

Université de Montréal

Contribution du récepteur GPR55 dans la formation des contacts synaptiques

*Par*

Lucile Lacomme

École d'optométrie, Université de Montréal

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

Août 2023

© Lacomme, 2023

Université de Montréal

Unité académique : École d'optométrie

---

*Ce mémoire intitulé*

**Contribution du récepteur GPR55 dans la formation des contacts synaptiques**

*Présenté par*

**Lucile Lacomme**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Aarlenne Khan**

Président-rapporteur

**Jean-François Bouchard**

Directeur de recherche

**Reza Abbas**

Membre du jury

## Résumé

La synaptogenèse est un processus biologique aboutissant à la mise en place d'un réseau de connexions neuronales, par la genèse de synapses. La mise en place de ce réseau de connexions est essentielle au développement du système nerveux central (SNC) et de ses fonctions. Tout comme les autres étapes du développement du SNC, la synaptogenèse est régulée par une multitude de signaux cellulaires, et le système endocannabinoïde en fait partie. Les dérivés du cannabis tel que le  $\Delta$ -9-tétrahydrocannabinol (THC) et le cannabidiol (CBD) sont capables de traverser la barrière placentaire et de se retrouver dans le lait maternel. Par leur interaction avec le SNC, entre autres, ces phytocannabinoïdes sont capables d'influencer son développement. Le récepteur couplé à une protéine G 55 (GPR55) est catégorisé comme récepteur atypique du système endocannabinoïde, et il est capable d'être antagonisé par le CBD. Il a été prouvé par de précédentes études qu'il est lui aussi impliqué dans le développement du SNC, notamment dans le guidage et la croissance des axones durant les périodes fœtale et périnatale. Dans la littérature, il est souvent rapporté que les signaux impliqués dans le guidage axonal le sont aussi dans la synaptogenèse. C'est pourquoi le présent mémoire vise à examiner le rôle du récepteur GPR55 et l'effet de sa modulation par le CBD dans la formation de contacts synaptiques. Le modèle utilisé pour cette étude est la culture de neurones corticaux issus d'embryons de souris de génotypes *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>*. Pour comprendre le rôle physiologique de GPR55 dans la synaptogenèse nous avons étudié l'effet de la délétion du récepteur GPR55 à deux temps, Day In Vitro (DIV) 9-10 au début de la synaptogenèse, et à DIV14-15 un temps plus avancé. Ensuite pour comprendre comment le CBD est capable d'influencer la formation de contacts synaptiques de manière dépendante ou non de GPR55, les cultures de neurones corticaux de chaque génotype ont été exposées à DIV9 pour 24h à différentes concentrations du CBD (0,3 $\mu$ M ou 0,6 $\mu$ M ou 1 $\mu$ M). Les effets sur la formation de contacts synaptiques ont été étudiés en immunocytochimie, en immunobuvardage et en électrophysiologie de type *patch clamp*. Les résultats montrent que la délétion de GPR55 entraîne à DIV14-15 une augmentation de la densité des contacts synaptiques, mais une réduction de leur aire et de l'expression de la synaptophysine, en affectant l'activité synaptique. L'exposition au CBD 0,6 $\mu$ M et 1 $\mu$ M entraînent de manière dépendante ou

partiellement dépendante à GPR55, une augmentation de la densité des contacts synaptiques sans affecter leur aire, l'expression de protéines synaptiques ainsi que l'activité synaptique. La fréquence de décharge des neurones est diminuée de manière dépendante de GPR55 après l'exposition au CBD 1 $\mu$ M. Ces résultats suggèrent que GPR55 pourrait être un signal important pour l'arrêt de la formation de nouvelles synapses et un signal d'induction pour la maturation des synapses existantes.

**Mots-clés :** développement du système nerveux central, synaptogenèse, système endocannabinoïde, GPR55, cannabidiol, neurones corticaux *in vitro*.

## Abstract

Synaptogenesis is a biological process that leads to the establishment of a network of neuronal connections through the genesis of synapses. The formation of this network of connections is essential for the development of the central nervous system (CNS) and its functions. Like other stages of CNS development, synaptogenesis is regulated by multiple cellular signals, and the endocannabinoid system is part of it. Cannabis derivatives such as  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) can cross the placental barrier and be present in breast milk. Through their interaction with the endocannabinoid system, among others, these phytocannabinoids can influence CNS development. The G protein-coupled receptor 55 (GPR55) is categorized as an atypical receptor of the endocannabinoid system, and it can be antagonized by CBD. Previous studies have shown that GPR55 is also involved in CNS development, particularly in the guidance and growth of axons during fetal and perinatal periods. It is often reported in the literature that the signals involved in axonal guidance are also involved in synaptogenesis. Therefore, this study investigates the role of the GPR55 receptor and the effect of its modulation by CBD in the formation of synaptic contacts. The model used for this study consists of cortical neuron cultures from mouse embryos *gpr55<sup>+/+</sup>* and *gpr55<sup>-/-</sup>*. To understand the physiological role of GPR55 in synaptogenesis, we studied the effect of *gpr55* deletion at two-time points: Day In Vitro (DIV) 9-10 at the beginning of synaptogenesis, and DIV14-15 at a later time point. Then, to understand how CBD can influence the formation of synaptic contacts, whether dependent or independent of GPR55, cortical neuron cultures of each genotype were exposed to different concentrations of CBD (0.3 $\mu$ M or 0.6 $\mu$ M or 1 $\mu$ M) at DIV9 for 24 hours. The effects on the formation of synaptic contacts were studied through immunocytochemistry, western blot, and patch clamp electrophysiology. The results show that *gpr55* deletion leads to an increase in synaptic contact density at DIV14-15 but a reduction in their area and synaptophysin expression, by affecting synaptic activity. Exposure to 0.6 $\mu$ M and 1 $\mu$ M CBD results in a GPR55-dependent or partially dependent increase in synaptic contact density without affecting their area, expression of synaptic proteins, and synaptic activity. The firing frequency of neurons is decreased in a GPR55-dependent manner after exposure to 1 $\mu$ M CBD. These results suggest that GPR55 could be an

important signal for stopping the formation of new synapses and an induction signal for the maturation of existing synapses.

**Keywords** : central nervous system development, synaptogenesis, endocannabinoid system, GPR55, cannabidiol, cortical neurons *in vitro*

# Table des matières

Résumé .....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des figures .....	10
Liste des tableaux .....	11
Liste des sigles et abréviations.....	12
Remerciements.....	17
Chapitre 1 – Introduction.....	19
Formation d’une synapse du contact initial à la maturation .....	19
Formation du contact initial.....	21
Différenciation synaptique .....	22
Différenciation du compartiment présynaptique.....	22
Différenciation du compartiment postsynaptique .....	23
Les organisateurs synaptiques .....	23
Maturation synaptique .....	25
Maturation des récepteurs .....	25
Maturation du pool de vésicules synaptiques, de la recapture des neurotransmetteurs et de l’épine dendritique.....	27
Maturation électrophysiologique .....	28
GPR55, un récepteur atypique du système endocannabinoïde .....	30
Le système endocannabinoïde .....	30
Composants du système endocannabinoïde .....	31

Les récepteurs.....	31
Les endocannabinoïdes.....	34
Protéines de synthèse, recapture et dégradation .....	35
Fonctions dans le système nerveux central .....	36
Fonctions dans le développement du système nerveux central.....	38
Le récepteur GPR55 .....	39
Évidence d'un 3 <sup>e</sup> récepteur non-CB1/2R .....	40
Pharmacologie du récepteur GPR55.....	41
Fonctions dans le SNC.....	44
Fonctions dans le développement du SNC.....	46
Le cannabidiol, un composé de la plante de cannabis.....	48
Le cannabidiol, une molécule aux effets complexes.....	48
Effets de la consommation périnatale de cannabis .....	50
Objectif de la recherche.....	52
Chapitre 2 – Matériels et méthodes .....	53
Produits.....	53
Animaux.....	53
Cultures de neurones corticaux primaires.....	54
Immunocytochimie .....	54
Analyse des contacts synaptiques .....	55
Immunobuvardage (Western Blot) .....	56
Électrophysiologie.....	56
Génotypage.....	57
Statistiques .....	58



Chapitre 3 – Résultats .....	59
La délétion de <i>gpr55</i> dans les neurones corticaux entraine une modification du patron de maturation des synapses et de leur activité synaptique. ....	59
Le cannabidiol est capable de moduler la formation de contacts synaptiques de manière partiellement ou complètement dépendante de GPR55.....	65
Chapitre 4 – Discussion générale .....	73
GPR55, un récepteur important dans la maturation synaptique.....	73
Le cannabidiol est capable d’influencer la formation de contacts synaptique de manière partiellement dépendante de GPR55 .....	75
Impact de la recherche .....	78
Limites du modèle et des méthodes ; perspectives.....	79
Chapitre 5 – Conclusion .....	83
Références bibliographiques .....	84

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> –	Différents stades de la formation d'une synapse excitatrice.....	20
<b>Figure 2.</b> –	Maturation électrophysiologique .....	29
<b>Figure 3.</b> –	Système endocannabinoïde : voie de signalisation, synthèse et dégradation de l'AEA et du 2-AG.....	33
<b>Figure 4.</b> –	Voies de signalisation en aval de GPR55.....	43
<b>Figure 5.</b> –	Multiples cibles cellulaires du CBD.....	48
<b>Figure 6.</b> –	La délétion de <i>gpr55</i> entraîne une modification du patron de maturation synaptique des neurones corticaux <i>in vitro</i> . .....	63
<b>Figure 7.</b> –	La délétion du récepteur GPR55 entraîne une modification du patron de maturation de l'activité synaptique des neurones corticaux <i>in vitro</i> . .....	64
<b>Figure 8.</b> –	Le cannabidiol est capable de moduler la formation de contacts synaptiques de manière partiellement ou complètement dépendante de GPR55 .....	67
<b>Figure 9.</b> –	L'exposition au cannabidiol n'a pas d'effet sur l'expression des protéines synaptiques dans les neurones <i>gpr55<sup>+/+</sup></i> .....	68
<b>Figure 10.</b> –	Résumé schématique des effets du cannabidiol sur la formation de contacts synaptiques et sur l'expression des protéines synaptiques dans les neurones <i>gpr55<sup>+/+</sup></i> et <i>gpr55<sup>-/-</sup></i> . 70	
<b>Figure 11.</b> –	L'exposition au CBD 1µM n'affecte pas l'activité synaptique. ....	72

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> – L'exposition au CBD 1 $\mu$ M entraine une diminution de la fréquence de décharge dépendante de GPR55, mais n'affecte pas les autres propriétés de cellules. ....	71
---	----

## Liste des sigles et abréviations

2-AG : 2-Arachidonoylglycérol

2-AGE : 2-arachidonyl glycérol Ether (Noladin)

5HT<sub>3</sub>R : Récepteur à la sérotonine 3

AA : Acide arachidonique

LCRa : Solution de liquide céphalo-rachidien artificiel

ADAR2 : *adenosine deaminase acting on RNA* – Adenosine désaminase agissant sur l'ARN

AEA : Anandamide

AMPA : Récepteur  $\alpha$  -Amino-3-Hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acide

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

BDNF : *Brain-Derived Neurotrophic Factor* - *facteur neurotrophique dérivé du cerveau*

BSA : Albumine de sérum bovin

CASK : *Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase*

CB1/2R : Cannabinoid Receptors 1/2, Récepteurs cannabinoïdes de type 1 ou de type 2

CBD: Cannabidiol

CCK : Cholécystokinine

COX : Cyclooxygénase

DAG : Diacylglycérol

DAGL : Diacylglycérol lipase

DCC : *Deleted in colorectal cancer*

DIV : *Day In Vitro* - Jour in vitro

dNTP : Désoxyribonucléosites triphosphates

DSI/E : Suppression de l'inhibition/excitation produite par Dépolarisation

EAAT : *Excitatory Amino Acid Transporter*- Transporteur des amino-acides excitateurs

EMT : Transporteurs membranaires endocannabinoïdes

EPSC : *Excitatory Postsynaptic Current* - Courant Postsynaptique Excitateur

ERK1/2 : Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 And 2

FAAH : « Fatty Acid Amide Hydrolase »- Hydrolase des amides d'acides gras

FBS : Sérum de veau fœtal

FDA : Food and Drugs Administration

GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

Girks : G Protein-Coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels – Courant potassique rectifiant active par les protéines G

GPCR : Récepteur couplé à une protéine G

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HEK293 : Human Embryonic Kidney 293

I<sub>h</sub> : Canaux cationiques activés par hyperpolarisation

iNAT : N-Acyltransferase Indépendante du calcium

IP3R : Récepteur inositol trisphosphate

JNK : C-Jun N-Terminal Protein Kinase

LPI : Lysophosphatidylinositol

LTD : Long Term Depression - Dépression à long terme

Lyso-PLC : Lyso-Phospholipase C

LysoPtdGlc : Lyso-phosphatidyl- $\beta$ -D-glucoside

MAGL : Monoacyl glycérol lipase

MAP2 : Microtubule-Associated Protein 2-Protéine associée aux microtubules

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

mEPSCs : *Spontaneous Miniature Excitatory Postsynaptic Currents* - Courant Postsynaptique Excitateur Miniature Spontané

MSE/I : Suppression de l'inhibition/excitation induite par des récepteurs métabotropiques

N-Cams : *Neuronal – Cell Adhesion Molecule* – molécule d'adhérence cellulaire neuronale

NADA : N-arachidonoyldopamine

Naes: N-Acylethanolamines

NAPE-PLC : N-Acyl-Phosphatidyléthanolamine Phospholipase C

NAPE-PLD : N-Acyl-Phosphatidyléthanolamine Phospholipase D

NAPE : N-Arachidonoyl-Phosphatidylethanolamine

NAT : N-Acyltransferase dépendante du calcium

NGS : Sérum normal de Chèvre

NMDAR : Récepteur au N-méthyl-D-aspartate

OEA : N-Oleoylethanolamide

PCR : Polymerase Chain Reaction - Réaction en chaîne par polymérase

PDZ : post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)

PEA : N-Palmitoylethanolamine

PI : Phosphatidylinositol

PIP2 : 1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-Sn-Glycerol

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLA1 : Phospholipase A<sub>1</sub>

PLC $\beta$  : Phospholipase C  $\beta$

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -Récepteur active par les proliférateurs de peroxyosomes

PSD95 : *Postsynaptic Density Protein 95*

PTX : Picrotoxine

PVDF : Polyvinylidene Difluoride – polyfluorure de vinylidène

ROCK : Rho-Associated Coiled-Coil Containing Kinases

RRP : *Readily Releasable Pool* – Groupe de vésicules prêtes à être relâchées

SEM : *Standard error of the mean* – Erreur type

S-MEM : Minimum Essential Media Suspension

SNAP25 : *Synaptosome Associated Protein 25* - Protéine 25 associée aux synaptosomes

SNARE : *Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein Attachment Receptor*

SNC : Système nerveux central

STD : Short Term Depression - Dépression à court terme

Syncams : *Synaptic - Cell Adhesion Molecule* – Molécule d'adhésion cellulaire synaptique

TARP : Transmembrane AMPAR Regulatory Proteins

THC :  $\Delta^9$ - Tétrahydrocannabinol

TRPA : Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily A

TRPM : Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M

TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1

TTX : Tétrodotoxine



## Remerciements

Mon premier remerciement ira sans aucun doute à mon directeur de recherche Jean-François, que je remercie de m'avoir accepté dans son laboratoire pour au départ un stage 4 mois qui s'est transformé en deux ans de maîtrise. Merci pour votre encadrement et votre engagement dans la réussite de vos étudiants y compris la mienne. Merci pour votre optimisme et bonne humeur permanente qui redonne le sourire et un rayon d'espoir lorsque les mauvaises semaines s'enchaînent. Je tiens aussi à vous remercier de cultiver cette ambiance de travail positive et dynamique au laboratoire.

Je souhaiterais ensuite remercier Aurélie, qui a été ma mentore pendant ces deux dernières années. Merci pour la transmission de tes connaissances et de ton expertise. Je te dois mon savoir-faire en culture cellulaire, en biologie cellulaire, en électrophysiologie, et je t'en suis extrêmement reconnaissante. C'était un plaisir de travailler avec toi.

Je tiens à remercier également le Pr Tarek Ould-Bachir, pour son aide précieuse avec le code de Intellicount, les heures d'analyses auraient été encore plus longues sans votre aide.

Merci également à tous mes collègues étudiants qui ont contribué pour sûre à rendre des années plus agréables. Merci à vous, Ismaël, Catarina, Guillaume, Catherine pour votre énergie, vos conseils, nos discussions de sciences, mais pas seulement. Vous contribuez à la bonne ambiance de travail au laboratoire. Merci aux autres étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer, Lamyae Solenn, Fati, Ismaël Djerourou, Maxime. Je tiens aussi à remercier Pascale, que j'ai eu la chance de co-superviser durant ses stages, merci pour ton aide précieuse, et pour ces longues heures d'analyse sur Intellicount. Je vous souhaite à tous bon courage pour la suite.

Je tiens aussi à remercier Philippe pour la transmission de ce projet tout aussi passionnant que très frustrant par moment. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes questions bien après ton départ du laboratoire.

Merci à ma famille, qui malgré l'océan et les 6 fuseaux horaires qui nous séparent, vous avez toujours été d'un soutien indéfectible. Merci à Axel, d'avoir toujours répondu présent pour moi,

d'avoir partagé mes joies, mes petites victoires, comme mes moments de doute et remise en question. Et merci à mon petit chat de m'avoir tenu compagnie pendant mes longues journées de rédaction.

Je souhaiterais enfin remercier l'École d'optométrie, pour leurs infrastructures, de m'avoir soutenu financièrement avec les bourses d'excellences et la bourse d'intelligence artificielle qui m'ont été octroyées durant cette maîtrise. Je tiens aussi à les remercier de nous avoir soutenus avec Ismaël Djerourou dans l'organisation des deux éditions des 24 heures de sciences en collaboration avec le Réseau Vision. Je remercie aussi la Fondation Catherine Fradette pour la bourse d'excellence qu'elle m'a décernée en 2022.

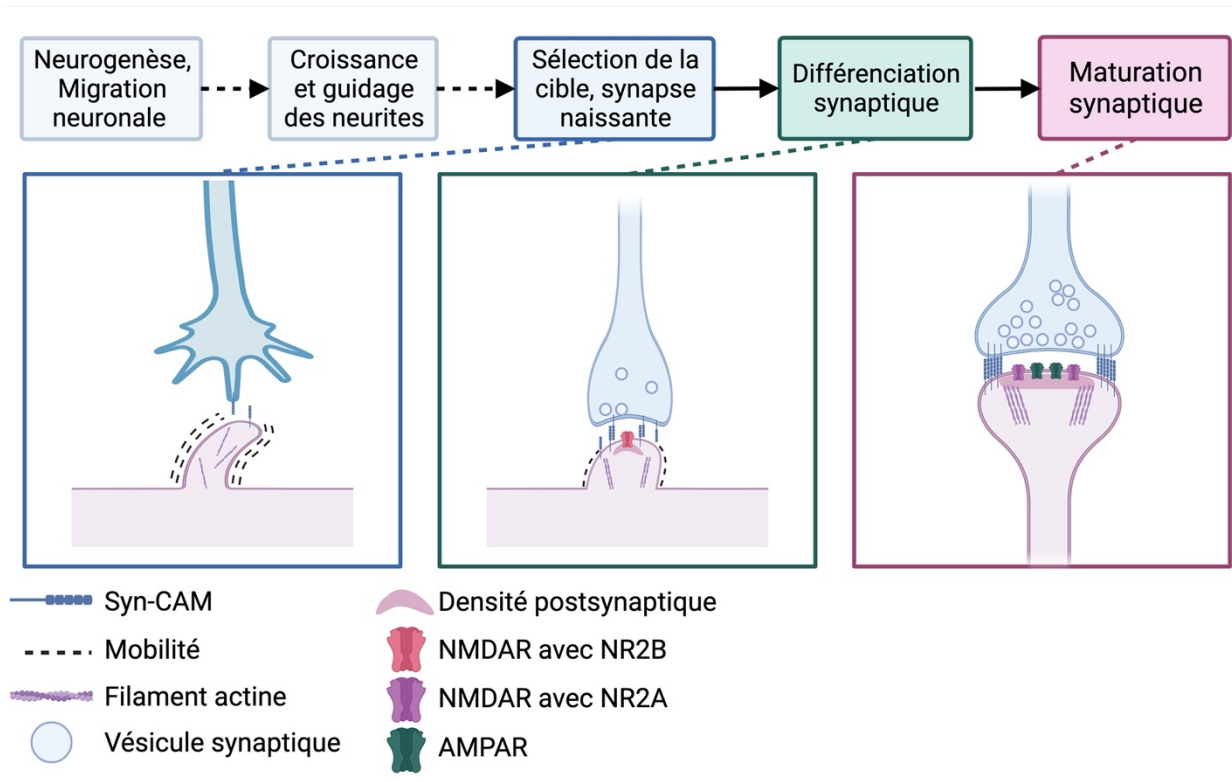
# Chapitre 1 – Introduction

## Formation d'une synapse du contact initial à la maturation

Pendant le développement, les neurones nouvellement formés migrent vers des positions spécifiques dans le cerveau. Les corps cellulaires se trouvent parfois loin de leurs cibles synaptiques et sont contraints d'envoyer des prolongements de leur cytoplasme, avec à leur extrémité un cône de croissance, pour atteindre leur cible (Südhof, 2021). Ce cône de croissance est une structure très dynamique capable d'analyser les signaux de l'environnement. Il guide le neurite jusqu'à sa cible synaptique en interprétant des signaux attractifs ou répulsifs solubles dans l'environnement ou présents à la surface de certaines cellules ou dans la matrice extracellulaire. Parmi les principaux signaux de guidage, on peut trouver entre autres: la nétrine, les sémaphorines, slit, les éphrines (Dabrowski et al., 2017; Kalil et Dent, 2005).

Les synapses chimiques sont des structures ultra spécialisées, qui comprennent un compartiment présynaptique, une fente synaptique et un compartiment postsynaptique. Dans le compartiment présynaptique, on retrouve des mitochondries, un pool de vésicules synaptiques et des zones actives comprenant le nécessaire à la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (comme les canaux calciques dépendant du voltage et le complexe *Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein Attachment Receptor* (SNARE)). Du côté postsynaptique, on retrouve les densités postsynaptiques, qui sont des regroupements de récepteurs associés à des protéines d'échafaudages. L'alignement des compartiments pré et postsynaptique est maintenu grâce à des molécules d'adhérence cellulaire neuronale (N-CAMs) (Dabrowski et al., 2017; Südhof, 2018).

Dans la formation d'une synapse du système nerveux central (SNC) on distingue plusieurs phases majeures : le contact initial, la différenciation et la maturation de la synapse. Toutes ces étapes font intervenir de multiples acteurs (**Figure 1.**) (Cline, 2009).



**Figure 1.** – Différents stades de la formation d’une synapse excitatrice.

*Le processus de formation d’une synapse commence après les phases de neurogenèse, migration neuronale, et de guidage et croissance des neurites. La première étape de la formation d’une synapse nécessite que le cône de croissance, guidé par des signaux comme les Syn-CAMs, sélectionne sa cible et établisse le contact initial. Ensuite, la période de différenciation synaptique commence pour recruter les éléments nécessaires au fonctionnement des entités pré et postsynaptique. À cette étape, à l’aide de signaux bidirectionnels, les Syn-CAMs commencent à stabiliser la synapse naissante via les filaments d’actine. Ils induisent également le développement de la partie présynaptique et le recrutement de récepteurs sous leur forme immature comme les NMDAR possédant la sous-unité NR2B du côté postsynaptique. Enfin, ils permettent le recrutement de quelques vésicules synaptiques. Le stade de maturation de la synapse permet le développement des fonctions d’une synapse mature. Ce stade se caractérise structurellement par le recrutement de nouvelles Syn-CAMs, le développement de la densité postsynaptique et l’expression de NMDAR possédant la sous-unité NR2A, le recrutement des AMPAR. Du côté présynaptique, le pool de vésicules présynaptiques se met en place. On retrouve également*

*l'élargissement de l'épine dendritique nécessitant une stabilisation via le cytosquelette d'actine.*  
*Abréviations : Syn-CAM Molécule d'adhésion cellulaire synaptique, NMDAR récepteur au N-méthyl-D-aspartate, AMPAR récepteur  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acide.*  
*Figure créée avec BioRender.com, adapté de Dabrowski et al., 2017; Giagtzoglou et al., 2009; Südhof, 2021.*

## **Formation du contact initial**

Une fois que le cône de croissance approche de sa cible, sa vitesse de croissance diminue par l'intermédiaire de signaux diffusibles présents dans l'environnement. Ce ralentissement est essentiel pour augmenter la probabilité de former un contact avec la cible (Sanes et al., 2019a). Pour trouver le site de liaison idéale entre le filopode et la membrane postsynaptique, le cône de croissance s'appuie sur une balance entre des signaux attractifs et répulsifs, tels que les sémaphorines, les N-CAMs, le *facteur neurotrophique dérivé du cerveau* (BDNF), les N-cadhérines. Si on perturbe cet équilibre de signaux, il est possible d'influencer la quantité de contacts synaptiques initiés (Dabrowski et al., 2017).

Lors de l'approche finale, un échange se met en place entre le filopode et sa cible postsynaptique, cet échange de signaux est nécessaire au recrutement des différents éléments d'une synapse naissante. Les signaux antérogrades envoyés par le filopode permettent notamment le regroupement de récepteurs, le « clustering », et le début de la spécialisation de la densité postsynaptique. Les signaux rétrogrades eux jouent un rôle important dans l'élimination d'innervation incorrecte ou excessive notamment par des mécanismes qui sont dépendants de son activité électrique (Sanes et al., 2019b). Une fois que le filopode a établi le contact initial avec la membrane postsynaptique, plusieurs évènements s'enchainent.

Dans un premier temps, on peut retrouver une augmentation du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cône de croissance. Celui-ci pourrait provenir du réticulum endoplasmique puisque l'expression du récepteur inositol trisphosphate (IP3R) responsable de son ouverture est augmentée durant les phases de synaptogenèse dans le SNC du rat. Le flux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire conduit à la différenciation du cône de croissance en compartiment présynaptique (Dent et al., 1996; Sanes et al., 2019b). En parallèle, on peut observer une augmentation rapide de la force d'adhésion

entre le filopode du cône de croissance et le site de contact, qui s'explique notamment grâce à l'augmentation rapide du nombre de molécules d'adhésion cellulaire. Une partie de ces molécules d'adhésion cellulaire sont dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (Sanes et al., 2019b). Ces N-CAMs sont essentiels à toutes les étapes de la formation d'une synapse, aussi bien dans le guidage, la formation du contact initial, la stabilisation de la synapse, mais aussi dans sa maturation.

