe aussi un couplage entre les cônes avec des jonctions serrées qui augmente le signal sans compromettre l'acuité visuelle (40).

Les cônes ont une structure synaptique particulière appelée pédicule avec plusieurs dizaines d'invaginations synaptiques. Les synapses sont des triades composées d'un ruban présynaptique qui fait contact avec deux dendrites de cellules horizontales de chaque côté et avec une ou deux cellules bipolaires au milieu (41). En plus, de l'effet du glutamate libéré par les cônes différents selon le type de cellules bipolaires, celles-ci ont des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) qui sont des canaux chloriques (et au bicarbonate) ligand-dépendants. Les cellules horizontales faisant partie de la synapse à ruban peuvent donc inhiber les cellules bipolaires en libérant du

GABA(41). Le signal des cônes est transmis à des cellules ON et OFF qui sont reliées à des cellules ganglionnaires ON et OFF respectivement. Celles-ci font synapse avec deux cellules amacrines (AII et A17) en dyade ou avec une cellule amacrine et une cellule ganglionnaire (42).

Les cellules bipolaires ON et OFF des cônes transmettent le signal aux cellules ganglionnaires ON et OFF respectivement dont les axones projettent aux différentes structures visuelles du cerveau (34, 43, 44).

Modulation rétinienne du signal visuel

Il y a une quarantaine de types différents de cellules amacrines. Elles jouent globalement un rôle de modulation du signal des différentes cellules de la rétine, en voici quelques exemples. Les cellules amacrines AII accentuent le message transmis aux cellules ganglionnaires grâce à leur input provenant des bâtonnets en connectant avec jonction serrée les cônes "ON" et en inhibant les cônes "OFF" avec de la glycine. Les cellules amacrines A17 renvoient une rétroinhibition GABAergique aux cellules bipolaires des bâtonnets (42). Les cellules amacrines AI ont des effets inhibiteurs sur les cellules ganglionnaires et se connectent aux cônes. Les cellules amacrines étoilées libèrent du GABA, un neurotransmetteur inhibiteur, mais aussi de l'acétylcholine qui joue un rôle excitateur (35). La moitié des cellules amacrines libèrent de la glycine, un modulateur inhibiteur et la plupart sont orientées à la verticale, bistratifiées et jouent un rôle de régulation des différentes sous-couches de l'IPL localement. Les cellules amacrines glycinergiques reçoivent leur signal des cellules bipolaires aux synapses à ruban et d'autres cellules amacrines et envoient leur signal vers les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires et d'autres cellules amacrines (35).

Les cellules horizontales comme les cellules amacrines ne jouent pas un rôle de transmission de l'information visuelle aux structures visuelles de l'encéphale. Elles sont reliées les unes aux autres dans la couche des noyaux internes grâce à des jonctions communicantes. Le glutamate des photorécepteurs les dépolarise et elles jouent un rôle de rétrocontrôle inhibiteur en sécrétant du GABA qui hyperpolarise les photorécepteurs. À cause de la communication entre les cellules horizontales, l'hyperpolarisation d'un groupe de cônes peut affecter un groupe de cônes voisins. Chez la rétine du primate, on retrouve des cellules horizontales de type 1 et de type 2 (HI et HII).

Les cellules H1 font synapse avec les cônes sensibles au vert, les cônes sensibles au rouge et avec des centaines de bâtonnets et jouent un rôle d'accentuation du contraste centre/périphérie dans le champ réceptif des cellules ganglionnaires. Les cellules HII connectent les cônes bleus entre eux. Elles jouent un aussi un rôle d'inhibition sur les cellules ganglionnaires (45).

Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires sont les seules cellules rétiniennes (sauf certaines amacrines) à transmettre un signal sous forme de potentiel d'action en raison de la plus longue distance que le signal doit parcourir. En effet, les axones des cellules ganglionnaires composent le nerf optique et projettent vers les différentes aires visuelles sous-corticales. Elles doivent donc atteindre un potentiel seuil pour être dépolarisées. Les autres neurones de la rétine ont un potentiel électrique et une réponse graduée en fonction de l'intensité du stimulus qu'elles reçoivent (20).

Dans la rétine du primate, les cellules ganglionnaires P (Parvus) ou naines sont liées aux cellules bipolaires des cônes et transmettent donc l'information de la couleur aux couches parvocellulaires du corps genouillé latéral (LGN; *lateral geniculate nucleus*). Ces cellules ont de petits champs récepteurs ce qui favorisent une haute acuité visuelle. Les cellules ganglionnaires M (Magnus) ou parasol, quant à elles, ont des arbres dendritiques très larges, ce qui facilite la perception du mouvement et aux changements temporels. Elles se rendent aux couches magnocellulaires du LGN(45). 80% des cellules ganglionnaires sont de type M, 10% de type P et 10% d'autres types (25). Un autre type de cellules ganglionnaires, les cellules K, sont de petites cellules bistratifiées qui se projettent aux couches koniocellulaires du LGN (25). Certaines cellules ganglionnaires contiennent un pigment, la mélanopsine, elles se projettent aux noyaux suprachiasmiques et participent à la régulation du rythme circadien. Ces cellules ne réagissent qu'à l'intensité de la lumière et contrôlent aussi le réflexe pupillaire (25).

Chez la souris, plus de 32 types différents de cellules ganglionnaires ont été répertoriées(46) variant selon la préférence chromatique, le centre ON ou OFF (47), le contraste centre/périphérie soutenu ou transitoire (48), la largeur du champ récepteur, la vitesse, ou la sélection de la direction.

Autres cellules rétiniennes

Les cellules de Müller sont les cellules gliales principales de la rétine. Leur forme allongée leur permet de s'étendre de la couche limitante interne jusqu'à la couche nucléaire externe. Elles sont un élément important de l'intégrité structurale de la rétine (dans le développement surtout) et supportent l'activité neuronale par le maintien de l'homéostasie extracellulaire. Une tâche importante de ces cellules est de réguler la concentration extracellulaire de potassium avec leurs canaux potassique (49). Elles régulent aussi l'hydratation des couches internes de la rétine par des canaux aquaporines. Ces régulations d'osmolarité et d'hydratation modulent le volume de l'espace extracellulaire rétinien dont le pH est aussi modulé par ces cellules. Elles fournissent aux neurones les nutriments nécessaires à leur métabolisme comme le lactate ou le pyruvate, tout en captant les déchets métaboliques neuronaux, notamment le CO₂. Elles modulent l'excitabilité des cellules avec la libération de substances telles que l'ATP, le glutamate ou la D-sérine, mais aussi par le recyclage des neurotransmetteurs. Également, elles font physiquement partie de la barrière hématorétinienne et régulent la dilatation des capillaires par la libération des substances vasoactives. Les cellules de Müller sont aussi importantes dans la réponse inflammatoire dans des conditions pathologiques (50). Ces cellules jouent aussi un rôle de fibre optique dépendante de la longueur d'onde de la lumière, elles concentrent la lumière jaune-vert en leur sein pour atteindre les cônes et améliorer la vision photopique. La lumière bleu-violet doit alors traverser le tissu environnant pour être absorbée surtout par les bâtonnets (51).

On continue de faire des découvertes fondamentales sur l'anatomie et la physiologie de la rétine. Récemment, on a découvert un nouveau type de neurone rétinien présent dans les souris, les ouistitis et les macaques. Cet interneurone surnommé cellule de Campana a des caractéristiques morphologiques uniques avec des neurites qui projettent dans la OPL comme les cellules bipolaires, mais avec des ramifications neuronales nombreuses dans la IPL de façon très similaire aux cellules amacrines AII. Cette cellule reçoit des inputs synaptiques des cônes et des bâtonnets avec une réponse lente qui est relayée aux cellules ganglionnaires. Elle contient des protéines propres aux cellules bipolaires, mais d'autres protéines habituellement retrouvées uniquement dans les cellules amacrines. À cause de ses caractéristiques peu propices à une perception directe des images, il est proposé qu'elle serve à d'autres fonctions (52).

La sensibilité au contraste

Le contraste est défini comme le ratio de la différence de luminance entre deux zones adjacentes. Le seuil de contraste est le contraste nécessaire à un individu ou un animal pour percevoir une cible. Ce seuil de contraste peut être exprimé par sa réciproque que l'on appelle sensibilité au contraste (53). Autant chez les humains que chez les souris, la sensibilité au contraste en fonction de la fréquence spatiale suit une courbe où il y a une sensibilité au contraste maximale aux fréquences spatiales intermédiaires de leur spectre respectif de perception (53, 54).

La réponse au contraste est issue au départ des champs récepteurs des cellules ganglionnaires de la rétine. Le champ récepteur d'une cellule ganglionnaire représente le champ visuel qu'elle couvre, dont le signal provient des photorécepteurs qui lui sont associés. Leur champ récepteur est circulaire et divisé en un centre et un pourtour. Les cellules ganglionnaires peuvent être divisées en deux classes égales en nombre, appelées centre ON et centre OFF. Les cellules ganglionnaires centre ON sont excitées lorsqu'illuminées en leur centre et inhibées lorsqu'illuminées en leur pourtour, alors que c'est le contraire pour les cellules centre OFF. Les potentiels d'actions de ces cellules sont générés de façon spontanée, donc une excitation veut dire une fréquence de décharge augmentée et une inhibition, une fréquence de décharge diminuée. Juste après une diminution de la fréquence de décharge, celle-ci augmente un peu avant de revenir à la normale. Une lumière diffuse qui couvre l'ensemble du champ récepteur cause une fréquence de décharge moyenne dans les deux cas. Cela veut donc dire qu'une réponse optimale des cellules ganglionnaires est observée dans une situation de contraste, dans le cas où leur partie ON est illuminée et leur partie OFF ne l'est pas (45).

Les propriétés du champ récepteur des cellules ganglionnaires proviennent principalement de l'input des cellules bipolaires dont l'état de polarisation crée l'excitation ou l'inhibition du champ récepteur. Les cellules bipolaires ON font synapse avec les cellules ganglionnaires ON et les bipolaires OFF avec les ganglionnaires OFF. Les cellules horizontales participent aussi au champ récepteur. Elles font synapse avec les cônes et quand les cônes du pourtour sont illuminés, les cellules horizontales sont hyperpolarisées et cessent d'accentuer l'hyperpolarisation des cônes du centre du champ récepteur avec de la glycine, ce qui dépolarise ces cônes centraux (45).

L'acuité visuelle quant à elle est le seuil de fréquence spatial où il y a perception. C'est-à-dire la capacité à percevoir de petits objets à haut contraste (53). La sensibilité au contraste est une mesure plus représentative de la perception du monde naturel où il y a de multiples fréquences spatiales avec un contraste qui est rarement total

Les voies visuelles

Les nerfs optiques contiennent les axones des cellules ganglionnaires myélinisés par des oligodendrocytes. Ils se rejoignent au chiasma optique où une partie des fibres se croisent dans le tractus optique contralatéral et une autre partie dans le tractus optique ipsilatéral (Fig. 4). Chez l'humain, 53% des axones vont du côté contralatéral et 47% du côté ipsilatéral(25). Chez la souris, dû à sa zone binoculaire beaucoup plus réduite, seulement 5 % des cellules ganglionnaires se projettent vers l'hémisphère ipsilatéral (55). Les axones vont alors vers plus de 20 aires sous-corticales du rongeur (56).

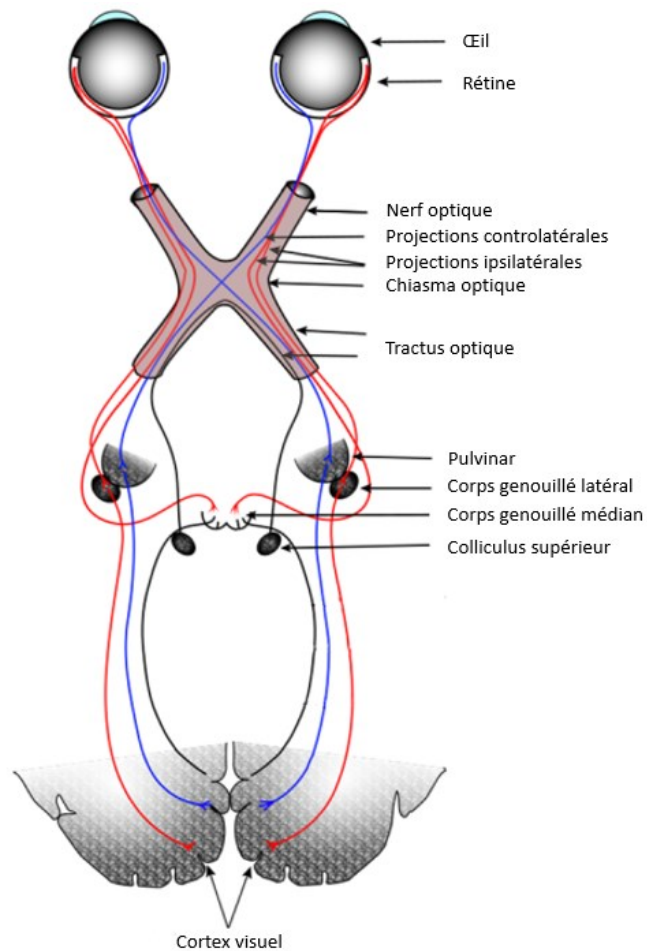


Figure 4. – Le système visuel basique du mammifère (adapté de Gray, H. *et collab.* 1878 (57)).

La voie rétino-géniculo-striée ou voie visuelle primaire est celle responsable en majorité de la perception visuelle consciente (Fig. 4). Chez les primates, 90% des axones des cellules ganglionnaires sont dirigés vers le corps genouillé latéral (LGN). Chaque LGN a une représentation rétinotopique de l'hémisphère controlatéral. Chez les primates, le LGN est séparé en six couches dont les deux plus ventrales contiennent des cellules magnocellulaires et les quatre plus dorsales comportent des cellules parvocellulaires. Entre chacune de ces six couches, il y a une couche de cellules koniocellulaires. Comme discuté précédemment, les couches parvocellulaires reçoivent l'input des cellules ganglionnaires P, tandis que les couches magnocellulaires ont des axones des cellules M. Les neurones de ces couches ont des champs récepteurs semblables à ceux des cellules ganglionnaires, c'est-à-dire centre ON ou OFF. Les deux types de neurones projettent à des

couches différentes de l'aire visuelle primaire (V1) et ont des préférences de fréquence spatiale différentes. Une atteinte de la voie magnocellulaire affecte donc la sensibilité au contraste à basse fréquence spatiale, alors qu'une atteinte de la voie parvocellulaire affecte la sensibilité au contraste à haute fréquence spatiale. Les cellules P sont aussi responsables de la vision en couleur (45). Le LGN de la souris partage les mêmes caractéristiques générales que celui des primates (56). En plus des voies parallèles mentionnées, le LGN de la souris aurait des zones spécifiques à la direction des stimuli (58).

L'organisation du cortex visuel de la souris partage des similarités avec celui de l'humain comme une aire visuelle primaire (V1) entourée d'aires visuelles supérieures avec un traitement similaire de l'information visuelle, mais à plus basse résolution (56). Cependant, contrairement aux primates, certaines fonctions visuelles semblent assurées par d'autres structures que V1 chez la souris. En effet, même avec V1 enlevé, la souris garde une sensibilité au contraste relativement bonne dans une tâche comme celle de la piscine visuelle (*visual water task*)(59).

La voie rétino-tectale envoie des projections aux colliculi supérieurs, coordonne les mouvements de la tête et des yeux et envoie des projections au prétectum qui stabilisent l'image. Chez la souris, cette voie est la plus importante avec 90% des axones des cellules ganglionnaires qui se projettent vers les colliculi supérieurs (55). Dans cette voie, les cellules ganglionnaires se projettent aux couches superficielles des colliculi supérieurs qui forment une carte du champ visuel. De ces couches, il y a des cellules qui se projettent au pulvinar qui se projette à son tour vers V1 créant ainsi une voie indirecte de la rétine vers le cortex. Le cortex visuel lui-même a des projections vers les couches superficielles des colliculi supérieurs. Les couches plus profondes régulent les saccades oculaires (45). Le noyau latéral postérieur du thalamus est l'équivalent du pulvinar chez la souris et servirait à comparer l'information visuelle autogénérée à celle reçue par les sens (55).

Les projections des cellules ganglionnaires à mélanopsine au noyau olivaire prétectal assurent le réflexe pupillaire (60). La voie rétino-hypothalamique envoie des projections au noyau suprachiasmique et régule le cycle circadien (61). La voie optique accessoire, quant à elle, cause les réflexes optomoteurs et optocinétiques et sera décrite plus loin dans ce chapitre.

Système visuel en développement après la naissance

Contrairement aux humains qui ont à la naissance un système vasculaire rétinien déjà développé à la naissance (62), chez les souris, le système vasculaire finit d'être développé après. C'est à la naissance que des astrocytes émergent de la tête optique guidant avec eux les cellules endothéliales à l'aide d'une matrice de fibronectine et de la sécrétion de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF; *vascular endothelial growth factor*) (63). Le plexus vasculaire superficiel est formé en premier jusqu'au huitième jour après la naissance (P8) pour la souche de souris C57Bl/6, suivi du plexus profond et du plexus intermédiaire jusqu'à P15. Après trois semaines, le système vasculaire rétinien est complètement formé avec des vaisseaux connectant les différentes couches (64).

Les neurones de la rétine dérivent d'un progéniteur commun et, durant le développement, se différencient, font croître des neurites, migrent à leur couche respective, puis y forment des contacts synaptiques. Chez la souris, le processus de différenciation commence 12 jours après la formation de l'embryon (E12) et fini 11 jours après la naissance (P11) (65, 66). Les cônes, les cellules horizontales et les cellules ganglionnaires se différencient durant la phase embryonnaire, les cellules amacrines avant et après la naissance et les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller seulement après la naissance (66). Même pour les premières cellules à se différencier, la maturation ne se finit qu'en postnatal, par exemple les pédicules des cônes ne deviennent matures qu'à P10 (67). La formation des synapses de la voie verticale entre les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires ne finit que peu avant l'ouverture des yeux et l'ouverture des yeux stimule l'achèvement de la synaptogénèse dans l'IPL et la maturation des voies ON et OFF (68). La projection des neurones vers les voies visuelles commence aussi dans l'embryon vers E12 et continue après la naissance (69, 70).

Méthodes utilisées pour analyser les fonctions visuelles

L'électrorétinographie (ERG) et le modèle de réflexe optomoteur sont les mesures principales qui sont utilisées dans le présent ouvrage pour étudier l'effet de GPR55 sur les fonctions visuelles. Ces méthodes sont des standards de l'étude de la vision, en particulier l'ERG qui est peu invasive et permet d'acquérir facilement de l'information sur l'activité de plusieurs cellules de la rétine. Le réflexe optomoteur est une mesure comportementale de la vision ayant plusieurs avantages telles que l'absence d'entraînement ou la possibilité d'étudier le développement de l'acuité visuelle dès l'ouverture des yeux.

L'électrorétinographie

L'ERG est la mesure de l'activité électrique des cellules de la rétine à la suite d'un flash de lumière. Cette méthode sera utilisée dans notre étude pour étudier les effets du récepteur GPR55 sur les fonctions rétinienne.

Afin d'acquérir cette mesure, une électrode active est placée à l'extérieur des cellules, habituellement sur la cornée, mais dans d'autres types d'ERG elle est placée dans le vitré ou à l'intérieur de certaines couches de la rétine. L'activité électrique des cellules est transmise via la matrice extracellulaire avec de la résistance électrique. Le fait que certaines cellules soient organisées en parallèle additionne leur potentiel électrique, alors que les courants latéraux s'annulent (71). L'ERG est utilisé en clinique comme outil diagnostique dans une grande diversité de pathologies comme certaines maladies congénitales (dans la cécité nocturne congénitale stationnaire par exemple (72)), dans la rétinopathie associée aux cancers (73, 74), dans l'occlusion des vaisseaux sanguins centraux de la rétine (75, 76) et bien d'autres maladies. La technique semble même prometteuse dans des maladies psychiatriques (77).

En 1865, le physiologiste suédois Holmgren a découvert les changements de potentiel électrique causés par une illumination de la rétine (71). La réponse qu'on observe est la somme des potentiels créés par plusieurs cellules qu'on peut diviser en ses différents constituants qu'on nomme composantes. La terminologie pour décrire les différentes composantes de l'ERG ont été élaborés par Einthoven and Jolly (78) (Fig 5A) avec une première onde négative rapide appelée onde-a, puis tout de suite après une onde positive rapide appelée onde-b qui redescend pour

remonter lentement de façon assez variable dans une onde appelée onde-c. L'onde-a n'est pas présente à des intensités lumineuses basses. Il y a aussi une autre onde observée qui n'est pas toujours présente appelée onde-d ou off-effect/off-response qui est une autre positive supplémentaire après l'onde-c ou un retard de celle-ci (79). Les potentiels oscillatoires (OPs), découverts plus tard, sont des ondes à hautes fréquences survenant dans la phase montante de l'onde-b et qu'il est possible d'isoler avec un filtre enlevant les fréquences les plus basses que sont l'onde-a, l'onde-b et l'onde-c (71, 80) (Fig 5B). Il y a en a quatre principales et constantes selon les intensités de flash que l'on peut annoter de OP1 à OP4. Les OPs sont les plus facilement observables dans des conditions scotopiques après des flashes de grande intensité(81).

Des ERG scotopiques mesurés à l'aide d'une électrode cornéenne avec un modèle de chat décérébré ont montré que diminuer l'aire d'exposition à la lumière diminue les amplitudes des composantes de façon similaire à une diminution de la force de la lumière. L'onde-c peut être diminuée, enlevée ou même rendue négative en fonction de la concentration de l'anesthésique par inhalation. Cette onde est divisée en PI, PII et PIII selon les cas (79) (Fig. 5C). Ces travaux ont permis à Ragnar Granit de remporter le prix Nobel en médecine en 1967 (71). La partie descendante de l'onde-a correspond à PIII jusqu'à ce que l'onde-b prenne le dessus. L'onde-b est la somme de l'onde positive PII et de PIII, alors que l'onde-c est la somme de l'onde PI positive et de PIII(71).

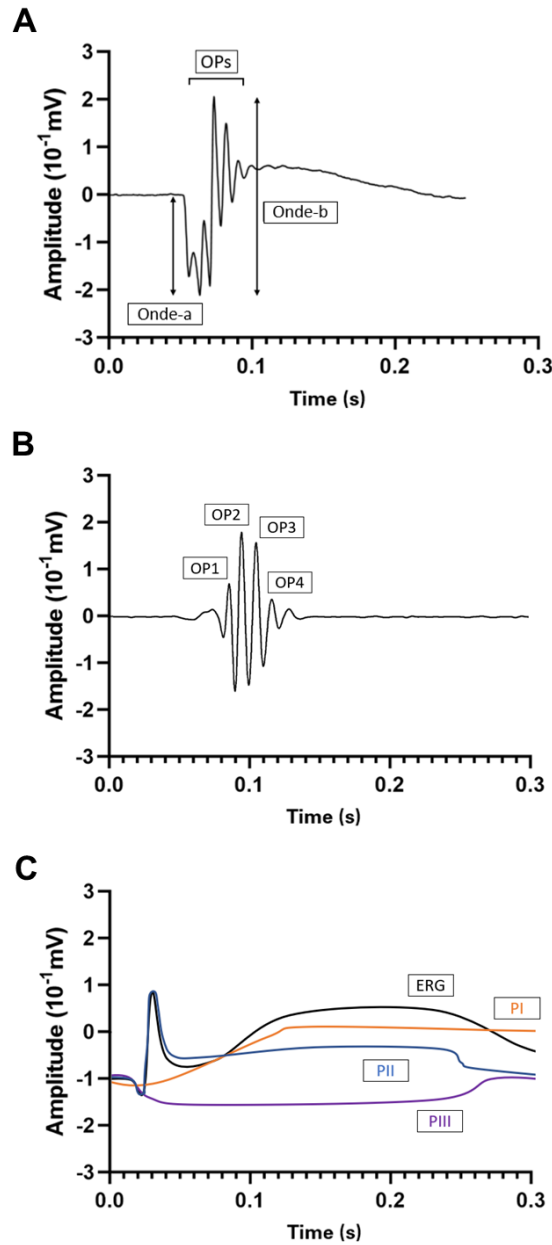


Figure 5. – Les composantes de l'électrorétinogramme.

(A) La terminologie de Einthoven and Jolly comprenant principalement une onde-a négative suivie d'une onde-b positive. Simultanément à l'onde-b se produisent des ondes à hautes fréquences appelées potentiels oscillatoires. (B) Les potentiels oscillatoires isolés. (C) La terminologie de Granit correspond aux ondes isolées en augmentant la concentration d'anesthésique (adaptée de Creel, D. et Yu, M. 2019 (82)).

L'origine cellulaire de chaque composante de l'ERG a fait l'objet de débats dans la littérature depuis l'invention de la technique, et pour certaines ondes cette origine est encore controversée. Plusieurs techniques ont été utilisées pour élucider l'origine de ces composantes. Il y a spécialement l'utilisation d'une électrode active directement insérée dans la rétine (ERG local; LERG) (83) ou le blocage spécifique de certaines cellules qui sont utilisés pour l'étude mécanistique de l'ERG (84, 85).

L'origine de l'onde-a est attribuée depuis longtemps aux photorécepteurs. En effet, l'amplitude maximale de l'onde-a en LERG est près de la membrane de Bruch qui est adjacente aux photorécepteurs (83). La mesure de l'activité électrique d'une culture de bâtonnets reproduit aussi l'allure de l'onde-a (86). En somme, avec des flashes courts et forts en luminosité, l'onde-a est égale dans la phase descendante à PIII et à l'activité des photorécepteurs, jusqu'à la phase montante où l'onde-b prend le dessus (87). Il y aurait également une rétroaction provenant de cellules postréceptrices qui modulerait un peu la réponse de l'onde-a (88), notamment une participation des cellules bipolaires OFF et/ou des cellules horizontales dans l'onde-a photopique (84).

Plusieurs études montrent que la majorité de l'onde-b est causée par les cellules bipolaires ON (89). L'amplitude en LERG est maximale dans l'INL(83) et en bloquant la transmission glutamatergique du signal des photorécepteurs aux cellules bipolaires ON, l'onde-b est sévèrement atténuée (85, 90). Cependant en bloquant les cellules bipolaires OFF, l'onde-b est augmentée, ce qui indiquerait que l'onde-b serait la somme de potentiels opposés provenant des voies ON et OFF de la rétine (84). Des effets différents du blocage de ces voies peuvent être observés dépendamment si l'ERG est effectué en conditions photopiques ou scotopiques. L'onde-b aurait donc une origine cellulaire différente dans ces deux cas, ce qui est en accord avec le fait que les voies de transmission de l'information visuelle sont différentes pour les cônes et les bâtonnets (85). L'onde-b est la somme d'une onde positive qui provient non seulement de la dépolarisation des cellules bipolaires, mais aussi de l'onde PIII lente négative (91). Un effet sur cette dernière peut alors aussi moduler l'amplitude de l'onde-b comme c'est le cas pour l'onde-

c. L'onde PIII lente provient des cellules de Müller contrairement à la partie la plus rapide de l'onde PIII qui provient des photorécepteurs (92). L'activité des photorécepteurs en diminuant la concentration extracellulaire de potassium (93) hyperpolarise les cellules de Müller qui sont très perméables aux ions potassiques (94). L'origine gliale de l'onde PIII lente a été prouvée par un modèle d'inhibition de la capacité des photorécepteurs à affecter la concentration potassique ou par une délétion des canaux potassiques des cellules de Müller (95, 96). Comme le montrent les effets de l'administration de GABA, de glycine ou dopamine sur l'onde-b, il y aurait aussi une contribution minimale des cellules amacrines ou horizontales qui sécrètent ces molécules. De même la modulation pharmacologique conjointe des cellules amacrines, interplexiformes, ganglionnaires et de certaines horizontales modifie la latence et l'amplitude de l'onde-b(97).

L'origine des OPs est tout particulièrement controversée et complexe. Les données en LERG indiquent une origine cellulaire des OPs en provenance de l'INL (98). Les OPs changent de polarité en fonction de la profondeur. Celle-ci influence aussi la prééminence des premiers ou des derniers OPs, ce qui amène à croire que plusieurs cellules créent les OPs (99).

La division des différentes ondes en voie des cônes/voies des bâtonnets et voie ON/voie OFF, ce qui indiquerait une contribution des cellules bipolaires consistante avec la localisation du signal en LERG (100). Les derniers OPs sont aussi plus affectés que les premiers par le blocage des voies OFF de la rétine et bloquant la voie ON, les premiers OPs disparaissent complètement (85). Cela a par contre été remis en doute par la suite (101). Il a aussi été suggéré que les premiers OPs soient reliés à la rétro-inhibition de la voie ON et les derniers à celle de la voie OFF en raison de leur vulnérabilité respective au blocage des voies GABAergique et de la glycine (100, 102). Les OPs sont aussi diminués par l'action du glutamate et de la dopamine (99). Les cellules amacrines dopaminergiques comme les cellules interplexiformes qui forment des boucles de rétro-inhibition à travers la rétine pourraient donc être impliquées dans la formation des OPs (99, 100). D'autres types de cellules amacrines sont aussi GABAergiques ou glycinergiques (100). Même si les cellules amacrines peuvent être impliquées dans le processus de création des OPs, elles ne peuvent pas être la cause même des potentiels créés, parce que les dipôles latéraux qu'elles génèrent ne peuvent être mesurés à la cornée (100). Les derniers OPs (OP3 et OP4) sont aussi affectés négativement par des conditions photopiques, alors que les premiers ne le sont pas. Cela suggère

une implication des cellules de la voie des cônes pour les premiers et des cellules qui reçoivent l'input des bâtonnets pour les derniers (103).

La participation des cellules ganglionnaires aux OPs est aussi controversée. D'un côté, il est possible d'observer des oscillations à la suite d'un flash de lumière dans les faisceaux optiques provenant d'une décharge des cellules ganglionnaires (104) et ils sont corrélés avec les OPs (98). Chez le singe dénervé, les OPs sont absents ou sévèrement réduits (102). Une atteinte aux dendrites des cellules ganglionnaires réduit aussi les OPs (105). En revanche, en LERG, les OPs sont absents dans la couche des noyaux des cellules ganglionnaires ou des fibres de ces cellules (98). De plus, chez des patients atteints d'atrophie du nerf optique, les OPs ne sont pas affectés (106) et chez les lapins 7 jours après une lésion du nerf optique, les OPs sont toujours présents (98).

Une étude extensive et plus récente utilisant des blocages pharmacologiques des différentes cellules de la rétine arrive aux conclusions suivantes : il y aurait de multiples générateurs impliqués en fonction des ondes précises. Le premier OP avant OP1 est causé par les photorécepteurs. OP1 et OP2 sont causés par des interactions synaptiques dépendantes des potentiels gradués et OP3 et OP4 dépendants de potentiels d'actions issus des cellules de la rétine interne (101). L'action directe des cellules bipolaires ON, les cellules horizontales et les neurones de la voie OFF, quant à elles, ne contribuent que minimalement aux OPs (101).

En ce qui a trait aux caractéristiques des conditions lumineuses, dans l'ERG scotopique avec un seul flash, il y a une contribution mixte à l'onde-b des cellules bipolaires ON des cônes et des bâtonnets. La contribution des cônes à l'onde-a est minimale (107, 108), ce qui suggère une amplification du signal des cônes au niveau post-synaptique dans l'onde-b (108). Le fait que l'onde-b est aussi plus grande que l'onde-a à faible intensité lumineuse est aussi explicable par l'amplification du signal des bâtonnets par leur convergence vers leur cellule bipolaire (109). L'ERG photopique quant à elle reflète l'activité des cônes et des voies en dérivant (110, 111).

Le réflexe optomoteur

Le réflexe optomoteur (OMR, *optomotor response*) est le modèle qui permettra dans notre étude de mesurer l'acuité visuelle et la sensibilité au contraste grâce au comportement des souris.

L'OMR est un mouvement stéréotypé de la tête en réponse au mouvement de l'environnement environnant qui sert à stabiliser cette image sur la rétine en combinaison avec le nystagmus optocinétique qui fait bouger les yeux (112). Ces réflexes sont conservés à travers les vertébrés des poissons, salamandres et grenouilles jusqu'aux mammifères (112). Chez la souris, le réflexe optocinétique a des paramètres semblables de sensibilité à la fréquence spatiale, au contraste ou à la vitesse (112).

Le OMR permet d'étudier les fonctions visuelles de souris dont le système visuel est en développement (113) contrairement aux tâches comportementales nécessitant un entraînement que celles-ci ne seraient pas en mesure de faire à leur âge (54). En effet, contrairement aux tâches de discrimination visuelle qui peuvent prendre aux animaux plusieurs semaines d'entraînement pour les effectuer correctement, le OMR peut être utilisé sur des animaux non entraînés dès l'ouverture de leurs yeux (54). Cette méthode est en conséquence souvent utilisée dans des modèles murins ou autre pour évaluer la pathogenèse et le traitement de maladies affectant la vision (114) ou le développement du système visuel par exemple dans la rétinopathie diabétique (115, 116) ou dans le glaucome (117, 118).

Le OMR serait enclenché par des cellules ganglionnaires ON sélectifs au mouvement qui envoient leurs axones dans le système optique accessoire et régulent la stabilisation de l'image (119-121). Le système optique accessoire est composé des projections axonales contralatérales de la rétine qui se divise entre les faisceaux accessoires supérieur et inférieur. Le faisceau supérieur projette vers les noyaux terminaux latéraux et dorsaux (LTN et DTN), alors que c'est vers le noyau terminal médial (MTN) que vont les axones du faisceau inférieur (122). Des axones projettent aussi vers le noyau du tractus optique (NOT) (112, 121). Chez la souris, c'est vers le MTN et le DTN, mais pas vers le LTN, et vers le NOT que projettent des cellules ganglionnaires ON activées par trois différentes orientations de mouvement des stimuli : vers le haut, vers le bas ou vers l'avant sans spécificité d'un type dans les différents noyaux (121). Ces projections contrôlent la stabilisation

horizontale et verticale de l'image. Il existe aussi un type de cellules ganglionnaires ON-OFF activées par un mouvement vers l'avant qui projette dans le NOT et contrôle le réflexe optocinétique horizontal (121).

Chez des souris génétiquement modifiées sans projections axonales vers le MTN, le DTN, le LTN et avec une réduction des projections vers le NOT, le LGN, le colliculus supérieur et le noyau suprachiasmique, les pertes des réflexes optomoteur et optocinétique sont les mêmes suggérant des voies communes aux deux réflexes coopérants pour la stabilisation de l'image (112).

Le OMR produit des acuités visuelles inférieures à des tâches de discrimination visuelle comme celle de la piscine de Morris visuelle. Cela pourrait être dû à une implication de la voie géniculocorticale dans cette dernière tâche qui est affectée par une lésion des cortex visuels contrairement au réflexe optomoteur (123).

Avant les laboratoires utilisaient des systèmes de stimulation visuelle qu'ils avaient eux-mêmes confectionnés avec un cylindre dont la rotation était contrôlée manuellement (124, 125). Avec ces systèmes, il était difficile de faire varier efficacement et rapidement la fréquence spatiale et le contraste des bandes ou d'utiliser une méthode adaptative par marches. Il fallait aussi restreindre les animaux pour que leur tête reste au milieu du cylindre.

Aujourd'hui la plupart des équipes utilisent un système optocinétique virtuel (chambre de test et logiciel *OptoMotry*[™] commercialisé par *CerebralMechanics*[™], Canada) (54, 113-118, 126). Ce système consiste en une chambre fermée avec une petite plateforme au centre où l'animal peut bouger librement. Celle-ci est entourée de quatre écrans d'ordinateur affichant un cylindre virtuel en rotation dont le centre peut être ajusté par rapport à la tête de l'animal et dont la fréquence spatiale, le contraste et la vitesse sont contrôlés à l'aide d'un logiciel. Les fréquences spatiales et courbes de contrastes de la souris ont été mesurées de cette façon et les études subséquentes suivent le protocole standardisé qui a servi à ces mesures (54). Le OMR est imagé par une caméra au sommet de la chambre et peut être évalué à l'aveugle par un chercheur expérimenté ou plus récemment à l'aide d'algorithmes (112, 127). Les résultats obtenus avec le système sont reproductibles (114, 123) et la réponse des yeux individuels peut être isolée selon le sens de la

rotation des bandes. En effet, la même réponse est observée lors d'une mesure monoculaire ou binoculaire (123).

La famille des récepteurs couplés aux protéines G dans la fonction visuelle

Le récepteur GPR55, l'objet de cette étude est un GPCR et possède les caractéristiques communes à cette classe de récepteurs qui est la plus large classe de récepteurs avec près de 800 différentes protéines répertoriées. Avec plus de 30% des drogues ayant une affinité principale pour un GPCR, c'est aussi la famille de protéines la plus ciblée à des fins thérapeutiques (128). Ils contrôlent de nombreuses fonctions telles que la neurotransmission (métabotrope), le métabolisme cellulaire, les réponses inflammatoires ou la régulation de la pression sanguine (129). Ils sont classés en famille selon la similarité de la séquence avec ces quatre récepteurs : rhodopsine, sécrétine, récepteur métabotrope du glutamate, récepteurs aux phéromones fongiques, récepteur à l'AMPC ou autre (frizzled/SMO) (129). Les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 qui seront décrits plus loin sont aussi des GPCRs.

Pour ce qui a trait à leur structure, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont des protéines à sept hélices α transmembranaires, un extrémité N-terminal extracellulaire, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et une extrémité C-terminal intracellulaire (130) (Fig. 6). Les boucles extracellulaires contiennent un site de liaison, alors que des séquences dans les boucles intracellulaires permettent une affinité avec un type de protéine G (131).

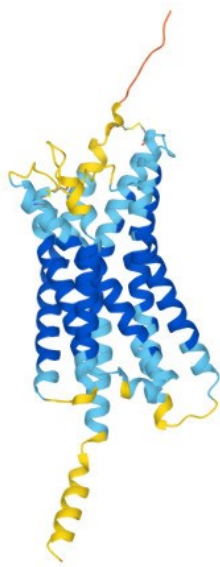


Figure 6. – La structure de GPR55 (tiré de la RCSB Protein Data Bank)

Le récepteur GPR55 est un GPCR. Il est possible de voir sa structure avec sept hélices α transmembranaires, un extrémité N-terminal extracellulaire, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et une extrémité C-terminal intracellulaire.

Beaucoup de GPCRs ont été découverts sans qu'on ne sache au début leur fonction ou plus souvent sans qu'on ne sache le ou les ligands endogènes qui y sont associés. On les appelle alors récepteurs orphelins. Il y a en ce moment plusieurs dizaines de GPCRs orphelins dont une quarantaine dans la famille des rhodopsines (132).

Selon le modèle mécanistique classique, avant d'être activée par le GPCR, la protéine G qui y est associée est composée de trois sous-unités : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Les sous-unités $G\alpha$ et $G\gamma$ ont une partie transmembranaire. L'activation du récepteur par un ligand change sa conformation, ce qui augmente son affinité avec la protéine G. En se liant avec le récepteur la sous-unité $G\alpha$ qui liait un GDP à son domaine GTPase libère ce dernier et accueille un GTP. Cela cause une dissociation du complexe hétérotrimérique entre le complexe $G\beta\gamma$ et le $G\alpha$ -GTP (133).

Ces derniers peuvent alors avoir de nombreux effets transducteurs selon les types de sous-unités. Il existe plus de 20 différents $G\alpha$, dont voici quelques exemples. Les $G_{\alpha s}$ stimulent l'adénylate cycle qui synthétise l'AMPc, alors que les $G_{\alpha i}$ l'inhibent. Les $G_{\alpha q}$ activent la phospholipase C qui hydrolyse les phospholipides. La sous-unité α des transducines comme on l'a vu précédemment activent les phosphodiésthérases qui transforment le GMPc en GMP. Les $G\beta\gamma$ peuvent aussi activer des messagers secondaires ou ouvrir des canaux ioniques. Ces sous-unités spécifiques varient selon le GPCR (133).

Éventuellement l'activité enzymatique GTPase de la sous-unité $G\alpha$ hydrolyse la GTP en GDP, ce qui lui fait retrouver son affinité avec la sous-unité $G\beta\gamma$ et arrête la transduction du signal. Les GPCRs lorsqu'activés peuvent eux même activer plusieurs protéines G dont les sous-unités activent plusieurs molécules transductrices qui elles même souvent peuvent synthétiser de nombreux seconds messagers. Le signal initial est ainsi grandement amplifié (133).

Dans les faits, il y a plusieurs conformations que les GPCRs peuvent avoir en équilibre entre l'état actif et inactif (134, 135). C'est ce qui explique que l'activité de leur conformation intermédiaire sans liaison d'agoniste ait une activité constitutive capable d'activation des protéines G, ce que les agonistes inverses sont capables de bloquer (133).

Les GPCRs sont aussi caractérisés pour leur capacité à être désensibilisés et internalisés. Juste après leur activation, les récepteurs sont phosphorylés par des kinases des GPCRs (GRKs) surtout à leur queue C-terminal intracellulaire et à d'autres sites intracellulaires. Cette phosphorylation recrute des arrestines (β arrestines 1 et 2 dans la plupart des tissus sauf la rétine) qui bloquent la signalisation médiée par les protéines G (131, 136).

Le changement de la conformation du GPCR après la liaison de l'arrestine peut recruter un complexe protéique appelé AP-2 qui recrute une clathrine. Si plusieurs récepteurs avec une clathrine sont présents localement, elles peuvent s'agréger et créer une invagination dans la membrane cellulaire qui s'internalise pour créer un endosome qui peut éventuellement être digéré par un lysosome ou recyclé dans un processus où les récepteurs retournent à la membrane (131, 136).

Les β arrestines lorsque liées au récepteur peuvent elles aussi participer à la signalisation cellulaire impliquant des kinases en recrutant c-SRC (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) qui peut activer une MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ou des protéines de la voie ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) (131, 136).

Une autre caractéristique des GPCRs est leur potentiel à se dimériser et ainsi créer des homodimères ou des hétérodimères qui ont des caractéristiques pharmacologiques différentes de celle des récepteurs seuls (137).

Le système endocannabinoïde

Le récepteur GPR55 fait partie du système endocannabinoïde étendu en raison des nombreux ligands cannabinoïdes endogènes, synthétiques ou venant du cannabis qui ont une affinité pour le récepteur. Ce chapitre vise à introduire les ligands, récepteurs et enzymes qui composent le système endocannabinoïde.

Le cannabis dans la fonction visuelle

Le cannabis est une plante utilisée et cultivée par l'humain depuis des millénaires pour ses propriétés textiles, nutritives, médicales et psychoactives (138). On a retrouvé du cannabis datant de 2800–2400 ans dans d'anciennes tombes en Chine utilisé entre autres comme linéol (139, 140), mais aussi du cannabis contenant du THC, du cannabinoïde, un produit de dégradation du THC, mais ne contenant pas de cannabidiol, ce qui indiquerait un usage à des fins psychotropes, médicinales ou religieuses (141). Pour appuyer cette hypothèse, dans la même région et datant de la même période, on a retrouvé des brasiers funéraires contenant du cannabis brûlé à escient et contenant une concentration supérieure en THC qu'une plante sauvage ne pourrait avoir (142).

Dans le *pên-ts'ao ching*, pharmacopée chinoise écrite entre 1122-206 avant J.-C., on décrit que les fruits du chanvre consommés en excès causent des « hallucinations, rendent possible la communication avec les esprits et allègent le corps ». Dans d'autres traités botaniques chinois datant de 1100 avant J.-C., on rapporte que le cannabis est toxique, est utilisé pour contrer des maladies et blessures, clarifie le sang et diminue la température, soulage la dysenterie, enlève les rhumatismes, décharge le pus et pris en excès affecte la coordination et cause des hallucinations

(143). On mentionne dans l'Avesta, des textes sacrés de la religion mazdéenne écrits entre 600 et 1000 avant J.-C., que le cannabis est un « bon » narcotique (144, 145) Hérodote au 5^e siècle avant J.-C. relate l'utilisation comme drogue de la plante chez les Scythes, mais pas chez les Grecs, Romains et Hébreux (145).

Au départ, le mot cannabinoïde désignait les molécules aromatiques contenant 21 carbones et de l'oxygène, mais pas d'azote contenu dans la plante de cannabis, mais maintenant est utilisé pour toutes les molécules naturelles ou synthétiques agissant sur les mêmes récepteurs que les phytocannabinoïdes (les cannabinoïdes de la plante) (146). Le cannabis contient plus de 120 de ces phytocannabinoïdes (147). Les deux plus étudiés et en relative grande concentration sont le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC/THC), la principale molécule psychotrope et euphorisante du cannabis (148) et le cannabidiol (CBD). Les deux trouvés majoritairement sous forme acide avant d'être oxydés par combustion (acide tétrahydrocannabinolique (THCA) et acide cannabidiolique (CBDA)). On retrouve aussi en abondance le Δ^8 -tétrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), le cannabinol (CBN), le cannabigérol (CBG), le cannabichromène (CBC), la Δ^9 -tétrahydrocannabivarine (THCV), la cannabivarine (CBV), la cannabidivarine (CBDV) et dans une moindre mesure d'autres phytocannabinoïdes comme le cannabinodiol (CBND), le cannabielsoin (CBE), le cannabicyclol (CBL) et le cannabitriol (CBT) (147).

La plante induit une grande variété d'effets. On retrouve par exemple des propriétés d'anti-inflammation, d'immunosuppression ou d'analgésie (149) et dans le système nerveux central, des effets psychoactifs qui affectent l'humeur et peuvent entraîner une dépendance, des propriétés anticonvulsivantes, d'atténuation du réflexe vomitif. Il a aussi des effets délétères sur l'apprentissage, la mémoire ou la motivation avec une consommation chronique (150, 151).

Depuis longtemps, on s'intéresse aux effets du cannabis sur la vision. L'influent philosophe et médecin perse Ibn Sina rapportait dans le *Canon de la médecine* que le cannabis obscurcit la vision (152). Depuis, on a prouvé avec des méthodes scientifiques modernes que le cannabis affecte une multitude de paramètres visuels.

La plante peut avoir des effets oculaires non visuels comme une diminution de la pression intraoculaire (153-155) qui est étudiée dans le contexte du glaucome (148, 154, 156, 157) ou la

vasodilatation des vaisseaux sanguins de l'uvéa qui est bien connue pour la teinte rosée qu'elle donne à la sclère après la consommation de cannabis (155). Les effets du cannabis sur le diamètre pupillaire sont controversés avec des études montrant une diminution légère sur le diamètre après une consommation aiguë (158, 159), une augmentation ou même aucun effet en conditions photopique/mésopique, mais une différence en conditions scotopique (160). Les consommateurs réguliers de cannabis (de 1g par semaine à 1g par jour) ont une vitesse de contraction de la pupille diminuée à la suite de l'exposition à la lumière (161).

En ce qui concerne les effets affectant plus spécifiquement les fonctions visuelles : la consommation aiguë de THC diminue la discrimination de la couleur (162, 163), augmente le temps de récupération après l'éblouissement causé par une forte lumière (164) et diminue l'acuité visuelle dynamique significativement à un contraste de 49%, mais pas à un contraste de 12% (165). La consommation aiguë de cannabis augmente la lumière parasite intraoculaire qui donne l'impression d'un halo rendant plus difficile à discerner des images en périphérie (160). Elle apporte aussi une diminution de la réponse accommodante, c'est-à-dire l'habilité à maintenir le focus sur un objet changeant de distance ou semblant le faire à l'aide d'un autoréfracteur (160).

Un autre effet intéressant de la consommation aiguë (166) ou chronique (167) du cannabis est de nuire à l'inversion de la profondeur binoculaire des images. C'est une illusion qui consiste à percevoir une image ou un objet concave comme étant convexe lorsqu'il a une portée particulière pour nous, par exemple un visage humain. Cet effet est aussi présent chez des patients atteints de schizophrénie (167).