### **Différenciation synaptique**

Une fois que le contact initial est stabilisé entre autres par les N-CAMs, il faut que la machinerie cellulaire des compartiments pré et postsynaptiques soit synthétisée et recrutée au site de contact, c'est la différenciation synaptique.

### **Différenciation du compartiment présynaptique**

Une hypothèse pour la mise en place du compartiment présynaptique est celle de la synapse préassemblée. Cette hypothèse propose que le compartiment présynaptique naissant recrute (1) des vésicules à cœur dense, contenant des pools de vésicules synaptiques ainsi que leurs protéines, et (2) des vésicules contenant les protéines de la zone active comme piccolo et bassoon. Piccolo et bassoon sont deux protéines d'échafaudages du compartiment présynaptique qui vont jouer un rôle essentiel dans l'assemblage de la zone active. Bassoon va permettre la localisation des canaux calciques dépendant du voltage à proximité du site de relâche. Tandis que Piccolo va jouer un rôle dans l'assemblage dynamique du cytosquelette d'actine (Gundelfinger et al., 2015; Pinto et Almeida, 2016).

Originaires de l'appareil de Golgi (trans-Golgi network), ces vésicules sont transportées le long de l'axone même en l'absence d'un contact postsynaptique, mais la formation d'un contact va induire leur recrutement au site. Une fois ces vésicules recrutées l'assemblage de la zone active se fait de manière séquentielle, avec dans un premier temps l'assemblage des vésicules synaptiques, puis des protéines de la zone active, suivie de la machinerie d'exocytose des vésicules et enfin le recrutement des mitochondries (Dabrowski et al., 2017).

### **Différenciation du compartiment postsynaptique**

Pour la différenciation du compartiment postsynaptique, contrairement au compartiment présynaptique, il n'y a pas encore de consensus. Les protéines d'échafaudage à domaine PDZ (*post synaptic density protein (PSD95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)*, and *zonula occludens-1 protein (zo-1)*), comme la *postsynaptic Density Protein 95 (PSD95)* pourraient être recrutées en premier, 30 minutes suivant le début du recyclage vésiculaire. Le recrutement de PSD95 permettrait l'initiation de la différenciation du compartiment postsynaptique et le recrutement des paquets de NMDAR transportés le long de dendrites. Ce processus est remis en cause par des observations montrant que les regroupement de NMDAR peuvent être recrutés au site de contacts en seulement quelques minutes et en l'absence de PSD95 (Kayser et Dalva, 2014).

La libération spontanée de neurotransmetteur serait un autre élément permettant le recrutement et l'assemblage du compartiment postsynaptique. Puisque le compartiment présynaptique serait assemblé avant le compartiment postsynaptique, la libération spontanée de neurotransmetteur pourrait faciliter l'accumulation des récepteurs appropriés, par exemple la relâche de glutamate permettrait le recrutement de regroupement de NMDAR (Dabrowski et al., 2017).

### **Les organisateurs synaptiques**

Le processus de différenciation implique l'action de protéines ou de molécules qui sont capables de l'initier, on les nomme les organisateurs synaptiques ou SAMs (Dabrowski et al., 2017; Südhof, 2021). Le développement des compartiments synaptiques est régulé majoritairement par deux types de signaux : les molécules trans-synaptiques et les facteurs sécrétés.

Les molécules trans-synaptiques sont composées d'un membre ancré dans la membrane présynaptique et d'un autre ancré dans celle postsynaptique. Leur interaction permet une communication bidirectionnelle générant le recrutement des structures essentielles à la différenciation synaptique. Dans cette catégorie on retrouve les SynCAMs. Ce sont des protéines trans-synaptiques avec un domaine Immunoglobuline extracellulaire qui leur permet une interaction avec une autre SynCAM et un motif PDZ en intracellulaire qui leur permettent d'interagir avec les protéines d'échafaudage. Les SynCAM en particulier SynCAM 1 et 2 jouent un

rôle important dans la génération de synapses excitatrices (Dabrowski et al., 2017; Kayser et Dalva, 2014). Dans cette catégorie on retrouve également les éphrines et leurs récepteurs Ephs, bien que ces molécules soient connues comme étant des signaux répulsifs lors du guidage axonal, les EphB et Éphrines-B sont également importants dans la différenciation synaptique des synapses excitatrices. Leur interaction en culture neuronale augmente le nombre de spécialisations pré et postsynaptiques formées. L'activation de EphB augmente les courants calciques liés aux NMDAR et l'expression de gènes impliqués dans la différenciation synaptique. Son interaction avec Éphrine-B en présynaptique, permet le recrutement de vésicules synaptiques, notamment grâce à son interaction avec syntenin-1 (Dabrowski et al., 2017; Kayser et Dalva, 2014). L'interaction neurexines-neurologine fait également partie des signaux transsynaptiques. La  $\beta$ -neurexine permet par son interaction avec les protéines d'échafaudage *Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase* (CaMK) et Mint, le recrutement de Munc-18, une protéine essentielle à l'exocytose des vésicules synaptiques. Les neurologine 1 et 3 ont elles aussi été reliées à la formation des synapses excitatrices. Leur surexpression dans des cultures de neurones augmente le nombre de synapses alors que leur délétion entraîne une diminution plus modérée (Dabrowski et al., 2017; Kayser et Dalva, 2014).

Il est intéressant de noter que la délétion de plusieurs de ces protéines n'entraîne pas une diminution drastique du nombre de synapses. Cette observation peut s'expliquer par les multiples de voies qui régissent la synaptogenèse. La délétion d'une de ces voies peut ainsi être compensée par une autre (Dabrowski et al., 2017; Kayser et Dalva, 2014; Sanes et al., 2019b).

Dans la catégorie des facteurs sécrétés, on retrouve notamment les facteurs de Wnt et de BDNF. Wnt7a dans l'hippocampe induit le regroupement de protéines présynaptiques et augmente la transmission synaptique. Le BDNF est connu pour son rôle dans le développement de l'arborescence dendritique. De plus, une corrélation a été démontrée entre la croissance de l'arbre dendritique et la formation de synapse. Deux explications sont possibles : la densité synaptique est augmentée en lien avec une arborisation plus développée augmentant la probabilité d'un contact, ou bien le BDNF est capable de promouvoir directement le recrutement d'éléments synaptiques (Dabrowski et al., 2017; Kayser et Dalva, 2014).



## **Maturation synaptique**

Une fois que les compartiments présynaptiques et postsynaptiques ont recruté la machinerie cellulaire nécessaire à leur fonctionnement, plusieurs étapes sont encore nécessaires afin d'arriver à une synapse fonctionnelle mature. La maturation des différents éléments de la synapse est étroitement reliée aux propriétés électrophysiologiques des neurones.

### **Maturation des récepteurs**

Une synapse lors de sa formation initiale exprime des sous-unités particulières des récepteurs, ce sont les « isoformes néonatales ». Ces isoformes particulières, entre autres, leur confèrent des propriétés électrophysiologiques distinctives, typiques de synapses non matures. Au cours du développement, les sous-unités des récepteurs changent ce qui modifie leurs propriétés et permet à la synapse d'exprimer toutes les caractéristiques d'une synapse mature (Sanes et al., 2019b). Si on s'intéresse aux NMDAR, au cours du développement, on retrouve un schéma d'expression pour les différentes sous-unités et de leurs isoformes. Les changements d'expression des isoformes de la sous-unité NR2 ont été particulièrement étudiés dans le cadre de la maturation des synapses. En effet, les sous-unités NR2A et NR2B ont des différences dans leur patron d'expression développemental, dans leur sensibilité au glutamate et leur cinétique d'inactivation, ce qui leur procure des propriétés électrophysiologiques distinctes (Rebecca C, 2009). La sous-unité NR2B serait prédominante dans les neurones immatures et les synapses naissantes, alors que la sous-unité NR2A serait graduellement incorporée aux neurones matures, de manière dépendante de l'activité synaptique (Rebecca C, 2009; Tovar et Westbrook, 1999). Les différences dans la cinétique d'inactivation des récepteurs conduisent à des influx de  $Ca^{2+}$  différents (Rebecca C, 2009; Sobczyk et al., 2005). Puisque le  $Ca^{2+}$  est un acteur important dans de nombreuses voies de signalisation au niveau synaptique, on peut penser que les changements de sous-unités du NMDAR conduisent à des changements dans l'activation des voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans la maturation (Rebecca C, 2009). De plus l'équipe de Kim et al., 2005 propose que les récepteurs contenant la NR2A soient capables de promouvoir l'insertion de AMPAR exprimant la sous-unité GluR1. Leur insertion conduirait à une potentialisation de la synapse alors que les récepteurs avec la NR2B l'inhibent, entraînant une dépression de la synapse (Kim et al., 2005). Puisqu'au début du développement et à la synapse

naissante la transmission synaptique glutamatergique est en majorité médiée par les NMDAR, acquérir une transmission synaptique médiée par les AMPAR est une avancée dans la maturation de la synapse (Wu et al., 1996).

L'équipe de Hall et al., 2005 a montré dans des cultures de neurones corticaux de rats que l'expression de la sous-unité NR2B par les NMDAR limite l'insertion des AMPAR à la membrane des synapses en développement en régulant négativement l'expression de la protéine régulatrice transmembranaire AMPA. Au cours du développement, la sous-unité NR2B sera remplacée par la sous-unité NR2A, ce qui lèvera la régulation négative sur la protéine transmembranaire régulatrice des AMPAR (TARP), permettant l'insertion de AMPAR à la membrane et ainsi l'augmentation du rapport de courant AMPA/NMDA (Hall et al., 2007).

La composition des AMPAR a également un rôle à tenir dans la maturation synaptique, en particulier car sa composition détermine sa perméabilité ionique. La sous-unité GluR2 détermine si le AMPAR est perméable ou non aux ions  $Ca^{2+}$ . La sous-unité GluR2 est soumise à l'édition de l'ARN par l'enzyme adénosine désaminase agissant sur l'ARN (ADAR2). Cette enzyme va convertir le codon glutamine (Q) présent dans le gène de GluR2, en un codon arginine (R). Les AMPAR sont perméables au calcium ( $Ca^{2+}$ ) s'ils contiennent la sous-unité GluR2(Q) non éditée ou s'ils n'ont pas la sous-unité GluR2. Dans le cerveau, la majorité des AMPAR sont des hétéro-oligomères composés de GluR1/GluR2(R) ou GluR2(R)/GluR3, et sont donc imperméables au  $Ca^{2+}$  (Wright et Vissel, 2012). Dans plusieurs structures du cerveau de rat (néocortex, striatum, hippocampe) durant le développement embryonnaire et le début du développement postnatal, les synapses contiennent majoritairement des AMPAR perméables au  $Ca^{2+}$  ne contenant pas la sous-unité GluR2. Après la deuxième semaine de vie, un changement s'observe au profit de AMPAR non perméable au  $Ca^{2+}$  contenant la sous-unité GluR2(R) (Pellegrini-Giampietro et al., 1992). De manière plus générale, la présence de la sous-unité GluR2 est importante pour le transport et la stabilité des AMPAR. Son C-terminal interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans l'insertion de AMPAR à la synapse et leur activation (Wright et Vissel, 2012).

## **Maturation du pool de vésicules synaptiques, de la recapture des neurotransmetteurs et de l'épine dendritique**

La maturation d'une synapse nécessite le recrutement et la maturation de protéines, mais aussi une maturation structurelle. La forme de l'épine dendritique serait reliée à son état de maturation. Les différentes formes de l'épine dendritique de la moins mature vers la plus mature sont : structure en filopode – mince – court et épais – champignon. Les formes en structure de filopode et mince sont des précurseurs de l'épine dendritique abondante au départ et progressivement remplacée par la forme en champignon dans plusieurs structures du cerveau adulte chez le rat et la souris (Kayser et Dalva, 2014; Runge et al., 2020). Cette modification structurelle fait intervenir le dynamisme du cytosquelette d'actine, dans laquelle la mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire est un acteur essentiel (Nakahata et Yasuda, 2018).

La maturation du pool de vésicules synaptiques est un marqueur largement accepté de la maturation d'une synapse. Le pool de vésicules synaptiques se compose du pool de vésicule prêt à être relâché (« readily releasable pool » RRP), du pool de recyclage et du pool de réserve (Alabi et Tsien, 2012). Une étude rapporte que la maturation du pool de vésicules synaptiques s'effectue en 3 étapes. (1) Au départ, la synapse possède très peu de vésicules dans le RRP, mais elle possède des vésicules dans son pool de recyclage libérable à la suite d'une forte stimulation. (2) Ensuite, la majorité des vésicules dans le pool de recyclage passe dans le RRP. (3) Après l'assemblage du RRP, le recrutement de nouvelles vésicules permet de constituer le pool de réserve. Lorsque la synapse est mature, la taille du RRP augmente de manière linéaire avec celle du pool de recyclage. La taille du pool de vésicules synaptiques influence la quantité de neurotransmetteur disponible pour être libéré, ce qui influence l'activité synaptique (Mozhayeva et al., 2002).

La maturation du système de recapture des neurotransmetteurs est essentiel pour le développement de fonction synaptique puisque la durée des courants postsynaptiques excitateurs (EPSCs) évoqués en dépend. Plus longtemps le neurotransmetteur restera dans la fente synaptique, plus l'EPSC sera long. Les transporteurs glutamatergiques EAAT1 et EAAT2 sont exprimés dès la gliogenèse dans la zone proliférative. Le recrutement du EAAT1 dans les astrocytes des synapses triparties est dépendant de l'activité neuronale. Cette accumulation se

fait dans les branches adjacentes au compartiment présynaptique (Benediktsson et al., 2012; Sutherland et al., 1996).

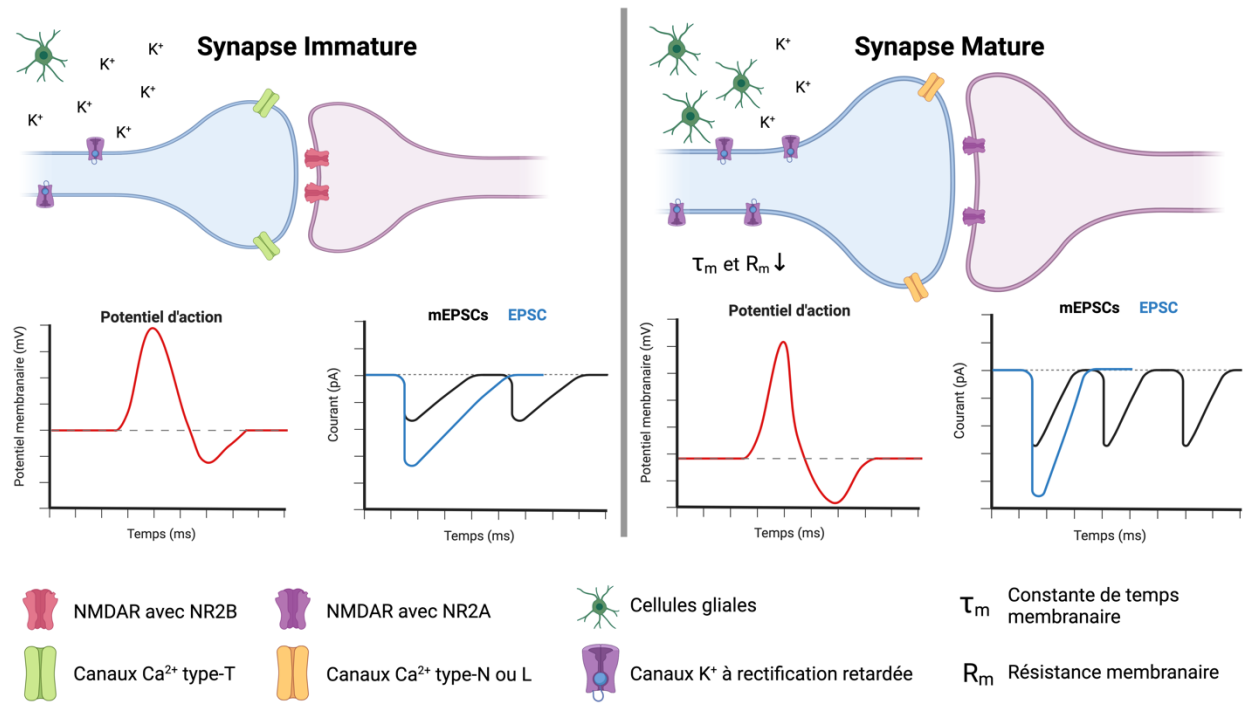
### **Maturation électrophysiologique**

Le SNC utilise les signaux électriques pour transmettre et traiter les informations, ainsi la maturation des propriétés électrophysiologiques des neurones est essentielle à l'émergence de cette fonction (**Figure 2.**).

L'une des caractéristiques électrophysiologiques principales est le potentiel de membrane. Durant le développement, le potentiel de membrane va s'hyperpolariser. *In vivo*, ce changement dans le potentiel de membrane s'explique en partie par la prolifération des cellules gliales dans le cerveau entraînant une diminution de la concentration extracellulaire de K<sup>+</sup> (**Figure 2.**) (Burgard et Hablitz, 1993; Sanes et al., 2019b).

La résistance et la constante de temps membranaire vont aussi montrer une évolution au cours du développement (Burgard et Hablitz, 1993). La résistance dépend du nombre de canaux ouverts à la membrane et de la taille de la cellule. La constante de temps correspond au temps nécessaire pour que la différence de potentiel transmembranaire atteigne 63% de sa valeur finale. La diminution de ces deux variables est en lien avec l'augmentation du nombre de canaux K<sup>+</sup> à rectification retardée à la membrane et avec l'augmentation de la taille du neurone lors de la maturation. Cette diminution permet l'augmentation de l'amplitude des EPSCs et une diminution de leur durée (**Figure 2.**) (Barish, 1986; Burgard et Hablitz, 1993; Etherington et Williams, 2011).

La durée des EPSCs s'explique également par les isoformes néonataux des NDMAR. Comme discuté dans une précédente section, la sous-unité NR2B est prédominante dans les synapses naissantes et sera progressivement remplacée par la sous-unité NR2A. Ces deux sous-unités procurent au NMDAR des propriétés d'inactivation différentes. La présence de la NR2B entraîne une inactivation 3 à 4 fois plus lente qu'en présence du NR2A. Le changement pour la sous-unité NR2A permet le raccourcissement de la durée des EPSC, et influence également la sensibilité du récepteur au potentiel de membrane (**Figure 2.**) (Flint et al., 1997).



**Figure 2. – Maturation électrophysiologique**

*Changements électrophysiologiques entre un neurone mature et immature. Durant le développement le potentiel de membrane va s'hyperpolariser en partie à cause de la prolifération des cellules gliales qui entraîne une diminution de la concentration extracellulaire de K<sup>+</sup>. Le potentiel d'action va également se raccourcir puisqu'il sera initié principalement par les Nav. Les courants postsynaptiques excitateurs (EPSC) vont voir leur amplitude augmentée et leur durée diminuée avec la maturation. Ce changement s'explique par l'échange de la sous-unité NR2B pour la NR2A aux synapses matures et la diminution de la constante de temps et résistance membranaire. La constante de temps et la résistance membranaire vont diminuer durant la maturation en raison de l'insertion de nouveaux canaux K<sup>+</sup> à rectification retardée et l'augmentation de la taille du neurone. Avec la maturation on peut aussi observer une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs miniatures (mEPSCs). Au niveau du bouton présynaptique l'échange des canaux Ca<sup>2+</sup> de type-T pour des type-N ou L permet un changement dans la cinétiques des flux de Ca<sup>2+</sup> important pour la maturation des propriétés électriques des neurones. Abréviations : NMDAR récepteur au N-méthyl-D-aspartate. Figure crée avec BioRender.com.*

L'activité synaptique va également évoluer au cours de la maturation des neurones. Entre DIV4 et DIV16, la fréquence et l'amplitude des mEPSCs augmentent (**Figure 2.**) (Chanda et al., 2017).

Dans un neurone mature, le potentiel d'action est initié par l'ouverture des canaux sodiques dépendant du voltage, les Nav, ce qui crée la dépolarisation du neurone avec une entrée massive d'ions  $\text{Na}^+$  dans le milieu extracellulaire. Ces canaux s'activent, mais s'inactivent rapidement également, et au même moment, les canaux potassiques dépendant du voltage, les Kv, s'ouvrent, provoquant une sortie massive d'ion  $\text{K}^+$  et donc une hyperpolarisation de la membrane. Lorsque le potentiel d'action arrive au niveau de la synapse, les canaux calciques dépendants du voltage s'ouvriront provoquant l'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de zone active. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  permet l'exocytose des vésicules synaptiques. Les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , entre autres, rétablissent les gradients de concentrations ioniques (Purves et al., 2019). Dans les neurones immatures, les potentiels d'actions sont plus longs, cela s'explique également par le fait qu'ils ne sont pas initiés par des Nav, mais par des canaux calciques qui ont un temps d'ouverture plus long. Lors de maturation, les canaux Nav vont devenir la première source de courant sortant du neurone (**Figure 2.**) (Spitzer et Lamborghini, 1976).

De plus, à la synapse naissante, l'expression des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type-T est dominante, ces canaux sont activés par un faible voltage contrairement aux canaux de type-L ou N. Au cours de la maturation de la synapse, les canaux de type-L ou N deviennent dominants (Yaari et al., 1987). Ces changements dans la cinétique des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  sont importants pour la maturation des propriétés électriques des neurones (**Figure 2.**) (Desarmenien et Spitzer, 1991).

## **GPR55, un récepteur atypique du système endocannabinoïde**

### **Le système endocannabinoïde**

La plante de *cannabis sativa* est utilisée depuis des centaines d'années à différentes fins, thérapeutiques, récréatives ou autres. L'extrait de la plante contient plus de 120 composés actifs

que l'on nomme les phytocannabinoïdes. Les deux principaux et les plus connus sont le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol (THC) et le cannabidiol (CBD). La découverte de la structure moléculaire du THC en 1964 a contribué à l'idée de l'existence de récepteur capable de lier ces phytocannabinoïdes aboutissant par la suite à la découverte des composants du système endocannabinoïde (Crocq, 2020; Gaoni et Mechoulam, 1964; Lu et Mackie, 2016; Pertwee, 2006).

### **Composants du système endocannabinoïdes**

Le système endocannabinoïde est composé de plusieurs éléments, incluant des récepteurs, de nombreuses molécules permettant de moduler les récepteurs, ainsi que des enzymes responsables de leur synthèse et de leur dégradation et des gènes encodant toutes les protéines du système (Marichal-Cancino et al., 2017). Depuis 2019, on peut retrouver aussi le terme « endocannabinoïdome », il désigne tous les composants du système, *ie* des protéines, des enzymes, des lipides qui ont un effet direct ou indirect dans la modulation du système cannabinoïde entraînant un effet significatif sur la santé, mais le terme endocannabinoïde reste largement utilisé dans la littérature (Rezende et al., 2023). Les cannabinoïdes, terme regroupant les phytocannabinoïdes, les endocannabinoïdes, et les cannabinoïdes synthétiques, exercent leur action en liant les récepteurs du système endocannabinoïde à la surface des membranes cellulaires et en agissant sur les enzymes du système. Cependant, les études pharmacologiques révèlent que ces cannabinoïdes pourraient se lier à d'autres récepteurs. Parmi eux, on peut retrouver des récepteurs vanilloïdes (TRPV1/2/3/4, TRPA1, TRPM8), des récepteurs métabotropiques (GPR3, GPR6, GPR55, GPR12, GPR18, GPR19), des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ ) (Lu et Mackie, 2016; Morales et al., 2020; Rezende et al., 2023).

### **Les récepteurs**

Les deux récepteurs les plus connus et les plus étudiés du système endocannabinoïde sont les CB1R et CB2R et sont donc capables de lier les cannabinoïdes. Les CB1R et CB2R sont des récepteurs couplés à une protéine  $G_{i/o}$ , et leur activation inhibe l'adénylate-cyclase, conduisant à une diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et une diminution de l'activité de la protéine kinase A (PKA). Elle inhibe également certains canaux calciques dépendants du

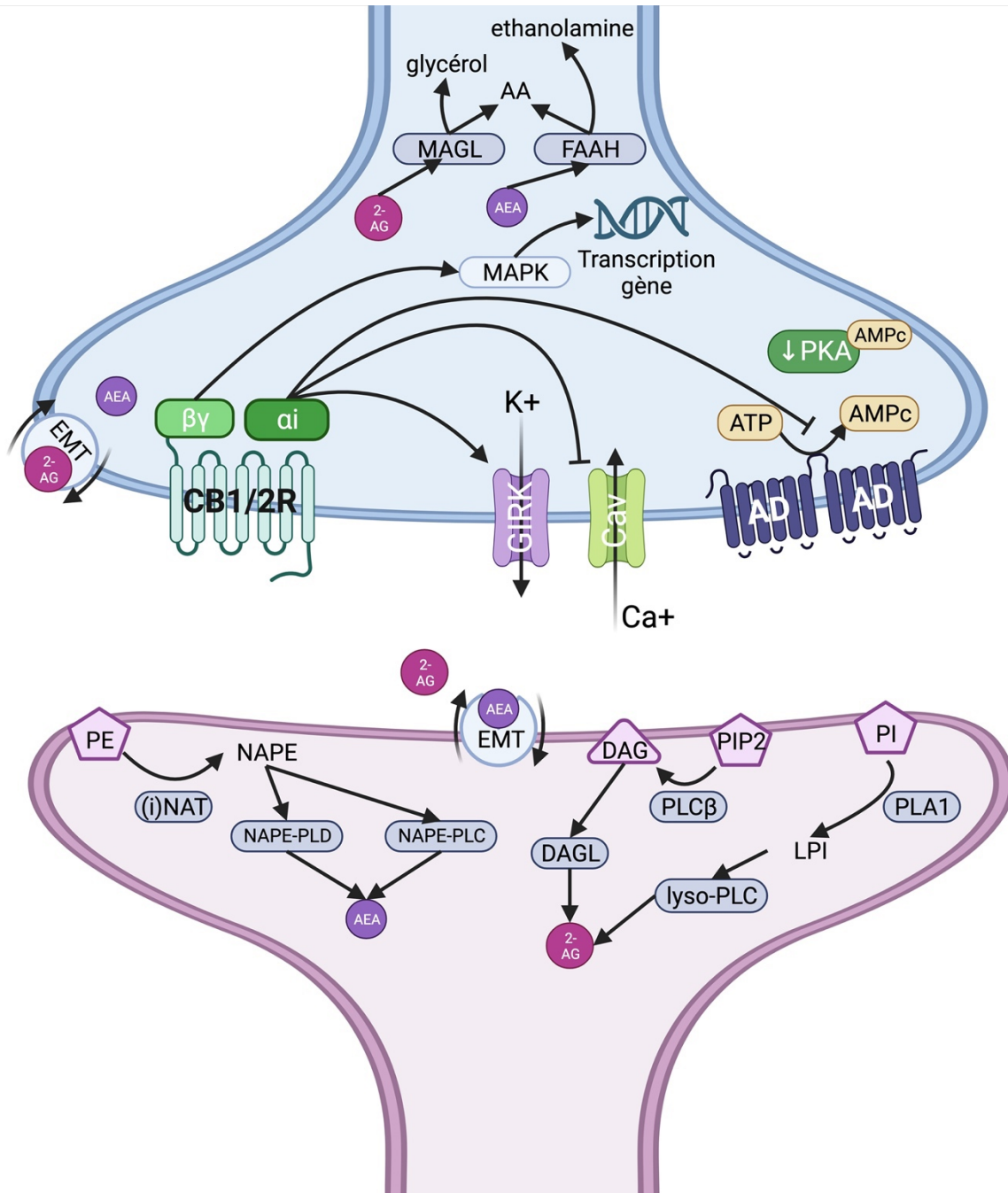
voltage, mais active les courants potassiques rectifiants activés par les protéines G (GIRKs) et la voie des *mitogen-activated kinases* (MAPK) incluant ERK1/2, JNK et p38 (Lu et Mackie, 2016; Rezende et al., 2023). Cependant, l'équipe de Felder rapporte que chez l'homme, le CB2R serait moins efficace pour inhiber les canaux calciques et GIRKs (**Figure 3.**) (Felder et al., 1995).

CB1R est codé par le gène CNR1 chez l'homme et il se compose de 472 acides aminés, contre 473 chez la souris et le rat, avec une homologie de séquence entre 97-99% (Zou et Kumar, 2018). L'expression de CB1R est prédominante dans le système nerveux central, mais on la retrouve également dans le système nerveux entérique et dans des cellules non neuronales comme dans la muqueuse intestinale, le foie, le système cardiovasculaire, et les organes reproducteurs. Au niveau du SNC, on le retrouve dans le cortex, l'hippocampe, les ganglions de la base, le striatum, le cervelet, la rétine, la moelle épinière, etc. Au niveau cellulaire, CB1R se localise sur les neurones au niveau présynaptique, mais en dehors de la zone active, et sur les cellules gliales comme sur les astrocytes et les microglies. Dans le cortex et l'hippocampe, on retrouve particulièrement CB1R dans les interneurones positifs à la cholécystokinine (CCK), et dans les neurones glutamatergiques bien que l'expression soit moins importante (Lu et Mackie, 2016). Au niveau subcellulaire, on retrouve typiquement le CB1R au niveau de la membrane plasmique, et au niveau intracellulaire. On peut trouver des récepteurs à la surface des lysosomes et des mitochondries. Ces récepteurs ont des propriétés différentes des récepteurs membranaires. La littérature rapporte trois isoformes du récepteur chez l'homme et deux chez le rat, résultants de l'épissage alternatif : la forme canonique, et deux isoformes avec des N-terminaux plus courts. La forme canonique est prédominante dans le cerveau (Shire et al., 1995; Ryberg et al., 2005).

Le gène CNR2 code pour le CB2R, qui est une chaîne de 360 acides aminés chez l'homme, conservé à 80% chez les rongeurs (Liu et al., 2009; Zhang et al., 2015; Zou et Kumar, 2018). CB2R a été identifié pour la première fois dans les macrophages de la rate, et il a ensuite été montré que son expression était prédominante dans les cellules immunitaires. Plusieurs autres organes expriment CB2R tels que le foie, le pancréas, la moelle épinière, la peau, les os, l'estomac, les reins et les testicules (Gong et al., 2006; Rezende et al., 2023). La présence de CB2R dans le SNC a longtemps été débattue, ce qui lui a valu pour un temps d'être identifié comme le « récepteur endocannabinoïde périphérique ». Il est maintenant largement accepté qu'il se retrouve exprimé



à la surface des cellules microgliales, au niveau de la barrière hématoencéphalique et dans les neurones du SNC. Sa présence dans les neurones du cervelet, du thalamus, du tronc cérébral, du



**Figure 3.** – Système endocannabinoïde : voie de signalisation, synthèse et dégradation de l'AEA et du 2-AG.

*Les CB1/2R sont couplés à une protéine Gαi. Leur activation entraîne l'activation des canaux potassiques (GIRK), l'inhibition des canaux calciques (Cav) et de l'adénylate cyclase (AD), conduisant à une diminution de la production d'AMPC et de l'activation de la PKA et, le tout permet de diminuer l'excitabilité neuronale. Leur activation permet également l'activation de la MAPK. Les endocannabinoïdes, AEA et 2-AG sont synthétisés à partir de phospholipides membranaires, leur dégradation est réalisée par hydrolyse de leur groupe arachidonique. Abréviations : AA acide arachidonique, MAGL monoacyl glycérol lipase, FAAH acide gras aminohydrolase, MAPK mitogen-activated kinase, EMT transporteurs membranaires des endocannabinoïdes, PKA protéine kinase A, AD adénylatecyclase, AMPc adénosine monophosphate cyclique, ATP Adénosine triphosphate, PE phosphatidyléthanolamine, (i)NAT N-acyltransferase dépendante/indépendante du Ca<sup>2+</sup>, NAPE N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine, NAPE-PLD N-Acyl-phosphatidyléthanolamine-spécifique phospholipase D, NAPE-PLC N-Acyl-phosphatidyléthanolamine-spécifique phospholipase C, DAG diacylglycérol, PIP2 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol, PLCβ phospholipase C β, DAGL diacylglycérol lipase, PI phosphatidylinositol, lyso-PLC, LPI lysophosphatidylinositol, PLA1 phospholipase A<sub>1</sub>, lyso-PLC lysophospholipase C. Créé avec BioRender.com, adapté de Rezende et al., 2023.*

striatum, de l'amygdale, de l'hippocampe et du cortex a été rapportée. Au niveau neuronal, CB2R contrairement à CB1R serait localisé au niveau postsynaptique (Brusco et al., 2008; Stempel et al., 2016; Van Sickle et al., 2005). Il faut tout de même noter que les niveaux d'expression de CB2R dans ces structures sont nettement inférieurs à ceux de CB1R (Atwood et Mackie, 2010; Gong et al., 2006; Rezende et al., 2023). Chez l'homme et la souris, 2 isoformes du récepteur ont été identifiées alors que 4 ont été identifiés chez le rat (Liu et al., 2009; Zhang et al., 2015; Zou et Kumar, 2018).

### **Les endocannabinoïdes**

Les endocannabinoïdes sont des lipides bio actifs endogènes capables de lier CB1R ou CB2R à leur site orthostérique, mais aussi d'autres récepteurs couplés aux protéines G, des récepteurs nucléaires, et des canaux ioniques (Lu et Mackie, 2021; Pertwee, 2015). Le premier endocannabinoïde identifié est l'anandamide (AEA), et la compréhension de sa structure moléculaire a permis d'identifier de nombreux autres lipides regroupés sous le nom N-acyléthanolamines (NAEs). Dans ce groupe on retrouve le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), le N-oléylethanolamide (OEA), le 2-arachidonoyl glycérol ether (noladin, 2-AGE), virodhamine, N-

arachidonoyldopamine (NADA), et le N-palmitoylethanolamine (PEA) entre autres, mais le 2-AG et le AEA sont les plus étudiés (Pertwee, 2015; Rezende et al., 2023).

Les endocannabinoïdes sont considérés comme des neuromodulateurs agissant de manière rétrograde. Ils sont synthétisés par la cellule postsynaptique et traversent la synapse pour activer des récepteurs cannabinoïdes sur la cellule présynaptique. À cause de leurs caractéristiques lipophiles, les endocannabinoïdes ne peuvent pas être encapsulés dans des vésicules synaptiques et être libérés par exocytose. Ils impliquent un système de synthèse et de libération « sur demande » permettant une libération spatio-temporelle précise (Lu et Mackie, 2021).

### **Protéines de synthèse, recapture et dégradation**

Les endocannabinoïdes sont synthétisés « sur demande » à partir de phospholipides membranaires, généralement de manière dépendante de l'activité, en réponse à l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Bien que la structure du 2-AG et de l'AEA soit similaire, leurs voies de synthèse et de dégradation sont différentes (Rezende et al., 2023).

La synthèse de l'AEA peut se faire au travers de multiples voies pouvant varier selon les différentes régions du cerveau (Lu et Mackie, 2016). Les mieux caractérisées sont les voies faisant intervenir la N-Acyl-phosphatidyléthanolamine-spécifique phospholipase D (NAPE-PLD) et la N-Acyl-phosphatidyléthanolamine-spécifique phospholipase C (NAPE-PLC) suivie d'une phosphatase. Dans ces deux voies, le précurseur est le N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE). La NAPE est produite par la N-acyltransférase dépendante du  $Ca^{2+}$  (NAT) ou indépendante du  $Ca^{2+}$  (iNAT) à partir de la phosphatidyléthanolamine (PE), un phospholipide membranaire. La NAPE est ensuite hydrolysée en AEA par la NAPE-PLD ou clivée en phospho-AEA puis déphosphorylée (**Figure 3.**) (Lu et Mackie, 2016, 2021; Rezende et al., 2023; Zou et Kumar, 2018).

La synthèse du 2-AG se fait par deux hydrolyses séquentielles, l'hydrolyse du 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol (PIP2) en diacylglycérol (DAG) par une phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) suivie de l'hydrolyse du DAG en 2-AG par la diacylglycérol lipase (DAGL). Il existe deux isoformes de la DAGL exprimée dans le cerveau, et la forme  $\alpha$  serait peut-être plus impliquée dans la production

synaptique, tant pis que la  $\beta$  serait plus impliquée dans la production microgliale (Lu et Mackie, 2016, 2021; Rezende et al., 2023; Zou et Kumar, 2018). Il existe une seconde voie pour la production du 2-AG faisant intervenir une phospholipase A<sub>1</sub> (PLA1). Le phosphatidylinositol (PI) un lipide membranaire, est hydrolysé en lysophosphatidylinositol (LPI) par la PLA1, lui-même hydrolysé en 2-AG par la lysophospholipase C (lyso-PLC) (**Figure 3.**) (Higgs et Glomset, 1994).

Les endocannabinoïdes sont des molécules hydrophobes qui ne sont donc pas capables de traverser par simple diffusion les membranes cellulaires. Les mécanismes de diffusion et de recapture leur permettant d'atteindre leurs cibles intracellulaires ou d'être dégradés reste encore flous. Plusieurs études suggèrent l'implication de transporteurs membranaires endocannabinoïdes (EMT) dépendant de l'ATP ou du Na<sup>+</sup> (Lu et Mackie, 2021). L'AEA et le 2-AG pourraient utiliser le même transporteur (**Figure 3.**) (Chicca et al., 2012).

La dégradation des endocannabinoïdes est réalisée par hydrolyse de leur groupe arachidonique. Le 2-AG est hydrolysé en acide arachidonique (AA) et glycérol par la monoacyl glycérol lipase (MAGL). L'AEA est hydrolysé en AA et éthanolamine par l'acide gras aminohydrolase (FAAH) (**Figure 3.**) (Lu et Mackie, 2021; Rezende et al., 2023).

Il est envisageable que la dégradation des endocannabinoïdes ne soit pas la fin de leur signalisation, mais une étape. Les AA produits de leur dégradation peuvent être utilisés comme substrat par la cyclooxygénase (COX) pour produire entre autres des prostaglandines. De plus, le 2-AG et l'AEA peuvent être utilisés directement par la COX2 pour produire de la prostamide et prostaglandine glycérol ester (Glaser et Kaczocha, 2010; Lu et Mackie, 2021).

### **Fonctions dans le système nerveux central**

Comme discuté précédemment, le système endocannabinoïde est largement exprimé dans le SNC où il régule de nombreuses fonctions. Des études ont montré son implication dans la nociception et l'hyperalgésie, l'activité motrice, les comportements de peur, d'anxiété et de stress, l'appétit, la régulation de la température corporelle, l'attention, l'apprentissage et la mémoire, l'acuité visuelle (Cécyre et al., 2020; Freund et al., 2003; Lutz et al., 2015).

L'une des principales fonctions du système endocannabinoïde dans le SNC mature est la modulation de l'activité synaptique. La signalisation via des messagers rétrogrades semble être cruciale pour certaines formes de plasticité synaptique à court et long terme, sur les synapses excitatrices et inhibitrices. Cette plasticité synaptique contribue à une variété de fonctions dans le cerveau, incluant la mémoire et l'apprentissage, processus principalement soutenu par la plasticité synaptique (Hashimoto et al., 2007; Lu et Mackie, 2016, 2021; Lutz et al., 2015; Rezende et al., 2023).

Il existe trois formes de plasticité synaptique médiée par les endocannabinoïdes : la suppression de l'inhibition/excitation produite par dépolarisation (DSI/DSE), la suppression de l'inhibition/excitation induite par des récepteurs métabotropiques (MSI/MSE), et la dépression à court/long terme (STD/LTD) induite par les cannabinoïdes (Lu et Mackie, 2016, 2021). La DSI/DSE correspond à l'inhibition transitoire des inputs inhibiteurs/excitateurs à la suite d'une forte stimulation. Le phénomène se produit donc aussi bien sur les synapses inhibitrices qu'excitatrices, bien que les synapses inhibitrices semblent y être plus sensibles. Plusieurs équipes rapportent que les messagers rétrogrades du système endocannabinoïde seraient un acteur majeur de cette plasticité, dans plusieurs régions du cerveau (Alger, 2012; Castillo et al., 2012; Kreitzer et Regehr, 2001; Lu et Mackie, 2016; Ohno-Shosaku et al., 2002). La MSI/MSE est également une forme de plasticité à court terme faisant intervenir : l'activation d'un grand nombre de récepteurs couplés à une protéine  $G_{q/11}$ , comme mGluR1/5 entre autres, et l'activation d'une PLC $\beta$  permettant la production de 2-AG. Le 2-AG entraînera l'inhibition de la transmission présynaptique via CB1R. Il est intéressant de noter que ces formes de plasticité peuvent être homosynaptiques (agissant sur la même synapse) ou hétérosynaptiques (agissant sur les synapses voisines) (Lu et Mackie, 2016; Ohno-Shosaku et Kano, 2014).

Les AA, produits en partie par la dégradation des endocannabinoïdes, peuvent également agir comme un messager rétrograde en inhibant les canaux Kv en présynaptique permettant la potentialisation de l'excitation induite par la dépolarisation (Carta et al., 2014; Lutz et al., 2015).

Le système endocannabinoïde est aussi capable de moduler l'activité synaptique autrement que par ses effets rétrogrades. En effet, les endocannabinoïdes peuvent moduler

directement l'activité des canaux ioniques, comme 5HT<sub>3</sub>R, TRPV1, GABA-A. De plus, le CB1R est capable d'activer les canaux GIRKs et les canaux cationiques activés par hyperpolarisation ( $I_h$ ). Ces  $I_h$  sont enrichis dans les dendrites et régulent leur excitabilité, leur fonction est importante dans la plasticité synaptique et l'apprentissage (De Petrocellis et al., 2017; Lu et Mackie, 2021; Mackie et al., 1995; Maroso et al., 2016).

### **Fonctions dans le développement du système nerveux central**

Le système endocannabinoïde est largement exprimé de manière fonctionnelle dès les premières étapes de la gestation et notamment dans le cerveau fœtal aussi bien chez les rongeurs que chez l'humain. Sa présence lui permet de réguler de nombreuses étapes lors du développement embryonnaire du SNC (Vitalis et al., 2008; Wu et al., 2011).

Le système endocannabinoïde est impliqué positivement dans la prolifération des progéniteurs neuronaux. On retrouve la présence de CB1R et de certaines enzymes de synthèse et de dégradation des endocannabinoïdes dans les progéniteurs neuronaux des zones ventriculaires et supra-ventriculaires (Wu et al., 2011). L'activation de CB1R et l'inactivation de la FAAH augmentent la prolifération de ces progéniteurs alors que la diminution d'AEA ainsi que la délétion de CB1R la diminuent (Aguado et al., 2005).

Les nouveaux progéniteurs pyramidaux produits doivent ensuite migrer vers la plaque corticale en suivant le système de migration « inside-out ». Le système endocannabinoïde est capable de moduler positivement cette étape. L'augmentation de l'AEA augmente la migration alors que la délétion de CB1R la retarde (Mulder et al., 2008). La signalisation de CB1R est également importante pour la migration radiaire des interneurons positifs à la CCK et GABAergique (Berghuis et al., 2005; Morozov et al., 2009).

Une fois que les neurones sont arrivés à leur position finale, il faut qu'ils envoient leurs axones pour atteindre leurs cibles. La présence du système endocannabinoïde au niveau du cône de croissance a été rapportée par de nombreuses études (Argaw et al., 2011; Berghuis et al., 2007; Duff et al., 2013; Keimpema et al., 2013; Mulder et al., 2008). Sa modulation influence le guidage des axones et la fasciculation des axones cortico-thalamiques et thalamico corticaux (Wu et al., 2010) et au niveau du corps calleux (Mulder et al., 2008). Le rôle du système endocannabinoïde

dans le guidage et la croissance des axones dans le système nerveux visuel a été étudié par le laboratoire du Pr Bouchard. L'activation des récepteurs CB1 ou des récepteurs CB2 sur les cônes de croissance des cellules ganglionnaires de la rétine entraîne l'effondrement du cône de croissance et sa répulsion par des mécanismes dépendant de *deleted in colorectal cancer* (DCC) et PKA. De plus, l'injection intraoculaire d'agonistes inverses des récepteurs induit une perturbation des projections rétinienne spécifiques à chaque œil (Argaw et al., 2011; Duff et al., 2013). Des résultats similaires ont été rapportés dans des cultures d'interneurones GABAergiques, l'activation de CB1R a provoqué l'effondrement du cône de croissance et sa répulsion (Berghuis et al., 2007).

Plusieurs évidences montrent que le système endocannabinoïde serait impliqué négativement dans la synaptogenèse. L'activation du CB1R dans des cultures de neurones hippocampiques entraîne une diminution de la formation de nouvelles synapses via la diminution d'AMPC (Kim et Thayer, 2001). Ces résultats concordent avec le fait que l'activation de la voie AMPC/PKA est capable de promouvoir la formation de nouvelles synapses et que l'activation de CB1R entraîne une diminution de l'AMPC. Dans des cultures neurones corticaux, l'inhibition de l'enzyme de production du 2-AG, la DAGL $\alpha$ , à entraîner une augmentation de l'expression de SNAP25, une protéine du complexe SNARE (Mulder et al., 2008). Bien que l'augmentation de l'expression d'une protéine synaptique ne soit pas toujours synonyme de formation de nouvelles synapses fonctionnelles, cette étude suggère que dans les neurones corticaux l'activation de CB1R entraîne une régulation négative de la synaptogenèse. Un article plus récent confirme que l'antagonisation de CB1R augmente la synaptogenèse de synapses excitatrices (Papariello et al., 2021).

### **Le récepteur GPR55**

GPR55 a été découvert pour la première fois en 1999 par l'équipe de Sawzdargo (Sawzdargo et al., 1999). C'est seulement, en 2007, que le récepteur a été identifié comme étant le récepteur endogène du LPI et capable de lier des cannabinoïdes (Oka et al., 2007; Ryberg et al., 2007). Chez l'homme, le gène se situe sur le chromosome 2q37 et code pour une séquence de 319 acides aminés, alors que chez la souris le gène se situe sur le chromosome 1 et code pour une séquence

de 327 acides aminés. L'ARNm de GPR55 a été quantifié par Ryberg et al. 2007 à travers divers organes de la souris, notamment les glandes surrénales, le système gastrique et plusieurs structures du SNC (Ryberg et al., 2007). GPR55 est décrit comme étant un récepteur atypique du système endocannabinoïde. Depuis de nombreuses années des évidences s'accumulent pour l'existence d'un 3<sup>e</sup> récepteur cannabinoïde, et GPR55 semble être un des candidats favoris.

### **Évidence d'un 3<sup>e</sup> récepteur non-CB1/2R**

Dès le début des années 2000, plusieurs équipes émettent l'hypothèse d'un récepteur cannabinoïde non-CB1, non CB2. Au départ, cette idée a été proposée dans le système vasculaire méésentérique, mais plusieurs évidences dans le système nerveux central ont été apportées ensuite (Begg et al., 2005; Járai et al., 1999). Une première équipe suggère l'existence d'un récepteur sensible aux cannabinoïdes non-CB1R dans l'hippocampe. Cette étude rapporte que l'agoniste synthétique WIN55,212-2, inhibe les EPSCs des cellules pyramidales du CA1 aussi bien dans les souris sauvages que dans les souris *knockouts* pour CB1R. (Hájos et al., 2001). Ces données concordent avec celles d'une autre étude dans l'hippocampe montrant que l'activation du mGluR entraîne la relâche d'endocannabinoïdes dans les neurones pyramidaux CA1, causant une dépression à court terme, dans des souris sauvages et *knockout* pour le CB1R. Ces résultats suggèrent l'existence d'un récepteur sensible aux cannabinoïdes autre que CB1R (Rouach et Nicoll, 2003).

GPR55 semble à l'heure actuelle être le principal candidat pour le titre de 3<sup>e</sup> récepteur cannabinoïde, bien que quelques réserves soient émises (Godlewski et al., 2009; Ryberg et al., 2007), notamment à cause du fait que sa séquence d'acide aminé ne présente que très peu de similitudes avec les récepteurs classiques, 13.5% avec CB1R et 14.4% avec CB2R. De plus, certains endocannabinoïdes montrent une très faible sélectivité pour le récepteur et ne l'activerait que partiellement, contrairement à des biolipides actifs non-cannabinoïdes comme le LPI. Également, GPR55 n'appartient pas à la même famille de GPCR que CB1/2R et aurait des effets opposés sur les neurones. CB1/2R induisent une inhibition de la libération de neurotransmetteur alors que GPR55 permettrait sa facilitation. Enfin, il ne possède pas le site de liaison classique aux cannabinoïdes présent sur CB1/2R (Petitet et al., 2006).



Cependant, Marichal-Cancino et al. 2013 avancent que ces arguments ne sont pas suffisants pour exclure la possibilité que GPR55 soit un récepteur du système endocannabinoïde. En effet, dans le système sérotoninergique, certains de ses récepteurs appartenant à la même famille présentent une faible homologie de séquences. Le manque d'homologie pourrait expliquer les différences dans les voies de signalisation associées à GPR55 et leur fonctionnalité opposée (Marichal-Cancino et al., 2017). De plus, le LPI par l'action de la lyso-PLC permet de produire du 2-AG (Higgs et Glomset, 1994). Enfin, plusieurs études rapportent des interactions fonctionnelles entre les récepteurs CB1, CB2 et GPR55 (Marichal-Cancino et al., 2013; Martínez-Pinilla et al., 2014; Yang et al., 2016).

### **Pharmacologie du récepteur GPR55**

Dans la catégorie des ligands endogènes spécifiques à GPR55, on peut retrouver le LPI, identifié par Oka et al., 2007 comme étant un agoniste endogène du récepteur GPR55, jusqu'ici orphelin. Le LPI n'est pas un composé unique, mais une famille de biophospholipides, pouvant présenter des variations dans la chaîne d'acyl. Ces variations pourraient modifier l'efficacité de l'activation de GPR55. Le LPI est produit à partir du PI par la PLA1, une phospholipase indépendante du  $Ca^{2+}$ , ou une PLA2 dépendante du  $Ca^{2+}$ . La PLA1 permet de produire du 2-arachidonoyl LPI alors que la PLA2 permet de produire du 1-stearoyl-LPI. Dans l'ensemble, le LPI se retrouve à une concentration de 20-40nmol/g dans le cerveau de rongeurs et c'est la forme 1-stearoyl-LPI qui est la plus abondante. Mais le 2-arachidonoyl LPI serait plus efficace pour lier GPR55 (Oka et al., 2009). La dégradation du LPI permet de réguler l'activation de GPR55. Elle peut être réalisée par 4 lipases, la lyso-PLA, la lyso-PLD, la phospholipase C spécifique au LPI et la lyso-PLC. Cette dernière permet de produire du 2-AG à partir du LPI (Alhouayek et al., 2018; Calvillo-Robledo et al., 2022). Le lyso-phosphatidyl- $\beta$ -D-glucoside (LysoPtdGlc) produit à partir du phosphatidyl- $\beta$ -D-glucoside des glies radiaires et des astrocytes naissants est également capable d'activer GPR55 (Guy et al., 2015).

La capacité de GPR55 à être pleinement activé par les endocannabinoïdes est contestée, notamment par le 2-AG et l'AEA. Cependant, GPR55 possède une affinité, bien que faible, pour certains NAEs, comme le 2-AGE, le virodhamine, le NADA et le PEA (Ryberg et al., 2007).