La littérature contient des résultats contradictoires par rapport aux effets du cannabis sur la vision nocturne. Dans une étude, une majorité des participants rapportent un effet négatif de la drogue (160), mais il a été rapporté que des pêcheurs marocains (168) ou jamaïcains (169) fumaient du cannabis avant d'aller en mer la nuit afin d'améliorer leur vision scotopique (consommé avec du tabac ou avec de l'alcool respectivement). Ces affirmations anecdotiques avaient été prouvées en utilisant un adaptomètre portatif (LKC Technologies Scotopic Sensitivity Tester-1) pour tester la sensibilité rétinienne scotopique (152).

Les bases du système endocannabinoïde

Le système endocannabinoïde est exprimé à travers l'organisme entier et joue des rôles de modulations extrêmement divers.

Dans sa forme la plus simple, le système endocannabinoïde est composé des récepteurs cannabinoïdes de type 1 et de type 2 (CB1 et CB2), de ses ligands endogènes principaux (2-AG et anandamide) et des enzymes de synthèse et de dégradation de ces deux molécules.

À cause de la nature hydrophobe des phytocannabinoïdes, on n'était d'abord pas sûr s'ils agissaient par l'entremise de récepteurs ou s'ils avaient un mécanisme d'action similaire aux anesthésiques qu'on attribuait à un déséquilibre non spécifique des membranes neuronales. Cependant, en 1990, le récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1) a été cloné à partir du rat et on s'est rendu compte que des cannabinoïdes activaient ce récepteur couplé à une protéine G inhibitrice de l'adénylate cyclase et que son acide ribonucléique messager (ARNm) était retrouvé dans le cerveau (170). À ce moment, on n'avait retrouvé CB1 que dans le cerveau et à de bas niveaux dans les testicules. La question était alors de savoir par quels mécanismes étaient médiés les effets périphériques. Trois ans plus tard, un deuxième récepteur cannabinoïde a été cloné, CB2, et s'est avéré le récepteur principal médiant ces effets (171). Les récepteurs CB1 et CB2 ont une homologie élevée entre eux avec une séquence d'acides aminés à 44% identiques et à 68% si on ne regarde que les domaines transmembranaires. L'arbre phylogénétique montre que CB1 et CB2 sont apparentés à la famille de récepteur des Edg (endothelial differentiation gene) qui inclut les récepteurs à acide lysophosphatidique (LPA) et au sphingosine-1-phosphate (S1P) (172).

CB1 est l'un des GPCRs les plus abondants du SNC, on le retrouve notamment dans le néocortex, dans les ganglions de la base, l'hippocampe, le tronc cérébral et le cervelet (173). Il est aussi retrouvé dans les testicules, la rate, les nerfs périphériques ou l'endothélium vasculaire (174). Le récepteur est responsable de la majorité des effets centraux que le cannabis cause et joue des rôles dans l'apprentissage, la mémoire, la perception de la douleur entre autres (174).

CB2 est surtout trouvé dans la périphérie, notamment dans le pancréas, la rate, le thymus, les tonsilles ou la moelle osseuse. Dans ces derniers, il est exprimé dans des cellules immunitaires telles que les macrocytes et monocytes de la rate, dans les cellules dendritiques, dans les

mastocytes et leucocytes en circulation dans le sang ou dans les lymphocytes B, NK et T (175-179). Le récepteur a des fonctions d'activation ou de différenciation de ces cellules (175, 177).

Même s'il était initialement cru que CB2 n'était exprimé qu'à la périphérie (180), on a par la suite trouvé qu'il est exprimé dans les cellules immunitaires du système nerveux. Par exemple, CB2 est exprimé dans la microglie et régule leur migration (181). Il peut être exprimé dans des neurones du SNC à la suite d'une lésion de leur axone et a dans ce cas des effets neuroprotecteurs (182). CB2 est aussi exprimé dans différentes régions du cerveau comme le tronc cérébral, le cortex frontal, les ganglions de la base ou le striatum et est exprimé dans des neurones du tronc cérébral(183) ou dans des neurones dopaminergiques (184) où le récepteur modulerait des fonctions dans l'anxiété, la dépression, la douleur, les comportements moteurs ou les effets de récompense de l'alcool et de la cocaïne (185).

Les deux récepteurs sont des GPCRs couplés à des protéines $G_{i/o}$ qui inhibent l'activité de l'adénylate cyclase qui par la diminution de l'AMPc inhibe la voie de la protéine kinase A (PKA). Ils inhibent aussi la MAPK qui régule entre autres l'expression de gènes, la mitose, la survie cellulaire ou la différenciation des cellules. Ils peuvent inhiber des canaux calciques et stimuler des canaux potassiques ou activer les voies dérivées des β arrestines (186). Les voies secondaires activées par les récepteurs cannabinoïdes peuvent dépendre des ligands et du système (174, 187). Il existe même des protéines spécifiques à CB1, les CRIPs (cannabinoid receptor interacting proteins) qui peuvent sélectionner certaines voies de signalisation (188). Par exemple, CRIP1a peut supprimer l'inhibition des canaux calciques ou bien compétitionner les β arrestines dans la liaison avec CB1 et empêcher sa désensibilisation ou son internalisation (189).

CB1 existe aussi sous une forme intracellulaire ou il est associé à des endolysosomes et permet la libération de calcium de ces compartiments pour augmenter la concentration calcique cytosolique (190).

En plus de CB1 et CB2, plusieurs autres récepteurs sont associés au système endocannabinoïde en raison de leur affinité avec des ligands cannabinoïdes. On retrouve par exemple TRPV1 à 4 (transient receptor potential vanilloïde 1 à 4) et d'autres TRPs (transient receptor potential comme TRPA1 et TRPM8) ((191, 192), GPR55 (193), GPR18, GPR119, des récepteurs activés par

les proliférateurs de peroxysomes (PPARS), ENT-1 (equilibrative nucleoside transporter-1), certains récepteurs à la sérotonine et plusieurs canaux ioniques dépendants du voltage (147, 194).

Les récepteurs cannabinoïdes forment aussi plusieurs hétérodimères avec d'autres récepteurs, on retrouve ainsi des dimères CB1-CB2 (195), CB1- 5-HT_{2A} (196), CB2-CXCR₄ (197), CB1-OX₁ (198), CB2-GPR55 (199) ou CB1-GPR55 (200), parmi bien d'autres (201).

Les ligands cannabinoïdes endogènes, appelés endocannabinoïdes, sont principalement l'anandamide et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG), mais il existe une multitude d'autres lipides avec une affinité pour les ligands cannabinoïdes comme le 2-arachidonyl glycéryl éther (noladin éther), la virodhamine, la *N*-arachidonoyldopamine (NADA), le dihomom-γ-linolenylethanolamide (dihomom-γ-LEA), l'oléamide, le docosahexaénoyléthanolamide (DHEA), l'eicosapentaénoyléthanolamide (EPEA), le docosatétraoénoyléthanolamide (DTEA), la *N*-arachidonoyldopamine, la *N*-oléoyldopamine (OLDA). (182, 202, 203). La *N*-oléoyléthanolamine (OEA) et la *N*-palmitoyléthanolamine (PEA) pourraient aussi améliorer l'activité du 2-AG et de l'anandamide en inhibant leur dégradation (204).

L'anandamide est un ligand agoniste de CB1, CB2 et d'autres récepteurs cannabinoïdes comme TRPV1. Le 2-AG est l'endocannabinoïde avec la plus grande concentration dans le corps. Il a aussi une affinité pour CB1, CB2 et d'autres récepteurs cannabinoïdes comme GPR55. La molécule est notamment un agoniste complet de CB2, alors que l'anandamide est un agoniste partiel du récepteur et peut même atténuer l'activité du 2-AG à cause de son activité inférieure (205).

La synthèse de l'anandamide peut passer par plusieurs voies. La voie de synthèse du *N*-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD) à partir du *N*-arachidonoyl phosphatidylethanolamine (NAPE) dérivé de phospholipides membranaires est la plus souvent citée. Trois autres voies de synthèse existent aussi à partir du NAPE (206). Il y a aussi plusieurs voies de catabolisme de l'anandamide, mais la plus importante est celle qui la dégrade en acide arachidonique et en éthanolamine à l'aide de l'hydrolase des amides d'acides gras (FAAH) (207). D'autres voies sont par des CYP450 ou par la cyclooxygénase-2 (COX-2) pour synthétiser des prostaglandines similairement au 2-AG (206). La synthèse du 2-AG et de l'anandamide dans le

SNS est faite dans le neurone post-synaptique et la dégradation du 2-AG dans le neurone présynaptique (187).

La biosynthèse du 2-AG est principalement exécutée par des enzymes diacylglycérol lipase (DAGL α et β), à partir du diacylglycerol (DAG) provenant du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) avec d'autres voies de synthèses dont une commence aussi avec le PIP₂ qui est un lipide constituant les membranes cellulaires. Plusieurs voies de dégradations existent aussi pour le 2-AG, la principale étant sa transformation en acide arachidonique et en glycérol par la monoacylglycérol lipase (MAGL). Des cyclooxygénase (COX), lipoxygénase (LOX), et des enzymes cytochrome P450 monooxygénases (CytP450) peuvent aussi transformer le 2-AG en prostaglandines entre autres (208).

Les endocannabinoïdes peuvent être synthétisés sur demande, puis libérés par une augmentation du calcium intracellulaire à la suite de stimulus tels une stimulation synaptique prolongée ou un signal pro-inflammatoire comme des lipopolysaccharides (209-211). Plusieurs protéines de transport dont SCP-2 (stérol Carrier Protein-2) se lient aux endocannabinoïdes et pourraient participer à leur transport et exportation hors de la cellule à la suite de la synthèse (212).

Le système endocannabinoïde dans le système nerveux central

Dans le SNC, l'activation post-synaptique induit la synthèse de 2-AG et d'anandamide qui activent CB1 dans le neurone présynaptique qui par l'activation de canaux potassique l'hyperpolarise et par l'inhibition des canaux calciques inhibe la libération de neurotransmetteurs. Il joue ainsi un rôle de modulation inhibitrice et est impliqué dans la plasticité synaptique (174).

Le système endocannabinoïde est exprimé dans plusieurs structures du système visuel. Un ligand radioactif de CB1 et CB2 a montré une densité de récepteurs cannabinoïdes en ordre décroissant dans les aires visuelles primaires et secondaires, dans le thalamus et dans les colliculi supérieurs (213). Chez l'humain, des marquages immunohistochimiques ont révélé une expression de CB1 dans plusieurs parties de l'œil. En ordre de concentration d'expression : les épithéliums cilié et cornéen, les segments externes des photorécepteurs, puis le trabéculum et le canal de Schlemm, ensuite les muscles ciliés, les vaisseaux sanguins du corps ciliaire, et enfin dans le muscle sphincter de la pupille (214). CB1 joue dans l'œil des rôles de régulation de la pression intraoculaire, de

neuroprotection rétinienne (215, 216). CB2 est surtout présent dans les cellules immunitaires des yeux (215) et a des effets neuroprotecteurs sur les cellules de la rétine (216, 217).

Des récepteurs et enzymes du système endocannabinoïde sont exprimés dans la rétine de façon différente selon les espèces (218, 219) et y jouent des fonctions de modulation de l'activité des neurones qui sont aussi divergentes selon l'espèce. Chez la souris CB2, mais non CB1, module l'activité de la rétine (220, 221).

Les lysophosphatidylinositols

La famille de molécule des lysophosphatidylinositols (LPI) sont considérés comme étant les ligands endogènes principaux de GPR55. Ce sont des molécules de la famille des lysophospholipides.

Les lysophospholipides sont des lipides bioactifs dérivés des phospholipides membranaires dont des exemples saillants sont les glycérophospholipides et des sphingolipides. Plusieurs de ces dernières molécules participent à la signalisation lipidique comme le glycérolipide LPA et le sphingolipide S1P (sphingosine-1-phosphate). Le LPA a six récepteurs connus, tous des GPCRs. Ils sont impliqués dans des fonctions telles que le développement du SNC, la fertilité, le cancer, la chimiotaxie des cellules dendritiques, la formation des vaisseaux lymphatiques, l'agrégation des plaquettes ou la croissance des cheveux (222). En ce qui concerne la S1P, elle a une forte affinité avec cinq GPCRs qui ont aussi une grande affinité avec la dihydro-S1P (sphinganine 1-phosphate) et la phytoS1P (4-hydroxysphinganine 1-phosphate). Toutes ces molécules sont entre autres impliquées dans la formation de lamellipodes et des jonctions adhérentes, dans le développement du SNC et du système vasculaire, dans la neurogenèse, dans la migration des lymphocytes, dans la prolifération cellulaire, dans l'inflammation, la protection de plusieurs types cellulaires ou dans la fertilité (222).

Cette ressemblance structurelle du LPI avec d'autres lipides bioactifs connus tels que le S1P, le LPA ou le lysoPS présupposait une activité biologique de la molécule avant même qu'on en fasse la démonstration (223). Par exemple, sans connaître de récepteur auquel la molécule pouvait se lier, on savait déjà que le LPI (et le LPG) permettait la libération d'insuline dans le pancréas (224).

Le LPI a aussi des effets mitogéniques (223, 225), augmente la concentration de calcium cytosolique dans les hépatocytes (226) et est impliqué dans l'obésité (227).

La structure des LPIs est composée d'un sucre inositol comme groupement de tête hydrophile lié au glycérol-3-phosphate qui contient une chaîne acyl en position sn-1 ou sn-2. La biosynthèse classique du LPI consiste au clivage du phosphatidylinositol (PI) en 2-acyl LPI par la phospholipase A1 (PLA1) ou en 1-acyl LPI par la phospholipase A2 (PLA2) (228). Le LPI peut être dégradé par différentes enzymes telles que des lysophospholipases A et C (lyso-PLA et lyso-PLC). Un lyso-PLC est notamment spécifique au LPI. Le LPI peut être dans un premier temps transformé en glycérophosphoinositol (GPI), puis par d'autres enzymes redevenir du PI (172).

Comme pour les endocannabinoïdes, les LPIs peuvent être excrétés de la cellule dans le but de causer des effets autocrines ou paracrines. Cette sortie de la cellule peut être médiée par des transporteurs à cassettes liant l'ATP (ABC) comme ABCC1 (229).

Les LPIs peuvent avoir différentes activités biologiques dépendamment de la longueur de leur groupement acyle, on en retrouve notamment avec des groupements : acide stéarique, acide arachidonique, acide palmitique, acide oléique, acide palmitoléique, en ordre d'abondance, biosynthétisés chez les mammifères (230). C'est le LPI avec le groupement acide arachidonique qui active le plus GPR55. Il est intéressant de constater que la majorité des sources commerciales de LPI disponibles proviennent du soya et que les plantes ne contiennent pas la variété de LPI contenant le groupement acide arachidonique (230). Cette sorte de LPI a aussi des similarités moléculaires avec le 2-AG et peut être synthétisé à l'aide du même précurseur phosphatidylinositol que le 2-AG. Ces propriétés le rendent proche des ligands endocannabinoïdes. Certaines variétés de LPI comme celle avec un groupement acide oléique peuvent avoir des effets bioactifs passant par d'autres récepteurs comme GPR119 (231).

Le récepteur 55 couplé aux protéines G

Le récepteur GPR55 a été découvert *in silico* en 1999 en recherchant l'homologie de plusieurs séquences d'acides aminés de la famille des rhodopsines des récepteurs couplés aux protéines G (Fig. 6) dans des bases de données de génomes et de transcriptome. GPR55 est une protéine de 319 acides aminés située dans le chromosome humain 2 à q37. L'ARN messager de la protéine

avait aussi été retrouvé dans du tissu humain de putamen et de noyau caudé (232). Dans les années suivantes, des brevets ont été déposés montrant que plusieurs ligands cannabinoïdes liait GPR55 (233). En 2001, il est montré que l'AM251, un agoniste inverse du récepteur cannabinoïde CB1, a une affinité pour le récepteur GPR55 (193). Même s'il a une faible homologie de séquence avec CB1 (13,5%) et CB2 (14,4%), il lie les phytocannabinoïdes Δ^9 -THC, cannabidiol (CBD) et cannabinol (CBN); les cannabinoïdes synthétiques CP-55940, WIN 55,212-2, HU210, JWH-015, JWH-133 et Abn-CBD; les ligands endocannabinoïdes 2-AG, anandamine, virohdamine et noladin ether (2-AGE) et les ligands lipidiques non endocannabinoïdes PEA et oleylethanolamine (OEA) (234). Les quatre ligands endocannabinoïdes seraient même plus puissants pour activer GPR55 que CB1 ou CB2, ceci mesuré par concentration efficace médiane (EC50) requise pour stimuler la liaison de [35 S]GTP γ S à la surface de la membrane (203).

Même si tous les premiers articles publiés sur GPR55 tendaient à présenter le récepteur comme un récepteur purement cannabinoïde, certains éléments permettaient déjà d'en douter. En plus de sa faible homologie avec les récepteurs cannabinoïdes classiques, il ne partage pas la poche d'acides aminés conservée entre CB1 et CB2 qui tient lieu de site de liaison pour les cannabinoïdes synthétiques (235).

En 2007, on a fait l'hypothèse que le LPI est le ligand principal de GPR55. L'ajout de LPI induit une phosphorylation dose-dépendante de ERK seulement dans les cellules HEK293 exprimant GPR55. Cette différence de phosphorylation de ERK entre les cellules exprimant GPR55 ou non n'est pas reproduite avec d'autres lysolipides comme les LPC, LPE, lysoPS, PAF, SPC, et psychosine. L'administration de LPI augmente le calcium intracellulaire, cet effet pouvant être diminué par un prétraitement indiquant une désensibilisation. Ces voies de signalisations seraient médiées par la protéine GTP γ (236). Certains ligands autres que le LPI comme la lysophosphatidylcholine (LPC)(237), le lysophosphatidylglucoside (lysoPtdGlc) (238, 239) ou le lysophosphatidylglycérol (Lyso-PG) (240) ont été découverts comme ayant des actions biologiques médiées par GPR55. Le lysoPtdGlc serait même le ligand endogène ayant la meilleure affinité avec GPR55 (241).

The International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) classifiait GPR55 avant 2019 comme récepteur orphelin de classe A, cette famille regroupant les GPCRs apparentés à la

rhodopsine (132). Depuis GPR55 a été regroupée dans une catégorie provisoire avec les récepteurs GPR18 et GPR119, parce que tous ces récepteurs ont une affinité pour les ligands cannabinoïdes tout en ayant plus d'affinité pour d'autres lipides non-cannabinoïdes. Le manque de preuve d'activation *in vivo* par ces ligands explique qu'ils gardent leur statut de récepteur orphelin (242).

GPR55 a une large expression dans le corps en périphérie et dans le système nerveux. À l'extérieur du système nerveux central, GPR55 est retrouvé notamment dans des organes comme la rate, le thymus, les petits intestins, les poumons, le cœur, les reins, le foie, les glandes surrénales, les testicules, l'utérus, les tonsilles et les adipocytes des seins (193, 223, 232, 243), dans les ostéoclastes et les ostéoblastes (244) et les cellules endothéliales de plusieurs organes (245-247). Il est aussi exprimé dans des cellules tumorales et joue des rôles dans de nombreux cancers (228, 248, 249). Parmi ses fonctions en périphérie on retrouve la modulation de l'inflammation et la douleur (250), la croissance/résorption des os (244), la prolifération des cellules cancéreuses (248, 249), la vasodilatation (251), les fonctions cardiaques (252, 253).

Dans le système nerveux central, on a retrouvé son ARNm dans le cortex frontal, l'hippocampe, l'hypothalamus, le tronc cérébral, le cervelet, le striatum (noyau caudé et putamen), le noyau thalamique et dans le mésencéphale (193, 232, 243). GPR55 est impliqué dans plusieurs fonctions centrales comme l'apprentissage ou la coordination motrice (240). L'activation de GPR55 a des effets antidépresseurs, autant au niveau du comportement que des symptômes pathophysiologiques tels que la neuroinflammation de l'hippocampe ou les dommages oxydatifs dans la vessie (254, 255). La modulation de GPR55 régule aussi l'anxiété comme le montre l'augmentation des comportements anxieux lors de l'injection d'un antagoniste de GPR55, le ML-193 alors qu'au contraire l'agoniste O-1602 cause des effets anxiolytiques (256). Dans l'hippocampe, le LPI, avec un effet médié par GPR55, facilite la libération de neurotransmetteurs excitateurs et diminue les réactions d'inhibition post-synaptique (257).

We found that LPI transiently increased hippocampal CA3-CA1 excitatory presynaptic release probability and evoked synaptic strength in *Gpr55*^{+/+} mice, while attenuating inhibitory postsynaptic strength by decreasing GABA_AR_{γ2} and gephyrin puncta

GPR55 a une signalisation assez complexe qui dépend du ligand ou du type cellulaire (258). Il peut être associé aux protéines $G\alpha_{13}$ (243), $G\alpha_{12}$, $G\alpha_q/11$ ou $G\alpha_{12}/13$ (259, 260). Ainsi via la voie $G\alpha_{13}/RhoA$ ou directement avec une protéine $G\alpha_q$ il peut libérer du calcium intracellulaire (230). Dans ces deux cas, une PLC est impliquée transformant du PIP_2 en IP_3 qui peut activer la libération du calcium du réticulum endoplasmique (228). En passant par la protéine $G\alpha_{12}/13$ et $RhoA$, GPR55 peut aussi réguler la formation du cytosquelette d'actine ou le facteur de transcription AFT2 (223). D'autres voies cellulaires que GPR55 peut activer sont la voie des MAP kinases, l'activation de NFAT, la phosphorylation de ERK1/2 ou de CREB et l'activation de $NF\kappa B$, deux facteurs de transcription (228, 260). L'activation de ce dernier ou de ERK, n'est pas présente avec tous les agonistes de GPR55 (260). Au final, les voies actives régulent des fonctions comme la différenciation cellulaire, l'apoptose, la prolifération autant dans des conditions physiologiques que dans le cas d'un cancer (228).

Le récepteur 55 couplé aux protéines G dans le système visuel

Des résultats d'immunohistochimie confirment que GPR55 n'est exprimé que dans les bâtonnets chez le singe vervet (261). Ces résultats sont complétés en ERG où seulement l'onde-b scotopique causée par les cellules bipolaires ON liés aux bâtonnets sont affectés par des ligands de GPR55. L'agoniste lysophosphatidylglucoside (LPG) augmente significativement l'amplitude de l'onde-b scotopique alors que l'antagoniste spécifique de GPR55, le CID16020046, baisse cette amplitude (262).

GPR55 est trouvé dans la rétine des hamsters et des souris. À la naissance (P1), la rétine des hamsters est moins développée que celles des autres rongeurs (263). À cet âge, la protéine et l'ARNm sont retrouvés dans toutes les couches de la rétine (GCL, GCL, IPL et NBL). Les rétines d'embryons de souris (E14-15) expriment la protéine dans toutes les couches et l'ARNm dans la couche des cellules ganglionnaires. À l'âge adulte, la rétine des souris contient la protéine et l'ARNm dans toutes les couches. GPR55 est situé dans le corps cellulaire, l'axone et les dendrites d'explants rétinien. Le récepteur est aussi exprimé dans le cortex des souris durant le développement et après la naissance (264).

La taille du cône de croissance et le nombre de filopodes et la croissance axonale d'explants neuronaux de souris sont augmentés après traitement avec des agonistes de GPR55 et diminués avec traitement avec un antagoniste. Le *knock-out* de GPR55 reproduit les effets de l'antagoniste. Ces effets sont médiés par une modulation de la voie ERK1/2. À basse concentration (1 μ M), le LPI augmente la taille du cône de croissance, le nombre de filopodes et la croissance axonale via la voie ERK1/2. À plus haute concentration (10 μ M), le LPI a des effets inverses en passant par la voie RhoA. À basse concentration, le LPI induit une chimioattraction axonale, alors qu'à plus haute concentration, il induit une chimiorépulsion (264).

Finalement, les souris *Gpr55*^{-/-} ont une ramification diminuée vers le noyau terminal dorsal (DTN) et une ségrégation anormale entre les projections rétiniennes ipsilatérales et contralatérales vers les colliculi supérieurs et corps genouillés latéraux. L'injection intraoculaire de LPI à la naissance dans le système visuel en développement de hamster augmente aussi la ramification vers le DTN, alors que l'injection de CBD les diminue. De plus, l'injection de LPI intraoculaire engendre des projections ipsilatérales aberrantes vers le colliculus supérieur (264).