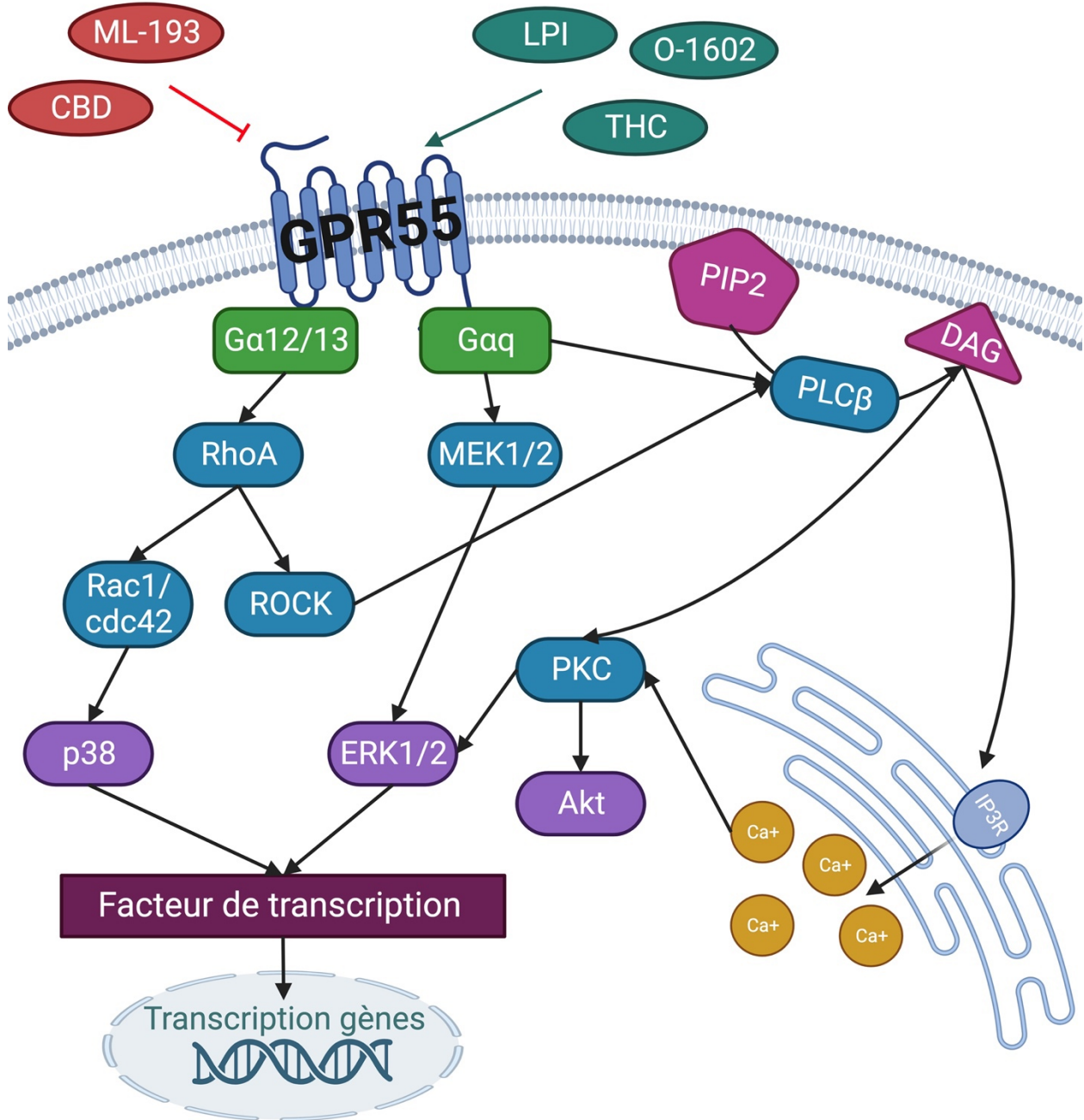
Les deux phytocannabinoïdes principaux de la plante de cannabis sont également capables d'activer GPR55 de manière non spécifique, le THC est un agoniste, alors que le CBD est un antagoniste (Ryberg et al., 2007).

Dans le cadre de l'étude des fonctions de GPR55, des ligands synthétiques spécifiques ont été développés. Bien que sa structure soit analogue à celle du CBD l'O-1602 bien que sa structure soit analogue à celle du CBD est un agoniste dit « spécifique » de GPR55 puisqu'il ne démontre qu'une très faible affinité pour le récepteur CB1 ou le récepteur CB2. Cependant, certaines études rapportent qu'il pourrait également activer GPR18 (Ashton, 2012). Le ML-193 et le CID16020046 sont des antagonistes spécifiques à GPR55 (Kargl et al., 2013).

GPR55 est couplé à une protéine  $G_{\alpha 12/13}$  ou  $G_{\alpha q}$ , et son activation par le LPI entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Lorsque couplé à une  $G_{\alpha q}$ , celle-ci va activer une  $PLC\beta$  entraînant la libération de  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique via la production de IP3. Le  $Ca^{2+}$  relâché ainsi que le DAG produit par la  $PLC\beta$ , permettront l'activation de plusieurs isoformes de PKC, conduisant à l'activation de plusieurs facteurs de transcription via la phosphorylation de ERK1/2. La  $G_{\alpha q}$  permet également d'activer la voie de MAPK-ERK1/2 conduisant également à l'activation de facteur de transcription. Lorsque couplé à une  $G_{\alpha 12/13}$ , son activation conduit à celle de petite GTPase, RhoA, Rac1, cdc42, ROCK aboutissant finalement à l'activation de facteurs de transcription (Alhouyeyk et al., 2018; Calvillo-Robledo et al., 2022). Cependant, ces voies de signalisation peuvent être considérées comme une simplification de la pharmacologie très complexe de GPR55. En effet, l'activation des voies de transcription est dépendante du ligand, voire dans certains cas du type cellulaire (**Figure 4.**) (Moriconi et al., 2010).

Plusieurs hypothèses sont avancées par Alhouyeyk et al., 2018 pour expliquer la complexité de la pharmacologie de GPR55. La première est le principe des agonistes biaisés, selon lequel certains agonistes sont capables d'activer seulement certaines voies de signalisation spécifiques du récepteur. La seconde est que GPR55 serait soumis à la modulation allostérique. Un modulateur allostérique par sa liaison ailleurs qu'au site orthostérique module l'effet d'un autre ligand. La troisième réside dans le fait que GPR55 est capable de former des hétérodimères avec les récepteurs CB1/2R, et de cette manière il pourrait y avoir des effets d'agonisme/antagonisme

croisé entre CB1/2R et GPR55. La liaison d'un antagoniste à un récepteur CB1 dimérisé avec le GPR55 pourrait prévenir son activation. Enfin, une dernière explication serait des interférences (*crosstalk*) dans les voies de signalisation lorsque GPR55 et CB1/2R seraient exprimés dans la même cellule (Alhouayek et al., 2018).



**Figure 4.** – Voies de signalisation en aval de GPR55

*GPR55 est couplé à une protéine  $G_{\alpha 12/13}$  ou une  $G_{\alpha q}$ . Lorsque couplé à une  $G_{\alpha 12/13}$  l'activation de GPR55 entraîne l'activation de la voie de RhoA, Rac1, cdc42 aboutissant à l'activation de facteur de transcription. La protéine  $G_{\alpha 12/13}$  permet aussi l'activation de la PKC via l'activation de ROCK. Lorsque couplé à une protéine  $G_{\alpha q}$  l'activation de GPR55 stimule l'activité de la PLC $\beta$  aboutissant via la libération de  $Ca^{2+}$  intracellulaire à l'activation de la PKC. La protéine  $G_{\alpha q}$  peut aussi promouvoir l'activation de facteurs de transcription via l'activation de la voie de MAPK. Abréviations : CBD cannabidiol, LPI lysophosphatidylinositol, THC  $\Delta 9$ - tétrahydrocannabinol, RhoA ras homolog family member A, MEK1/2 mitogen-activated protein kinase kinase, ROCK Rho-associated coiled-coil containing kinases, ERK1/2 extracellular signal-regulated kinases, Akt protéine kinase B, PIP2 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, DAG diacylglycerol, IP3R récepteur inositol trisphosphate, PLC $\beta$  phospholipase C  $\beta$ , cdc42 cell division control protein 42 homolog, p38 (p38 mitogen-activated protein kinases), Rac1, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1. Créé avec BioRender.com, adapté de Alhouayek et al., 2018.*

### **Fonctions dans le SNC**

GPR55 est exprimé dans les neurones et les cellules gliales (Kallendrusch et al., 2013; Ryberg et al., 2007). Son ARNm se retrouve à travers plusieurs structures du SNC, telles que le striatum, l'hypothalamus, le tronc cérébral, l'hippocampe, le cervelet et la moelle épinière (Ryberg et al., 2007). Malheureusement, ni cette étude ni aucune autre à ma connaissance n'explorent l'expression de GPR55 dans le cortex visuel. Bien que les niveaux d'expression de GPR55 soient nettement inférieurs à ceux de CB1R dans le cerveau, il a été relié à plusieurs fonctions, comme la coordination motrice, la neuroprotection, la nociception, la formation de la mémoire procédurale, l'anxiété, mais aussi dans la régulation de l'activité neuronale et la plasticité synaptique (Hurst et al., 2017; Kallendrusch et al., 2013; Marichal-Cancino et al., 2017; Shen et al., 2022; Shi et al., 2017; Sylantsev et al., 2013; Wu et al., 2013).

Plusieurs études se sont intéressées au rôle de GPR55 dans l'activité neuronale. GPR55 a été localisé en présynaptique au niveau des collatérales de Schaffer, et son activation par le LPI entraîne une augmentation de la probabilité de libération glutamatergique au niveau des synapses du CA3-CA1. L'augmentation de l'excitabilité neuronale produite par GPR55 est décrite comme dépendante de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire présynaptique. Cette même étude a montré que la potentialisation à court terme après une stimulation en *burst* a une composante

dépendance de GPR55 et de la synthèse de LPI (Sylantsev et al., 2013). Plus tard, une autre équipe a montré que GPR55 est capable de moduler la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe, puisque l'activation de GPR55 par le LPI augmente la LTP. Récemment, une autre équipe affirme que le LPI affaiblit l'inhibition postsynaptique dans l'hippocampe en dispersant les regroupements de la protéine d'arrimage géphyrine et les récepteurs GABA<sub>A</sub> contenant la sous-unité  $\gamma_2$  (Rosenberg et al., 2023). De plus, dans les cellules HEK293 exprimant de manière transitoire GPR55, son activation inhibe les courants potassiques de type M (Lauckner et al., 2008). Puisqu'il a été montré que le blocage de ces courants a pour conséquence de dépolariser le potentiel de membrane, on peut supposer que ce mécanisme pourrait également être impliqué dans la régulation de l'activité neuronale dépendante de GPR55 (Wladyka et Kunze, 2006).

Il a par la suite été démontré que GPR55 est capable de moduler la libération de neurotransmetteur dans les synapses du CA3-CA1, la plasticité synaptique ainsi que d'influencer la balance d'excitation-inhibition dans l'hippocampe (Hurst et al., 2017; Rosenberg et al., 2023; Sylantsev et al., 2013).

GPR55 est également impliqué dans le système visuel. En effet il a été localisé au niveau de la rétine, au niveau du segment interne des bâtonnets, suggérant son implication dans la vision scotopique. Les résultats d'électrorétinogrammes vont également en ce sens. Chez le singe vervet, l'injection intraoculaire de LysoPtdGlc, un agoniste du récepteur, a augmenté l'amplitude de l'onde-b en condition scotopique alors que l'injection d'un antagoniste CID16020046 l'a diminuée. Bouskila et al. 2015 proposent que la liaison du LysoPtdGlc à GPR55 couplé à une protéine G <sub>$\alpha_{13}$</sub> , entraîne une activation de la voie RhoA, ROCK, PLC provoquant l'ouverture des canaux Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Cette ouverture entrainerait la dépolarisation de la membrane et ainsi l'augmentation de l'amplitude de l'onde-b en lien avec l'augmentation de la transmission glutamatergique sur les cellules bipolaires de type ON associées aux bâtonnets. L'antagonisation du récepteur aurait l'effet inverse (Bouskila et al., 2016). Enfin, GPR55 est impliqué dans le développement du système visuel (Cherif et al., 2015).

## Fonctions dans le développement du SNC

Comme discuté précédemment, le système endocannabinoïde est impliqué dans le développement du SNC. La présence et l'étude de GPR55 ont révélé son implication lors de plusieurs étapes du développement des circuits neuronaux.

L'équipe de Hill et al. 2018 s'est intéressée à l'impact de la modulation de GPR55 dans la neurogenèse. L'activation de GPR55 sur des cellules souches neurales humaines augmente leur prolifération et la différenciation neuronale *in vitro*. Des données concordantes *in vivo* ont été retrouvées. L'injection continue dans l'hippocampe d'un agoniste de GPR55 a entraîné une augmentation de la prolifération neuronale alors que les souris *knockouts* pour GPR55 démontrent une diminution de la prolifération et de la neurogenèse (Hill et al., 2018). De plus, GPR55 aurait un effet neuroprotecteur sur les cellules souches neurales face à la réduction de leur prolifération causée par l'inflammation (Hill et al., 2019).

Plusieurs études montrent également que GPR55 est impliqué dans le guidage axonal. Le LysoPtdGlc sécrété par les glias radiaires au niveau dorso-médial est impliqué dans la ségrégation spatiale des axones nociceptifs de la moelle en dorso latérale. En liant GPR55, le LysoPtdGlc entraîne la répulsion des axones nociceptifs dans la partie dorso latérale de la moelle. La perte de fonction du LysoPtdGlc ainsi que la délétion de GPR55 entraînent une mauvaise ségrégation des axones nociceptifs. Des projections nociceptives se retrouvent dans la partie dorso-médiale recevant habituellement des projections proprioceptives. De cette manière GPR55 serait impliqué dans le guidage des axones nociceptifs dans le développement du SNC et dans la ségrégation des modalités sensorielles de la moelle épinière (Guy et al., 2015). Hosni et al., 2015 se sont intéressés à l'implication de GPR55 dans le développement du système nerveux visuel. Ils ont montré que GPR55 est exprimé dans la rétine en développement et dans les projections axonales des cellules ganglionnaires de la rétine, dans leurs cônes de croissance et leurs filopodes. De plus, sa modulation pharmacologique est capable d'influencer la croissance et le guidage des axones. En effet, l'application d'agoniste à faible concentration (LPI 1 $\mu$ M, O-1602 0,3 $\mu$ M), entraîne une augmentation de la surface du cône de croissance et du nombre de filopodes à son extrémité en activant la voie ERK1/2. Alors que l'application d'antagoniste comme le CBD ou de forte concentration de LPI (10 $\mu$ M) entraîne une répulsion et l'effondrement du cône de

croissance. Les effets du CBD sont produits par une régulation négative de la voie de ERK1/2, alors que les effets du LPI 10  $\mu$ M sont produits par l'activation de la voie de RhoA. Ce changement dans les effets et la voie de signalisation activés par le LPI, montre un effet dose dépendant de ce lipide bioactif. Enfin, ils ont également montré que GPR55 à un rôle important dans le guidage des projections rétiniennes dans le développement. Chez les souris mutantes dont le gène codant pour GPR55 a été délété, ils ont observé une diminution de la ségrégation spécifique à chaque œil dans les colliculi supérieurs et le noyau dorsal du corps genouillé latéral. De même, l'injection intravitréenne d'agoniste de GPR55 entraîne des projections aberrantes en ipsilatéral dans ces mêmes régions (Cherif et al., 2015).

Considérant que plusieurs protéines et molécules impliquées dans le guidage axonal le sont également dans la formation de contacts synaptiques, il a été proposé que GPR55 puisse contribuer à la synaptogenèse. L'activation de GPR55 augmente la formation de filopodes par une voie dépendant de la phosphorylation des MAPKinases ERK1/2. De plus, l'activation de GPR55 peut entraîner une activation de la PKC et la libération intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Alhouayek et al., 2018; Ross, 2009). L'activation de ces voies de signalisation, MAPK-ERK1/2, PKC,  $Ca^{2+}$  intracellulaire, ont été reliées à la formation de nouvelles synapses (Berridge, 1998; Giachello et al., 2010; Mateos-Aparicio et Rodríguez-Moreno, 2020; Meier et al., 2003; Sen et al., 2016). Tous ces indices suggèrent une possible implication de GPR55 dans la formation de contacts synaptiques.

## Le cannabidiol, un composé de la plante de cannabis

### Le cannabidiol, une molécule aux effets complexes

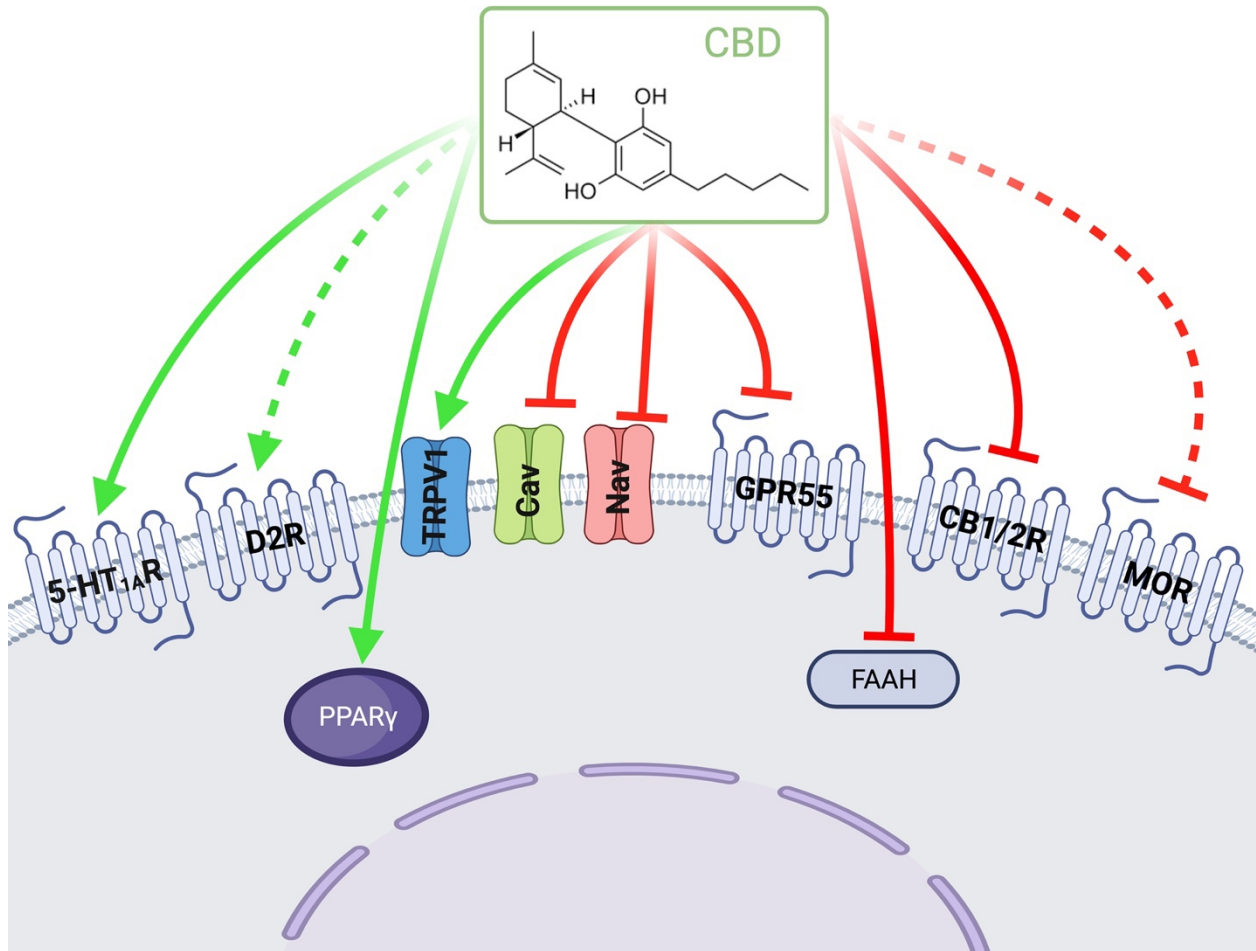


Figure 5. – Multiples cibles cellulaires du CBD.

Le CBD possède de multiples cibles cellulaires. C'est un agoniste des 5-HT<sub>1A</sub>, TRPV1, et PPAR $\gamma$ , et un agoniste partiel des D2R. Mais un antagoniste des canaux sodiques (Nav), des canaux calciques (Cav), de GPR55, de CB1/2R, de la FAAH, et il est capable d'antagoniser le MOR par modulation allostérique. Abréviations : CBD cannabidiol, D2R récepteur à la dopamine 2, PPAR $\gamma$  récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxydases, TRPV1 transient receptor potential vanilloid 1, GPR55 récepteur couplé à une protéine G 55, FAAH Fatty-acid amide hydrolase, MOR récepteur aux opioïdes mu. Créé avec BioRender.com, adapté de Almeida et Devil, 2020.



Le cannabidiol est le composé non psychoactif principal de la plante de cannabis. Plusieurs effets fonctionnels ont été associés au CBD : augmentation de l'activité motrice, effets anxiolytiques, anti-inflammatoires, anti-nauséux, antidépresseurs, il pourrait également moduler l'activité neuronale (de Almeida et Devi, 2020; Ligresti et al., 2016).

Contrairement au THC, le CBD exerce des effets anxiolytiques qui seraient reliés à sa modulation de l'activité neuronale dans certaines régions du cerveau (Campos et al., 2012). Le CBD aussi est capable de renverser les effets anxiogènes et les psychoses associées avec de hautes doses de THC notamment en inhibant la phosphorylation de ERK1/2 dans l'hippocampe ventral (Hudson et al., 2019). La modulation des effets indésirables associés aux hautes doses de THC serait atténuée par le CBD, par la modulation allostérique négative du CB1R (Laprairie et al., 2015).

Le système endocannabinoïde est l'une des cibles pharmacologiques du CBD, mais des GPCR, des canaux ioniques et des enzymes peuvent aussi être ciblés (de Almeida et Devi, 2020). Dans le système endocannabinoïde, il est reconnu comme antagoniste des récepteurs CB1/CB2 via leur site orthostérique, et paradoxalement il est également capable d'inhiber la FAAH, conduisant à une augmentation d'AEA disponible pour activer les récepteurs (De Petrocellis et al., 2011; Thomas et al., 2007). Le CBD est aussi capable de lier GPR55, ce qui entraîne son antagonisation et produit des effets dépendants de GPR55 (Ryberg et al., 2007). Le CBD cible d'autres récepteurs comme les 5HT1A, pour lesquels il possède une forte affinité, et les TRPV1. La plupart des effets associés au CBD seraient produits via l'activation de ces deux récepteurs (Bisogno et al., 2001; Russo et al., 2005). Les récepteurs à la dopamine D2, les PPAR $\gamma$ , les récepteurs aux opioïdes  $\gamma$ , les canaux Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> sont aussi des cibles du CBD. L'inhibition des canaux Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> par le CBD, peut influencer le potentiel de membrane et ainsi l'excitabilité neuronale (**Figure 5.**) (Esposito et al., 2011; Ghovanloo et al., 2018; Kathmann et al., 2006; Ryan et al., 2009; Seeman, 2016).

Les nombreux effets associés au CBD en font une cible attrayante pour la recherche de nouvelles voies thérapeutiques dans plusieurs domaines. Ces propriétés anti convulsivantes ont été étudiées et ont conduit au développement du premier médicament approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) à base de CBD purifié, l'Epidiolex®. Il est indiqué comme

anticonvulsivant chez l'enfant de plus de 2 ans dans des formes d'épilepsies sévères, les syndromes de Dravet et de Lennox-Gastaut. Dans ce type de cas précis, le ratio bénéfices/risques développementaux est positif (Golub et Reddy, 2021).

Les mécanismes d'action du CBD pour atténuer les convulsions ne sont pas encore parfaitement compris à l'heure actuelle, mais l'inhibition des canaux  $Ca^{2+}$  et de GPR55 serait de bons candidats (Kaplan et al., 2017). Le LPI régulerait la balance excitation/inhibition dans l'hippocampe, en exerçant un effet pro-exciteur et anti-inhibiteur via GPR55. De plus, les crises de convulsion augmentent l'expression de GPR55 et ainsi potentialisent l'effet exciteur du LPI. En inhibant GPR55, le CBD permet de contrer les effets exciteurs du LPI (Rosenberg et al., 2023).

### **Effets de la consommation périnatale de cannabis**

Exception faite de la nicotine, le cannabis est la drogue la plus consommée par les femmes au cours de la grossesse et de l'allaitement (Grant et al., 2018). Une étude sur sa consommation durant la grossesse, révèle que 11% des femmes présentaient des métabolites de cannabis dans leur sérum (Shiono et al., 1995). Dans les états où la consommation de cannabis récréatif a été légalisée, les femmes sont plus susceptibles de consommer en tout temps, y compris pendant la grossesse (Gnofam et al., 2020). Au États-Unis en 2015, la consommation de cannabis est perçue par certaines femmes enceintes comme plus acceptable et comprenant moins de risques pour la santé du fœtus comparativement à 2005 (Jarlenski et al., 2017). Sa consommation contre les nausées associées au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesses est une cause d'utilisation fréquente chez les mères qui consomment (Westfall et al., 2009). Pour autant, étant donné leur caractère lipophile, les composés actifs traversent aisément la barrière placentaire, exposant le fœtus à des cannabinoïdes exogènes. Également, si une mère allaite et consomme, les composés actifs peuvent être excrétés dans le lait maternel (Gómez et al., 2003). Bien que le cannabis ne soit pas reconnu comme une substance tératogène puisqu'aucun phénotype particulier n'a été associé à l'exposition prénatale, les risques pour le développement du fœtus restent préoccupants.

Des effets sur la croissance ont été rapportés. Le temps de gestation est raccourci chez les mères consommatrices. Une diminution significative du poids à la naissance, de la circonférence de la tête et de la taille des pieds a été associée à la consommation de cannabis. Pour autant, il

ne semble pas y avoir de conséquence à long terme. La croissance d'enfants avec un historique d'exposition ne montre pas de différence vers l'âge de 5 ans ni à l'adolescence (Fried et al., 1999).

Des effets comportementaux ont aussi été associés à l'exposition *in utero*. Les nourrissons exposés montrent plus de tremblements et de sursauts ainsi qu'une moins bonne adaptation à la lumière. Les auteurs rapportent que ces symptômes se rapprochent de ceux du syndrome de sevrage aux narcotiques (Fried, 1980; Fried et al., 1987). Des encéphalogrammes sur des nourrissons exposés révèlent que leurs patrons de sommeil semblent altérés, et ils présentent une augmentation des mouvements durant le sommeil jusqu'à l'âge de 3 ans (Dahl et al., 1995; Scher et al., 1988). Ces résultats suggèrent que l'exposition *in utero* au cannabis perturbe les mécanismes contrôlant l'éveil et les cycles de sommeil. Enfin, les enfants exposés montrent plus d'impulsivité et d'hyperactivité entre de 6 à 10 ans (Fried et al., 1992; Goldschmidt et al., 2000).

Des effets sur les fonctions cognitives ont été mis en avant, en particulier sur les fonctions exécutives. Chez les jeunes enfants, la mémoire à court terme, ainsi que le raisonnement verbal et visuel sont affectés par l'exposition *in utero* au cannabis (Day et al., 1994). Les études chez les animaux vont également en ce sens, montrant une forte vulnérabilité de la mémoire à court terme à l'exposition prénatale. L'altération des fonctions cognitives chez les animaux s'accompagne d'un changement dans l'expression de certains gènes des neurones corticaux, suggérant une altération de la neurotransmission d'après les auteurs (de Salas-Quiroga et al., 2015). De plus, les performances mentales des enfants semblent affectées, car les enfants de 9 mois performant moins bien selon l'échelle du développement du nourrisson de Bayley. Cependant, il est important de noter que cette différence disparaît dès 18 mois (Richardson et al., 1995).

Des altérations dans l'activité neuronale dans certaines régions du cerveau ont été retrouvées dans le groupe des enfants exposés. Des analyses en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), révèlent des changements dans l'activité neuronale lors de tâches de mémoire de travail visuospatial (Smith et al., 2004, 2006).

Enfin, chez le rat, l'exposition au CBD entraîne une diminution de la viabilité des neurones et des astrocytes ainsi qu'une altération de leur métabolisme énergétique en interagissant avec le système endocannabinoïde (Jurič et al., 2022).

Les effets rapportés chez les enfants, énoncés ci-dessus, proviennent de différentes études avec des critères d'inclusions et d'exclusions distincts, où la consommation de cannabis est mesurée de manière plus ou moins fiable, par des questionnaires autorapportés ou des tests urinaires. Également, la consommation de cannabis dans ces études est relativement importante, des études sur la consommation faible à modérée seraient plus représentatives. Les effets rapportés sont une généralisation de l'état des connaissances actuel sur les effets de la consommation de cannabis sur le développement de l'enfant. Les études menées sur les animaux permettent un meilleur contrôle des biais et des paramètres expérimentaux. Elles permettent également de mieux comprendre les effets de la consommation de cannabis sur le cerveau d'un point de vue structurel et biochimique.

## **Objectif de la recherche**

Comme précédemment discuté, l'équipe du Pr Bouchard a déjà démontré l'implication de GPR55 dans la croissance et le guidage des axones dans le SNC. Puisque plusieurs des molécules impliquées dans ces processus le sont aussi dans la synaptogenèse, le but de cette étude vise à examiner le rôle du récepteur GPR55 et l'effet de sa modulation par le CBD dans la formation de contacts synaptiques.

## Chapitre 2 – Matériels et méthodes

### Produits

Les produits Gibco : Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), milieu Neurobasal, milieu Minimum Essential Media Suspension (S-MEM), B-27, complément Glutamax, pénicilline-streptomycine et trypsine, les anticorps secondaires Alexa Fluor 488 chèvre anti-lapin (#A11008), Alexa Fluor 546 chèvre anti-souris(#A11003), Taq DNA Polymerase, dNPT, MgCl<sub>2</sub>, amorces *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>*, SyberSafe, ont été achetés chez Life Technologies. La poly-D-lysine, l'agarose, la DNase, l'anticorps primaire contre la synaptophysine (#S5768) et le Hoechst 33258 ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'anticorps primaire dirigé contre la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA (#AB1504) a été obtenu chez Millipore. L'albumine de sérum bovin (BSA) a été achetée chez Hyclone. Le sérum normal de chèvre (NGS), l'anticorps Peroxidase-AffiniPure d'âne anti-lapin IgG et l'anticorps Peroxidase-AffiniPure d'âne anti-souris IgG ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch. Le milieu de montage pour lamelle Immu-Mount a été obtenu chez Fisher Scientific. La tétradotoxine (TTX) chez Tocris. La picrotoxine (PTX) chez Abcam Biochemicals. L'Alternum est un substitut éthique du sérum de veau fœtal (FBS) et a été acheté chez Alternat Technologies. Les gels d'acrylamide 10%, les membranes de PVDF, le tampon de transfert, le réactif ECL Clarity ont été achetés chez BioRad. Le cannabidiol a été acheté chez Cayman.

### Animaux

Toutes les procédures ont été approuvées par le CDEA, le comité d'éthique sur la recherche animale de l'Université de Montréal, conformément aux lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les souris C57bl/6J de type sauvage (*gpr55<sup>+/+</sup>*) ont été achetées chez Jackson Laboratory. Les souris *gpr55<sup>-/-</sup>* dans lesquelles le gène codant pour le récepteur GPR55 est délété, ont été généreusement fournies par le Dr Ken Mackie. La méthode de délétion a été décrite par (Wu et al., 2013), dans cette souris, l'ARNm de GPR55 n'est pas traduit. Toutes les souris ont été maintenues dans une

pièce contrôlée à 22°C, avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures. La nourriture et l'eau ont été fournies à volonté.

## **Cultures de neurones corticaux primaires**

Pour les deux génotypes, les embryons (E15.5-E17) ont été obtenus à partir de souris gestantes. Les cerveaux ont été disséqués à froid dans une solution HBSS, les cortex ont été isolés et transférés dans 2 ml de S-MEM à 37°C avec 2,5% de trypsine et 2 mg/ml de DNase pendant 10 minutes. Le culot a été transféré dans 10 ml de S-MEM avec 10% d'Alternum, sur glace pendant 10 minutes. Le culot a ensuite été transféré dans 2 ml de S-MEM avec 10% d'Alternum pour une dissociation mécanique. Le surnageant a été transféré dans 5 ml de milieu Neurobasal supplémenté avec 2% de B27, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,5 mM de Glutamax. La suspension cellulaire a été filtrée à travers un tamis de 40 µm. Les cellules dissociées ont été comptées etensemencées à raison de 75 000 cellules par puit sur des lamelles de verre de 12 mm préalablement traitées avec de la poly-D-lysine suivant la méthode décrite dans (Stil et al., 2023) ou à raison de 125 000 cellules par boîtes de Petri. Les neurones ont été cultivés pendant 4 ou 19 jours dans un milieu Neurobasal supplémenté avec 2% de B-27, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,5 mM de Glutamax. Pour étudier l'effet du CBD sur la formation des contacts synaptiques, les neurones ont été traités à DIV9 pour 24 heures avec 0,3µM, 0,6µM ou 1µM de CBD. Pour l'étude du rôle physiologique de GPR55 les neurones n'ont été exposés à aucun traitement.

## **Immunocytochimie**

Pour l'étude du rôle physiologique de GPR55, les neurones exempts de traitement ont été fixés à DIV9-10 ou DIV14-15. Pour l'étude de l'impact du CBD sur la formation des synapses, les neurones ont été fixés à la fin des 24 heures de traitement, soit à DIV10. Les cultures de neurones corticaux primaires ont été rapidement lavées avec du PBS (0,1 M, pH 7,4), fixées dans du PFA (4%, pH 7,4) pendant 15 minutes, à nouveau lavées avec du PBS puis ont été incubées pour 30 minutes dans

une solution de blocage (PBS 0,1M, 2% NGS, 2% BSA, 0,1% de Tween 20, pH7,4) à température ambiante. Les neurones ont ensuite été incubés toute la nuit à 4°C dans la solution de blocage contenant l'anticorps anti-synaptophysine (SVP38) (1:500) et de l'anti-GluR1 (1:500). La synaptophysine est une protéine du complexe d'arrimage des vésicules synaptiques permettant, de localiser le compartiment présynaptique, et GluR1 est une sous-unité du récepteur glutamate AMPA, permettant d'identifier le compartiment postsynaptique et de différencier les synapses excitatrices. Le lendemain, les neurones ont été lavés et marqués avec des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes (AlexaFluor 488 et 546). Les noyaux ont été colorés avec Hoechst 33258. Les lamelles ont été montées avec un milieu de montage commercial (Immu-Mount) et les images ont été prises avec un microscope confocal FV300 (Olympus). Les neurones individuels ont été imagés à un grossissement de 100X et des images Z-stack ont été obtenues à l'aide du logiciel Fluoview.

## **Analyse des contacts synaptiques**

Les contacts synaptiques ont été détectés automatiquement à l'aide du logiciel *Intellicount* (Fantuzzo et al., 2017). Grâce aux auteurs, c'est un code open source. Nous l'avons modifié pour le rendre compatible avec le système d'exploitation Microsoft Windows. Certaines modifications ont également été apportées pour détecter un seul soma dans l'image. Bien que le code ait été initialement écrit pour détecter et délimiter un marquage MAP2, il fonctionne également avec le marquage GluR1. Les neurites positifs à GluR1 apparaissent en vert, les points positifs à la synaptophysine en rouge, et le soma en bleu ont été détectés, délimités et quantifiés. Plusieurs données sont extraites du logiciel, et nous avons utilisé la surface de l'aire marquée à l'aide de GluR1 et le nombre de points de synaptophysine pour obtenir la densité des contacts synaptiques. Nous avons également extrait la taille moyenne des points positifs à la synaptophysine par neurone.

## **Immunobuvardage (Western Blot)**

Pour l'étude du rôle physiologique de GPR55, les neurones exempts de traitement ont été lavés avec du PBS (0,1 M, pH 7,4), puis lysés à DIV4-5, DIV7, DIV9-11, DIV14-15 et DIV17-19. Pour l'étude de l'impact du CBD sur la formation des synapses, les neurones ont été lavés avec du PBS (0,1 M, pH 7,4), puis lysés à la fin des 24 heures de traitements, soit à DIV10. La lyse des échantillons a été effectuée à l'aide du tampon d'échantillon de Laemmli (« Laemmli sample buffer ») préchauffé à 100°C, les échantillons ont ensuite été stockés à -20°C. Toutes les procédures ont été effectuées selon le protocole de Bio-Rad (Taylor et Posch, 2014). Les protéines totales ont été visualisées par excitation UV dans un système d'imagerie Chemidoc (Bio-Rad). Les membranes ont ensuite été bloquées avec 5% de BSA dans du TBST (Tris 10 mM et NaCl 150 mM dans une solution saline avec 0,1% de Tween 20) pendant 1 heure et incubées pendant la nuit à 4°C avec des anticorps dirigés contre la synaptophysine (SVP38) et la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA. Elles ont ensuite été exposées à des anticorps secondaires couplés à la HRP pendant 2 heures dans un tampon de blocage et détectées à l'aide du Chemidoc avec le substrat Clarity ECL de Bio-Rad. Les expressions des protéines ont été analysées avec le logiciel Image Lab et normalisées avec l'expression des protéines totales.

## **Électrophysiologie**

Pour l'enregistrement électrophysiologique, les neurones étaient perfusés avec une solution artificielle de liquide céphalo-rachidien (LCRa) (124 NaCl, 3 KCl, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 1.6 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, and 10 dextrose (en mM)) oxygénée (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) et à température ambiante. Les pipettes de patch utilisées avaient une résistance comprise entre 4 et 6 MΩ et étaient remplies de solution interne (140 K-gluconate, 5 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 ATP, and 0.4 GTP en mM ; pH 7,2-7,3 ; osmolarité 275-285 mOsm). Les enregistrements en cellule entière ont été réalisés avec un numériseur Digidata 1440A et un amplificateur Multiclamp 700B. Le potentiel de jonction liquide a été corrigé. Les propriétés des cellules ont été enregistrées en courant imposé à -80mV, l'enregistrement a été réalisé et filtré à 10kHz. L'acquisition et l'analyse ont été effectuées à l'aide du logiciel pCLAMP (Axon Instruments Co.). Le potentiel de membrane



a été enregistré 2 minutes après le patch, en courant imposé en absence d'injection de courant. La rhéobase a été déterminée comme étant le courant minimal à injecter pour générer un potentiel d'action. La valeur a été obtenue en imposant une dépolarisation de 1 sec générée par des incréments de courant de 5pA. La fréquence de décharge a été déterminée en injectant un courant de 1sec correspondant à 2X la rhéobase déterminée précédemment, et l'enregistrement a été répété deux fois. La fréquence de décharge enregistrée pour le neurone correspond à la moyenne des trains de potentiels d'action obtenue sur les deux enregistrements. Les propriétés du potentiel d'action ont été déterminées à l'aide d'un protocole imposant des dépolarisations de 0,5 sec générées par des incréments de courant de 5pA. Le premier potentiel d'action généré a servi pour l'analyse. Le seuil du potentiel d'action a été défini comme le point en mV où la pente de la courbe atteignait 10mV/ms, et le temps auquel il survient a aussi été enregistré. La valeur maximum de pic du potentiel d'action en mV ainsi que le temps auquel il survient ont été déterminés. La durée du potentiel d'action correspond à la différence entre le temps auquel survient le pic et le temps auquel survient le seuil du potentiel en ms. L'amplitude du potentiel d'action correspond à la différence entre la valeur du seuil et la valeur du pic en mV. Pour déterminer le sag ratio et la résistance d'entrée, le protocole consiste à injecter des incréments de courant de 30pA et 1sec. Le sag ratio a été déterminé sur la première hyperpolarisation, par le potentiel minimal de la membrane divisé par le potentiel de la membrane à l'équilibre à 1sec. La résistance d'entrée en M $\Omega$  a été calculée comme la pente d'une ligne droite ajustée à courbe tension-courant (courbe V-I), elle-même obtenue à l'aide du potentiel de membrane en fonction du courant injecté. Les courants spontanés miniatures postsynaptiques excitateurs (mEPSCs), ont été enregistrés en voltage imposé à -70mV, 7 minutes après l'application de 1 $\mu$ M de tétrodotoxine (TTX) et 50 $\mu$ M de picrotoxine (PTX). L'enregistrement a été réalisé et filtré à 10kHz, avant l'analyse, l'enregistrement a été refiltré avec un Bessel (8-pole).

## Génotypage

Les souris *post mortem* ont été génotypées par PCR en utilisant l'extrémité de la queue amputée pour l'extraction de l'ADN. Les échantillons de queue ont été plongés dans une solution de NaOH

à 50 mM, chauffés pendant 20 minutes à 95°C, vigoureusement vortexés pendant 10 secondes, et neutralisés avec du Tris-HCl à 1 M, pH 8.0. Les lysats de queue obtenus ont été à nouveau vortexés pendant 10 secondes et centrifugés à 13 000 rpm pendant 8 minutes. Le surnageant a été prélevé pour l'amplification de l'ADN et ajouté au mélange réactif PCR contenant un tampon PCR, du MgCl<sub>2</sub>, un mélange de dNTP, de la Taq DNA polymérase, deux paires d'amorces pour générer les amplicons suivants : les 441 pb pour l'allèle *gpr55*<sup>+/+</sup> et les 301 pb pour l'allèle néo. Les conditions du cycle PCR étaient : 5 minutes à 95°C, 36 cycles de trois étapes (50 secondes à 94°C, 40 secondes à 55°C et 40 secondes à 72°C), puis 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été chargés dans un gel d'agarose à 1% contenant 0,01% SybrSafe, avec l'aide de tampon de chargement et ont été imagés au Chemidoc avec l'application Nucleotide Sybr Safe UV. La séquence d'amorce pour l'allèle WT était : 5'-GCCATCCAGTACCCGATCC-3' et 5'-GTCCAAGATAAAGCGGTTCC-3' et pour l'allèle mutant *gpr55* la séquence était : 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3' et 5'-TCAAGCTACGTTTTGGGTT-3'.

## Statistiques

Les données ont été importées dans le logiciel GraphPad Prism 9. Des tests de normalité ont été effectués avec le test D'Agostino-Pearson. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées en fonction de la distribution paramétrique ou non paramétrique avec l'analyse statistique appropriée. Les valeurs en delta pourcent ( $\Delta\%$ ) de *gpr55*<sup>+/+</sup> et du contrôle (CTRL) ont été rapportées sous la forme de la moyenne  $\pm$  l'erreur type (SEM). Pour les propriétés de cellules en l'électrophysiologie de type *patch clamp* avec le traitement au CBD 1 $\mu$ M les données sont brutes et présentées sous la forme de la moyenne  $\pm$ SEM.

## Chapitre 3 – Résultats

### **La délétion de *gpr55* dans les neurones corticaux entraîne une modification du patron de maturation des synapses et de leur activité synaptique.**

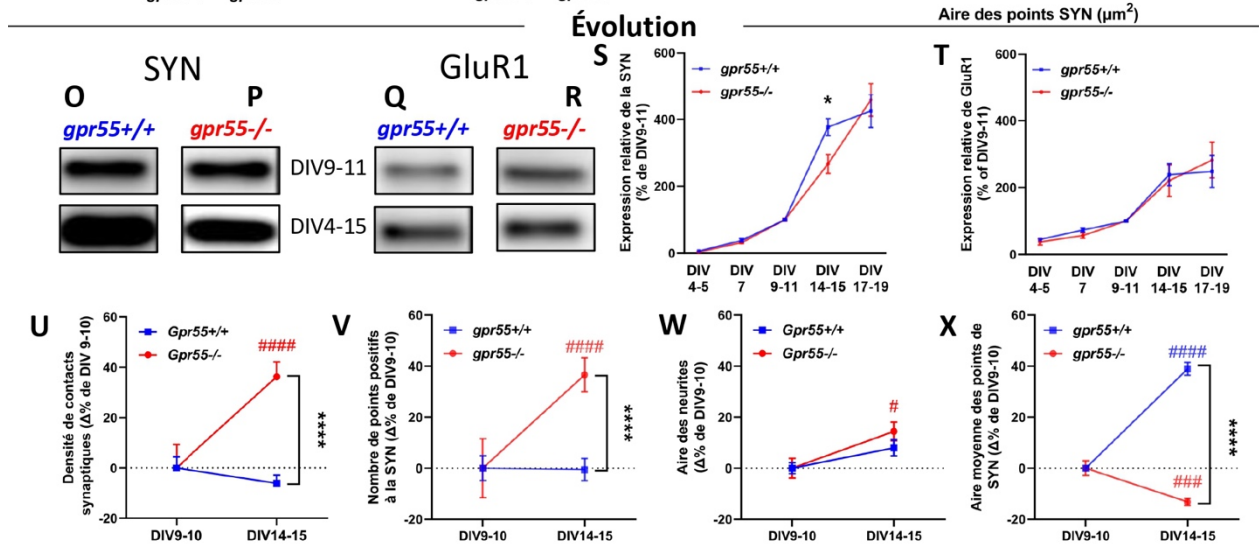
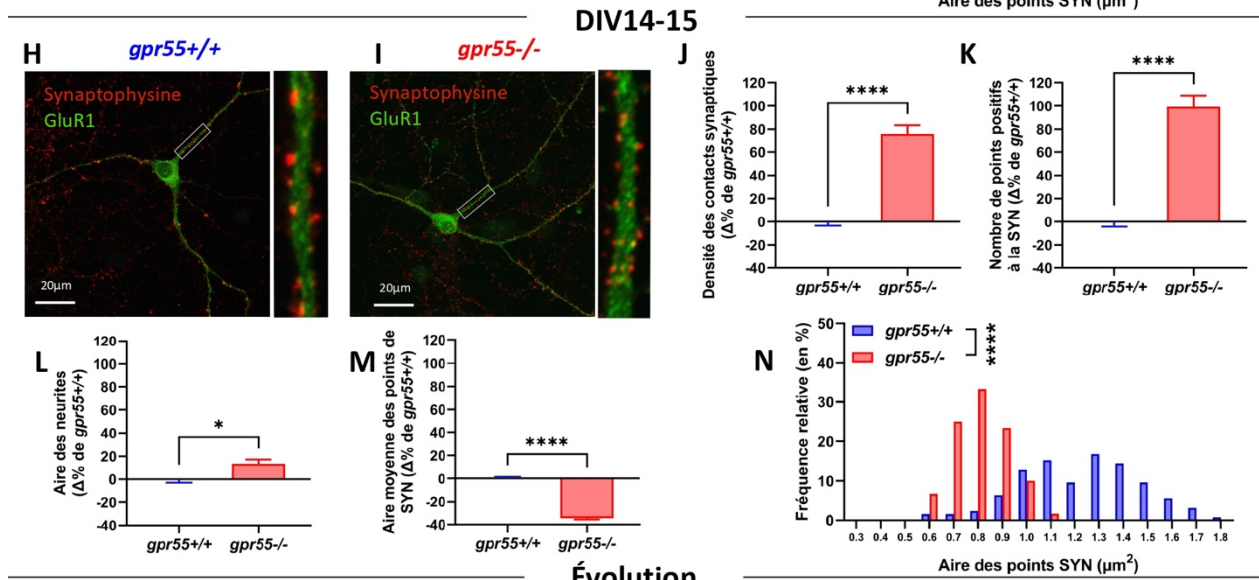
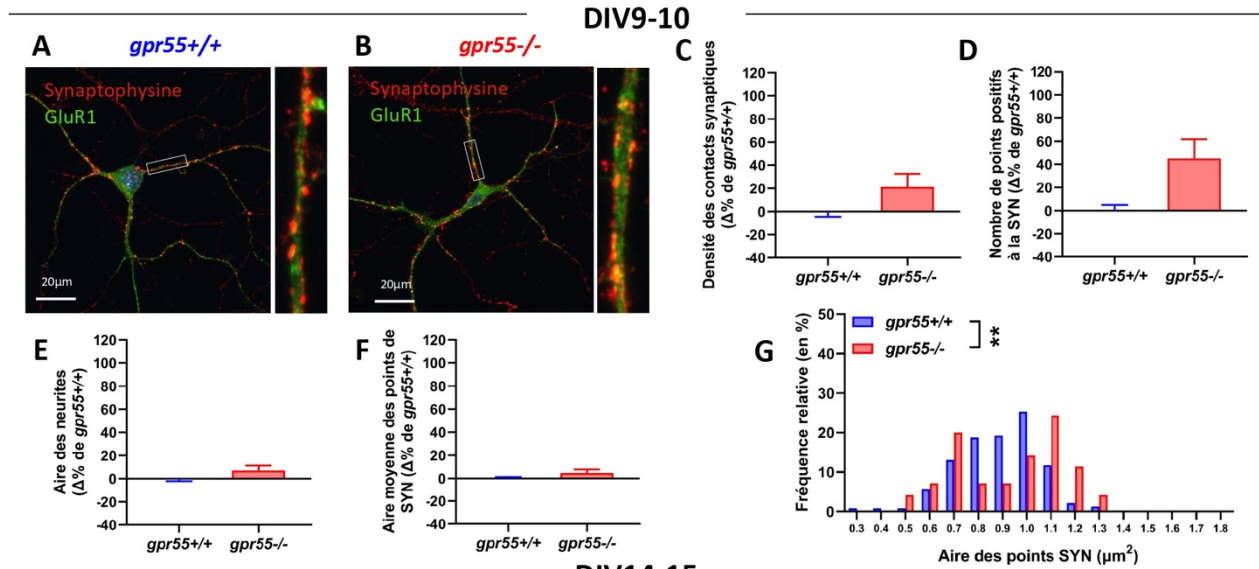
Pour mieux comprendre le rôle intrinsèque / biologique de GPR55 dans la phase de synaptogenèse, des cultures de neurones corticaux issus d'embryons de souris exprimant le récepteur (*gpr55*<sup>+/+</sup>) et d'embryons délétés pour le récepteur (*gpr55*<sup>-/-</sup>) ont été comparées. Pour dénombrer les contacts synaptiques excitateurs dans les cultures, la technique d'immunocytochimie a été utilisée. Le contact synaptique s'identifie par l'apposition d'un compartiment présynaptique marqué par la synaptophysine (SYN), une protéine du complexe SNARE, et d'un neurone exprimant la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA. Utiliser un marquage ciblant le récepteur glutamatergique AMPA permet de quantifier les contacts synaptiques sur les neurones excitateurs exclusivement. La quantification a été réalisée sur toute la longueur du neurite, en excluant le soma, et à l'aide d'un logiciel utilisant l'apprentissage automatisé (« *machine learning* ») pour optimiser la délimitation du contact synaptique. Le logiciel extrait plusieurs données, comme le nombre de points positifs à la SYN, l'aire moyenne de ces points de SYN par cellule et l'aire du marquage de GluR1. La densité de contacts synaptiques est ensuite calculée à partir du nombre de points positifs à la SYN et de l'aire du marquage de GluR1. Les données extraites du logiciel nous permettent d'évaluer la formation de contacts synaptiques ainsi que leur maturation. Le nombre de points positifs à la SYN nous permet de quantifier les contacts synaptiques sur les neurones, tandis que l'aire du marquage de GluR1 nous permet de normaliser cette valeur en fonction de la taille de leurs neurites. De plus, l'aire des neurites peut servir de marqueur de la maturation des neurones. En d'autres termes, plus un neurone est mature, plus ses neurites seront développés, ce qui se traduira par une valeur plus élevée de l'aire du marquage de GluR1 (Cline, 2009). L'aire des points de SYN nous permet d'évaluer la maturation des contacts synaptiques. Une synapse mature tend à s'élargir davantage, ce qui se traduit par une valeur plus élevée de l'aire des points de SYN (Chanda et al., 2017; Kayser et Dalva, 2014;

Runge et al., 2020). Dans notre étude, l'aire des points de SYN a été représentée de deux manières : d'abord en calculant une taille moyenne pour illustrer la maturité moyenne des connexions dans un groupe, puis en montrant comment ces tailles sont distribuées pour voir lesquelles sont les plus courantes dans chaque groupe. Toutes ces données ont été comparées entre les souches *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>*, à deux temps pour suivre de la formation des contacts synaptiques à différent stade de synaptogenèse. Un premier point a été pris au début de la phase de synaptogenèse, à DIV9-10, puis un deuxième point, à DIV14-15, plus vers la fin de la phase.

À DIV 10, l'absence de GPR55 n'entraîne pas de différence significative dans la densité de contacts synaptiques, ni dans le nombre de point positif à la SYN, ni dans l'aire des neurites (**Figure 6. A, B, C, D, E**). En revanche, bien que l'aire moyenne des points de synaptophysine ne diffère pas entre les deux génotypes, une différence significative est retrouvée dans la distribution de l'aire de ces points (**Figure 6. F, G**). En d'autres termes, l'absence du récepteur GPR55 entraîne un changement dans la taille des synapses, mais ne semble pas affecter les autres paramètres de la synaptogenèse étudiés à ce temps.