La souris comme modèle d'étude de la vision

Les Euarchontoglires sont un clade des mammifères placentaires qui est composé des superordres des Euarchonta (primates et lémures volants) et des Glires (rongeurs et lagomorphes) (265). La division entre les deux super-ordre aurait eu lieu il y a 87,9 millions d'années (266), (entre 64 et 104 millions d'années (265, 267)) alors qu'il y avait encore des dinosaures (267). L'humain a donc un ancêtre commun avec la souris plus récent que n'importe quels laurasiathériens qui comporte entre autres les carnivores comme le chat qui a été un modèle très utilisé au début de la recherche dans le domaine des sciences de la vision par exemple en ERG (79). Même si le génome de la souris est plus petit de 14% que les humains, près de 90% de celui-ci peut être divisé en sections de synténie conservée et 40% peuvent être alignés au niveau des nucléotides. Plus important encore, seulement 1% des gènes humains ou murins n'ont pas d'orthologues dans l'autre génome (268).

La souris est le modèle de mammifère le plus utilisé en général en biologie en raison de sa petite taille, de sa reproduction rapide, mais surtout de la quantité d'outils de modification génétique

accessible avec le modèle. En ce qui a trait à la vision, le modèle a des différences avec l'humain qui pourrait le désavantager comme modèle, comme une très faible acuité visuelle, l'absence de fovéa ou une vision majoritairement scotopique. Par ailleurs, cet animal navigue dans son environnement principalement par l'odorat et l'usage de ses vibrisses (269). Par contre en plus des outils de modification génétique, il a des avantages comme la possibilité de visualiser simultanément l'ensemble de son cortex visuel en raison de sa petite taille (56). La souris a aussi une organisation basique des structures visuelles assez similaires à l'humain qui en fait au final un modèle intéressant en sciences de la vision (56). Il est par ailleurs important de bien sélectionner la souche à utiliser dans une expérience comme l'ERG parce que celle-ci peut influencer les composantes de l'ERG (270). C'est aussi pourquoi il faut utiliser la même souche pour tester l'effet de délétion d'un gène dans ce genre de technique.

Rationnel de l'étude

Cette étude a pour but d'observer les effets du récepteur GPR55 sur la vision de la souris. Des souris dont le gène *Gpr55* a été déléte (*Gpr55*^{-/-}) sont utilisées afin de mesurer les effets de l'absence du récepteur et d'en déduire les fonctions. Des ligands agonistes et antagonistes du récepteur seront aussi injectés de façon aigüe et systémique afin de vérifier que les effets observés ne soient pas dus à des différences de développement ou de réorganisation du système visuel dû à l'absence du récepteur. Le choix d'une injection systémique est fait pour éviter les conséquences d'une injection locale (intravitréenne) qui créerait des distorsions optiques et pourrait causer une inflammation ou d'autres complications (271).

Plus spécifiquement, le modèle du réflexe optomoteur est utilisé pour mesurer le développement de l'acuité visuelle après l'ouverture des yeux et à l'âge adulte, ainsi que la sensibilité au contraste des souris adulte. Cette technique a été choisie, parce qu'elle ne nécessite pas d'entraînement et peut être utilisée dès l'ouverture des yeux, ce qui la rend utile pour mesurer le développement de l'acuité visuelle avant l'âge adulte. Ces mesures comportementales sont complémentées par les mesures électrophysiologiques prises en ERG qui est la référence pour mesurer l'activité des cellules de la rétine. L'activité des neurones de la rétine peut aussi fournir une piste d'explication

des résultats obtenus avec le réflexe optomoteur puisqu'une altération des fonctions rétinienne peut affecter le comportement visuel.

Chapitre 2 – Article scientifique : Functional and behavioral effects of GPR55 on vision in mice

Authors: Ismaël Bachand, Sabrina Ramdane, Annik Lannoie, Pierre Joffre, Bruno Cécyre, Samuel Laroche, Jean-François Bouchard.

This paper is not yet published. Provisory contributions are: Bachand, I.: conception, writing, supervision, manipulations, and analysis, 63%. Ramdane, S.: manipulations and analysis, 10%. Lannoie, A.: manipulations et analysis, 4%. Cécyre, B.: conception and methods 2%. Joffre, P.: analyses, 2%. Laroche, S.: methods, 1%. Bouchard, J.-F.: conception, support, supervision, and corrections, 18%.

Abstract

Endogenous and exogenous cannabinoid ligands are known to influence retinal function and visual behavior. While most of these roles have been attributed to the canonical cannabinoid receptors, there are other candidate receptors that can also be activated by these ligands and, therefore, be involved in mediating their effects. The G protein-coupled receptor 55 (GPR55) is an atypical cannabinoid receptor that is expressed in the retina where its functions remain poorly studied. To investigate the putative roles of GPR55 in vision, we compared the the retinal electrical responses, the visual acuity, and the contrast sensitivity of C57BL/6J *Gpr55* knockout (KO) mice (*Gpr55*^{-/-}) and their age-matched wild-type controls (*Gpr55*^{+/+}). The full-field electroretinograms (ERGs) acquired in light- and dark-adapted conditions revealed significant differences between groups for several components of the ERG waveform. The scotopic b-wave and photopic a-wave amplitudes were significantly lower in *Gpr55*^{-/-} mice. The first three main oscillatory potentials (OPs) and the sum of the four main OPs were also lower in *Gpr55*^{-/-} mice. The minimal spatial frequency capable of triggering an optomotor response was used to measure visual acuity from postnatal day 15 to 50 and in adult mice aged three to four months old. During development, *Gpr55*^{-/-} mice had significantly lower visual acuity, but eventually at P50 reached and kept levels comparable to their wild-type counterpart. The optomotor reflex was also used

to study contrast sensitivity in adult mice. Adult *Gpr55*^{-/-} mice had lower contrast sensitivity than *Gpr55*^{+/+} mice. This effect was reproduced by the systemic administration of the GPR55 antagonist ML-193 to wild-type mice. Conversely, administration of the GPR55 agonist O-1602 increased contrast sensitivity. Overall, these results suggest that the GPR55 is capable of altering visual functions by regulating the activity of different retinal cell types.

Introduction

The endocannabinoid (eCB) system is ubiquitously expressed and implicated in the functions of the main systems in most living organisms. Research on this topic has largely revolved around the cannabinoid receptors type 1 and 2 (CB1 and CB2), the principal receptors for the two main eCB ligands, 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and anandamide. However, over the last two decades, the endocannabinoid system has been expanded to include other receptors that, despite having their own main ligands, are also activated by endogenous cannabinoids. These so-called atypical cannabinoid receptors feature GPR55 (234) and other members of the G-protein coupled receptors (GPRs) family, transient receptors potential (TRPs) (191, 192), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS), the equilibrative nucleoside transporter-1 (ENT-1), some serotonin receptors and several voltage-gated ion channels (147, 194). GPR55 has received particular attention, as it is broadly expressed in the central nervous system and in the periphery (193, 223, 232, 243) where it participates in a vast array of biological processes, such as the regulation of the cardiovascular function (251), inflammation (250), learning (272) and anxiety (253). Whilst the principal endogenous ligands of GPR55 are lysophosphatidylinositols (LPIs)(236), eCBs, phytocannabinoids and synthetic cannabinoids(234) also show a strong binding affinity for this receptor.

Due to the presence of the eCB receptors, ligands and metabolic enzymes in the retina and other ocular tissues, cannabis affects the vision in numerous ways (162-167, 169). The expression and function of the GPR55 in the retina has been studied in vervet monkeys. In this species, the GPR55 was found to be expressed solely in rods (261) and the administration of a GPR55 agonist affected the ERG scotopic b-wave (262). The scotopic b-wave originates from a mixed response of cone and rod ON-bipolar cells (107, 108).

Since species differences in the expression of the eCB system in the retina have been reported, its functions might differ between primates and mice (218, 219). In mice, GPR55 is broadly expressed in the retina and regulates axon growth and guidance during embryonic development (264). However, the effects of this receptor on murine vision are not known yet. Therefore, the goal of this study was to investigate the effects of GPR55 on murine vision.

Materials and methods

Animals

All experiments were approved by the Ethics Committee on animal research of the Université de Montréal and performed under the ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) guidelines, and in accordance with the standards of the Canadian Council on Animal Care and the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The *Gpr55*^{-/-} mice were acquired from the Texas Institute of Genomic Medicine (Houston, Texas) (273-275) and the *Gpr55*^{+/+} mice were acquired from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Both mouse strains have a *C57BL/6J* genetic background (275). The *Gpr55*^{-/-} mice do not present any visible pathological phenotype nor show early lethality. An approximately equal number of males and females was used in each group. Mice between 15 and 50 days of age were used to determine the development of visual acuity with the optomotor response (OMR). Adult mice between 3 and 6 months old were used for electroretinography and measuring visual acuity and contrast sensitivity with the OMR.

After the experiments, the animals were genotyped by polymerase chain reaction (PCR). Briefly, after euthanasia, the tails were collected and digested for 45 minutes using 0,5M NaOH at 95°C and neutralised with 1 M Tris-HCl, 7 mM EDTA (pH 8). After centrifugation, the supernatant was collected and used in a standard PCR with primer sequences 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3' and 5'-TCAAGCTACGTTTTGGGT-3' for the knockout allele, and primer sequences 5'-GCCATCCAGTACCCGATCC-3' and 5'-GTCCAAGATAAAGCGGTTC-3' for the wild-type allele. The 301 bp sequence amplified for the *Gpr55*^{-/-} allele and the 411 bp sequence amplified for the

Gpr55^{+/+} allele allowed the identification of the genotype of the animals after running the DNA on an agarose gel (264).

The rodent colonies were maintained in an animal facility kept between 20 and 24 °C, with a 12-hour light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water. Technicians monitored the conditions and health of the animals daily and a veterinarian was available in case of complications.

Drugs

ML-193, an antagonist of GPR55, was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan) and O-1602, a GPR55 agonist, was obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Stock solutions of the drugs in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) were stored at -20 °C. The drugs were freshly diluted in a 10% DMSO saline vehicle and injected intraperitoneally (i.p.) at a volume of 6 mL/kg of body weight, for a final concentration 10 mg/kg for ML-193 and 2 mg/kg for O-1602. These concentrations were similar to those used in other studies of systemic administration (276-280) and were chosen to elicit an optimal effect without losing the specificity to GPR55.

Electroretinography

The ERG protocols were adapted from the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) clinical standards (281) and done as described in Cécylre, B. et al. (2020) (126). After overnight dark adaptation, the mice were anesthetized by isoflurane inhalation (2% isoflurane in oxygen; Harvard apparatus, Cambridge, Massachusetts) and their temperature was maintained at 37°C using warming pads (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts). The manipulations were done under dim red light to maintain dark adaptation. The animals were given analgesic (proparacaine hydrochloride 0.5%, Alcon) and mydriatic eye drops (phenylephrine chlorhydrate 2.5%, Alcon). Vital signs were monitored by electrocardiogram and via a rectal probe for temperature. The light flashes were delivered with a xenon flashtube photostimulator (LabeoTech, Montréal, Québec) placed on a Ganzfeld dome. The light-induced electrical activity of the retina was recorded using corneal lenses with a gold electrode (LKC Technologies,

Gaithersburg, Maryland), a reference electrode placed under the skin of the forehead and a ground electrode inserted in the tail (E2 subdermal electrode, Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island). The mice were exposed to progressively brighter stimuli ranging from -3.866 to $1.396 \log \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ in scotopic conditions with an interstimulus interval of 30 seconds. After the scotopic acquisition, the animals were adapted to light for 30 minutes at a luminance of $33 \text{ cd} \cdot \text{m}^{-2}$ and the photopic acquisitions were done under the same luminance. The flashes ranged from -0.578 to $1.396 \log \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ in photopic conditions with an interstimulus interval of 3 seconds. The signal was amplified (bandwidth, 1–1000 Hz; 10,000x; P511 AC amplifier, Grass Instruments) and filtered in an analog-digital interface (1401, CED, Cambridge, UK). The software Signal (v.3.01x, CED) was used to acquire and analyse the data.

The ERG components relevant to the analysis were extracted from the averaged signal of five responses in scotopic conditions and fifteen responses in photopic conditions. The a-wave was measured from the bottom of the negative pit to the baseline, whereas the b-wave was measured from the trough of the a-wave to the peak of the b-wave. The oscillatory potentials (OPs) were analysed for flashes between $-2.246 \log$ and $1.396 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$. The four principal OPs were measured from their most negative adjacent trough to their peak while their latency was taken between the second and the third OP (OP2 and OP3). The filtration with a high-pass at 60 Hz allowed the extraction of all these components (282).

Optomotor Response

Visual functions and contrast sensitivity were tested with the OMR as described by Prusky, G. *et al.* (2004) (54) with the OptoMotry system (CerebralMechanics Inc. Lethbridge, Alberta). First, the mice were accustomed to being placed on an elevated platform in the center of a closed chamber surrounded by four computer monitors for 15 minutes. This adaptation to the environment took place before the day of the measurement and had the goal to reduce the stress of the animals. The monitors displayed a virtual rotating cylinder with sinusoidal gratings that trigger the animal to respond with a stereotypic head movement. The experiments were carried immediately after the opening of the light to make sure the animals were still active. A trained experimenter determined the spatial frequency thresholds of mice during visual development at ages P15, P16,

P17, P19, P21, P24, P27, P30, P35 and P50 (*Gpr55*^{+/+} n=16, *Gpr55*^{-/-} n=18) and adulthood (n=19). The stimuli had a fixed contrast of 100% and rotated at a speed of 12 degrees/second. Thresholds were measured using an adaptive staircase protocol. The value was set after 8 smaller steps reversals or 50 trials). The monitors turned gray after a positive response of the mouse or 3.5 seconds after the stimulus onset. The contrast sensitivity of adult mice (n=4) was also tested using fixed spatial frequencies of 0.031; 0.064; 0.092; 0.103; 0.192 and 0.272 cycle/degree (c/d), using the same adaptative staircase protocol. The contrast sensitivity was determined by calculating the reciprocal of the measured contrast threshold.

Statistics

Random numbers were assigned to the data so it could be analysed blindly. The different components of ERG, the development of visual acuity and contrast sensitivities were analysed using a three-way mixed model analysis of variance (ANOVA). The genotype or pharmacological treatment were used as a between-subject factors, and the flashes strength, the age or the spatial frequency and the eyes as within-subject factors. The visual acuity of the adult mice was analysed using a two-way mixed ANOVA with the genotype or pharmacological treatment as a between-subject factor and the eyes as within-subject factors. Post-hoc tests were executed using Šidák tests. A p-value ≤ 0.05 was considered significant.

The eyes were used as a within-subject factor (both eyes of an animal as repeated measures) to avoid type 1 errors. Analysing both eyes separately would falsely decrease the variance of the groups and augment the risk of rejecting the null hypothesis (H_0) when it is true (283).

The software SPSS Statistics 28 (IBM, Armonk, New York) was used to perform the statistical tests and the software GraphPad Prism 9 (Dotmatics, San Diego, California) was used to generate the figures. The *p*-values of the statistically significant data were represented graphically with asterisks: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$ and ***: $p \leq 0.001$.

Results

Dark-adapted electroretinography

Dark-adapted ERG were performed with *Gpr55*^{+/+} and *Gpr55*^{-/-} mice and the different components of the response were analyzed (Fig. 7A, B). For a-wave and b-wave latencies (Fig. 7C, E), the difference between genotypes was not significant ($p=0.217$ and 0.863 respectively), but the interaction between the genotype and the light flash strength was significant (three-way mixed ANOVA; $F(7,140.743)=3.381$, $p=0.002$ and $F(7,168.314)=2.578$, $p=0.015$ respectively) In both cases, *Gpr55*^{-/-} mice had significantly lower latencies at a -3.48 log cd.s.m⁻² flash strength (Šidák, $p<0.001$).

The a-wave amplitudes (Fig. 7D) were not significantly different between the groups (three-way mixed ANOVA; $F(1,20.392)=0.839$, $p=0.259$). However, the b-wave amplitudes (Fig. 7F) were significantly lower in *Gpr55*^{-/-} mice ($p=0.023$) with an interaction between the groups and the flash strength (three-way mixed ANOVA; $F(7;147,243)=3.059$, $p=0.005$).

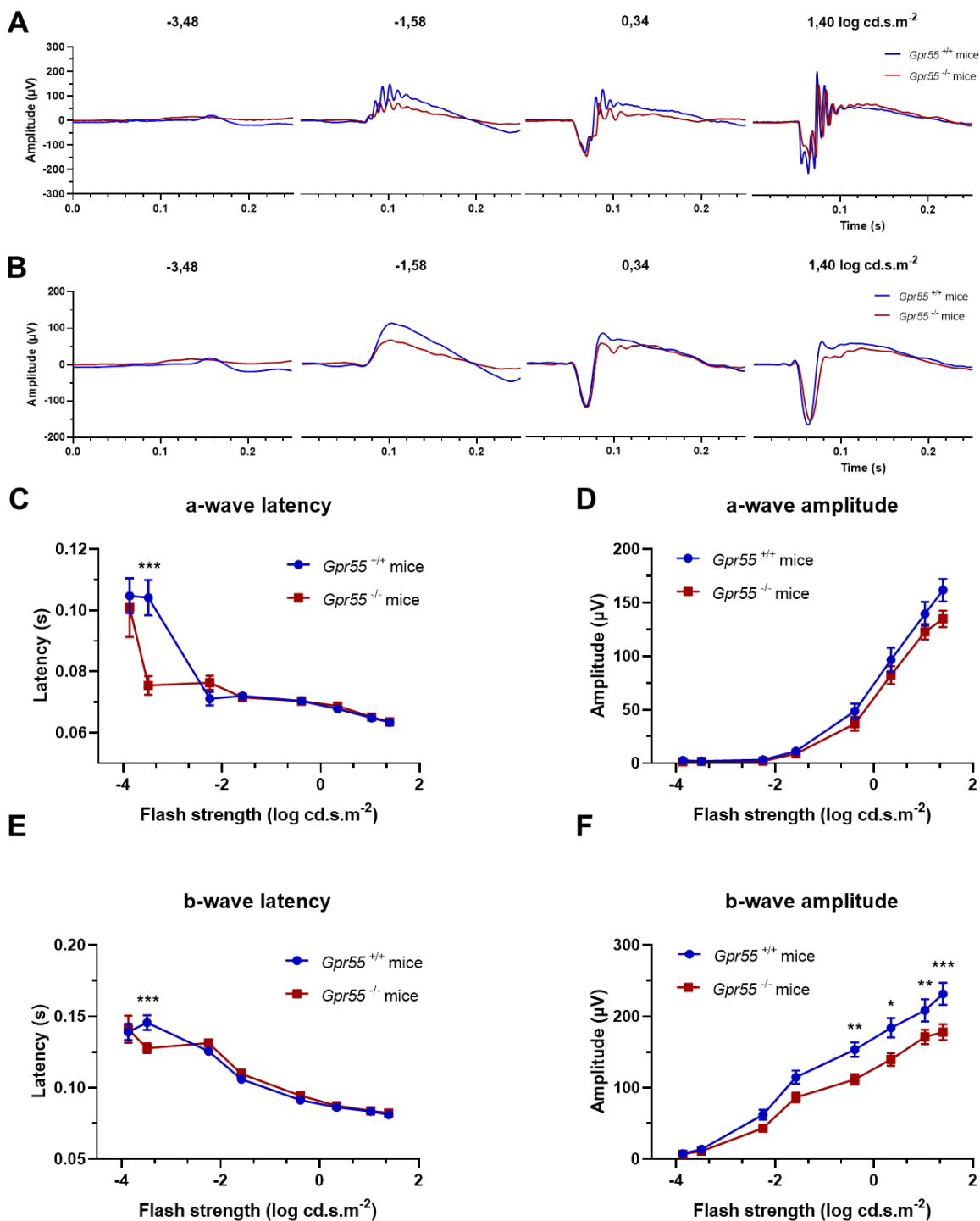


Figure 7. – Dark-adapted ERG responses are affected by *Gpr55* deletion.

(A) Representative examples of unfiltered dark-adapted ERG responses for *Gpr55*^{+/+} and *Gpr55*^{-/-} mice. (B) Representative examples of low-pass filtered ERG responses where the a and b-waves are isolated. (C, E) At a -3.48 log cd.s.m⁻² flash strength, the latency of the a and b-waves is lower in *Gpr55*^{-/-} mice than in *Gpr55*^{+/+} mice. (D, F) *Gpr55* deletion decreases the amplitude of the dark-adapted b-wave but does not affect the amplitude of the a-wave. (n=11) Three-way mixed ANOVA with Šidák post-hoc test. (F) **: p=0.008, **=0.005, *=0.019, (C,E,F) ***: p ≤ 0.001. Points: mean, Error bars: standard error of the mean (SEM).

The latencies of the oscillatory potentials (Fig. 8B) were significantly higher in *Gpr55*^{-/-} animals (three-way mixed ANOVA; F (1,42.233)=5.491, p=0.024). The first three OPs (Fig. 8C, D, E) had a significantly smaller amplitude in *Gpr55*^{-/-} animals (three-way mixed ANOVA. OP1: F (1,21.444) =5.923, p=0.024. OP2: p=0.018. OP3: F (1,21.372) =4.719, p=0.041). There were no differences in amplitude for the last OP (Fig.8F. Three-way mixed ANOVA; F (1,21.306) =0.735, p=0.401). There was a significant interaction between the genotype and the flash strength for the OP2 (Three-way mixed ANOVA; F(5,106.233)=2.982, p=0.015) and for the sum of all OPS (Fig. 8G. Three-way mixed ANOVA; F (5,104.389) =4.303, p=0.001). The sum of the amplitudes of all OPs of *Gpr55*^{-/-} mice was also significantly lower compared to *Gpr55*^{+/+} mice (p=0.002).

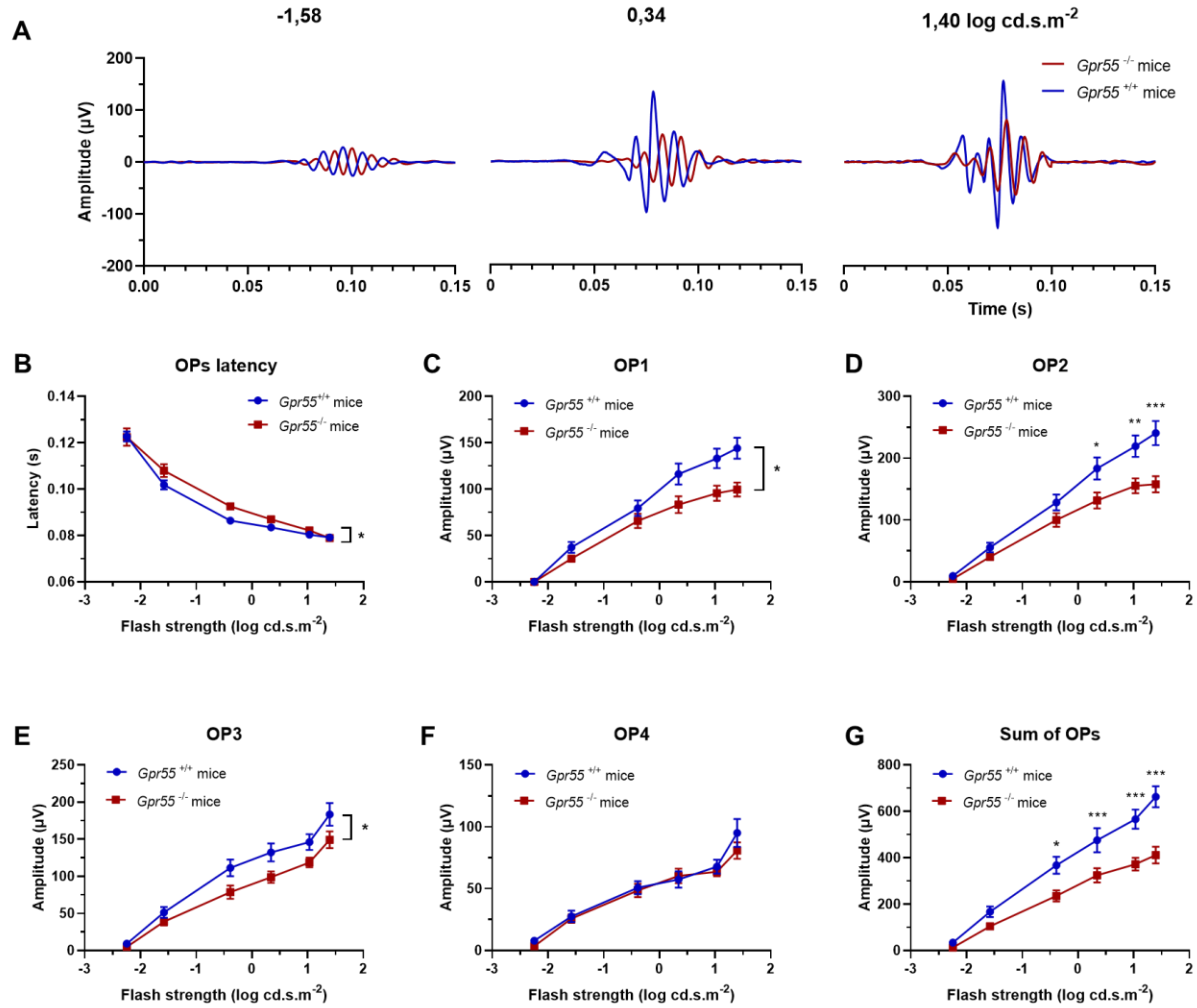


Figure 8. – The absence of GPR55 affects oscillatory potentials.

(A) Characteristic high-pass filtered ERG responses, showing OPs for both genotypes. (B) Average OPs latencies are lower in the *Gpr55*^{-/-} group. (C-G) Amplitudes of OP1, OP2, OP3 and the sum of all OPS are smaller in *Gpr55*^{-/-} mice. (n=8) Three-way mixed ANOVA with Šidák post-hoc test. (B, C, D) *: p=0.024, (D) **:p=0.006, (E) *:p=0.041, (G) *:p=0.016, (D,G) ***: p ≤ 0.001. Points: mean, Error bars: SEM.

Light-adapted electroretinography

The same mice were then adapted to light for 30 minutes to perform photopic ERGs (Fig. 9A). The a-wave (Fig. 9B) and b-wave latencies (Fig. 6D) were not affected by the deletion of *Gpr55* (three-way mixed ANOVA; F(1,261)=0.113, p=0.737 and F(1,257)=2.703, p=0.101 respectively). The light

adapted a-wave amplitude (Fig. 9C) was inferior in *Gpr55*^{-/-} mice (p=0.006) with an interaction between the genotype and the flash intensity (three-way mixed ANOVA; F(6,112.526)=2.224, p=0.046). The b-wave amplitude (Fig. 9E) was not affected by the deletion of *Gpr55* (three-way mixed ANOVA; F(1,19.073)=0.630, p=0.437).

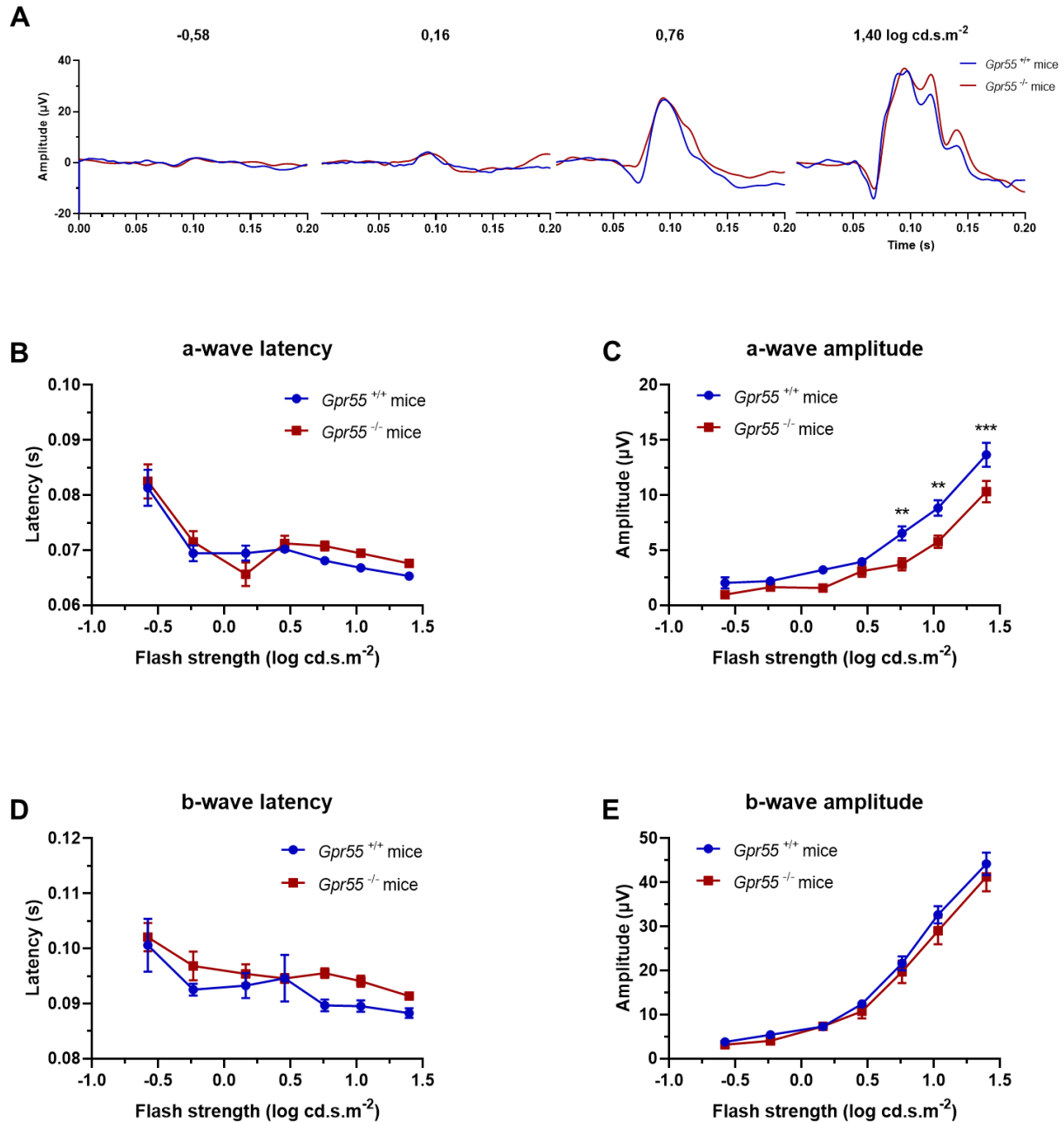


Figure 9. – Light-adapted ERG is impacted by *Gpr55* deletion.

(A) Representative examples of low-filtered light-adapted ERG responses for both genotypes. (B,C) a-wave latencies are not affected by *Gpr55* deletion. However, a-wave amplitudes were decreased in *Gpr55*^{-/-} mice. (D,E) The latency and the amplitude of the b-wave are not affected by *Gpr55* deletion. (n=10) Three-way mixed ANOVA with Šidák post-hoc test. (C) **: p=0.004, **: p=0.002, ***: p < 0.001. Points: mean, Error bars: SEM.

Spatial Frequency Threshold

The optomotor reflex was used to evaluate the visual spatial acuity of mice. For young mice with a still maturing visual system (Fig. 10A), there was a significant interaction between the age of animals and their genotype (three-way mixed ANOVA; $F(9,522)=1.997$, $p=0.038$) and a significant difference of visual acuity during development between the *Gr55*^{+/+} and *Gpr55*^{-/-} groups ($p<0.001$). For adults (Fig. 10B), there were no differences between the spatial frequency thresholds of the two groups (two-way mixed ANOVA; $F(1,67)=0.273$, $p=0.603$). Therefore, from P15 (eye opening) until P35, KO animals had a lower spatial frequency threshold, but after P50 and for the rest of their life, there were no differences observed between both groups. There were no differences in visual acuity when *Gpr55*^{+/+} or *Gpr55*^{-/-} animals were injected i.p. with a vehicle (saline, DMSO 10%), the GPR55 antagonist ML-193 or the GPR55 agonist O-1602 (Fig. 10C; two-way mixed ANOVA; $F(2, 18)=0.099$; $p=0.906$).

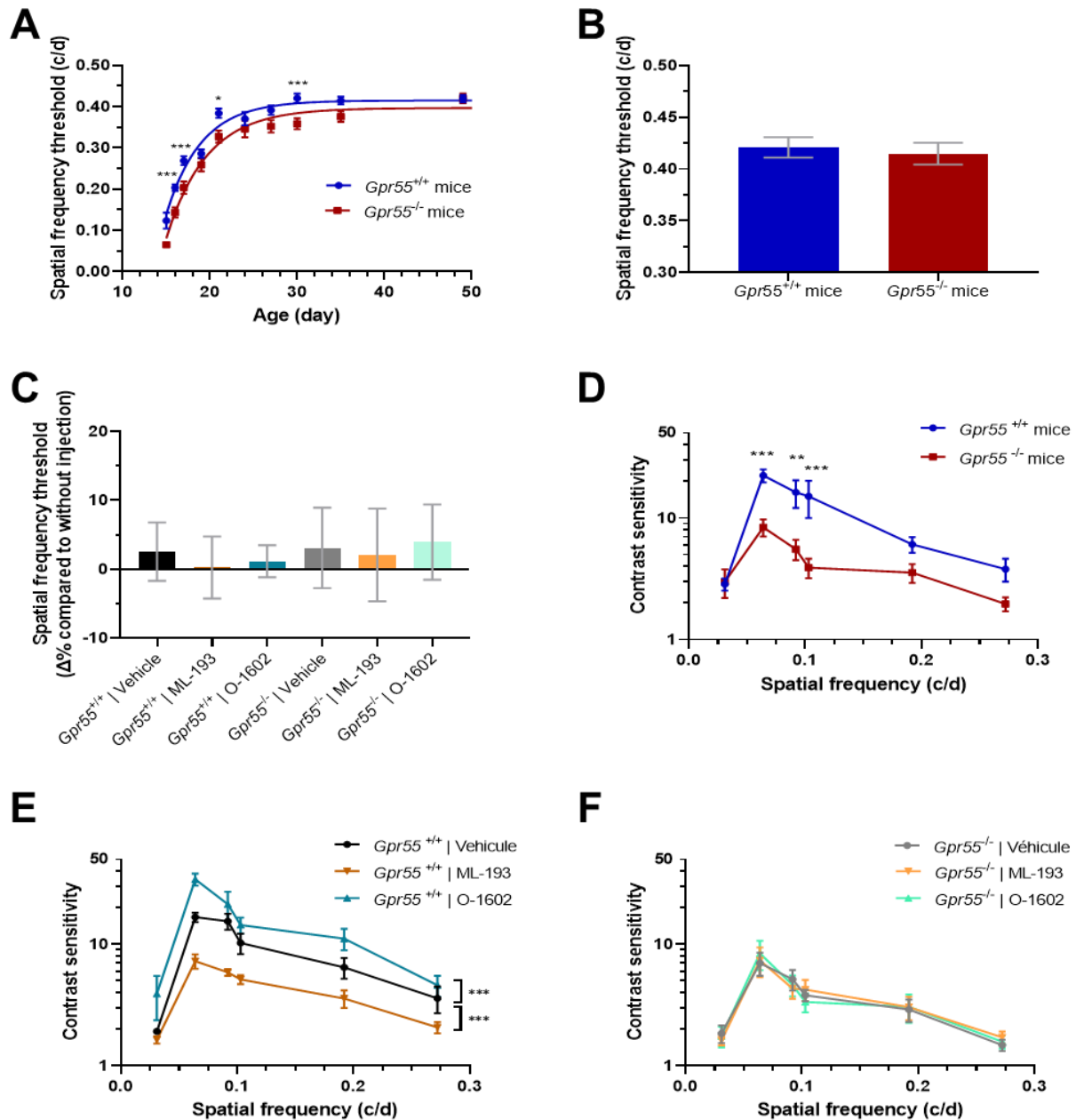


Figure 10. – The deletion of *Gpr55* delays the development of visual acuity and GPR55 positively modulates contrast sensitivity.

(A) From P15 to P35, *Gpr55*^{-/-} mice (n=17) have lower spatial frequency thresholds than *Gpr55*^{+/+} mice (n=16). Three-way mixed ANOVA with Šidák post-hoc test. *: p=0.05, ***: p≤0.001. (B) During adulthood, there are no differences in visual acuity between the different genotypes (n=18) or (C) after the injection of drugs targeting GPR55 (n=4). Two-way mixed ANOVA. (D)

Gpr55^{-/-} mice have a lower contrast sensitivity compared to *Gpr55*^{+/+} mice (n=4). (E) *Gpr55*^{+/+} animals treated with an acute i.p. injection of ML-193 (10mg/kg) have a lower contrast sensitivity and those treated with O-1602 (2mg/kg) have a higher contrast sensitivity than mice treated with the vehicle (saline DMSO 10%) (n=4). (F) *Gpr55*^{-/-} mice do not have a significantly different contrast sensitivity whether they are injected with the vehicle, ML-193 or O-1602 (n=4). Three-way mixed ANOVA with Šidák post-hoc test. (D) **: p=0.005, (D,E) ***: p≤0.001. Points or bars: mean, Error bars: SEM.

Contrast Sensitivity

Using the optomotor reflex behavioral method, we investigated the effects of GPR55 on contrast sensitivity. When comparing *Gpr55*^{+/+} and *Gpr55*^{-/-} mice (Fig. 10D), an interaction between the genotype and the spatial frequency was revealed (three-way mixed ANOVA; F (5,80)=3.159, p=0.012). The difference between the mice strains was significant (p<0.001), with *Gpr55*^{-/-} mice having a lower sensitivity contrast for spatial frequencies between 0.064 to 0.272 cycle/degree.

When wild type mice were acutely injected i.p. with the drugs or the vehicle (Fig. 10E), there was an interaction between the treatment and the spatial frequency (three-way mixed ANOVA; F(10,108)=5.949, p<0.001). Similarly to the effect of *Gpr55* deletion, mice treated with the GPR55 antagonist ML-193 had significantly lower contrast sensitivity than mice injected with the vehicle (p<0.001). Conversely, mice injected with the agonist O-1602 had significantly higher contrast sensitivities compared to the vehicle (p<0.001). As expected, when these drugs were administered to KO mice (Fig. 10F), no differences were found between the vehicle and the pharmacologic agents (three-way mixed ANOVA; F(2, 108)=0.007, p=0.993).

Discussion

We found that the genetic deletion of *Gpr55* affects retinal activity by lowering the amplitudes of the dark-adapted b-waves and OPs, augmenting the latency of the latter, and decreasing the amplitude of the light-adapted a-wave. The deletion of *Gpr55* also delays the development of visual acuity and reduces contrast sensitivity in adults. In addition, the pharmacological blockade

and activation of GPR55 respectively reduce and increase contrast sensitivity measured by behavioral testing.

Effects of GPR55 on electroretinography

Since GPR55 is expressed in all layers of the mouse retina (264), it is difficult to establish the exact cell types that are responsible for the effects of *gpr55* deletion on ERG responses. Besides, ERG components are often the result of the activity or modulation of several cell types.

The reduction in the amplitude of the dark-adapted b-wave suggests a modulation of the rod and/or cone ON-bipolar cells, as, in these conditions, a single bright flash elicits a mixed response (107, 108). However, because the light-adapted b-wave reflects the activity of cone bipolar cells (110) and this component is not affected in *Gpr55*^{-/-} mice, we can deduce that GPR55 mostly modulates rod bipolar cell activity. Müller cells also contribute to the b-wave of the ERG (91), so they could be involved in mediating GPR55 effects on the dark-adapted b-wave. It is possible to see this mechanism in vervet monkeys where CB2 is exclusively expressed in Müller cells (284) and mediates alterations of the b-waves amplitude (285).

The OPs are high-frequency waves superimposed on the ascending part of the b-wave. They are thought the product of the synaptic modulation of bipolar and ganglion cells by amacrine cells. A hypothesis for the cellular origin of these components is that the first OPs are caused by the ON-pathway and rod activity and that the last OPs originate from the OFF-pathway and cone signaling (85, 100, 103). Based on the dark-adapted b-wave results, the deletion of *Gpr55* could be associated to a diminution in the activity of the rod ON-pathway. This would explain why, under our experimental conditions, only the first three OPs are affected by the deletion of *Gpr55*. On the contrary, cone post-receptoral signalling seems unaffected by the deletion of *Gpr55*, as no significant changes were noticed for the light-adapted b-wave and the fourth OP that could have similar cellular origins.

The cones generate the a-wave of the light-adapted ERG (110). The decrease in the amplitude of the photopic a-wave in *Gpr55*^{-/-} animals may be explained by lower levels of intracellular calcium. Indeed, in photoreceptors, calcium is known primarily to inhibit guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) that activate guanylyl cyclases, enzymes involved in the synthesis of cGMP from

GMP (286). Due to the presence of cGMP-dependent sodium channels in the membranes of photoreceptors, the concentration of cGMP determines the membrane potential and thus the release of glutamate. The calcium enters through these sodium channels open in the dark and exits through specialized calcium transporters located in the inner segment. Intracellular calcium concentration also causes light adaptation. In fact, in the initial photoreceptor hyperpolarization that occurs in response to light is compensated by a decrease in the intracellular concentration of calcium, that cannot enter the cell but continues to exit. The reduction in calcium-mediated inhibition of GCAPs leads to a slow increase in the concentration of cGMP, followed by the opening of ion channels that decrease the polarization of the cell (45). A decrease in the intracellular calcium concentration is also known to play a role in cone desensitization by decreasing phosphodiesterase activation following a light flash (286). Phosphodiesterases are enzymes degrading cGMP. Another regulatory pathway by which calcium can affect cone but not rod polarization implicates the calmodulin- Ca^{2+} binding site of cGMP-dependent sodium channels. The binding of Ca^{2+} -calmodulin to this channel decreases its activation by cGMP. If the calcium concentration is low, calmodulin leaves, causing the channels to open (286). Hence, a lower calcium concentration could promote photoreceptor depolarization and reduce the a-wave in mice lacking GPR55. Because activation of the GPR55 is known to increase the amount of intracellular calcium (287), a reduced intracellular calcium concentration in the cones of *Gpr55*^{-/-} animals could account for the alterations in the a-wave detected in these mice by increasing light adaptation (288). Additionally, a cone-specific inhibition of the calmodulin- Ca^{2+} -mediated blockade of cGMP-dependent sodium channels could explain why the light-adapted but not the dark-adapted b-wave is reduced in *Gpr55*^{-/-} animals.

Alterations of the optomotor response

The curve of contrast sensitivity as a function of spatial frequency that was measured in *Gpr55*^{+/-} mice is consistent with the literature. The maximal contrast sensitivity is between 30 and 40 at 0.064 c/d, with less sensitivity for lower or higher spatial frequencies (54).

The reduction in contrast sensitivity following the deletion of *Gpr55* could be partially attributable to the decreased function of certain retinal cells as observed by ERG. The cellular basis of contrast

sensitivity is the receptive field of ganglion cells. This receptive field originates from the sum of the inputs of ON and OFF bipolar cells and their lateral modulation (289). Thus, the same cell types at the origin of the b-wave and the OPs are also participating in contrast sensitivity.

It is possible to see the detrimental effects of the retinal cell dysfunction on contrast sensitivity in pathological conditions. For instance, a defective rod ON-pathway can lead to a decline in contrast sensitivity. In a recent study, a mouse model with a mutation in the *Nyx* gene occasioning ON bipolar cell dysfunction with lacking dark-adapted ERG b-waves (290, 291) showed impairments in visual acuity and contrast sensitivity(292).

The effects seen in contrast sensitivity could also be explained by post-retinal visual structures, as the accessory optic system that causes the optomotor reflex (120, 121). During the development of the visual system in mice, GPR55 modulates axon guidance and target innervation. In *Gpr55*^{-/-} mice, there is a decreased axon branching in the dorsal terminal nucleus (DTN) of the accessory optic (264). Hence, a deletion of the receptor since birth could undermine the integrity of the pathways controlling the OMR and explain the decreased contrast sensitivity of *Gpr55*^{-/-} mice. However, this is hardly the only cause of this effect, as we replicated the decrease in contrast sensitivity by administering an antagonist of GPR55 and had the opposite effect with an agonist of the receptor.

Particularly noteworthy is the fact that we could also induce an improvement in contrast sensitivity after the systemic injection of O-1602. Studies reporting increases in contrast sensitivity in mice using the OMR, often do so in the context of a pathology that decreases it (115, 118, 293), but rarely a pharmacological agent is depicted as causing a gain of function in healthy mice. Another example of a drug that can increase in contrast sensitivity is atropine (294).

Given that the effects of O-1602 are not always mediated by GPR55 (295, 296), it was important to test if the improvement in contrast sensitivity was replicated in *Gpr55*^{-/-} mice. Our results showed no significant differences in contrast sensitivity between *Gpr55*^{-/-} mice injected with O-1602 or the vehicle. Hence, we confirmed that the changes in contrast sensitivity provoked by O-1602 are mediated by GPR55.

The spatial frequency thresholds that we obtained in *Gpr55*^{+/+} developing and adult mice were similar to the ones described in other studies (54, 293). The fact that *Gpr55*^{-/-} mice had lower spatial frequency thresholds just until the complete maturation of the visual system leads to believe that the GPR55 has effects specific to the developmental stage of the retina. A mechanism by which GPR55 could alter visual acuity development is by affecting retinal endothelial cell growth. In mice, vascularisation of the retina is achieved postnatally with the migration of endothelial cells (63). GPR55 is expressed in the endothelial cells of several organs, including in the placenta (246). In this organ, GPR55 activation enhances the migration of venous endothelial cells, and an antagonist of this receptor blocks this effect (246). If GPR55 is expressed and has similar pro-migratory effects in retinal endothelial cells, the knockout of the *Gpr55* gene could delay the vascularization of the retina and affect the activity of the retinal cells, that have high metabolic needs (297). While the expression of GPR55 in retinal endothelial cells remains to be confirmed, the receptor is expressed in brain microvascular endothelial cells (247).

Interestingly, while contrast sensitivity seems affected in adult *Gpr55*^{-/-} mice, visual acuity does not. However, contrast sensitivity is normally a better indicator of a dysfunction of the retina than visual acuity (298). To support this statement, in a murine model of retinitis pigmentosa where a gene coding for rhodopsin was deleted, there was a progressive degeneration of rods from P14 onwards, followed by cones. With time, the contrast sensitivity function and the visual acuity measured by the OMR decreased. At the same time, the amplitudes of the photopic b-wave and the 3 Hz flicker ERG waveform dropped. The reduction in contrast sensitivity was more strongly correlated to the decrease in b-wave amplitude or the loss of cones than the decrease in visual acuity (293), showing that retinal cell dysfunction can affect contrast sensitivity in a greater extent than visual acuity.

Relationship with previous studies

Our laboratory showed that the genetic deletion of *Cnr1* did not affect ERG responses in mice. However, the deletion of *Cnr2* increased the amplitude of the dark-adapted a-wave and of the sum of OPs, as well as the light-adapted b-wave amplitude (220). Those results were later reproduced by another team (221). The deletion of *Cnr2*, but not *Cnr1* also increased visual acuity

during development and in adult mice. Moreover, the spatial frequency threshold of wild type mice given i.p. injections of the CB2 agonist HU308 for 3 days was significantly lower than the one measured at the baseline (pre-treatment). The opposite was observed with the CB2 inverse agonist AM630 (126).

We also showed a modulation of retinal functions and visual acuity by systemic injections of inhibitors of the 2-AG metabolic enzymes diacylglycerol lipase (DAGL) and monoacylglycerol lipase (MAGL) (126). DAGL is the main enzyme responsible for the synthesis of 2-AG, whereas MAGL is the principal enzyme implicated in its degradation. These enzymes are expressed in all murine retinal cells except for Müller cells (219). The inhibitor of DAGL, RHC80267, reduces the 2-AG concentration, while JKK048 inhibits MAGL and therefore increasing the 2-AG concentration. Reduced 2-AG levels lowered the amplitudes of the dark-adapted a- and b-waves and the light-adapted b-wave and increased the latencies of the light-adapted a- and b-waves. Diminishing the levels of 2-AG also decreased the OP1 to 3 and the sum of all OPs but did not alter the OP4. Noteworthy, a higher concentration of 2-AG increased the amplitude of OP3, OP4 and the sum of all OPs, but did not affect OP1 and OP2. In addition, JKK048 lowered visual acuity and RHC80267 improved it (126).