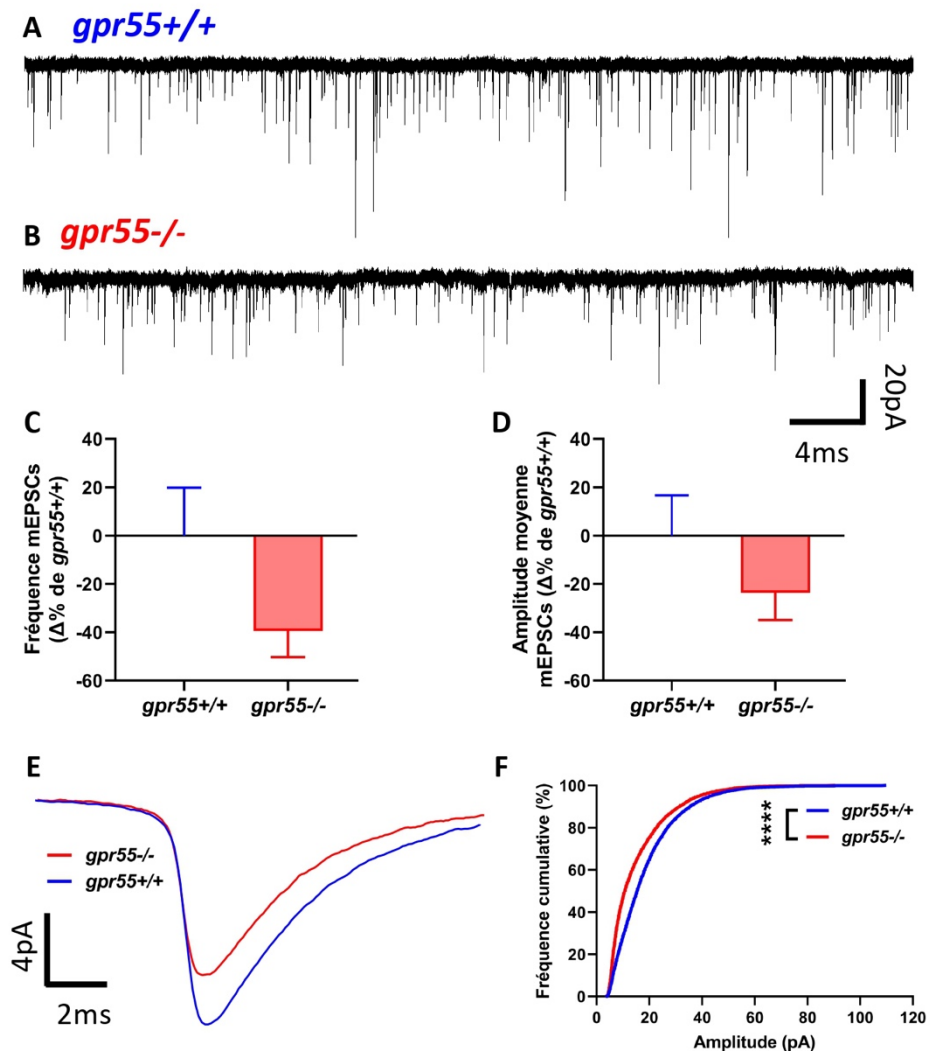
À DIV14-15, l'absence du récepteur semble avoir plus de conséquences. On observe une augmentation de la densité des contacts synaptiques en lien avec une augmentation du nombre de points positifs à la SYN et de l'aire des neurites (**Figure 6. H, I, J, K, L**). Cependant, bien qu'on observe une augmentation des précédents paramètres, une diminution dans l'aire moyenne des points est retrouvée, ainsi qu'une différence dans la distribution de leur aire (**Figure 6. M, N**). On peut retrouver plus de points de plus petites tailles dans les neurones *gpr55<sup>-/-</sup>*. La diminution de l'aire des points positifs à la SYN à DIV14-15 dans les neurones *gpr55<sup>-/-</sup>*, s'accompagne diminution de l'expression relative de cette même protéine dans les lysats de neurones *gpr55<sup>-/-</sup>* au même temps (**Figure 6. P, S**). Cependant bien qu'une augmentation de l'aire des neurites soit retrouvée à DIV14-15 dans ce même génotype, l'expression relative de GluR1 aux mêmes temps expérimentaux reste inchangée (**Figure 6. R, T**). L'évolution temporelle de la densité de contacts synaptiques, du nombre de points, de l'aire de ces points, ainsi que l'aire des neurites dans les neurones corticaux *gpr55<sup>-/-</sup>* est affectée (**Figure 6. U, V, W, X**). Ainsi, l'absence du récepteur GPR55 semble impacter l'évolution de plusieurs paramètres de la synaptogenèse, particulièrement dans une phase plus avancée.

L'étude électrophysiologique des neurones corticaux a permis d'examiner la fonctionnalité des contacts synaptiques, et de les comparer entre les deux génotypes. Les courants postsynaptiques excitateurs miniatures (mEPSCs) spontanés ont été enregistrés, leur amplitude et leur fréquence ont été analysées (**Figure 7.**). L'absence du récepteur n'a pas d'effet significatif sur la fréquence et l'amplitude moyennes des événements (**Figure 7. A, B, C, D**). On peut seulement observer pour ces deux paramètres des tendances non significatives à la diminution dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup> (**Figure 7. B, C, D, E**). Cependant, la fréquence cumulative de l'amplitude des mEPSCs entre les deux génotypes diffère significativement. Dans les cellules *gpr55*<sup>-/-</sup> la fréquence des événements de plus petite amplitude est augmentée (**Figure 7. F**).



**Figure 6.** – La délétion de *gpr55* entraîne une modification du patron de maturation synaptique des neurones corticaux *in vitro*.

Immunocytochimie sur culture de neurones corticaux *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>* à DIV9-10 au début de la phase de synaptogenèse et à DIV14-15 lorsque la phase est plus avancée. Les compartiments présynaptiques ont été marqués avec un anticorps dirigé contre la synaptophysine (SYN) (en rouge) et les neurones excitateurs avec un anticorps dirigé contre la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA (en vert). Les images acquises au microscope confocal avec un grossissement de 100X ont été analysées à l'aide de Intellicount. Images représentatives de neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* (**A, H**) et *gpr55<sup>-/-</sup>* (**B, I**) à DIV 9-10 (**A, B**) et à DIV14-15 (**H, I**), marquage SVP38 (rouge) et GluR1 (vert), avec agrandissement sur une neurite. Les résultats de la densité de contacts synaptiques (nombre de points positifs à la SYN/aire des neurites) (**C, J**), le nombre de points positifs à la SYN (**D, K**), l'aire des neurites (**E, L**), l'aire moyenne des points positifs à la SYN (**F, M**) ont été représentés en  $\Delta\%$  de *gpr55<sup>+/+</sup>* pour chaque temps. Les valeurs brutes de l'aire moyenne des points de SYN en  $\mu\text{m}^2$  ont été utilisées pour l'histogramme de la fréquence relative en % (**G, N**). La représentation des données à chaque temps en  $\Delta\%$  de *gpr55<sup>+/+</sup>*, permet d'évaluer la différence entre les génotypes à un temps. Membrane représentative de l'évolution (DIV9-11 et DIV14-15) de l'expression relative des protéines synaptiques SYN (**O, P**) et GluR1 (**Q, R**) dans les lysats de neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* (**O, Q**) et *gpr55<sup>-/-</sup>* (**P, R**). Graphique de l'expression relative de la SYN (**S**) et GluR1 (**T**) dans des lysats de neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* (en bleu) et *gpr55<sup>-/-</sup>* (en rouge) exprimé en % de DIV9-11 dans chaque génotype. L'évolution de la densité de contacts synaptiques (**U**), du nombre de points positifs à la SYN (**V**), de l'aire des neurites (**W**), et de l'aire moyenne des points positifs à la SYN (**X**) sont les mêmes données que celles représentées de A à I, mais elles sont exprimées en  $\Delta\%$  de DIV9-10 de chaque génotype. Cette représentation des données permet de rendre compte de l'évolution de ces paramètres dans un même génotype. Tous les résultats à l'exception de la fréquence relative de l'aire des points positifs à la SYN sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent des changements significatifs par rapport à *gpr55<sup>+/+</sup>*. Les # représentent des changements significatifs dans le même génotype. ####/\*\*\*\*= $p < 0,0001$  - ###/\*\*\*= $p < 0,001$  - ##/\*\*\*= $p < 0,01$  - #/\*\*\*= $p < 0,05$ . N=nombre de cultures, n=nombre de cellules pour immunocytochimie/ échantillons pour immunobuvardage. C-G et DIV9-11 de U-X : *gpr55<sup>+/+</sup>* N=5, n=229 ; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=4, n=70. J-N et DIV14-15 de U-X : *gpr55<sup>+/+</sup>* N=2, n=125; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=2, n=60. S et T DIV4 *gpr55<sup>+/+</sup>* N=1, n=2; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=1, n=3 ; DIV7 *gpr55<sup>+/+</sup>* N=2, n=4; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=2, n=4 ; DIV9-11 *gpr55<sup>+/+</sup>* N=6, n=12; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=5, n=11 ; DIV14-15 *gpr55<sup>+/+</sup>* N=5, n=9; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=5, n=10 ; DIV17-19 *gpr55<sup>+/+</sup>* N=4, n=9; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=4, n=8. S, T, U, V, W et X il ne s'agit pas de mesures répétées mais les points ont été reliés dans un soucis d'esthétique.



**Figure 7.** – La délétion du récepteur GPR55 entraîne une modification du patron de maturation de l’activité synaptique des neurones corticaux *in vitro*.

La maturation de l’activité synaptique entre les souches *gpr55*<sup>+/+</sup> et *gpr55*<sup>-/-</sup> a été étudiée en électrophysiologie de type patch clamp, en cellule entière, et les mEPSCs ont été enregistrés en voltage imposé à -70mV, 7 minutes après application de la TTX et PTX. Trace représentative des mEPSCs enregistrés dans une cellule *gpr55*<sup>+/+</sup> (A) et une cellule *gpr55*<sup>-/-</sup> (B). La fréquence des mEPSCs est exprimée en  $\Delta\%$  de *gpr55*<sup>+/+</sup> (C). L’amplitude des mEPSCs a été représentée sous forme de valeur de l’amplitude moyenne exprimée en  $\Delta\%$  de *gpr55*<sup>+/+</sup> (D), de trace moyenne (E) et de fréquence cumulative en % (F) dans les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> (bleu) et *gpr55*<sup>-/-</sup> (rouge). Les histogrammes sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent des



changements significatifs par rapport à *gpr55<sup>+/+</sup>*. \*\*\*\*= $p < 0,0001$ .  $n = \text{nombre de cellules } gpr55^{+/+} n=9 ; gpr55^{-/-} n=13$ .

## **Le cannabidiol est capable de moduler la formation de contacts synaptiques de manière partiellement ou complètement dépendante de GPR55**

Pour étudier l'effet du traitement au CBD sur la formation de contacts synaptiques, les cultures de neurones corticaux *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>* ont été exposées à DIV9 pour une durée de 24h, à différentes concentrations de CBD (0,3 $\mu$ M, 0,6 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) ou de DMSO à concentration équivalente comme groupe contrôle. La méthode d'immunocytochimie et de quantification des contacts synaptiques est identique à celle décrite précédemment. L'utilisation de neurones corticaux issus d'embryons de souris *gpr55<sup>-/-</sup>* a permis d'évaluer l'implication de GPR55 dans les effets observés sur les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* suite à l'exposition au CBD, un antagoniste du récepteur.

Dans les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>*, avec les traitements aux CBD à 0,6 et 1 $\mu$ M, la densité des contacts synaptiques est augmentée lorsqu'elle est comparée au groupe contrôle (**Figure 8. A, C**). Pour autant, l'augmentation de la densité des contacts synaptiques dans ces deux concentrations ne s'explique pas de la même façon. Dans le cas du CBD 0,6 $\mu$ M, l'augmentation de la densité s'explique par une augmentation du nombre de points positifs à la SYN alors que l'aire des neurites reste inchangée. Au contraire, dans le cas du CBD 1 $\mu$ M, l'augmentation de la densité des contacts synaptiques s'explique par une diminution de l'aire des neurites alors que le nombre de points positifs à la SYN ne diffère pas significativement du groupe contrôle (**Figure 8. A, C, D, E**). Le traitement au CBD 0,3  $\mu$ M n'a pas affecté la densité de contacts synaptiques, ni le nombre de points positifs à la SYN, ni l'aire des neurites dans les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* comparée au groupe contrôle (**Figure 8. A, C, D, E**). Les traitements aux CBD n'ont pas affectée l'aire moyenne des points de synaptophysine dans les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* (**Figure 8. F**).

Les mêmes expériences ont été réalisées sur des cultures de neurones corticaux provenant d'embryons *gpr55<sup>-/-</sup>*, pour étudier l'implication du récepteur dans les effets observés lors de

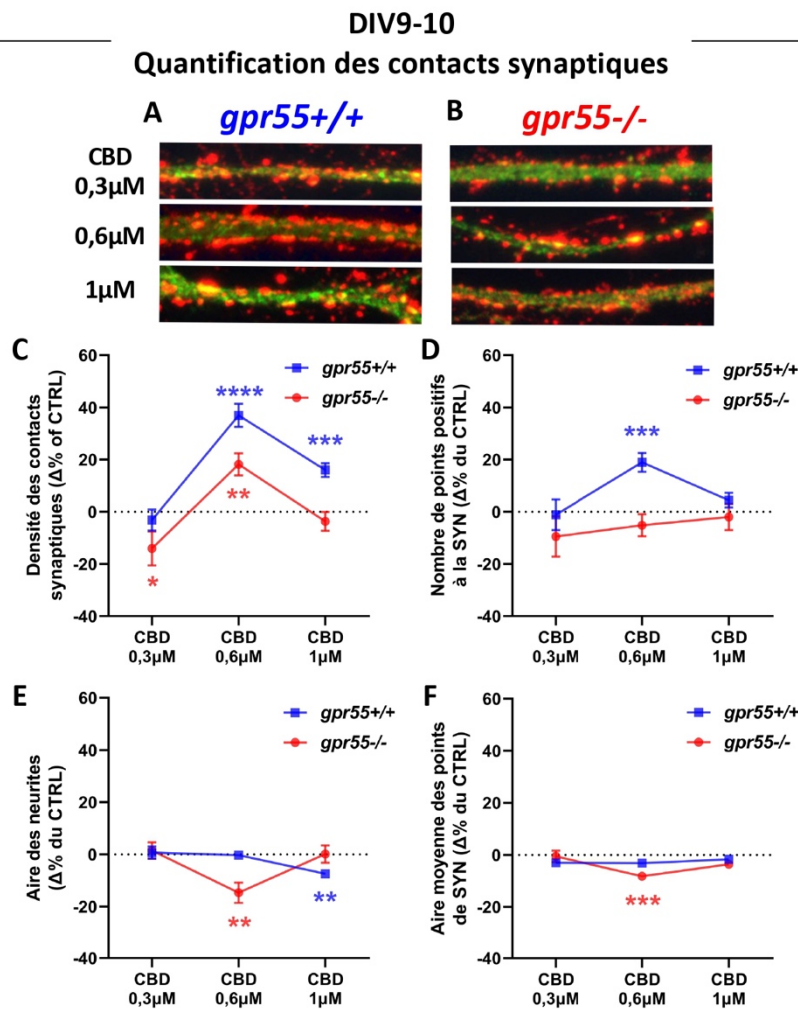
l'addition de CBD sur les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>*. L'exposition à 0,3 $\mu$ M de CBD, entraîne une diminution de la densité de contacts synaptiques s'expliquant par des tendances non significatives à la diminution du nombre de points positifs à la SYN, et une augmentation de l'aire des neurites (**Figure 8. B, C, D, E**). L'aire des points de SYN est inchangée par le traitement (**Figure 8. B, F**). Le traitement au CBD 0,6 $\mu$ M continue de montrer des effets dans les neurones *gpr55<sup>-/-</sup>*, bien que moindres. On retrouve une augmentation de la densité des contacts synaptiques, mais qui s'explique cette fois-ci par une forte diminution de l'aire des neurites alors que le nombre de points positifs à la SYN ne diffère pas significativement (**Figure 8. B, C, D, E**). L'aire moyenne des points de SYN est diminuée par le traitement au CBD 0,6 $\mu$ M (**Figure 8. F**). Aucun des effets du traitement au CBD 1 $\mu$ M observé dans les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* n'a été retrouvé dans ceux *gpr55<sup>-/-</sup>* (**Figure 8. B, C, E**). Le traitement au CBD 1 $\mu$ M dans les neurones *gpr55<sup>-/-</sup>* n'a pas eu d'effet sur l'aire des points de SYN (**Figure 8. B, F**).

Dans les lysats de neurones *gpr55<sup>+/+</sup>*, l'expression des protéines synaptiques SYN et GluR1 n'ont pas été affectées par le traitement au CBD toutes doses confondues (**Figure 9. A, B, E, F**). Dans les lysats de neurones *gpr55<sup>-/-</sup>* le traitement au CBD 0,3 $\mu$ M a diminué l'expression relative de la SYN. Cette diminution peut être mise en lien avec la diminution de la densité de contacts synaptique avec ce même traitement (**Figure 8. B, C**). Les traitements avec les autres concentrations de CBD n'ont pas eu d'effet sur l'expression des protéines synaptiques dans les neurones *gpr55<sup>-/-</sup>* (**Figure 9. C, D, E, F**).

Tous les résultats significatifs d'immunocytochimie et d'immunobuvardage avec les traitements au CBD sur les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>* ont été résumés et schématisés en une figure pour simplifier la compréhension des résultats (**Figure 10**). Les effets du CBD 1 $\mu$ M sont dépendants de GPR55 alors que ceux du CBD 0,6 $\mu$ M semblent partiellement dépendants de GPR55.

L'étude électrophysiologique des neurones corticaux exposés à 1 $\mu$ M de CBD pour 24h révèle que parmi toutes les propriétés de cellules étudiées (potentiel de membrane, sag ratio, rhéobase, résistance d'entrée, seuil de potentiel d'action, durée du potentiel d'action, amplitude du potentiel d'action et fréquence de décharge) seule la fréquence de décharge est affectée

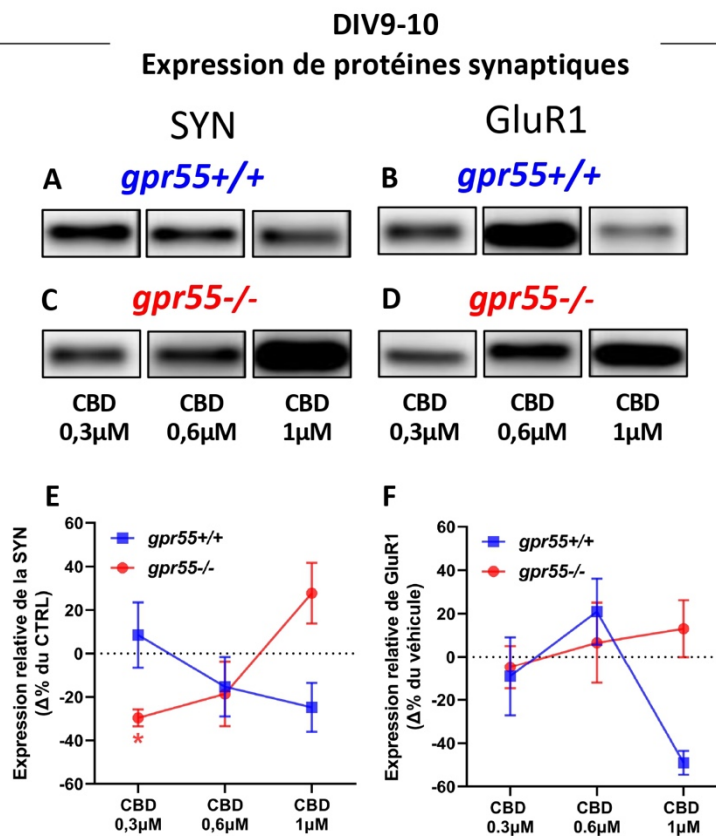
négativement par le traitement au CBD 1 $\mu$ M, et cette diminution est absente dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup> (**Tableau 1**). L'activité synaptique a été étudiée en enregistrant les mEPSCs. Dans les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> et *gpr55*<sup>-/-</sup> la fréquence et l'amplitude moyennes des évènements n'ont pas été affectées par le traitement au CBD 1 $\mu$ M (**Figure 11. A, B**). Cependant, la fréquence cumulative des évènements diffère significativement de son contrôle, dans les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> et *gpr55*<sup>-/-</sup> (**Figure 11. C, D**).



**Figure 8.** – Le cannabidiol est capable de moduler la formation de contacts synaptiques de manière partiellement ou complètement dépendante de GPR55

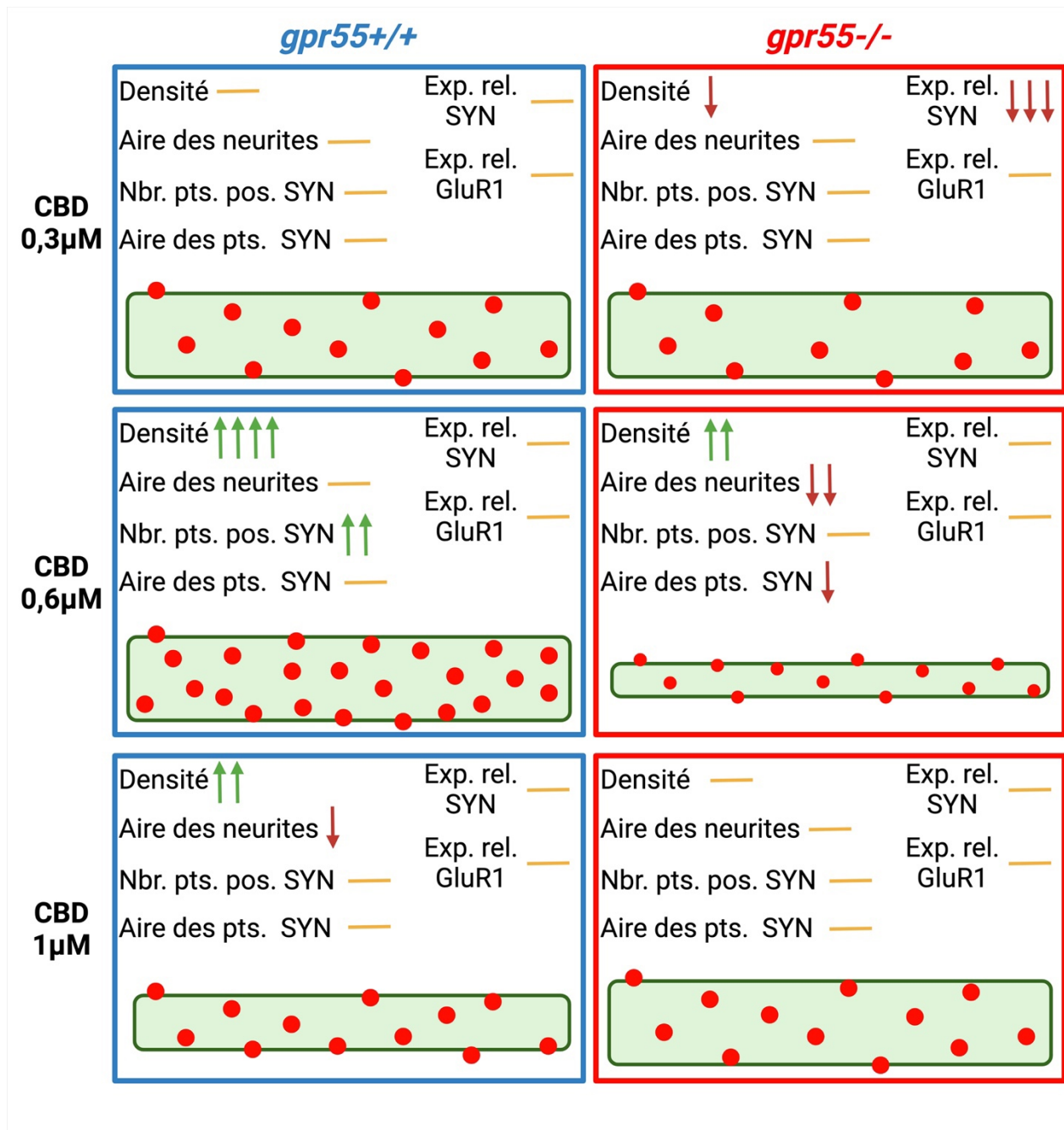
*Immunocytochimie sur culture de neurones corticaux *gpr55*<sup>+/+</sup> (A) et *gpr55*<sup>-/-</sup> (B) après 24h d'exposition à différentes concentrations de CBD (0,3 $\mu$ M, 0,6 $\mu$ M, 1 $\mu$ M). Les compartiments présynaptiques ont été marqués avec un anticorps dirigé contre la synaptophysine (SYN) (en*

rouge) et les neurones excitateurs avec un anticorps dirigé contre la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA (en vert). Les images acquises au microscope confocal avec un grossissement de 100X ont été analysées à l'aide de Intellicount. Les résultats de la densité de contacts synaptiques (nombre de points positifs à la SYN/aire des neurites) (C), le nombre de points positifs à la SYN (D), l'aire des neurites (E), l'aire moyenne des points de SYN (F) ont été représentés en  $\Delta\%$  de leur contrôle respectif (CTRL), non représentés ici (CBD 0,3 $\mu$ M – DMSO 0,3 ; CBD 0,6 $\mu$ M – DMSO 0,6 ; CBD 1 $\mu$ M – DMSO 1) dans les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> (bleu) et *gpr55*<sup>-/-</sup> (rouges). Tous les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent des changements significatifs par rapport au CTRL. \*\*\*\*= $p < 0,0001$  - \*\*\*= $p < 0,001$  - \*\*= $p < 0,01$  - \*= $p < 0,05$ . N=nombre de cultures, n=nombre de cellules pour immunocytochimie/ échantillons pour immunobuvardage. C - F CBD 0,3 $\mu$ M: *gpr55*<sup>+/+</sup> N=3, n=207; *gpr55*<sup>-/-</sup> N=3, n=64 ; CBD 0,6 $\mu$ M: N=5, n=303; *gpr55*<sup>-/-</sup> N=3, n=94 ; CBD 1 $\mu$ M: *gpr55*<sup>+/+</sup> N=8, n=370; *gpr55*<sup>-/-</sup> N=3, n=79. C, D, E et F il ne s'agit pas de mesures répétées mais les points ont été reliés dans un souci d'esthétique.