By diminishing the amplitudes of various ERG components, decreasing 2-AG produced similar effects to the ones observed following *Gpr55* deletion. Higher levels of 2-AG increased the amplitude of certain ERG components and GPR55 seems to have pro-excitatory effects in the retina. GPR55 would be a better candidate for mediating the 2-AG effects in the retina because CB2 have opposite modulation effects than those of 2-AG. In fact, CB2 decreases ERG components when 2-AG positively modulates those parameters. Also, 2-AG has a greater potency of activation of GPR55 than of CB2 as demonstrated in [³⁵S]GTPγS binding assays (203),(205),(243). 2-AG can also activate TRPV1 (299) and TRPV4 (300) and these receptors are expressed in the mouse retina (301-303), but the deletion of *Trpv1* or *Trpv4* does not affect murine ERG (301, 302). For the modulation of visual acuity, 2-AG levels correlate with a mediation of CB2 and not 2-AG, because both CB2 and 2-AG negatively modulates visual acuity, when GPR55 has no effect on the parameter. 2-AG could therefore modulate visual acuity via CB2 and retinal cells functions via GPR55.

We know that GPR55 and CB2 often have opposite effects in the same system (304). It is what we see with their modulation of the murine retina where CB2 seems to have a general inhibitory modulation. On the other hand, GPR55 in the brain has an excitatory modulation role (257, 305). They may nevertheless modulate different cells as the ERG components that are affected by the deletion of *Gpr55* versus *Cnr2* are not the same. It is also interesting to note that the heterodimerization of GPR55 and CB2 suppresses the activity of CB2 and that deletion of *Gpr55* could increase the amount of monomeric CB2 and amplify its inhibitory modulation (199, 201).

Cannabis and contrast sensitivity

Cannabis is known to decrease contrast sensitivity. A study tested binocular contrast sensitivity with the Pola VistaVision Visual Chart System (DMD Med Tech, Torino, Italy) after the consumption of cannabis in humans. The study showed a significant diminution of the mean contrast sensitivity compared to the control group. The differences of contrast sensitivity were bigger for higher spatial frequencies, but in the lowest spatial frequency the contrast sensitivity was still significantly different between both groups. A decrease in participants' contrast sensitivity was the only parameter determinant for them self-reporting a negative effect on their vision. Contrary to our results, they also saw a decreased binocular visual acuity in the study (160). Because phytocannabinoids can activate GPR55 (234), the receptor could mediate in part those consequences.

GPR55 could not be the only cannabinoid receptor implicated in contrast sensitivity. In a study, a CB1 knockout (*Cnr1^{-/-}*) mouse model was used to evaluate the role of the receptor in the primary visual cortex (V1). *Cnr1^{-/-}* mice had lower cortical responses to a grating at the lower contrasts compared to *Cnr1^{+/+}* mice. The contrast eliciting half of the maximum cortical response is therefore higher in *Cnr1^{-/-}* mice. Optimal spatial frequencies of *Cnr1^{-/-}* was lower when compared to *Cnr1^{+/+}* mice. So, at the cortical level the deletion of *Cnr1^{-/-}* diminishes contrast sensitivity and visual acuity (306). It can be interesting to note that in an optomotor response model, the deletion of CB1 or the administration of an agonist or inverse agonist of the receptor did not affect visual acuity in mice (126), which could be explained by the fact that V1 is not implicated in the OMR (123).

In summary, GPR55 modulates retinal functions and visual behavior in mouse. The findings presented herein uncover novel functions of GPR55 in the central nervous system and confirm the importance of the endocannabinoid system in vision.

Chapitre 3 – Discussion générale

Dans l'article, il a été montré que la délétion de *Gpr55* entraîne une diminution d'amplitude ou une latence retardée de plusieurs composantes d'ERG, ce qui suggère une réduction de la réponse à la lumière de plusieurs cellules rétiniennes. La délétion du gène cause aussi une plus basse sensibilité au contraste. Le mécanisme le plus plausible qui a été exploré dans l'article est la disparition de la modulation directe de GPR55 sur les cellules qui l'expriment. Le récepteur a également des fonctions dans d'autres systèmes qui pourraient influencer indirectement les fonctions rétiniennes ou la sensibilité au contraste. Par exemple, on sait que le récepteur peut avoir des effets excitateurs sur des neurones du cerveau (257, 305) et que son ARNm est retrouvé dans le thalamus (273) qui contient des structures du système visuel comme le corps genouillé latéral ou le pulvinar. Même s'il n'y a pas encore d'étude qui montre une modulation directe du récepteur sur des structures visuelles du cerveau, GPR55 pourrait moduler le réflexe optomoteur par une action directe sur les neurones du système accessoire optique.

D'autres systèmes plus éloignés pourraient aussi être responsable d'une partie des résultats obtenus dans cette étude. C'est ce qui sera exploré dans les prochaines sections.

Influence du récepteur 55 aux protéines G sur le système sanguin et liens avec la rétine

Une partie des effets de GPR55 sur les fonctions rétiniennes pourrait être causée par sa modulation du système vasculaire. GPR55 est exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux de plusieurs organes (245, 246, 251) et son activation peut entraîner une migration cellulaire (246) ou de la vasodilatation (245, 251). L'augmentation intracellulaire de calcium intracellulaire est commune à toutes les voies de signalisations connues de GPR55 (258) et dans les cellules endothéliales, le calcium joue un rôle essentiel dans la vasodilatation en activant les canaux à potassium dépendant du calcium (Kca) qui hyperpolarisent la membrane des cellules (307). La libération subséquente de facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et d'oxyde nitrique, deux molécules vasodilatatrices, est aussi dépendante du calcium (308, 309). Il a été démontré que l'O-1602 cause une vasodilatation en partie dérivée de l'endothélium et sans

être médié par CB1, CB2 ou TRPV1 (310). Les effets de vasodilatation du O-1602 ou du cannabidiol anormal, un autre agoniste de GPR55, restent en revanche chez des animaux *Gpr55*^{-/-} (296). Cependant, le LPI, l'agoniste endogène principal de GPR55, quant à lui cause une vasodilatation dépendante de l'endothélium et bloquée par l'antagoniste de GPR55 CID16020046 (251). GPR55 est aussi exprimé dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales des rats qui composent leur barrière hématoencéphalique. L'administration de LPI à ces cellules augmente la concentration cellulaire de calcium et induit une dépolarisation rapide suivie d'une hyperpolarisation de longue durée qui sont bloquées par le ML-193, un antagoniste de GPR55 (247). En sommes, GPR55 est exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux de plusieurs organes, y compris dans le système nerveux central, et a des effets vasodilatateurs. S'il s'avérait que GPR55 est exprimé dans les cellules endothéliales rétinienne et y joue aussi un rôle vasodilatateur, l'absence du récepteur pourrait avoir des effets de constriction des vaisseaux rétiens et une restriction du flux sanguin dans la rétine.

Des perturbations dans le système circulatoire de la rétine peuvent affecter l'ERG (311). En bloquant, l'artère centrale rétinienne, l'onde-b scotopique disparaît et peut réapparaître après une reperfusion (312). Chez des patients avec une occlusion de la veine centrale rétinienne, l'amplitude de l'onde-b scotopique et des OPs sont diminués (313). Dans un modèle de constriction transverse de l'aorte qui crée une hypertension dans un œil et une hypotension dans l'autre, on peut observer les effets de perfusion altérée sans occlusion complète. Après 4 semaines, il y a une augmentation de 40% de la vitesse du flux sanguin dans l'artère centrale rétinienne de l'œil droit et une diminution de 20% dans l'œil gauche. Dans les deux cas l'amplitude des potentiels oscillatoires est significativement plus basse, mais pas celle de l'onde-a scotopique. Seulement dans le cas de l'œil droit, l'amplitude de l'onde-b scotopique est diminuée (314). Les OPs sont particulièrement sensibles aux défauts de circulation rétinienne. Dans le cas de microangiopathie causée par la rétinopathie diabétique, les OPs peuvent être les seules ondes diminuées ou enlevées, avant que l'onde-b ne soit affectée. Ces changements d'amplitude des OPs peuvent survenir avant même que la rétinopathie soit observable dans le fond d'œil (81). Cela veut donc dire que si la délétion génétique de *Gpr55* dans la rétine créait une constriction prolongée du flux sanguin, une altération de l'onde-b scotopique et des OPs

serait une conséquence attendue comme plusieurs modèles le montrent. Le modèle de constriction transverse de l'aorte illustre spécifiquement qu'il serait possible de conserver une onde-a scotopique normale comme c'est le cas dans notre étude.

L'amplitude des potentiels oscillatoires est aussi diminuée chez les patients hypertensifs(315). Il a été montré que les souris *Gpr55*^{-/-} n'ont pas de différences de rythme cardiaque ou de pression artérielle à 10 semaines (296), mais qu'à 8 mois ils ont des dysfonctions cardiaques systoliques à plusieurs niveaux et une pression plus élevée (252, 253).

Effets métaboliques médiés par le récepteur 55 aux protéines G et potentiels effets sur la vision

Les actions métaboliques de GPR55 pourraient également avoir un effet sur l'ERG et sur le réflexe optomoteur. En exposant les îlots de Langerhans du pancréas à des agonistes de GPR55 dont l'O-1602, le calcium intracellulaire augmente dans les cellules β , ce qui induit une sécrétion d'insuline. Cet effet n'est plus présent chez des animaux *Gpr55*^{-/-}, ce qui indique une médiation de l'effet par GPR55 (316). Les souris *Gpr55*^{-/-} ont une masse adipeuse augmentée et une résistance à l'insuline, ainsi qu'une diminution de l'activité physique volontaire (317, 318). L'hyperglycémie peut diminuer l'amplitude de l'onde-b scotopique et des OPs (319). Dans la rétinopathie diabétique, on a trouvé une corrélation entre l'amplitude des potentiels oscillatoires et la sensibilité au contraste (320).

La rétine a de hauts besoins énergétiques et utilise le glucose, mais aussi des lipides pour son métabolisme (321). L'administration de O-1602 induit une augmentation de la prise de nourriture et l'accumulation de lipide, mais l'effet ne serait pas médié par GPR55 (295). Une alimentation riche en lipides durant le développement finit par diminuer la sensibilité au contraste chez les souris (113). Cette alimentation diminue aussi l'amplitude de l'onde-a et de l'onde-b scotopique et de l'OP2, mais pas de l'OP4 (113).

L'évolution du système endocannabinoïde

Comme il a été vu précédemment GPR55 n'est exprimé que dans les cônes chez le singe (261), alors que chez la souris le récepteur est exprimé dans toutes les couches (264). Chez le singe

vervet, seule l'onde-b scotopique est changée par une modulation pharmacologique de GPR55 (262), alors que dans notre étude une multitude d'ondes scotopiques et photopiques issues de l'activité de plusieurs types de cellules rétinienne sont affectées par la délétion de *Gpr55*.

Même si l'évolution du système endocannabinoïde est complexe avec plusieurs duplications et mutations de gènes, l'apparition d'un système endocannabinoïde primitif est très ancienne dans l'évolution. Les invertébrés comme les nématodes ou les ascidies ont un orthologue des gènes des récepteurs cannabinoïdes avant la duplication en CB1 et CB2, alors que les vertébrés comme le poisson-globe ont des gènes homologues de CB1 et CB2. Les enzymes métaboliques des endocannabinoïdes semblent être encore plus anciennes. La fonction du GPR55 en tant que récepteur cannabinoïde semble plus récente et une cause d'évolution convergente avec des homologues du gène seulement trouvés chez les mammifères(322). Chez la grenouille, on retrouve comme chez l'humain le CB1 dans le SNC et le récepteur est aussi impliqué dans la fertilité masculine montrant une stabilité dans les fonctions du récepteur au cours de l'évolution (323).

Le fait que la souris n'ait pas la même expression de GPR55 dans la rétine est commun pour le système endocannabinoïde. CB1 et CB2 n'ont pas non plus la même expression dans les cellules rétinienne chez la souris et chez les primates (218). Par exemple, CB2 n'est exprimé que dans les cellules de Müller des primates, alors que chez la souris l'expression est dans toutes les neurones de la rétine, mais pas dans les cellules de Müller (218). Il en est de même avec la fonction rétinienne des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 qui est différente chez la souris et le singe (220, 285).

L'importance de la sensibilité au contraste

La sensibilité au contraste est un enjeu majeur dans les symptômes pathologiques oculaires. Notamment chez les personnes âgées, on observe une baisse de la sensibilité au contraste surtout à hautes fréquences spatiales et de la vision photopique (324). Il est intéressant de noter que dans nos résultats nous observons que l'absence de GPR55 diminue aussi ces deux paramètres et son agonisme pourrait être une piste intéressante pour améliorer la vision des personnes âgées. Il a d'ailleurs été montré que chez les personnes âgées, une faible sensibilité au contraste ou une

faible acuité visuelle à bas contraste étaient associées à des difficultés pour conduire la nuit, alors que l'acuité visuelle à contraste maximal ne l'était pas (325). Similairement, il a été découvert que ces deux paramètres étaient de meilleurs prédicteurs du risque de chute chez les personnes âgées que l'acuité visuelle maximale (326, 327). En général, la sensibilité au contraste peut être considérée comme une mesure plus sensible aux déficiences visuelles et plus représentative de la vision de tous les jours que les tests d'acuité visuelle maximale (298, 328). La sensibilité au contraste est aussi diminuée dans la plupart des pathologies oculaires comme la rétinopathie diabétique (329), le glaucome (330), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (331) ou chez les patients avec une cataracte (332).

Limitations de l'étude

Cette étude présente certaines limitations qu'il est important de considérer pour comprendre la portée des résultats et pour planifier la suite des expérimentations à effectuer pour confirmer nos hypothèses.

Une limitation principale de l'étude est le caractère systémique des manipulations effectuées. Autant le KO que l'injection i.p. agissent sur l'organisme de l'animal en entier et en conséquence, il n'est pas possible de tirer des conclusions sur les mécanismes précis responsables du comportement visuel ou même de l'activité rétinienne. Il n'y a pas modèle commercial de délétion génétique de *Gpr55* ayant une spécificité pour la rétine ou les neurones et une administration locale de ligands comporte des désavantages expérimentaux encore plus importants. Dans ces conditions, il n'est possible que d'additionner des modèles limités seuls, mais complémentaires ensemble.

D'autre part, GPR55 a été découvert il n'y a pas si longtemps. Les connaissances sur le récepteur peuvent donc être limitées, surtout dans des domaines précis comme les sciences de la vision. C'est vrai aussi pour les connaissances entourant ses ligands synthétiques, assez peu d'études portent sur ces molécules et il peut être difficile de savoir leurs caractéristiques ou les concentrations standards à utiliser lors de leur administration. En raison de leur forte lipophilie, il est prévisible que ces molécules passent la barrière hématoencéphalique et des études montrent que l'administration systémique d'O-1602 peut avoir des effets au niveau du SNC (254,

333). Cependant, les seules études étudiant les effets du ML-193 sur le système nerveux central, l'administrent en micro-injection directement dans le cerveau ou l'utilisent en culture (247, 256, 334-337). Pour cette molécule, on ne peut donc que s'appuyer sur sa lipophilie pour croire qu'elle traverse la barrière hématoencéphalique et sur les données de la littérature portant sur des effets périphériques pour déterminer la dose d'administration systémique.

De même, il y a peu de connaissances sur les effets de GPR55 et de ses ligands sur le système visuel, d'où l'intérêt de cette étude. Par exemple, il n'est pas connu si GPR55 peut agir sur le diamètre pupillaire. On suppose que l'augmentation de sensibilité au contraste à la suite de l'administration d'atropine est due à l'augmentation du diamètre pupillaire(294). Si en ERG, le diamètre de la pupille est contrôlé par l'administration de chlorhydrate de phényléphrine, ce n'est pas le cas dans la technique du réflexe optomoteur. La méconnaissance des effets des ligands de GPR55 sur la vision augmente donc le nombre de mécanismes potentiels à évaluer pour comprendre leurs effets observés.

Perspectives

Dans cette étude, nous avons confirmé notre hypothèse selon laquelle GPR55 joue un rôle dans les fonctions rétinienne et dans les comportements visuels. Il sera possible d'approfondir par d'autres méthodes les mécanismes causant les effets en ERG que nous avons mis en lumière.

Chez la souris, on ne sait toujours pas l'expression exacte de GPR55 dans la rétine. Il serait avisé de faire une immunohistochimie de la rétine et regarder la coexpression du récepteur avec des marqueurs de différentes cellules rétinienne. Durant ma maîtrise, les anticorps et un ligand fluorescent utilisés dans la littérature pour marquer GPR55 ont été testés dans plusieurs conditions et concentrations. Dans tous les cas, le marquage n'était pas spécifique et était toujours présent dans le tissu des animaux *Gpr55*^{-/-}, même si dans cette souche la délétion génétique de GPR55 est complète et non seulement fonctionnelle. Il n'a donc pas été possible d'utiliser l'immunohistochimie pour déterminer dans quelles cellules GPR55 est exprimé et peut directement agir par sa modulation pharmacologique. En attendant, le développement d'un anticorps spécifique, il serait possible d'utiliser l'hybridation *in situ* par fluorescence pour déterminer dans quelles cellules on retrouve de l'ARNm de *Gpr55*.

Une autre information pertinente qu'il serait possible d'aller chercher avec une immunohistochimie de la rétine est le nombre et l'anatomie des différentes cellules de la rétine, ainsi que l'épaisseur du tissu. En effet, on sait que la délétion de *Gpr55* peut affecter les axones durant le développement et des résultats du laboratoire qui ne sont pas encore publiés montrent une influence du récepteur dans la synaptogénèse durant le développement. Il serait donc possible que le développement anormal de la rétine en absence de GPR55 engendre un nombre ou une structure fonctionnelle différente des cellules de la rétine qui pourraient affecter l'ERG. Une autre méthode qui pourrait être utilisée pour s'assurer que les effets observés ne soit pas dû exclusivement au développement serait un KO inducible à l'âge adulte. En revanche, ce type de modèle si systémique n'exclue pas les hypothétiques causes vasculaire ou métabolique abordées dans la discussion.

Pour confirmer notre hypothèse selon laquelle GPR55 affecte l'activité rétinienne par une modulation directe de ces cellules, nous pourrions aussi utiliser une souris avec un KO rétine spécifique en utilisant par exemple un système de délétion mRx-Cre/loxP (338). Si des modèle KO de *Gpr55* spécifiques à un type spécifique de cellule rétinienne existaient, il serait possible d'approfondir à un niveau supérieur les mécanismes de modulation des fonctions rétiniennes par le récepteur.

D'autre part, pour vérifier l'hypothèse dans l'article selon laquelle GPR55 médie les effets du 2-AG dans les fonctions rétiniennes, nous pourrions reproduire la modulation de sa concentration avec les inhibiteurs du MAGL ou du DAGL chez des animaux *Gpr55*^{-/-} ou chez des animaux *Gpr55*^{+/-} avec l'administration conjointe d'un antagoniste de GPR55. Si les effets du 2-AG sur l'ERG sont annulés en l'absence de GPR55 ou lorsqu'il est bloqué, cela mettrait en valeur une médiation par GPR55. Si GPR55 médiait les effets du 2-AG dans un contexte physiologique, cela renforcerait les arguments selon lesquels c'est un récepteur cannabinoïde à part entière.

Finalement, un agoniste de GPR55, le O-1602, augmente la sensibilité au contraste et comme nous l'avons vu, dans de nombreuses pathologies ou durant le vieillissement, la sensibilité au contraste est diminuée. Il serait donc très intéressant de voir si l'activation de GPR55 peut aussi augmenter la sensibilité au contraste dans un contexte pathologique ou de vieillissement. Il existe

des modèles animaux de ces pathologies où la baisse de sensibilité au contraste a été observée (116, 118, 339) et chez lesquels il serait facile d'administrer la même drogue. Éventuellement, si ces résultats se concrétisent, l'activation de GPR55 pourrait être une avenue thérapeutique intéressante pour l'atténuation de la perte de vue causée par les maladies oculaires.

Références bibliographiques

1. Wade NJ. A natural history of vision: MIT press; 2000.
2. Gordon KD. Rapport sommaire : Le coût de la perte de vision et de la cécité au Canada. In: Aveugles LCCd, editor. 2021.
3. INCA Scdo. Le coût de la perte de vision au Canada : Rapport sommaire. 2009.
4. Baratas Díaz LA. [Historical meanings of Santiago Ramón y Cajal's Rétine des vertébrés. Summary of his first scientific]. Asclepio. 1994;46(1):243-59.
5. Wässle H, Peichl L, Boycott BJN. Dendritic territories of cat retinal ganglion cells. 1981;292(5821):344-5.
6. Yap TE, Balendra SI, Almonte MT, Cordeiro MF. Retinal correlates of neurological disorders. Ther Adv Chronic Dis. 2019;10:2040622319882205.
7. London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain-from eye research to CNS disorders. Nat Rev Neurol. 2013;9(1):44-53.
8. Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines. Troisième Édition ed: ERPI; 2005.
9. Lakkaraju A, Umapathy A, Tan LX, Daniele L, Philp NJ, Boesze-Battaglia K, et al. The cell biology of the retinal pigment epithelium. Prog Retin Eye Res. 2020:100846.
10. Hurley JB. Retina Metabolism and Metabolism in the Pigmented Epithelium: A Busy Intersection. Annu Rev Vis Sci. 2021;7:665-92.
11. Ferrara M, Lugano G, Sandinha MT, Kearns VR, Geraghty B, Steel DHW. Biomechanical properties of retina and choroid: a comprehensive review of techniques and translational relevance. Eye (Lond). 2021;35(7):1818-32.
12. Kolb H. Simple anatomy of the retina. 2012.
13. Werkmeister RM, Schmidl D, Aschinger G, Doblhoff-Dier V, Palkovits S, Wirth M, et al. Retinal oxygen extraction in humans. 2015;5(1):1-9.
14. Hayreh SS. Orbital vascular anatomy. Eye (Lond). 2006;20(10):1130-44.
15. Sun Y, Smith LEH. Retinal Vasculature in Development and Diseases. Annu Rev Vis Sci. 2018;4:101-22.

16. Lejoyeux R, Benillouche J, Ong J, Errera MH, Rossi EA, Singh SR, et al. Choriocapillaris: Fundamentals and advancements. *Prog Retin Eye Res.* 2022;87:100997.
17. Rieke F. Mechanisms of single-photon detection in rod photoreceptors. *Methods Enzymol.* 2000;316:186-202.
18. Jeon C-J, Strettoi E, Masland RHJJoN. The major cell populations of the mouse retina. 1998;18(21):8936-46.
19. Mustafi D, Engel AH, Palczewski K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(4):289-302.
20. Solnitzky O. The clinical anatomy of the visual system. *Bull Georgetown Univ Med Cent.* 1948;2(3):90-109.
21. Spencer WJ, Lewis TR, Pearing JN, Arshavsky VY. Photoreceptor Discs: Built Like Ectosomes. *Trends Cell Biol.* 2020;30(11):904-15.
22. Massey SCJPirr. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. 1990;9:399-425.
23. Shiells R, Falk GJPotRSolSBBS. Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein. 1990;242(1304):91-4.
24. Penn RD, Hagins WA. Kinetics of the photocurrent of retinal rods. *Biophys J.* 1972;12(8):1073-94.
25. Prasad S, Galetta SL. Anatomy and physiology of the afferent visual system. *Handb Clin Neurol.* 2011;102:3-19.
26. Szél A, Röhlich P, Caffé AR, Juliusson B, Aguirre G, Van Veen T. Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 1992;325(3):327-42.
27. Röhlich P, van Veen T, Szél A. Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron.* 1994;13(5):1159-66.
28. Lyubarsky A, Falsini B, Pennesi M, Valentini P, Pugh EJJoN. UV-and midwave-sensitive cone-driven retinal responses of the mouse: a possible phenotype for coexpression of cone photopigments. 1999;19(1):442-55.

29. Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S. Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell*. 1994;77(3):361-9.
30. Vardi N, Duvoisin R, Wu G, Sterling P. Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J Comp Neurol*. 2000;423(3):402-12.
31. Nawy S, Jahr CE. cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter. *Neuron*. 1991;7(4):677-83.
32. Tsukamoto Y, Omi N. Classification of Mouse Retinal Bipolar Cells: Type-Specific Connectivity with Special Reference to Rod-Driven All Amacrine Pathways. *Front Neuroanat*. 2017;11:92.
33. Sampath AP, Rieke F. Selective transmission of single photon responses by saturation at the rod-to-rod bipolar synapse. *Neuron*. 2004;41(3):431-43.
34. Dacheux RF, Raviola E. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci*. 1986;6(2):331-45.
35. Ivanova E, Müller U, Wässle H. Characterization of the glycinergic input to bipolar cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci*. 2006;23(2):350-64.
36. Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, et al. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*. 2005;45(5):727-39.
37. Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R. Expression of neuronal connexin36 in All amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci*. 2001;21(1):230-9.
38. Mills SL, O'Brien JJ, Li W, O'Brien J, Massey SCJJoCN. Rod pathways in the mammalian retina use connexin 36. 2001;436(3):336-50.
39. Raviola E, Gilula NBJPotNAoS. Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. 1973;70(6):1677-81.
40. DeVries SH, Qi X, Smith R, Makous W, Sterling PJCB. Electrical coupling between mammalian cones. 2002;12(22):1900-7.
41. Haverkamp S, Grünert U, Wässle H. The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron*. 2000;27(1):85-95.

42. Demb JB, Singer JH. Intrinsic properties and functional circuitry of the AII amacrine cell. *Vis Neurosci*. 2012;29(1):51-60.
43. Kolb H, Famiglietti EV. Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science*. 1974;186(4158):47-9.
44. Smith RG, Freed MA, Sterling PJON. Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network. 1986;6(12):3505-17.
45. Kandel ER, Schwartz, J.H., Jessell, T. *Principles of Neural Science*. Fourth ed 2000.
46. Baden T, Berens P, Franke K, Román Rosón M, Bethge M, Euler TJN. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. 2016;529(7586):345-50.
47. van Wyk M, Wässle H, Taylor WR. Receptive field properties of ON- and OFF-ganglion cells in the mouse retina. *Vis Neurosci*. 2009;26(3):297-308.
48. Ikeda H, Wright MJTJoP. Receptive field organization of 'sustained' and 'transient' retinal ganglion cells which subserve different functional roles. 1972;227(3):769-800.
49. Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, et al. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. 2002;39(3):292-303.
50. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25(4):397-424.
51. Labin AM, Safuri SK, Ribak EN, Perlman I. Müller cells separate between wavelengths to improve day vision with minimal effect upon night vision. *Nat Commun*. 2014;5:4319.
52. Young BK, Ramakrishnan C, Ganjawala T, Wang P, Deisseroth K, Tian N. An uncommon neuronal class conveys visual signals from rods and cones to retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(44).
53. Owsley CJOCoNA. Contrast sensitivity. 2003;16(2):171-7.
54. Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4611-6.
55. Seabrook TA, Burbridge TJ, Crair MC, Huberman AD. Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annu Rev Neurosci*. 2017;40:499-538.

56. Huberman AD, Niell CM. What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci.* 2011;34(9):464-73.
57. Gray H. *Anatomy of the human body*: Lea & Febiger; 1878.
58. Huberman AD, Wei W, Elstrott J, Stafford BK, Feller MB, Barres BAJN. Genetic identification of an On-Off direction-selective retinal ganglion cell subtype reveals a layer-specific subcortical map of posterior motion. 2009;62(3):327-34.
59. Prusky GT, Douglas RM. Characterization of mouse cortical spatial vision. *Vision Res.* 2004;44(28):3411-8.
60. Hall CA, Chilcott RP. Eyeing up the Future of the Pupillary Light Reflex in Neurodiagnostics. *Diagnostics (Basel)*. 2018;8(1).
61. Abrahamson EE, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 2001;916(1-2):172-91.
62. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci.* 1995;15(7 Pt 1):4738-47.
63. Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(2):522-7.
64. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(6):2813-26.
65. Young RW. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec.* 1985;212(2):199-205.
66. Nguyen-Ba-Charvet KT, Chédotal AJCrb. Development of retinal layers. 2014;337(3):153-9.
67. Fei Y. Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice. *Mol Vis.* 2003;9:31-42.
68. Tian N. Visual experience and maturation of retinal synaptic pathways. *Vision Res.* 2004;44(28):3307-16.
69. Osterhout JA, El-Danaf RN, Nguyen PL, Huberman AD. Birthdate and outgrowth timing predict cellular mechanisms of axon target matching in the developing visual pathway. *Cell Rep.* 2014;8(4):1006-17.

70. McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron*. 2003;40(6):1147-60.
 71. Perlman I. The Electroretinogram: ERG. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center
- Copyright: © 2022 Webvision . 1995.
72. Tremblay F, Laroche RG, De Becker I. The electroretinographic diagnosis of the incomplete form of congenital stationary night blindness. *Vision Res*. 1995;35(16):2383-93.
 73. Neena R, Jain A, Anantharaman G, Antony MA. Carcinoma -associated Retinopathy(CAR): Role of Electroretinography(ERG) and Optical coherence Tomography(OCT) in diagnosis and predicting treatment outcome. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2021;21:101008.
 74. Goetgebuer G, Kestelyn-Stevens AM, De Laey JJ, Kestelyn P, Leroy BP. Cancer-associated retinopathy (CAR) with electronegative ERG: a case report. *Doc Ophthalmol*. 2008;116(1):49-55.
 75. Hayreh SS, Klugman MR, Podhajsky P, Kolder HE. Electroretinography in central retinal vein occlusion. Correlation of electroretinographic changes with pupillary abnormalities. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1989;227(6):549-61.
 76. Kim HM, Park KH, Woo SJ. Correlation of electroretinography components with visual function and prognosis of central retinal artery occlusion. *Sci Rep*. 2020;10(1):12146.
 77. Hébert M, Mérette C, Gagné A-M, Paccalet T, Moreau I, Lavoie J, et al. The electroretinogram may differentiate schizophrenia from bipolar disorder. 2020;87(3):263-70.
 78. Einthoven W, Jolly WA. THE FORM AND MAGNITUDE OF THE ELECTRICAL RESPONSE OF THE EYE TO STIMULATION BY LIGHT AT VARIOUS INTENSITIES. 1908;1(4):373-416.
 79. Granit R. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol*. 1933;77(3):207-39.
 80. Cobb WJJP. A new component of the human electroretinogram. 1954;123:36-7.
 81. Speros P, Price J. Oscillatory potentials. History, techniques and potential use in the evaluation of disturbances of retinal circulation. *Surv Ophthalmol*. 1981;25(4):237-52.
 82. Creel DJ. Electroretinograms. *Handb Clin Neurol*. 2019;160:481-93.

83. Brown KT, Wiesel TN. Localization of origins of electroretinogram components by intraretinal recording in the intact cat eye. *J Physiol.* 1961;158(2):257-80.
84. Bush RA, Sieving PA. A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(2):635-45.
85. Hare WA, Ton H. Effects of APB, PDA, and TTX on ERG responses recorded using both multifocal and conventional methods in monkey. Effects of APB, PDA, and TTX on monkey ERG responses. *Doc Ophthalmol.* 2002;105(2):189-222.
86. Hood DC, Birch DG. A quantitative measure of the electrical activity of human rod photoreceptors using electroretinography. *Vis Neurosci.* 1990;5(4):379-87.
87. Robson JG, Saszik SM, Ahmed J, Frishman LJ. Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque. *J Physiol.* 2003;547(Pt 2):509-30.
88. Jamison J, Bush R, Lei B, Sieving PJVn. Characterization of the rod photoresponse isolated from the dark-adapted primate ERG. 2001;18(3):445-55.
89. Gurevich L, Slaughter MM. Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res.* 1993;33(17):2431-5.
90. Pepperberg DR, Brown PK, Lurie M, Dowling JE. Visual pigment and photoreceptor sensitivity in the isolated skate retina. *J Gen Physiol.* 1978;71(4):369-96.
91. Dmitriev AV, Dmitriev AA, Linsenmeier RA. K(+)-dependent Müller cell-generated components of the electroretinogram. *Vis Neurosci.* 2021;38:E010.
92. Witkovsky P, Dudek FE, Ripps H. Slow PIII component of the carp electroretinogram. *J Gen Physiol.* 1975;65(2):119-34.
93. Dmitriev AV, Dmitriev AA, Linsenmeier RA. Extracellular K(+) reflects light-evoked changes in retinal energy metabolism. *Exp Eye Res.* 2022;221:109133.
94. Bykov K, Dmitriev A, Skachkov SJB. Relationship between photoinduced changes in the intercellular concentration of potassium ions and transretinal potential generation by the Muller cells of the retina. 1981;26(1):104-7.
95. Dmitriev A, Bykov K, Gavrikov KJSS. Light-induced hyperpolarization of glial Müller cells in the frog retina. 1988;2:17-26.

96. Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EAJJoN. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4. 1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. 2000;20(15):5733-40.
97. Dong CJ, Hare WA. Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third-order retinal neurons in the rabbit retina. Vision Res. 2000;40(6):579-89.
98. Ogden TE. The oscillatory waves of the primate electroretinogram. Vision Res. 1973;13(6):1059-74.
99. Wachtmeister L, Dowling JE. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1978;17(12):1176-88.
100. Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. Prog Retin Eye Res. 1998;17(4):485-521.
101. Dong CJ, Agey P, Hare WA. Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. Vis Neurosci. 2004;21(4):533-43.
102. Popova E. ON-OFF Interactions in the Retina: Role of Glycine and GABA. Curr Neuropharmacol. 2014;12(6):509-26.
103. Rousseau S, Lachapelle P. The electroretinogram recorded at the onset of dark-adaptation: understanding the origin of the scotopic oscillatory potentials. Doc Ophthalmol. 1999;99(2):135-50.
104. Steinberg RH. Oscillatory activity in the optic tract of cat and light adaptation. J Neurophysiol. 1966;29(2):139-56.
105. Millar TJVr. Effect of kainic acid and NMDA on the pattern electroretinogram, the scotopic threshold response, the oscillatory potentials and the electroretinogram in the urethane anaesthetized cat. 1994;34(9):1111-25.
106. Wachtmeister L, el Azazi MJO. Oscillatory potentials of the electroretinogram in patients with unilateral optic atrophy. 1985;191(1):39-50.
107. Pinilla I, Lund RD, Lu B, Sauvé Y. Measuring the cone contribution to the ERG b-wave to assess function and predict anatomical rescue in RCS rats. Vision Res. 2005;45(5):635-41.
108. Nixon PJ, Bui BV, Armitage JA, Vingrys AJ. The contribution of cone responses to rat electroretinograms. Clin Exp Ophthalmol. 2001;29(3):193-6.

109. Robson J, Frishman LJA. Photoreceptor and bipolar-cell contributions to the cat electroretinogram: a kinetic model for the early part of the flash response. 1996;13(3):613-22.
110. Ekesten B, Gouras P, Moschos MJDO. Cone properties of the light-adapted murine ERG. 1998;97(1):23-31.
111. Bui BV, Fortune B. Origin of electroretinogram amplitude growth during light adaptation in pigmented rats. *Vis Neurosci*. 2006;23(2):155-67.
112. Kretschmer F, Tariq M, Chatila W, Wu B, Badea TC. Comparison of optomotor and optokinetic reflexes in mice. *J Neurophysiol*. 2017;118(1):300-16.
113. Clarkson-Townsend DA, Bales KL, Marsit CJ, Pardue MT. Light Environment Influences Developmental Programming of the Metabolic and Visual Systems in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62(4):22.
114. Hecker C, Dietrich M, Issberger A, Hartung H-P, Albrecht PJJON. Comparison of different optomotor response readouts for visual testing in experimental autoimmune encephalomyelitis-optic neuritis. 2020;17(1):1-6.
115. Gudapati K, Singh A, Clarkson-Townsend D, Phillips SQ, Douglass A, Feola AJ, et al. Behavioral assessment of visual function via optomotor response and cognitive function via Y-maze in diabetic rats. 2020(164):e61806.
116. Sheskey SR, Antonetti DA, Rentería RC, Lin CM. Correlation of Retinal Structure and Visual Function Assessments in Mouse Diabetes Models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62(10):20.
117. Grillo SL, Montgomery CL, Johnson HM, Koulen P. Quantification of Changes in Visual Function During Disease Development in a Mouse Model of Pigmentary Glaucoma. *J Glaucoma*. 2018;27(9):828-41.
118. Burroughs SL, Kaja S, Koulen P. Quantification of deficits in spatial visual function of mouse models for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3654-9.
119. Oyster CW, Takahashi E, Collewijn H. Direction-selective retinal ganglion cells and control of optokinetic nystagmus in the rabbit. *Vision Res*. 1972;12(2):183-93.
120. Yonehara K, Shintani T, Suzuki R, Sakuta H, Takeuchi Y, Nakamura-Yonehara K, et al. Expression of SPIG1 reveals development of a retinal ganglion cell subtype projecting to the medial terminal nucleus in the mouse. *PLoS One*. 2008;3(2):e1533.

121. Dhande OS, Estevez ME, Quattrochi LE, El-Danaf RN, Nguyen PL, Berson DM, et al. Genetic dissection of retinal inputs to brainstem nuclei controlling image stabilization. *J Neurosci*. 2013;33(45):17797-813.
122. Simpson JJAron. The accessory optic system. 1984;7(1):13-41.
123. Douglas RM, Alam NM, Silver BD, McGill TJ, Tschetter WW, Prusky GT. Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Vis Neurosci*. 2005;22(5):677-84.
124. Cowey A, Franzini C. The retinal origin of uncrossed optic nerve fibres in rats and their role in visual discrimination. *Exp Brain Res*. 1979;35(3):443-55.
125. Schmucker C, Seeliger M, Humphries P, Biel M, Schaeffel F. Grating acuity at different luminances in wild-type mice and in mice lacking rod or cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(1):398-407.
126. Cécyre B, Bachand I, Papineau F, Brochu C, Casanova C, Bouchard JF. Cannabinoids affect the mouse visual acuity via the cannabinoid receptor type 2. *Sci Rep*. 2020;10(1):15819.
127. Shi C, Yuan X, Chang K, Cho K-S, Xie XS, Chen DF, et al. Optimization of optomotor response-based visual function assessment in mice. 2018;8(1):1-10.
128. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(12):829-42.
129. Basith S, Cui M, Macalino SJY, Park J, Clavio NAB, Kang S, et al. Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front Pharmacol*. 2018;9:128.
130. Ciancetta A, Sabbadin D, Federico S, Spalluto G, Moro S. Advances in Computational Techniques to Study GPCR-Ligand Recognition. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(12):878-90.
131. Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;190(1):9-19.
132. Alexander SP BJ, Benson HE, Benya RV, Bonner TI, Davenport AP, Dhanachandra Singh K, Eguchi S, Harmar A, Holliday N, Jensen RT, Karnik S, Kostenis E, Liew WC, Monaghan AE, Mpamhanga C, Neubig R, Pawson AJ, Pin JP, Sharman JL, Spedding M, Spindel E, Stoddart L, Storjohann L, Thomas WG, Tirupula K, Vanderheyden P. . Class A Orphans (version 2020.3) in the

IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2020; 2020(3).

133. Mahoney JP, Sunahara RK. Mechanistic insights into GPCR-G protein interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;41:247-54.

134. Kenakin TJBjop. New concepts in pharmacological efficacy at 7 TM receptors: IUPHAR R eview 2. 2013;168(3):554-75.

135. Park PS, Lodowski DT, Palczewski K. Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:107-41.

136. Calebiro D, Godbole A. Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(2):83-91.

137. Smith NJ, Milligan G. Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):701-25.

138. Small EJTbr. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. 2015;81(3):189-294.

139. Jiang H-E, Li X, Zhao Y-X, Ferguson DK, Hueber F, Bera S, et al. A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. 2006;108(3):414-22.

140. Jiang H, Wang L, Merlin MD, Clarke RC, Pan Y, Zhang Y, et al. Ancient Cannabis burial shroud in a central Eurasian cemetery. 2016;70(3):213-21.

141. Russo EB, Jiang HE, Li X, Sutton A, Carboni A, del Bianco F, et al. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J Exp Bot.* 2008;59(15):4171-82.

142. Ren M, Tang Z, Wu X, Spengler R, Jiang H, Yang Y, et al. The origins of cannabis smoking: Chemical residue evidence from the first millennium BCE in the Pamirs. *Sci Adv.* 2019;5(6):eaaw1391.

143. Li H-LJJoPD. Hallucinogenic plants in Chinese herbals. 1978;10(1):17-26.

144. Clarke R, Merlin M. *Cannabis. Evolution and Ethnobotany*, University of Cali. fornia Press, Berkeley and Los Angeles; 2013.

145. Mechoulam R, Gaoni Y. Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr Chem Org Naturst.* 1967;25:175-213.
146. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1(Suppl 1):S163-71.
147. Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2017;103:103-31.
148. Purnell WD, Gregg JM. Delta(9)-tetrahydrocannabinol,, euphoria and intraocular pressure in man. *Ann Ophthalmol.* 1975;7(7):921-3.
149. Klein TW, Newton C, Friedman H. Cannabinoid receptors and the cytokine network. *Drugs of Abuse, Immunomodulation, and Aids: Springer;* 1998. p. 215-22.
150. Solowij N, Stephens RS, Roffman RA, Babor T, Kadden R, Miller M, et al. Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *Jama.* 2002;287(9):1123-31.
151. Crane NA, Schuster RM, Fusar-Poli P, Gonzalez R. Effects of cannabis on neurocognitive functioning: recent advances, neurodevelopmental influences, and sex differences. *Neuropsychol Rev.* 2013;23(2):117-37.
152. Russo EB, Merzouki A, Mesa JM, Frey KA, Bach PJ. Cannabis improves night vision: a case study of dark adaptometry and scotopic sensitivity in kif smokers of the Rif mountains of northern Morocco. *J Ethnopharmacol.* 2004;93(1):99-104.
153. Flom MC, Adams AJ, Jones RT. Marijuana smoking and reduced pressure in human eyes: drug action or epiphenomenon? *Invest Ophthalmol.* 1975;14(1):52-5.
154. Hepler RS, Frank IR. Marihuana smoking and intraocular pressure. *Jama.* 1971;217(10):1392.
155. Green K, Kim K. Papaverine and verapamil interaction with prostaglandin E2 and delta9-Tetrahydrocannabinol in the eye. *Exp Eye Res.* 1977;24(2):207-12.
156. Merritt JC, Perry DD, Russell DN, Jones BF. Topical delta 9-tetrahydrocannabinol and aqueous dynamics in glaucoma. *J Clin Pharmacol.* 1981;21(S1):467s-71s.
157. Cooler P, Gregg JM. Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on intraocular pressure in humans. *South Med J.* 1977;70(8):951-4.

158. Hepler RS, Frank IM, Ungerleider JT. Pupillary constriction after marijuana smoking. *Am J Ophthalmol.* 1972;74(6):1185-90.
159. Brown B, Adams AJ, Haegerstrom-Portnoy G, Jones RT, Flom MC. Pupil size after use of marijuana and alcohol. *Am J Ophthalmol.* 1977;83(3):350-4.
160. Ortiz-Peregrina S, Ortiz C, Casares-López M, Jiménez JR, Anera RG. Effects of cannabis on visual function and self-perceived visual quality. *Sci Rep.* 2021;11(1):1655.
161. Campobasso CP, De Micco F, Corbi G, Keller T, Hartung B, Daldrup T, et al. Pupillary effects in habitual cannabis consumers quantified with pupillography. *Forensic Sci Int.* 2020;317:110559.
162. Adams AJ, Brown B, Haegerstrom-Portnoy G, Flom MC, Jones RTJP, Psychophysics. Evidence for acute effects of alcohol and marijuana on color discrimination. 1976;20(2):119-24.
163. Kiplinger GF, Manno JE, Rodda BE, Forney RB. Dose-response analysis of the effects of tetrahydrocannabinol in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1971;12(4):650-7.
164. Adams AJ, Brown B, Haegerstrom-Portnoy G, Flom MC, Jones RT. Marijuana, alcohol, and combined drug effects on the time course of glare recovery. *Psychopharmacology (Berl).* 1978;56(1):81-6.
165. Brown B, Adams AJ, Haegerstrom-Portnoy G, Jones RT, Flom MCJP, Psychophysics. Effects of alcohol and marijuana on dynamic visual acuity: I. Threshold measurements. 1975;18(6):441-6.
166. Emrich HM, Weber MM, Wendl A, Zihl J, von Meyer L, Hanisch W. Reduced binocular depth inversion as an indicator of cannabis-induced censorship impairment. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;40(3):689-90.
167. Semple DM, Ramsden F, McIntosh AM. Reduced binocular depth inversion in regular cannabis users. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;75(4):789-93.
168. Merzouki AMM, J. . La Chanvre (*Cannabis sativa* L.) dans La Pharmacopée Traditionnelle du Rif (Nord du Maroc). *Ars Pharmaceutica.* 1999;40(4):233-40.
169. West ME. Cannabis and night vision. *Nature.* 1991;351(6329):703-4.
170. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-4.

171. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
172. Yamashita A, Oka S, Tanikawa T, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Sugiura T. The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013;107:103-16.
173. Marsicano G, Kuner R, Kofalvi AJ, Ador, ligands, brain eit, circuitries tsc, neurochemistry. *Cannabinoids and the brain*. Springer New York; 2008.
174. Kendall DA, Yudowski GA. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:294.
175. Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, et al. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol*. 2000;396(2-3):141-9.
176. Gambi F, De Berardis D, Sepede G, Quartesan R, Calcagni E, Salerno RM, et al. Cannabinoid receptors and their relationships with neuropsychiatric disorders. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005;18(1):15-9.
177. Carlisle S, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GJli. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. 2002;2(1):69-82.
178. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995;232(1):54-61.
179. Matias I, Pochard P, Orlando P, Salzet M, Pestel J, Di Marzo VJEJoB. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. 2002;269(15):3771-8.
180. Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, et al. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol*. 1999;377(1):117-25.
181. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, et al. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. 2003;23(4):1398-405.

182. Viscomi MT, Oddi S, Latini L, Pasquariello N, Florenzano F, Bernardi G, et al. Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *J Neurosci*. 2009;29(14):4564-70.
183. Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. 2005;310(5746):329-32.
184. Zhang H-Y, Gao M, Liu Q-R, Bi G-H, Li X, Yang H-J, et al. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. 2014;111(46):E5007-E15.
185. Liu Q-R, Canseco-Alba A, Zhang H-Y, Tagliaferro P, Chung M, Dennis E, et al. Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. 2017;7(1):1-17.
186. Ibsen MS, Finlay DB, Patel M, Javitch JA, Glass M, Grimsey NL. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor-Mediated Arrestin Translocation: Species, Subtype, and Agonist-Dependence. *Front Pharmacol*. 2019;10:350.
187. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(9):771-84.
188. Elphick MRJPTotRSBBS. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. 2012;367(1607):3201-15.
189. Blume LC, Patten T, Eldeeb K, Leone-Kabler S, Ilyasov AA, Keegan BM, et al. Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1a Competition with β -Arrestin for CB1 Receptor Binding Sites. *Mol Pharmacol*. 2017;91(2):75-86.
190. Brailoiu GC, Oprea TI, Zhao P, Abood ME, Brailoiu E. Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *J Biol Chem*. 2011;286(33):29166-74.
191. Marzo V, Petrocellis LDJMc. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: a further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. 2010;17(14):1430-49.
192. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H-h, Sørsgård M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. 1999;400(6743):452-7.

193. Brown AJaW, A. Identification of modulators of GPR55 activity. Patent WO0186305. Glaxosmithkline. 2001.
194. Lin YF. Potassium channels as molecular targets of endocannabinoids. *Channels (Austin)*. 2021;15(1):408-23.
195. Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortés A, Mallol J, et al. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem*. 2012;287(25):20851-65.
196. Viñals X, Moreno E, Lanfumey L, Cordoní A, Pastor A, de La Torre R, et al. Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT_{2A} Receptors. *PLoS Biol*. 2015;13(7):e1002194.
197. Scarlett KA, White EZ, Coke CJ, Carter JR, Bryant LK, Hinton CV. Agonist-induced CXCR4 and CB2 Heterodimerization Inhibits Gα₁₃/RhoA-mediated Migration. *Mol Cancer Res*. 2018;16(4):728-39.
198. Ward RJ, Pediani JD, Milligan G. Heteromultimerization of cannabinoid CB(1) receptor and orexin OX(1) receptor generates a unique complex in which both protomers are regulated by orexin A. *J Biol Chem*. 2011;286(43):37414-28.
199. Balenga NA, Martínez-Pinilla E, Kargl J, Schröder R, Peinhaupt M, Platzer W, et al. Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling. *Br J Pharmacol*. 2014;171(23):5387-406.
200. Martínez-Pinilla E, Rico AJ, Rivas-Santisteban R, Lillo J, Roda E, Navarro G, et al. Expression of cannabinoid CB(1) R-GPR55 heteromers in neuronal subtypes of the Macaca fascicularis striatum. *Ann N Y Acad Sci*. 2020;1475(1):34-42.
201. Moreno E, Andradas C, Medrano M, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, Blasco-Benito S, et al. Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(32):21960-72.
202. Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66(2-3):101-21.
203. Pertwee RGJE. Endocannabinoids and their pharmacological actions. 2015:1-37.

204. Cacciola G, Chioccarelli T, Ricci G, Meccariello R, Fasano S, Pierantoni R, et al. The endocannabinoid system in vertebrate male reproduction: a comparative overview. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286(1-2 Suppl 1):S24-30.
205. Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*. 2000;57(5):1045-50.
206. Maccarrone M. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:166.
207. Deutsch DG. A Personal Retrospective: Elevating Anandamide (AEA) by Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) and the Fatty Acid Binding Proteins (FABPs). *Front Pharmacol*. 2016;7:370.
208. Baggelaar MP, Maccarrone M, van der Stelt M. 2-Arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain. *Prog Lipid Res*. 2018;71:1-17.
209. MARZO VD, BISOGNO T, SUGIURA T, MELCK D, PETROCELLIS LDJBJ. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal-and basophil-like cells: connections with anandamide. 1998;331(1):15-9.
210. Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA, et al. Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. 1999;264(1):258-67.
211. Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 2012;76(1):70-81.
212. Hillard CJ, Huang H, Vogt CD, Rodrigues BE, Neumann TS, Sem DS, et al. Endocannabinoid Transport Proteins: Discovery of Tools to Study Sterol Carrier Protein-2. *Methods Enzymol*. 2017;593:99-121.
213. Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. 1997;77(2):299-318.
214. Straiker AJ, Maguire G, Mackie K, Lindsey JJ, et al. Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. 1999;40(10):2442-8.

215. Toguri JT, Caldwell M, Kelly ME. Turning Down the Thermostat: Modulating the Endocannabinoid System in Ocular Inflammation and Pain. *Front Pharmacol*. 2016;7:304.
216. Maccarone R, Rapino C, Zerti D, Di Tommaso M, Battista N, Di Marco S, et al. Modulation of type-1 and type-2 cannabinoid receptors by saffron in a rat model of retinal neurodegeneration. 2016;11(11):e0166827.
217. Imamura T, Tsuruma K, Inoue Y, Otsuka T, Ohno Y, Ogami S, et al. Involvement of cannabinoid receptor type 2 in light-induced degeneration of cells from mouse retinal cell line in vitro and mouse photoreceptors in vivo. *Exp Eye Res*. 2018;167:44-50.
218. Bouchard JF, Casanova C, Cécyre B, Redmond WJ. Expression and Function of the Endocannabinoid System in the Retina and the Visual Brain. *Neural Plast*. 2016;2016:9247057.
219. Bouskila J, Javadi P, Elkrief L, Casanova C, Bouchard J-F, Ptito MJNP. A comparative analysis of the endocannabinoid system in the retina of mice, tree shrews, and monkeys. 2016;2016.
220. Cécyre B, Zabouri N, Huppé-Gourgues F, Bouchard JF, Casanova C. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(13):8079-90.
221. Borowska-Fielding J, Murataeva N, Smith B, Szczesniak AM, Leishman E, Daily L, et al. Revisiting cannabinoid receptor 2 expression and function in murine retina. *Neuropharmacology*. 2018;141:21-31.
222. Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. 2010;62(4):579-87.
223. Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem*. 2010;147(5):671-8.
224. Metz SA. Lysophosphatidylinositol, but not lysophosphatidic acid, stimulates insulin release. A possible role for phospholipase A2 but not de novo synthesis of lysophospholipid in pancreatic islet function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;138(2):720-7.

225. Falasca M, Corda D. Elevated levels and mitogenic activity of lysophosphatidylinositol in k-ras-transformed epithelial cells. *Eur J Biochem.* 1994;221(1):383-9.
226. Baran DT, Kelly AM. Lysophosphatidylinositol: a potential mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D-induced increments in hepatocyte cytosolic calcium. *Endocrinology.* 1988;122(3):930-4.
227. Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Whyte L, Díaz-Arteaga A, Vázquez-Martínez R, Rotellar F, et al. The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes.* 2012;61(2):281-91.
228. Falasca M, Ferro R. Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Adv Biol Regul.* 2016;60:88-93.
229. Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene.* 2011;30(2):142-52.
230. Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem.* 2009;145(1):13-20.
231. Arifin SA, Paternoster S, Carlessi R, Casari I, Ekberg JH, Maffucci T, et al. Oleoyl-lysophosphatidylinositol enhances glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine L-cells through GPR119. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(9):1132-41.
232. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, et al. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;64(2):193-8.
233. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(1):1-4.
234. Drmota E.G.P. GT. Screening assays for cannabinoid-ligand type modulators. Patent WO2004074844. Astra Zeneca. 2004.
235. Petitet F, Donlan M, Michel AJCb, design d. GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. 2006;67(3):252-3.
236. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(4):928-34.

237. Drzazga A, Sowinska A, Krzeminska A, Rytczak P, Koziolkiewicz M, Gendaszewska-Darmach EJB, et al. Lysophosphatidylcholine elicits intracellular calcium signaling in a GPR55-dependent manner. 2017;489(2):242-7.
238. Li X, Hanafusa K, Kage M, Yokoyama N, Nakayama H, Hotta T, et al. Lysophosphatidylglucoside is a GPR55 -mediated chemotactic molecule for human monocytes and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;569:86-92.
239. Guy AT, Nagatsuka Y, Ooashi N, Inoue M, Nakata A, Greimel P, et al. Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. 2015;349(6251):974-7.
240. Calvillo-Robledo A, Cervantes-Villagrana RD, Morales P, Marichal-Cancino BA. The oncogenic lysophosphatidylinositol (LPI)/GPR55 signaling. *Life Sci*. 2022;301:120596.
241. Guy AT, Ding F, Abe J, Inoue M, Hirabayashi Y, Ito Y, et al. Lysolipid chain length switches agonistic to antagonistic G protein-coupled receptor modulation. 2020;11(21):3635-45.
242. Alexander SP IA. GPR18, GPR55 and GPR119 (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database CITE*. 2019; 2019(4).
243. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007;152(7):1092-101.
244. Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(38):16511-6.
245. Bondarenko AI, Malli R, Graier WF. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol acts as an intracellular messenger and bidirectionally modulates Ca^{2+} -activated large-conductance K^{+} channels in endothelial cells. *Pflugers Arch*. 2011;461(1):177-89.
246. Kremshofer J, Siwetz M, Berghold VM, Lang I, Huppertz B, Gauster M. A role for GPR55 in human placental venous endothelial cells. *Histochem Cell Biol*. 2015;144(1):49-58.
247. Leo LM, Familusi B, Hoang M, Smith R, Lindenau K, Sporici KT, et al. GPR55-mediated effects on brain microvascular endothelial cells and the blood-brain barrier. *Neuroscience*. 2019;414:88-98.

248. Ford LA, Roelofs AJ, Anavi-Goffer S, Mowat L, Simpson DG, Irving AJ, et al. A role for L-alpha-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):762-71.
249. Andradas C, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, Salazar M, Lorente M, Velasco G, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene*. 2011;30(2):245-52.
250. Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 2008;139(1):225-36.
251. AlSuleimani YM, Hiley CR. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol relaxes rat mesenteric resistance artery and induces Ca(2+) release in rat mesenteric artery endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2015;172(12):3043-57.
252. Walsh SK, Hector EE, Andréasson AC, Jönsson-Rylander AC, Wainwright CL. GPR55 deletion in mice leads to age-related ventricular dysfunction and impaired adrenoceptor-mediated inotropic responses. *PLoS One*. 2014;9(9):e108999.
253. Puhl S-L, Hilby M, Kohlhaas M, Keidel LM, Jansen Y, Hristov M, et al. Haematopoietic and cardiac GPR55 synchronize post-myocardial infarction remodelling. 2021;11(1):1-14.
254. Wróbel A, Serefko A, Szopa A, Ulrich D, Poleszak E, Rechberger T. O-1602, an Agonist of Atypical Cannabinoid Receptors GPR55, Reverses the Symptoms of Depression and Detrusor Overactivity in Rats Subjected to Corticosterone Treatment. *Front Pharmacol*. 2020;11:1002.
255. Shen SY, Yu R, Li W, Liang LF, Han QQ, Huang HJ, et al. The neuroprotective effects of GPR55 against hippocampal neuroinflammation and impaired adult neurogenesis in CSDS mice. *Neurobiol Dis*. 2022;169:105743.
256. Rahimi A, Hajizadeh Moghaddam A, Roohbakhsh A. Central administration of GPR55 receptor agonist and antagonist modulates anxiety-related behaviors in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(2):185-90.
257. Rosenberg EC, Chamberland S, Bazet M, Nebet ER, Wang X, McKenzie S, et al. Cannabidiol modulates excitatory-inhibitory ratio to counter hippocampal hyperactivity. *Neuron*. 2023.

258. Ross RA. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(3):156-63.
259. Shore DM, Reggio PHJFip. The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. 2015;6:69.
260. Akimov MG, Gretskeya NM, Dudina PV, Sherstyanykh G, Zinchenko GN, Serova OV, et al. The Mechanisms of GPR55 Receptor Functional Selectivity. 2022.
261. Bouskila J, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF. Rod photoreceptors express GPR55 in the adult vervet monkey retina. *PLoS One.* 2013;8(11):e81080.
262. Bouskila J, Harrar V, Javadi P, Casanova C, Hirabayashi Y, Matsuo I, et al. Scotopic vision in the monkey is modulated by the G protein-coupled receptor 55. *Vis Neurosci.* 2016;33:E006.
263. Greiner JV, Weidman TA. Development of the hamster retina: a morphologic study. *Am J Vet Res.* 1978;39(4):665-70.
264. Cherif H, Argaw A, Cécyre B, Bouchard A, Gagnon J, Javadi P, et al. Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation. *eNeuro.* 2015;2(5).
265. Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA, O'Brien SJ. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature.* 2001;409(6820):614-8.
266. Janecka JE, Miller W, Pringle TH, Wiens F, Zitzmann A, Helgen KM, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science.* 2007;318(5851):792-4.
267. Bromham L, Phillips MJ, Penny D. Growing up with dinosaurs: molecular dates and the mammalian radiation. *Trends Ecol Evol.* 1999;14(3):113-8.
268. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002;420(6915):520-62.
269. Baker M. Neuroscience: Through the eyes of a mouse. *Nature.* 2013;502(7470):156-8.
270. Pinto LH, Invergo B, Shimomura K, Takahashi JS, Troy JB. Interpretation of the mouse electroretinogram. *Doc Ophthalmol.* 2007;115(3):127-36.
271. Patel D, Patel SN, Chaudhary V, Garg SJ. Complications of intravitreal injections: 2022. *Curr Opin Ophthalmol.* 2022;33(3):137-46.

272. Marichal-Cancino BA, Fajardo-Valdez A, Ruiz-Contreras AE, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O. Possible role of hippocampal GPR55 in spatial learning and memory in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2018;78(1):41-50.
273. Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, et al. GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One*. 2013;8(4):e60314.
274. Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K, et al. Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci*. 2010;32(5):693-706.
275. Carey LM, Gutierrez T, Deng L, Lee WH, Mackie K, Hohmann AG. Inflammatory and Neuropathic Nociception is Preserved in GPR55 Knockout Mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):944.
276. Schicho R, Bashashati M, Bawa M, McHugh D, Saur D, Hu H-M, et al. The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. 2011;17(8):1651-64.
277. Simcocks AC, Jenkin KA, O'Keefe L, Samuel CS, Mathai ML, McAinch AJ, et al. Atypical cannabinoid ligands O-1602 and O-1918 administered chronically in diet-induced obesity. 2019;8(3):203-16.
278. Kang S, Lee A-Y, Park S-Y, Liu K-H, Im D-S, Jo MS. O-1602 promotes hepatic steatosis through GPR55 and PI3 kinase/Akt/SREBP-1c signaling in mice. 2021;22(6):3091.
279. Li K, Feng J-y, Li Y-y, Yuece B, Lin X-h, Yu L-y, et al. Anti-inflammatory role of cannabidiol and O-1602 in cerulein-induced acute pancreatitis in mice. 2013;42(1):123-9.
280. Kurano M, Kobayashi T, Sakai E, Tsukamoto K, Yatomi Y, Teraoka H. Lysophosphatidylinositol, especially albumin-bound form, induces inflammatory cytokines in macrophages. 2021;35(6):e21673.
281. Robson AG, Frishman LJ, Grigg J, Hamilton R, Jeffrey BG, Kondo M, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2022 update). *Doc Ophthalmol*. 2022;144(3):165-77.
282. Gauthier M, Gauvin M, Lina JM, Lachapelle P. The effects of bandpass filtering on the oscillatory potentials of the electroretinogram. *Doc Ophthalmol*. 2019;138(3):247-54.

283. Armstrong RA. Statistical guidelines for the analysis of data obtained from one or both eyes. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2013;33(1):7-14.
284. Bouskila J, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF. Müller cells express the cannabinoid CB2 receptor in the vervet monkey retina. *J Comp Neurol.* 2013;521(11):2399-415.
285. Bouskila J, Harrar V, Javadi P, Beierschmitt A, Palmour R, Casanova C, et al. Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Modulate the Electrophoretographic Waves in Vervet Monkeys. *Neural Plast.* 2016;2016:1253245.
286. Vinberg F, Chen J, Kefalov VJ. Regulation of calcium homeostasis in the outer segments of rod and cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res.* 2018;67:87-101.
287. Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2699-704.
288. Palczewski K, Polans AS, Baehr W, Ames JB. Ca(2+)-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *Bioessays.* 2000;22(4):337-50.
289. Turner MH, Schwartz GW, Rieke F. Receptive field center-surround interactions mediate context-dependent spatial contrast encoding in the retina. *Elife.* 2018;7.
290. Miyake Y, Yagasaki K, Horiguchi M, Kawase Y, Kanda T. Congenital stationary night blindness with negative electroretinogram. A new classification. *Arch Ophthalmol.* 1986;104(7):1013-20.
291. Miyake Y. [Establishment of the concept of new clinical entities--complete and incomplete form of congenital stationary night blindness]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2002;106(12):737-55; discussion 56.
292. Aung MH, Hogan K, Mazade RE, Park HN, Sidhu CS, Iuvone PM, et al. ON than OFF pathway disruption leads to greater deficits in visual function and retinal dopamine signaling. *Exp Eye Res.* 2022;220:109091.
293. Xiao J, Adil MY, Chang K, Yu Z, Yang L, Utheim TP, et al. Visual Contrast Sensitivity Correlates to the Retinal Degeneration in Rhodopsin Knockout Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(13):4196-204.

294. Schmucker C, Schaeffel FJ. Contrast sensitivity of wildtype mice wearing diffusers or spectacle lenses, and the effect of atropine. 2006;46(5):678-87.
295. Díaz-Arteaga A, Vázquez MJ, Vazquez-Martínez R, Pulido MR, Suarez J, Velásquez DA, et al. The atypical cannabinoid O-1602 stimulates food intake and adiposity in rats. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(3):234-43.
296. Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, et al. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):825-31.
297. Viegas FO, Neuhauss SCF. A Metabolic Landscape for Maintaining Retina Integrity and Function. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:656000.
298. Xiong Y-Z, Kwon M, Bittner AK, Virgili G, Giacomelli G, Legge GE, et al. Relationship between acuity and contrast sensitivity: differences due to eye disease. 2020;61(6):40-.
299. Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BA, et al. Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One.* 2013;8(12):e81618.
300. Ho WS, Zheng X, Zhang DX. Role of endothelial TRPV4 channels in vascular actions of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol.* 2015;172(22):5251-64.
301. Yarishkin O, Phuong TTT, Lakk M, Križaj D. TRPV4 Does Not Regulate the Distal Retinal Light Response. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1074:553-60.
302. Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S. A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci.* 2009;29(19):6088-93.
303. Ryskamp DA, Witkovsky P, Barabas P, Huang W, Koehler C, Akimov NP, et al. The polymodal ion channel transient receptor potential vanilloid 4 modulates calcium flux, spiking rate, and apoptosis of mouse retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 2011;31(19):7089-101.
304. Balenga NA, Aflaki E, Kargl J, Platzer W, Schröder R, Blättermann S, et al. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. 2011;21(10):1452-69.

305. Sylantsev S, Jensen TP, Ross RA, Rusakov DA. Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(13):5193-8.
306. Abbas Farishta R, Robert C, Turcot O, Thomas S, Vanni MP, Bouchard JF, et al. Impact of CB1 Receptor Deletion on Visual Responses and Organization of Primary Visual Cortex in Adult Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(13):7697-707.
307. Lückhoff A, Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch*. 1990;416(3):305-11.
308. Ozkor MA, Quyyumi AA. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:156146.
309. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Sources of Ca²⁺ in relation to generation of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1997;120(7):1328-34.
310. Al Suleimani YM, Al Mahruqi AS, Hiley CR. Mechanisms of vasorelaxation induced by the cannabidiol analogue compound O-1602 in the rat small mesenteric artery. *Eur J Pharmacol*. 2015;765:107-14.
311. Karpe G, Uchermann A. The clinical electroretinogram. VII. The electroretinogram in circulatory disturbances of the retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1955;33(5):493-516.
312. Hayreh SS, Zimmerman MB, Kimura A, Sanon A. Central retinal artery occlusion. Retinal survival time. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):723-36.
313. Sefandarmaz N, Behbahani S, Ramezani A. A novel method for electroretinogram assessment in patients with central retinal vein occlusion. *Doc Ophthalmol*. 2020;140(3):257-71.
314. Tsai S-H, Xie W, Zhao M, Rosa Jr RH, Hein TW, Kuo LJTAJoP. Alterations of ocular hemodynamics impair ophthalmic vascular and neuroretinal function. 2018;188(3):818-27.
315. Bellini G, Bocin E, Cosenzi A, Sacerdote A, Molino R, Solimano N, et al. Oscillatory potentials of the electroretinogram in hypertensive patients. 1995;25(4):839-41.

316. Romero-Zerbo SY, Rafacho A, Diaz-Arteaga A, Suarez J, Quesada I, Imbernon M, et al. A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. 2011;211(2):177-85.
317. Meadows A, Lee JH, Wu CS, Wei Q, Pradhan G, Yafi M, et al. Deletion of G-protein-coupled receptor 55 promotes obesity by reducing physical activity. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(3):417-24.
318. Lipina C, Walsh SK, Mitchell SE, Speakman JR, Wainwright CL, Hundal HS. GPR55 deficiency is associated with increased adiposity and impaired insulin signaling in peripheral metabolic tissues. *Faseb j*. 2019;33(1):1299-312.
319. Segawa M, Hirata Y, Fujimori S, Okada K. The development of electroretinogram abnormalities and the possible role of polyol pathway activity in diabetic hyperglycemia and galactosemia. *Metabolism*. 1988;37(5):454-60.
320. Kawasaki K, Yonemura K, Yokogawa Y, Saito N, Kawakita S. Correlation between ERG oscillatory potential and psychophysical contrast sensitivity in diabetes. *Doc Ophthalmol*. 1986;64(2):209-15.
321. Joyal JS, Sun Y, Gantner ML, Shao Z, Evans LP, Saba N, et al. Retinal lipid and glucose metabolism dictates angiogenesis through the lipid sensor Ffar1. *Nat Med*. 2016;22(4):439-45.
322. McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene*. 2006;370:64-74.
323. Fasano S, Meccariello R, Cobellis G, Chianese R, Cacciola G, Chioccarelli T, et al. The endocannabinoid system: an ancient signaling involved in the control of male fertility. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1163:112-24.
324. Owsley C. Vision and Aging. *Annu Rev Vis Sci*. 2016;2:255-71.
325. Jones PR, Ungewiss J, Eichinger P, Wörner M, Crabb DP, Schiefer U. Contrast Sensitivity and Night Driving in Older People: Quantifying the Relationship Between Visual Acuity, Contrast Sensitivity, and Hazard Detection Distance in a Night-Time Driving Simulator. *Front Hum Neurosci*. 2022;16:914459.
326. Lord SR, Dayhew J. Visual risk factors for falls in older people. *J Am Geriatr Soc*. 2001;49(5):508-15.

327. Mehta J, Czanner G, Harding S, Newsham D, Robinson J. Visual risk factors for falls in older adults: a case-control study. *BMC Geriatr.* 2022;22(1):134.
328. Nixon DR, Flinn NA. Evaluation of contrast sensitivity and other visual function outcomes in neovascular age-related macular degeneration patients after treatment switch to aflibercept from ranibizumab. *Clin Ophthalmol.* 2017;11:715-21.
329. Safi S, Rahimi A, Raeesi A, Safi H, Aghazadeh Amiri M, Malek M, et al. Contrast sensitivity to spatial gratings in moderate and dim light conditions in patients with diabetes in the absence of diabetic retinopathy. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2017;5(1):e000408.
330. Ichhpujani P, Thakur S, Spaeth GLJog. Contrast sensitivity and glaucoma. 2020;29(1):71-5.
331. Kleiner RC, Enger C, Alexander MF, Fine SLJ Aoo. Contrast sensitivity in age-related macular degeneration. 1988;106(1):55-7.
332. Elliott DB, Situ PJVR. Visual acuity versus letter contrast sensitivity in early cataract. 1998;38(13):2047-52.
333. Alavi MS, Hosseinzadeh H, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A. The effect of O-1602, an atypical cannabinoid, on morphine-induced conditioned place preference and physical dependence. *Pharmacol Rep.* 2016;68(3):592-7.
334. Deliu E, Sperow M, Console-Bram L, Carter RL, Tilley DG, Kalamarides DJ, et al. The Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55 Modulates Pain Perception in the Periaqueductal Gray. *Mol Pharmacol.* 2015;88(2):265-72.
335. Blanton H, Armin S, Muenster S, Abood M, Benamar K. Contribution of G Protein-Coupled Receptor 55 to Periaqueductal Gray-Mediated Antinociception in the Inflammatory Pain. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2022;7(3):274-8.
336. Armin S, Muenster S, Abood M, Benamar K. GPR55 in the brain and chronic neuropathic pain. *Behav Brain Res.* 2021;406:113248.
337. Vázquez-León P, Miranda-Páez A, Calvillo-Robledo A, Marichal-Cancino BA. Blockade of GPR55 in dorsal periaqueductal gray produces anxiety-like behaviors and evokes defensive aggressive responses in alcohol-pre-exposed rats. *Neurosci Lett.* 2021;764:136218.

338. Baumann BH, Shu W, Song Y, Sterling J, Kozmik Z, Lakhal-Littleton S, et al. Liver-Specific, but Not Retina-Specific, Hepcidin Knockout Causes Retinal Iron Accumulation and Degeneration. *Am J Pathol.* 2019;189(9):1814-30.
339. Lehmann K, Schmidt KF, Löwel S. Vision and visual plasticity in ageing mice. *Restor Neurol Neurosci.* 2012;30(2):161-78.