**Figure 9.** – L'exposition au cannabidiol n'a pas d'effet sur l'expression des protéines synaptiques dans les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup>

Quantification de l'expression relative de protéines synaptiques, synaptophysine (SYN) et GluR1 dans des lysats de neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>* après 24h d'exposition à différentes concentrations de CBD (0,3 $\mu$ M, 0,6 $\mu$ M, 1 $\mu$ M). Membranes représentatives de l'expression des protéines synaptiques, SYN (A, C) et GluR1 (B, D), dans les lysats de neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* (A, B) et *gpr55<sup>-/-</sup>* (C, D) après 24h d'exposition à différentes concentrations de CBD (0,3 $\mu$ M, 0,6 $\mu$ M, 1 $\mu$ M). Graphique de l'expression relative de SYN (E) et GluR1 (F) dans des lysats de neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* (bleu) et *gpr55<sup>-/-</sup>* (rouge) après exposition aux différentes concentrations de CBD exprimé en  $\Delta\%$  de leur contrôle respectif (CTRL), non représenté ici (CBD 0,3 $\mu$ M – DMSO 0,3 ; CBD 0,6 $\mu$ M – DMSO 0,6 ; CBD 1 $\mu$ M – DMSO 1). Tous les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent des changements significatifs par rapport au CTRL. \*= $p < 0,05$ . N=nombre de cultures, n=nombre de cellules pour immunocytochimie/ échantillons pour immunobuvardage. K, L CBD 0,3 $\mu$ M: *gpr55<sup>+/+</sup>* N=2, n=6; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=3, n=9 ; CBD 0,6 $\mu$ M: *gpr55<sup>+/+</sup>* N=2, n=6; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=5, n=14 ; CBD 1 $\mu$ M: *gpr55<sup>+/+</sup>* N=1, n=3; *gpr55<sup>-/-</sup>* N=4, n=12. K et E il ne s'agit pas de mesures répétées mais les points ont été reliés dans un soucis d'esthétique.



**Figure 10.** – Résumé schématique des effets du cannabidiol sur la formation de contacts synaptiques et sur l'expression des protéines synaptiques dans les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>*.

Résultats d'immunocytochimies et d'immunobuvardage dans des neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* (en cadré bleu) et *gpr55<sup>-/-</sup>* (encadré rouge) en fonction du traitement au cannabidiol (CBD) (0,3 ; 0,6 ; 1µM). Les changements significatifs dans la densité des contacts synaptiques (densité), l'aire des neurites, le nombre de points positifs à la synaptophysine (Nbr. Pts. Pos. SYN), l'aire des points de

*synaptophysine (Aire des pts. SYN), l'expression relative de la synaptophysine (Exp. Rel. SYN) et l'expression relative de GluR1 (Exp. Rel. GluR1) sont représentés par des flèches vertes pour les augmentations et des flèches rouges pour les diminutions. Les changements non significatifs sont représentés par une barre horizontale jaune. Schéma représentatif d'une neurite dans chaque condition où le rectangle vert représente une neurite exprimant GluR1 et les cercles rouges représentent les points de synaptophysine. La largeur du rectangle varie en fonction de l'aire des neurites, le nombre de points rouge varie en fonction du nombre de positifs à la SYN, et le diamètre des points varie en fonction de l'aire de points de SYN. Figure créée avec BioRender.*

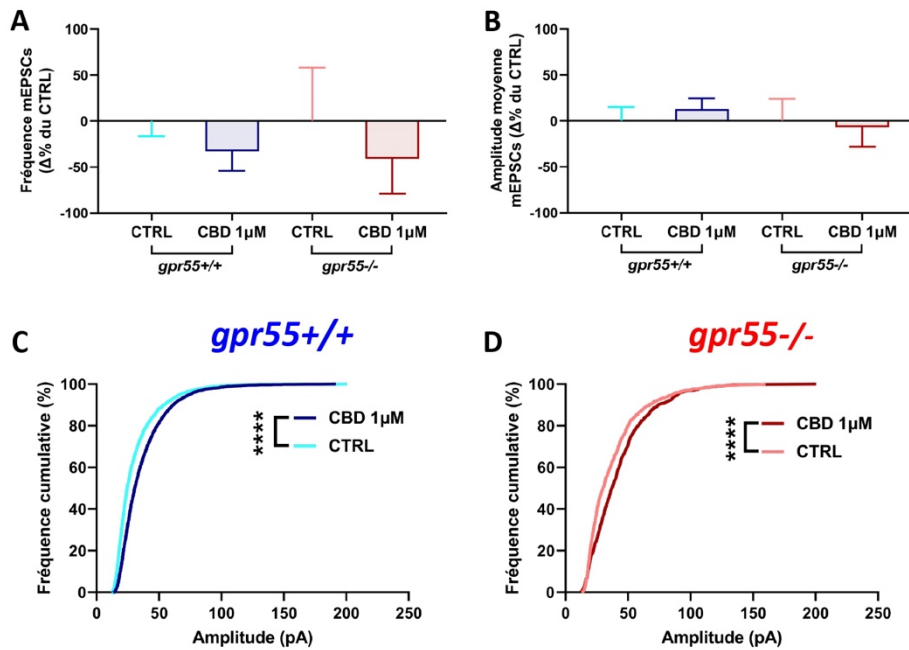
Propriété de cellule à DIV10	gpr55+/+		gpr55-/-	
	CBD 1µM	CTRL	CBD 1µM	CTRL
Potentiel de membrane (mV)	-64,2 ± 3,6 (7)	-66,58 ± 1,3 (6)	-68,0 ± 1,1 (4)	-64,0 ± 1,6 (3)
Résistance d'entrée (MΩ)	228,6 ± 29,47 (7)	188,5 ± 13,14 (6)	233,0 ± 18,03 (4)	270,3 ± 19,54 (3)
Sag ratio	1,102 ± 0,496 (7)	1,076 ± 0,024 (6)	1,027 ± 0,016 (4)	1,070 ± 0,037 (3)
Rhéobase (pA)	37,9 ± 5,7 (7)	60,0 ± 13,9 (6)	40,0 ± 6,1 (4)	51,7 ± 10,1 (3)
Fréquence de décharge (Hz)	13,6 ± 1,1 (7) *	23,7 ± 2,5 (6)	13,8 ± 3,6 (4)	13,83 ± 6,2 (3)
Seuil de potentiel d'action (mV)	-36,04 ± 2,5 (3)	-34,07 ± 6,5 (4)	X	X
Durée du potentiel d'action (ms)	1,500 ± 0,656 (3)	1,225 ± 0,132 (4)	X	X
Amplitude du potentiel d'action (mV)	59,2 ± 2,1 (3)	56,72 ± 7,7 (4)	X	X

**Tableau 1.** – L'exposition au CBD 1µM entraîne une diminution de la fréquence de décharge dépendante de GPR55, mais n'affecte pas les autres propriétés de cellules.

*L'impact de l'exposition au CBD 1µM pendant 24 heures sur les propriétés de cellules des neurones gpr55+/+ et gpr55-/- a été étudié en électrophysiologie de type patch clamp en cellule entière. Les propriétés des neurones ont été enregistrées en courant imposé à -80mV. L'âge moyen des cellules était de DIV10. Le tableau représente les résultats de l'analyse du potentiel de membrane (en mV), de la résistance d'entrée (en MΩ), du sag ratio, de la rhéobase (en pA), de la fréquence de décharge (en Hz), du seuil de potentiel d'action (en mV), la durée du potentiel d'action (en ms), et l'amplitude du potentiel d'action (en mV). Les X indique une absence de résultat dans le groupe. Les moyenne ± SEM sont présentées. Le chiffre entre parenthèse représente le nombre de cellules dans le groupe. Les \* représentent des changements significatifs par rapport au CTRL. \*=p<0,05.*

DIV10

Activité synaptique mEPSCs



**Figure 11.** – L'exposition au CBD 1 $\mu$ M n'affecte pas l'activité synaptique.

L'impact de l'exposition au CBD 1 $\mu$ M pendant 24 heures sur l'activité synaptique des neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> et *gpr55*<sup>-/-</sup> a été étudié en électrophysiologie de type patch clamp en cellule entière. Les mEPSCs, représentant l'activité synaptique, ont été enregistrés en voltage imposé à -70mV, 7 minutes après application de la TTX et PTX. La fréquence (**A**) et l'amplitude (**B**) des mEPSCs dans les neurones traités au CBD 1 $\mu$ M (bleu et rouge) ont été exprimées en  $\Delta\%$  du CTRL (cyan et rose) dans les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> (cyan et bleu) et *gpr55*<sup>-/-</sup> (rose et rouge). L'amplitude des mEPSCs a été représentée sous forme de fréquence cumulative en % (**C**, **D**) dans des neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> (**C**) et *gpr55*<sup>-/-</sup> (**D**) exposé au CBD 1 $\mu$ M (bleu et rouge) ou son CTRL (cyan et rose). Les histogrammes des mEPSCs sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent des changements significatifs par rapport au CTRL. \*\*\*\*= $p < 0,001$ . n=nombre de cellules. A-D CTRL *gpr55*<sup>+/+</sup> n=6 ; *gpr55*<sup>-/-</sup> n=3 ; CBD 1 $\mu$ M *gpr55*<sup>+/+</sup> n=8 ; *gpr55*<sup>-/-</sup> n=4.



## Chapitre 4 – Discussion générale

### GPR55, un récepteur important dans la maturation synaptique

Nous avons étudié l'impact physiologique de GPR55 dans la formation des contacts synaptiques. La délétion du récepteur entraîne peu ou pas d'effet à DIV9-10, soit au début de la phase de synaptogenèse comparativement aux neurones exprimant le récepteur (*gpr55<sup>+/-</sup>*). Cependant à DIV14-15, soit à un temps plus avancé dans la synaptogenèse, sa délétion entraîne une augmentation de la densité de contacts synaptiques, mais une diminution de l'aire des points marqués à la synaptophysine, accompagnée d'une diminution de l'expression relative de la synaptophysine. L'activité synaptique semble elle aussi affectée par la délétion de GPR55, puisque la fréquence cumulative de l'amplitude des mEPSCs est diminuée significativement, traduisant une plus grande occurrence d'évènements de plus petites amplitudes.

Une étude dans les neurones de l'hippocampe issus d'embryons de souris de souche sauvage montre qu'entre DIV4 et DIV16, on observe une augmentation de la densité de synapses ainsi qu'une augmentation de la taille des synapses (Chanda et al., 2017). La maturation de la synapse se caractérise par le recrutement de nouvelles molécules d'adhésion synaptique, et leur couplage entraîne l'activation de voies de signalisation permettant la maturation de la synapse, notamment par l'élargissement de la tête du bouton dendritique et un renforcement de l'activité synaptique (Giagtzoglou et al., 2009). Des études ont relié la taille des points de PSD-95, à la taille de la zone active présynaptique, mais également à la taille du bouton dendritique. De plus, une corrélation positive existe entre la taille du bouton dendritique et le nombre de vésicules synaptiques, ainsi qu'entre la taille du bouton et la force de l'activité synaptique (Holler et al., 2021; Hsu et al., 2017; Sanderson et al., 2020). Enfin, avec la maturation, la taille du pool de vésicules synaptiques augmente de manière parallèle aux changements architecturaux des boutons synaptiques (Mozhayeva et al., 2002). Dans notre étude, nous avons montré que la délétion de GPR55 affectait particulièrement les neurones entre DIV14-15, soit vers la fin de la période de synaptogenèse. De plus, bien qu'on observe une augmentation de la densité des contacts synaptiques, leur aire est significativement réduite, suggérant une taille du bouton

synaptique réduite. Ce qui est une caractéristique des synapses moins matures. La réduction de l'expression relative de synaptophysine dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup> à DIV14-15 suggère que la maturation du pool de vésicules synaptiques est également affectée.

L'amplitude et la fréquence des mEPSCs augmentent avec la maturation d'une synapse (Chanda et al., 2017). De plus, les études électrophysiologiques rapportent une corrélation positive entre la fréquence des mEPSCs et le nombre de synapses. Pourtant, dans le cas des neurones *gpr55*<sup>-/-</sup>, l'augmentation du nombre de synapses potentielles n'a pas eu d'effet significatif sur la fréquence des mEPSCs, et on peut au contraire voir une tendance non significative à la diminution. Ces observations supportent également le fait que ces nouvelles synapses potentielles ne sont pas matures et puisqu'elles sont moins efficaces ou silencieuses. Enfin, dans l'hippocampe l'activation de GPR55 est capable de promouvoir l'activité synaptique (Hurst et al., 2017; Rosenberg et al., 2023; Sylantsev et al., 2013). Or le développement de l'activité synaptique à une synapse naissante est un point déterminant pour sa maturation. La diminution de l'activité synaptique en lien avec l'absence de GPR55 pourrait ainsi affecter la maturation des synapses naissantes.

Il a également été démontré que GPR55 est un facteur de neuroprotection, notamment dans les modèles de dépression, et son potentiel thérapeutique dans la maladie de Parkinson est également étudié (Celorrio et al., 2017; Martínez-Pinilla et al., 2019; Shen et al., 2022). La dépression est une maladie où le nombre de synapses et leur plasticité sont affectés dans les régions qui régulent la cognition comme le cortex préfrontal et l'hippocampe, des régions où GPR55 est fortement exprimé (Duman et Aghajanian, 2012; Ryberg et al., 2007). Dans un modèle de dépression chez la souris, il a été montré que l'expression de GPR55 dans l'hippocampe était réduite, mais que son activation par un agoniste synthétique, l'O-1602, prévient le développement de la dépression, de la neuroinflammation et protège contre les altérations de la neurogenèse dans l'hippocampe (Shen et al., 2022). De plus, le LPI, l'agoniste endogène de GPR55, est capable de promouvoir l'activité synaptique dans l'hippocampe, un des effets recherchés par un traitement à l'aide d'antidépresseurs (Sylantsev et al., 2013). Le défaut de neuroprotection dans nos cultures *gpr55*<sup>-/-</sup> à DIV14-15 pourrait avoir créé des conditions défavorables à la maturation synaptique.

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un messager intracellulaire régulant de nombreuses fonctions dans les neurones, y compris dans la formation, la maturation et l'élimination des synapses ainsi que dans leur plasticité (Berridge, 1998; Mateos-Aparicio et Rodríguez-Moreno, 2020). Sa signalisation via l'activation de  $\text{PKC}\epsilon$ , une isoforme de la famille des PKC, est capable de moduler la synaptogenèse (Sen et al., 2016; Sun et Alkon, 2009). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est aussi essentiel pour l'activation d'autre protéine kinase impliquée dans la plasticité synaptique (Mateos-Aparicio et Rodríguez-Moreno, 2020; Yasuda et al., 2022). De plus, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un déclencheur pour le remodelage de l'épine dendritique, et est impliqué dans le dynamisme du cytosquelette d'actine, lui-même essentiel pour l'élargissement du bouton synaptique lors de sa maturation (Gasperini et al., 2017; Giagtzoglou et al., 2009; Nakahata et Yasuda, 2018). Or l'activation de GPR55 augmente les courants calciques intracellulaires provenant du réticulum endoplasmique (Alhouayek et al., 2018). La délétion de GPR55 impacterait de ce fait la signalisation calcique au niveau de la synapse et ainsi sa maturation. Ces observations seraient compatibles avec les résultats de notre étude montrant qu'à DIV14-15 la délétion de GPR55 semble affecter la maturation des synapses.

Puisque la délétion de GPR55 entraîne une augmentation de synapses qui semblent non matures d'un point de vue structurel et fonctionnel, nous proposons que GPR55 soit un signal régulant négativement la formation de nouvelles synapses, mais au contraire, un signal permettant de promouvoir la maturation des synapses naissantes.

## **Le cannabidiol est capable d'influencer la formation de contacts synaptique de manière partiellement dépendante de GPR55**

Le CBD a rapidement été identifié comme un antagoniste de GPR55 (Ryberg et al., 2007). Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'effet du CBD sur la formation des contacts synaptiques. Puisque le CBD possède de nombreuses cibles cellulaires possibles, nous avons utilisé plusieurs concentrations de CBD dans l'idée d'activer différentes cibles du CBD (de Almeida et Devi, 2020). L'utilisation de souris transgéniques délétées pour GPR55 permet d'évaluer l'implication de GPR55 dans les effets observés.

L'exposition au CBD 0,6 $\mu$ M et 1 $\mu$ M a entraîné une augmentation de la densité des contacts synaptiques, les effets du CBD 1 $\mu$ M sont dépendants de GPR55 puisqu'ils ne sont pas observés dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup>. En revanche, les effets du CBD 0,6 $\mu$ M sont partiellement dépendants de GPR55 puisque l'augmentation de la densité des contacts synaptiques se retrouve dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup> mais dans une moindre mesure. Les effets du CBD 0,3 $\mu$ M, pourraient au premier abord sembler indépendant de GPR55, bien que l'on n'observe pas d'effet dans les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup>, on observe une diminution significative de la densité de contacts synaptiques dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup>. Comme que mentionné précédemment le CBD possède plusieurs cibles cellulaires autres que GPR55 (de Almeida et Devi, 2020). Dans le cas du CBD 0,3 et 0,6 $\mu$ M il est possible que les autres cibles cellulaires soient activées et aient un effet antagoniste à celui produit par GPR55. Cela expliquerait la diminution de la densité des contacts synaptiques avec le CBD 0,3 $\mu$ M et la diminution partielle de la densité de contacts synaptiques avec CBD 0,6 $\mu$ M dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup>.

Les effets obtenus avec le CBD 1 $\mu$ M tendent à être similaire à ceux obtenus dans l'étude du rôle physiologique de GPR55. L'antagonisation et la délétion de GPR55 entraînent une augmentation de la densité de contacts synaptiques, sans affecter significativement l'activité synaptique. En revanche, contrairement aux neurones *gpr55*<sup>-/-</sup> l'aire des points n'est pas diminuée avec le traitement au CBD. Cette différence pourrait s'expliquer par l'âge des neurones au moment de l'exposition au CBD. Nous avons vu que l'effet physiologique de GPR55 est présent principalement à DIV14-15, alors que l'exposition au CBD a été faite à DIV9 pour 24h. Il est possible que le CBD n'ait pas eu l'opportunité d'affecter la maturation des synapses à DIV9-10. De plus, les effets d'une antagonisation pour 24h sont difficilement comparables à ceux d'une délétion du récepteur depuis la conception de l'animal. Une réorganisation fonctionnelle ne peut pas être exclue dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup>.

Le CBD semble avoir eu peu d'impact sur les propriétés électrophysiologiques des neurones, puisque seule la fréquence de décharge diminue. La fréquence de décharge varie entre les neurones et dans un même neurone à travers le temps. Elle est affectée par la géométrie de la membrane, le type de canaux ioniques ainsi que leur distribution et par l'efficacité synaptique

(Miyawaki et al., 2019). D'après nos données, il est difficile d'expliquer qu'elle pourrait être la cause de cette diminution engendrée par l'exposition au CBD.

Le potentiel thérapeutique du CBD est très étudié dans la dépression, et nos résultats sont en accord avec les données publiées. La dépression se caractérise morphologiquement par une diminution du nombre de synapses ainsi que de l'activité synaptique dans des régions responsables de la cognition telles que l'hippocampe et le cortex préfrontal. Fait intéressant, ces deux régions expriment un fort taux de GPR55, expression qui est régulée négativement lors de la dépression (Ryberg et al., 2007; Shen et al., 2022). Dans des modèles de dépression, l'exposition au CBD a eu des effets antidépresseurs, a rétabli l'expression de GPR55, a augmenté la synthèse de protéines synaptiques ainsi que le nombre d'épines dendritiques (Fogaça et al., 2018; Sales et al., 2019; Shen et al., 2022). L'augmentation du nombre de points positifs à la SYN obtenue avec le CBD 0,6 $\mu$ M à DIV10 et la délétion de GPR55 à DIV14-15, soutiennent également ces résultats. Un autre groupe de recherche étudiant l'effet du CBD en aigue (enregistrement après 20 minutes d'application) dans l'épilepsie rapporte que le CBD n'a pas d'effet sur la fréquence des mEPSCs seuls (Rosenberg et al., 2023). Dans notre étude nous n'obtenons pas d'effet significatif du CBD sur l'activité synaptique, conformément avec ces résultats. Cependant, il faut tout de même noter que l'exposition au CBD dans les neurones *gpr55<sup>+/+</sup>* et *gpr55<sup>-/-</sup>* a changé significativement la fréquence cumulative de l'amplitude des mEPSCs sans pourtant affecter significativement leur amplitude moyenne.

Bien que nos données soient cohérentes entre elles, d'après les études précédemment menées dans le guidage et la croissance axonale, nous nous attendions aux résultats opposés. En effet, dans ces études, la délétion de GPR55 ainsi que son antagonisation par le CBD ont entraîné une diminution de la croissance de neurites, et des signaux de guidage chemiorépulsif pour le cône de croissance. Au contraire, son activation a entraîné une augmentation de la croissance des neurites et des signaux chemoattractif pour les cônes de croissance (Cherif et al., 2015; Guy et al., 2015). Dans la littérature, la plupart des signaux positifs pour la croissance et le guidage des axones ont également un effet positif sur la synaptogenèse (Shen et Cowan, 2010). Pourtant dans cette étude, il semble que la délétion de GPR55 et l'exposition au CBD aient un effet positif sur la synaptogenèse. Nos observations vont à l'inverse de ce qui était attendu d'après les résultats de

guidage et de croissance des axones. Cette divergence peut s'expliquer de plusieurs façons. Dans l'étude de Cherif et al., 2015 la concentration de CBD utilisé était de 0,3 $\mu$ M, concentration à laquelle dans la présente étude nous n'obtenons pas d'effet sur la densité des contacts synaptiques dans les neurones *gpr55<sup>+/-</sup>*. Cela pourrait refléter un changement de niveau d'expression de GPR55 ou des autres cibles cellulaires du CBD entre les cônes de croissance et les neurones corticaux immatures. Il pourrait également y avoir des effets différents suivant le stade de développement. Dans l'étude de Guy et al., 2015, l'effet de GPR55 est étudié dans des neurones nocicepteurs du ganglion dorsal de la moelle épinière. Une étude a montré que l'effet du CBD pouvait changer d'une structure à l'autre du SNC, les effets de GPR55 et du CBD entre les neurones corticaux et les neurones nocicepteur de la moelle épinière pourraient donc différer (Sales et al., 2019).

## **Impact de la recherche**

Dans cette étude nous avons montré que GPR55 est impliqué dans la synaptogenèse et que sa modulation par le CBD est capable d'influencer la formation des contacts synaptiques. Puisque GPR55 est relié au système endocannabinoïde, cette étude aura permis de mieux comprendre le rôle de ce système dans le développement du SNC et en particulier dans la phase de synaptogenèse. Elle nous aura également permis d'en apprendre plus sur les fonctions que peut avoir GPR55 dans le SNC. De manière plus générale, elle nous aura permis de découvrir un autre des acteurs de la synaptogenèse.

Mieux comprendre les mécanismes de synaptogenèse, et la découverte de molécules ou de récepteurs capables de la promouvoir pourrait ouvrir la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques pour des maladies impliquant une diminution du nombre de synapses tel que dans les maladies neurodégénératives, la dépression ou la récupération post-traumatique. Par exemple dans le cas d'un AVC dans l'aire visuelle, être capable de promouvoir la synaptogenèse dans cette région pourrait augmenter les chances de retrouver les fonctions visuelles perdues chez les patients.

La légalisation du cannabis récréatif au Canada le rend plus accessible et le fait paraître moins nocif qu'il ne l'est vraiment. Pourtant la consommation de cannabis ou juste de CBD durant la grossesse ou l'allaitement a des conséquences néfastes avérées pour le fœtus et l'enfant (Augustin et Lovinger, 2022; Bara et al., 2021). Dans notre étude, nous avons montré que l'antagonisation de GPR55 par le CBD augmentait le nombre de contacts synaptiques non matures. Plus de synapses n'est pas nécessairement quelque chose de positif, tout particulièrement dans le développement du SNC, puisque la maturation et le l'élagage synaptique (« pruning ») sont des étapes tout aussi importantes dans le développement des réseaux de connexion neuronales (Paolicelli et al., 2011). Des anomalies dans l'élagage synaptique ont été associées à des troubles neurodéveloppementaux comme le spectre de l'autisme (Tang et al., 2014). Les médicaments à base de cannabis ou de leurs dérivés sont très en vogue actuellement. Le présent mémoire apporte une preuve supplémentaire que ces substances ont des cibles moléculaires multiples et des effets très divers, qui ne sont pas tous encore compris. La compréhension approfondie des effets du CBD sur le cerveau permettra d'évaluer de manière plus éclairée l'équilibre entre les avantages et les risques de son utilisation thérapeutique, afin de déterminer dans quelle mesure celle-ci est favorable.

## **Limites du modèle et des méthodes ; perspectives**

Les premières limites de cette étude viennent du modèle utilisé. Bien que la culture cellulaire de neurones corticaux présente des avantages, notamment pour la simplification du système, elle présente aussi des désavantages. Le premier est aussi son avantage principal, la simplification du modèle, nos cultures ne sont pas optimisées pour le développement des astrocytes ni des glies pourtant essentielles au bon développement et à la survie des neurones, la solution serait de faire des cocultures de ces types cellulaires. De plus, bien que les neurones soient cultivés à une densité qui leur permet de développer des connexions, il faut qu'ils restent suffisamment isolés pour des questions de quantifications en immunocytochimie. Ce type de réseau de connexions ne peut pas avoir la même richesse et la fonctionnalité qu'un réseau de connexions que l'on pourrait retrouver dans un cerveau. La solution serait d'utiliser des tranches de cerveau pour l'étude électrophysiologique. Une autre limite du modèle est la délétion constitutive de GPR55. Puisque le récepteur est absent depuis la conception de l'animal, il est

possible qu'il y ait eu des mécanismes de compensation qui se soient mis en place, permettant une réorganisation du système. Il est également envisageable que les observations de notre étude soient en partie causées par d'autres problèmes dans le développement du SNC, comme des perturbations dans la neurogenèse, de la croissance et le guidage des axones. Une solution serait de faire une délétion conditionnelle du récepteur spécifiquement durant la phase de synaptogenèse. Enfin, une des dernières limites du modèle est que les neurones corticaux proviennent d'embryons de souris. La souris, bien qu'elle soit un mammifère, reste éloignée de l'homme, et les effets observés dans cette étude pourraient ne pas être complètement transposables chez l'humain. Une solution serait d'utiliser des progéniteurs neuronaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) humaines.

Dans cette étude, nous avons utilisé des méthodes traditionnelles dans l'étude des synapses, mais certaines limites sont à souligner. Par exemple le western blot ou immunobuvardage est une méthode de quantification relative de l'expression des protéines synaptiques dans les lysats, elle est moins efficace pour détecter des modifications faibles d'expression de protéines. La méthode ELISA serait plus adaptée pour détecter des modifications fines dans l'expression de protéines. En immunocytochimie, nos limites viennent de notre méthode de quantification. En effet, nous utilisons le logiciel *Intellicount* pour quantifier nos contacts synaptiques ainsi qu'extraire plusieurs autres données. Pour que la quantification soit la plus exacte possible, il faut que le neurone prêt en photo soit relativement isolé, or la représentativité d'un neurone isolé pour quantifier des contacts synaptiques avec d'autres neurones est questionnable. Nous rencontrerions le même problème si les contacts synaptiques étaient comptés manuellement. Une critique que l'on pourrait faire à *Intellicount*, c'est qu'il ne détecte pas les points positifs à la SYN de très petite taille. Cependant, *Intellicount* reste une méthode de quantification que nous avons jugée optimale pour nous. Elle nous permet de supprimer le biais humain, de gagner beaucoup de temps dans la quantification, nous permettant de quantifier de plus grande quantité de données laissant l'opportunité à des différences faibles d'être significatives.

Une dernière limite de notre étude actuellement est que nos groupes ne sont pas tous équilibrés en nombres de neurones quantifiés. Cela s'explique par la qualité des cellules dans



certaines conditions en particulier après DIV14, et un manque de temps notamment pour l'électrophysiologie avec le CBD. Une fois les groupes complétés, certaines données pourraient devenir statistiquement significatives et confirmer ou infirmer nos hypothèses.

Enfin, cette étude fait face à une limite complètement indépendante de notre volonté, le manque de spécificité des anticorps dirigés contre GPR55. Nous avons essayé, plusieurs compagnies, plusieurs protocoles, du démasquage d'antigène, nous avons également essayé d'utiliser un ligand fluorescent de GPR55, le Tocrifluor T1117. Nous avons même essayé de contacter Rosenberg et al., 2023 qui ont publié en avril 2023 après avoir localisé GPR55 au niveau présynaptique dans l'hippocampe et confirmé leur marquage avec la même souris transgénique que nous utilisons. Nous avons reproduit le protocole tel que décrit dans l'article, utilisé l'anticorps de la même compagnie à la même concentration, mais nous obtenons du marquage dans les neurones *gpr55*<sup>-/-</sup>. Dans ces souris transgéniques, l'ARNm de *GPR55* n'est pas traduit et le génotype de nos souris a été vérifié. Nous les avons contactés pour obtenir plus de détail sur le protocole et le numéro de lot de l'anticorps. Le numéro de lot de l'anticorps utilisé pour l'article nous a été communiqué, mais malheureusement, la compagnie ne dispose plus de ce lot en stock. Ils nous ont également confié avoir constaté un manque de spécificité dans les nouveaux lots de cette même compagnie... L'hybridation *in situ* pourrait être une solution permettant de confirmer l'expression de GPR55 dans nos neurones corticaux *gpr55*<sup>+/+</sup> et de potentiellement le localiser au niveau synaptique.

Pour la suite de cette étude, il sera important d'équilibrer les groupes qui ne le sont pas, continuer d'essayer de localiser GPR55 dans nos cultures. Il sera aussi pertinent de tester l'effet du LPI, l'agoniste endogène de GPR55, sur la formation de contacts synaptique, leur maturation et leur fonctionnalité (Oka et al., 2007). Il pourrait aussi être intéressant de tester l'effet de GPR55 sur les synapses GABAergiques, puisque dans l'hippocampe le LPI via GPR55 diminue la transmission GABAergique (Rosenberg et al., 2023).

Concernant la maturation des synapses, une étude sur la forme des épines dendritiques entre les neurones *gpr55*<sup>+/+</sup> et *gpr55*<sup>-/-</sup> pourrait être pertinente puisque que leur forme reflète leur état de maturation (Kayser et Dalva, 2014). Il sera aussi intéressant de regarder si la délétion

du gène *gpr55* entraîne une altération de la maturation électrophysiologique globale du neurone en étudiant les propriétés de cellules dont la maturation est depuis longtemps décrite dans la littérature (McCormick et Prince, 1987). Enfin, l'effet du CBD 1 $\mu$ M à DIV14-15 pourrait être investigué voir si on retrouve le même patron que dans le *gpr55*<sup>-/-</sup>.

## Chapitre 5 – Conclusion

Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre le rôle physiologique que joue GPR55 dans la formation des contacts synaptiques excitateurs. Nos résultats suggèrent que ce dernier pourrait intervenir dans les phases plus tardives de la synaptogenèse, ici à DIV14-15, et qu'il serait un signal d'arrêt de la formation de nouvelles synapses, mais un signal positif pour la maturation des synapses existantes. La deuxième question de cette étude concernait l'effet du CBD sur la formation de contacts synaptiques excitateurs. Nous avons montré que l'exposition au CBD est capable de moduler la formation de nouveaux contacts synaptiques de la manière dépendante ou partiellement dépendante de GPR55. Les résultats de cette étude nécessiteront d'être complétés par des résultats supplémentaires, mais pour l'instant nous pouvons affirmer que GPR55 semble bien impliqué dans la synaptogenèse et particulièrement dans la maturation des synapses. Également, que le CBD est capable de moduler cette phase critique du développement des connexions neuronales. Ces données nous permettront à terme de mieux comprendre le rôle du système endocannabinoïde dans le développement du SNC, et d'avoir une meilleure compréhension face aux déficits induits par la consommation périnatale de cannabis.

## Références bibliographiques

- Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M. et Galve-Roperh, I. (2005, Oct). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *Faseb j*, 19(12), 1704-1706. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3995fje>
- Alabi, A. A. et Tsien, R. W. (2012, Aug 1). Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(8), a013680. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013680>
- Alger, B. E. (2012, May 15). Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J Physiol*, 590(10), 2203-2212. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.220855>
- Alhouayek, M., Masquelier, J. et Muccioli, G. G. (2018, Jun). Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands. *Trends Pharmacol Sci*, 39(6), 586-604. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.011>
- Argaw, A., Duff, G., Zabouri, N., Cécyre, B., Chainé, N., Cherif, H., Tea, N., Lutz, B., Ptito, M. et Bouchard, J.-F. (2011). Concerted Action of CB1 Cannabinoid Receptor and Deleted in Colorectal Cancer in Axon Guidance. *The Journal of Neuroscience*, 31(4), 1489-1499. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4134-09.2011>
- Ashton, J. C. (2012, Sep). The atypical cannabinoid O-1602: targets, actions, and the central nervous system. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 12(3), 233-239. <https://doi.org/10.2174/187152412802430156>
- Atwood, B. K. et Mackie, K. (2010, Jun). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*, 160(3), 467-479. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x>
- Augustin, S. M. et Lovinger, D. M. (2022, Jun 1). Synaptic changes induced by cannabinoid drugs and cannabis use disorder. *Neurobiol Dis*, 167, 105670. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105670>
- Bara, A., Ferland, J. N., Rompala, G., Szutorisz, H. et Hurd, Y. L. (2021, Jul). Cannabis and synaptic reprogramming of the developing brain. *Nat Rev Neurosci*, 22(7), 423-438. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00465-5>
- Barish, M. E. (1986, Jun). Differentiation of voltage-gated potassium current and modulation of excitability in cultured amphibian spinal neurones. *J Physiol*, 375, 229-250. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016114>
- Begg, M., Pacher, P., Bátkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertáler, L., Mo, F. M., Liu, J. et Kunos, G. (2005, May). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*, 106(2), 133-145. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.005>
- Benediktsson, A. M., Marrs, G. S., Tu, J. C., Worley, P. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E. et Dailey, M. E. (2012, Feb). Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia*, 60(2), 175-188. <https://doi.org/10.1002/glia.21249>
- Berghuis, P., Dobszay, M. B., Wang, X., Spano, S., Ledda, F., Sousa, K. M., Schulte, G., Ernfors, P., Mackie, K., Paratcha, G., Hurd, Y. L. et Harkany, T. (2005, Dec 27). Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 19115-19120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509494102>

- Berghuis, P., Rajnicek, A. M., Morozov, Y. M., Ross, R. A., Mulder, J., Urbán, G. M., Monory, K., Marsicano, G., Matteoli, M., Canty, A., Irving, A. J., Katona, I., Yanagawa, Y., Rakic, P., Lutz, B., Mackie, K. et Harkany, T. (2007, May 25). Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science*, 316(5828), 1212-1216. <https://doi.org/10.1126/science.1137406>
- Berridge, M. J. (1998, Jul). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1), 13-26. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80510-3)
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R. et Di Marzo, V. (2001, Oct). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*, 134(4), 845-852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Bouskila, J., Harrar, V., Javadi, P., Casanova, C., Hirabayashi, Y., Matsuo, I., Ohyama, J., Bouchard, J. F. et Ptito, M. (2016, Jan). Scotopic vision in the monkey is modulated by the G protein-coupled receptor 55. *Vis Neurosci*, 33, E006. <https://doi.org/10.1017/s095252381600002x>
- Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T. et Onaivi, E. S. (2008, Dec). Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse*, 62(12), 944-949. <https://doi.org/10.1002/syn.20569>
- Burgard, E. C. et Hablitz, J. J. (1993, Jan). Developmental changes in NMDA and non-NMDA receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *J Neurophysiol*, 69(1), 230-240. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.69.1.230>
- Calvillo-Robledo, A., Cervantes-Villagrana, R. D., Morales, P. et Marichal-Cancino, B. A. (2022, Jul 15). The oncogenic lysophosphatidylinositol (LPI)/GPR55 signaling. *Life Sci*, 301, 120596. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120596>
- Campos, A. C., Moreira, F. A., Gomes, F. V., Del Bel, E. A. et Guimarães, F. S. (2012, Dec 5). Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1607), 3364-3378. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0389>
- Carta, M., Lanore, F., Rebola, N., Szabo, Z., Da Silva, S. V., Lourenço, J., Verraes, A., Nadler, A., Schultz, C., Blanchet, C. et Mulle, C. (2014, Feb 19). Membrane lipids tune synaptic transmission by direct modulation of presynaptic potassium channels. *Neuron*, 81(4), 787-799. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.028>
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E. et Hashimoto, Y. (2012, Oct 4). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1), 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>
- Cécylre, B., Bachand, I., Papineau, F., Brochu, C., Casanova, C. et Bouchard, J. F. (2020, Sep 25). Cannabinoids affect the mouse visual acuity via the cannabinoid receptor type 2. *Sci Rep*, 10(1), 15819. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72553-y>
- Celorrio, M., Rojo-Bustamante, E., Fernández-Suárez, D., Sáez, E., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Müller, C. E., Ramírez, M. J., Oyarzábal, J., Franco, R. et Aymerich, M. S. (2017, Oct). GPR55: A therapeutic target for Parkinson's disease? *Neuropharmacology*, 125, 319-332. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.017>
- Chanda, S., Hale, W. D., Zhang, B., Wernig, M. et Südhof, T. C. (2017, Jul 19). Unique versus Redundant Functions of Neuroligin Genes in Shaping Excitatory and Inhibitory Synapse

- Properties. *J Neurosci*, 37(29), 6816-6836. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0125-17.2017>
- Cherif, H., Argaw, A., Cécyre, B., Bouchard, A., Gagnon, J., Javadi, P., Desgent, S., Mackie, K. et Bouchard, J.-F. (2015). Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation. *eneuro*, 2(5), ENEURO.0011-0015. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0011-15.2015>
- Chicca, A., Marazzi, J., Nicolussi, S. et Gertsch, J. (2012, Oct 5). Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem*, 287(41), 34660-34682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373241>
- Cline, H. (2009). Dendrite Development, Synapse Formation and Elimination. Dans L. R. Squire (dir.), *Encyclopedia of Neuroscience* (p. 427-430). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00347-8>
- Crocq, M. A. (2020, Sep). History of cannabis and the endocannabinoid system . *Dialogues Clin Neurosci*, 22(3), 223-228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq>
- Dabrowski, A., Johnson-Venkatesh, E. et Umemori, H. (2017). Chapter 4 - Synaptic Development. Dans P. M. Conn (dir.), *Conn's Translational Neuroscience* (p. 89-111). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00006-3>
- Dahl, R. E., Scher, M. S., Williamson, D. E., Robles, N. et Day, N. (1995, Feb). A longitudinal study of prenatal marijuana use. Effects on sleep and arousal at age 3 years. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 149(2), 145-150. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1995.02170140027004>
- Day, N. L., Richardson, G. A., Goldschmidt, L., Robles, N., Taylor, P. M., Stoffer, D. S., Cornelius, M. D. et Geva, D. (1994, Mar-Apr). Effect of prenatal marijuana exposure on the cognitive development of offspring at age three. *Neurotoxicol Teratol*, 16(2), 169-175. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0892-0362(94)90114-7)
- de Almeida, D. L. et Devi, L. A. (2020, Dec). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacol Res Perspect*, 8(6), e00682. <https://doi.org/10.1002/prp2.682>
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A. S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C. G. et Di Marzo, V. (2011, Aug). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*, 163(7), 1479-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x>
- De Petrocellis, L., Nabissi, M., Santoni, G. et Ligresti, A. (2017). Actions and Regulation of Ionotropic Cannabinoid Receptors. *Adv Pharmacol*, 80, 249-289. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.04.001>
- de Salas-Quiroga, A., Díaz-Alonso, J., García-Rincón, D., Remmers, F., Vega, D., Gómez-Cañas, M., Lutz, B., Guzmán, M. et Galve-Roperh, I. (2015, Nov 3). Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(44), 13693-13698. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514962112>
- Dent, M. A., Raisman, G. et Lai, F. A. (1996, Mar). Expression of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor during axogenesis and synaptic contact in the central and peripheral nervous system of developing rat. *Development*, 122(3), 1029-1039. <https://doi.org/10.1242/dev.122.3.1029>
- Desarmenien, M. G. et Spitzer, N. C. (1991, Nov). Role of calcium and protein kinase C in development of the delayed rectifier potassium current in *Xenopus* spinal neurons. *Neuron*, 7(5), 797-805. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90282-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90282-5)

- Duff, G., Argaw, A., Cecyre, B., Cherif, H., Tea, N., Zabouri, N., Casanova, C., Ptito, M. et Bouchard, J. F. (2013). Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance. *PLoS One*, 8(8), e70849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070849>
- Duman, R. S. et Aghajanian, G. K. (2012, Oct 5). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*, 338(6103), 68-72. <https://doi.org/10.1126/science.1222939>
- Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G. I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M. R., Iuvone, T. et Steardo, L. (2011). Cannabidiol reduces A $\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR $\gamma$  involvement. *PLoS One*, 6(12), e28668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028668>
- Etherington, S. J. et Williams, S. R. (2011, Jun 29). Postnatal development of intrinsic and synaptic properties transforms signaling in the layer 5 excitatory neural network of the visual cortex. *J Neurosci*, 31(26), 9526-9537. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0458-11.2011>
- Fantuzzo, J. A., Mirabella, V. R., Hamod, A. H., Hart, R. P., Zahn, J. D. et Pang, Z. P. (2017, Nov-Dec). Intellicount: High-Throughput Quantification of Fluorescent Synaptic Protein Puncta by Machine Learning. *eneuro*, 4(6). <https://doi.org/10.1523/eneuro.0219-17.2017>
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L. et Mitchell, R. L. (1995, Sep). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*, 48(3), 443-450.
- Flint, A. C., Maisch, U. S., Weishaupt, J. H., Kriegstein, A. R. et Monyer, H. (1997, Apr 1). NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci*, 17(7), 2469-2476. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-07-02469.1997>
- Fogaça, M. V., Campos, A. C., Coelho, L. D., Duman, R. S. et Guimarães, F. S. (2018, Jun). The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology*, 135, 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.03.001>
- Freund, T. F., Katona, I. et Piomelli, D. (2003, Jul). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, 83(3), 1017-1066. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2003>
- Fried, P. A. (1980, Dec). Marijuana use by pregnant women: neurobehavioral effects in neonates. *Drug Alcohol Depend*, 6(6), 415-424. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(80\)90023-x](https://doi.org/10.1016/0376-8716(80)90023-x)
- Fried, P. A., Watkinson, B., Dillon, R. F. et Dulberg, C. S. (1987, Dec). Neonatal neurological status in a low-risk population after prenatal exposure to cigarettes, marijuana, and alcohol. *J Dev Behav Pediatr*, 8(6), 318-326.
- Fried, P. A., Watkinson, B. et Gray, R. (1992, Sep-Oct). A follow-up study of attentional behavior in 6-year-old children exposed prenatally to marijuana, cigarettes, and alcohol. *Neurotoxicol Teratol*, 14(5), 299-311. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(92\)90036-a](https://doi.org/10.1016/0892-0362(92)90036-a)
- Fried, P. A., Watkinson, B. et Gray, R. (1999, Sep-Oct). Growth from birth to early adolescence in offspring prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol*, 21(5), 513-525. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(99\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(99)00009-4)
- Gaoni, Y. et Mechoulam, R. (1964, 1964/04/01). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646-1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>
- Gasparini, R. J., Pavez, M., Thompson, A. C., Mitchell, C. B., Hardy, H., Young, K. M., Chilton, J. K. et Foa, L. (2017, Oct). How does calcium interact with the cytoskeleton to regulate growth

- cone motility during axon pathfinding? *Mol Cell Neurosci*, 84, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.07.006>
- Ghovanloo, M. R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C. et Goodchild, S. J. (2018, Oct 26). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *J Biol Chem*, 293(43), 16546-16558. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004929>
- Giachello, C. N., Fiumara, F., Giacomini, C., Corradi, A., Milanese, C., Ghirardi, M., Benfenati, F. et Montarolo, P. G. (2010, Mar 15). MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. *J Cell Sci*, 123(Pt 6), 881-893. <https://doi.org/10.1242/jcs.056846>
- Giagtoglou, N., Ly, C. V. et Bellen, H. J. (2009). Cell Adhesion, the Backbone of the Synapse: "Vertebrate" and "Invertebrate" Perspectives. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a003079-a003079. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003079>
- Glaser, S. T. et Kaczocha, M. (2010, Nov). Cyclooxygenase-2 mediates anandamide metabolism in the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 335(2), 380-388. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.168831>
- Gnofam, M., Allshouse, A. A., Stickrath, E. H. et Metz, T. D. (2020, Jan). Impact of Marijuana Legalization on Prevalence of Maternal Marijuana Use and Perinatal Outcomes. *Am J Perinatol*, 37(1), 59-65. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696719>
- Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J. A. et Kunos, G. (2009, Sep). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3-4), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001>
- Goldschmidt, L., Day, N. L. et Richardson, G. A. (2000, May-Jun). Effects of prenatal marijuana exposure on child behavior problems at age 10. *Neurotoxicol Teratol*, 22(3), 325-336. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(00)00066-0)
- Golub, V. et Reddy, D. S. (2021). Cannabidiol Therapy for Refractory Epilepsy and Seizure Disorders. Dans (p. 93-110). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_7)
- Gómez, M., Hernández, M., Johansson, B., de Miguel, R., Ramos, J. A. et Fernández-Ruiz, J. (2003, Dec 30). Prenatal cannabinoid and gene expression for neural adhesion molecule L1 in the fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 147(1-2), 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.10.016>
- Gong, J.-P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A. et Uhl, G. R. (2006, 2006/02/03/). Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research*, 1071(1), 10-23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.035>
- Grant, K. S., Petroff, R., Isoherranen, N., Stella, N. et Burbacher, T. M. (2018). Cannabis use during pregnancy: Pharmacokinetics and effects on child development. *Pharmacology & Therapeutics*, 182, 133-151. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.014>
- Gundelfinger, E. D., Reissner, C. et Garner, C. C. (2015). Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front Synaptic Neurosci*, 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2015.00019>
- Guy, A. T., Nagatsuka, Y., Ooashi, N., Inoue, M., Nakata, A., Greimel, P., Inoue, A., Nabetani, T., Murayama, A., Ohta, K., Ito, Y., Aoki, J., Hirabayashi, Y. et Kamiguchi, H. (2015, Aug 28). NEURONAL DEVELOPMENT. Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory



- axon guidance in the spinal cord. *Science*, 349(6251), 974-977. <https://doi.org/10.1126/science.aab3516>
- Hájos, N., Ledent, C. et Freund, T. F. (2001). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*, 106(1), 1-4. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00287-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00287-1)
- Hall, B. J., Ripley, B. et Ghosh, A. (2007, Dec 5). NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *J Neurosci*, 27(49), 13446-13456. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3793-07.2007>
- Hashimoto, Y., Ohno-Shosaku, T. et Kano, M. (2007, Apr). Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist*, 13(2), 127-137. <https://doi.org/10.1177/1073858406296716>
- Higgs, H. N. et Glomset, J. A. (1994, Sep 27). Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(20), 9574-9578. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9574>
- Hill, J. D., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Winfield, M. et Persidsky, Y. (2018, Aug). Activation of GPR55 increases neural stem cell proliferation and promotes early adult hippocampal neurogenesis. *Br J Pharmacol*, 175(16), 3407-3421. <https://doi.org/10.1111/bph.14387>
- Hill, J. D., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Winfield, M., Sriram, U., Rom, S. et Persidsky, Y. (2019, 2019/02/01/). Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 76, 165-181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.017>
- Holler, S., Köstinger, G., Martin, K. A. C., Schuhknecht, G. F. P. et Stratford, K. J. (2021, Mar). Structure and function of a neocortical synapse. *Nature*, 591(7848), 111-116. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03134-2>
- Hsu, A., Luebke, J. I. et Medalla, M. (2017, Jun 15). Comparative ultrastructural features of excitatory synapses in the visual and frontal cortices of the adult mouse and monkey. *J Comp Neurol*, 525(9), 2175-2191. <https://doi.org/10.1002/cne.24196>
- Hudson, R., Renard, J., Norris, C., Rushlow, W. J. et Laviolette, S. R. (2019, Oct 30). Cannabidiol Counteracts the Psychotropic Side-Effects of  $\Delta$ -9-Tetrahydrocannabinol in the Ventral Hippocampus through Bidirectional Control of ERK1-2 Phosphorylation. *J Neurosci*, 39(44), 8762-8777. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0708-19.2019>
- Hurst, K., Badgley, C., Ellsworth, T., Bell, S., Friend, L., Prince, B., Welch, J., Cowan, Z., Williamson, R., Lyon, C., Anderson, B., Poole, B., Christensen, M., McNeil, M., Call, J. et Edwards, J. G. (2017, Sep). A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, 27(9), 985-998. <https://doi.org/10.1002/hipo.22747>
- Járai, Z., Wagner, J. A., Varga, K., Lake, K. D., Compton, D. R., Martin, B. R., Zimmer, A. M., Bonner, T. I., Buckley, N. E., Mezey, E., Razdan, R. K., Zimmer, A. et Kunos, G. (1999, Nov 23). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 14136-14141. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14136>
- Jarlenski, M., Koma, J. W., Zank, J., Bodnar, L. M., Bogen, D. L. et Chang, J. C. (2017, Dec). Trends in perception of risk of regular marijuana use among US pregnant and nonpregnant

- reproductive-aged women. *Am J Obstet Gynecol*, 217(6), 705-707. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.08.015>
- Jurič, D. M., Bulc Rozman, K., Lipnik-Štangelj, M., Šuput, D. et Brvar, M. (2022, Oct 21). Cytotoxic Effects of Cannabidiol on Neonatal Rat Cortical Neurons and Astrocytes: Potential Danger to Brain Development. *Toxins (Basel)*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/toxins14100720>
- Kalil, K. et Dent, E. W. (2005, 2005/10/01/). Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5), 521-526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.005>
- Kallendrusch, S., Kremzow, S., Nowicki, M., Grabiec, U., Winkelmann, R., Benz, A., Kraft, R., Bechmann, I., Dehghani, F. et Koch, M. (2013, Nov). The G protein-coupled receptor 55 ligand l- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. *Glia*, 61(11), 1822-1831. <https://doi.org/10.1002/glia.22560>
- Kaplan, J. S., Stella, N., Catterall, W. A. et Westenbroek, R. E. (2017, Oct 17). Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(42), 11229-11234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711351114>
- Kargl, J., Brown, A. J., Andersen, L., Dorn, G., Schicho, R., Waldhoer, M. et Heinemann, A. (2013, Jul). A selective antagonist reveals a potential role of G protein-coupled receptor 55 in platelet and endothelial cell function. *J Pharmacol Exp Ther*, 346(1), 54-66. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.204180>
- Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Tränkle, C. et Schlicker, E. (2006, Feb). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372(5), 354-361. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0033-x>
- Kayser, M. S. et Dalva, M. B. (2014). Synaptogenesis. Dans G. Kwakkel, L. Cohen, M. Selzer, R. Miller et S. Clarke (dir.), *Textbook of Neural Repair and Rehabilitation: Volume 1: Neural Repair and Plasticity* (2<sup>e</sup> éd., vol. 1, p. 317-328). Cambridge University Press. <https://doi.org/DOI:10.1017/CBO9780511995583.024>
- Keimpema, E., Calvigioni, D. et Harkany, T. (2013, Dec). Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochem Soc Trans*, 41(6), 1569-1576. <https://doi.org/10.1042/bst20130117>
- Kim, D. et Thayer, S. A. (2001, May 15). Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 21(10), Rc146. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-j0004.2001>
- Kim, M. J., Dunah, A. W., Wang, Y. T. et Sheng, M. (2005). Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Ras-ERK Signaling and AMPA Receptor Trafficking. *Neuron*, 46(5), 745-760. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.031>
- Kreitzer, A. C. et Regehr, W. G. (2001, Mar). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29(3), 717-727. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00246-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00246-x)
- Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. et Donovan-Wright, E. M. (2015, Oct). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol*, 172(20), 4790-4805. <https://doi.org/10.1111/bph.13250>
- Lauckner, J. E., Jensen, J. B., Chen, H. Y., Lu, H. C., Hille, B. et Mackie, K. (2008, Feb 19). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2699-2704. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711278105>

- Ligresti, A., De Petrocellis, L. et Di Marzo, V. (2016, Oct). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol Rev*, 96(4), 1593-1659. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2016>
- Liu, Q. R., Pan, C. H., Hishimoto, A., Li, C. Y., Xi, Z. X., Llorente-Berzal, A., Viveros, M. P., Ishiguro, H., Arinami, T., Onaivi, E. S. et Uhl, G. R. (2009, Jul). Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav*, 8(5), 519-530. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00498.x>
- Lu, H. C. et Mackie, K. (2016, Apr 1). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry*, 79(7), 516-525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Lu, H. C. et Mackie, K. (2021, Jun). Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*, 6(6), 607-615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R. et Hillard, C. J. (2015, Dec). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat Rev Neurosci*, 16(12), 705-718. <https://doi.org/10.1038/nrn4036>
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. et Mitchell, R. (1995, Oct). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15(10), 6552-6561. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-10-06552.1995>
- Marichal-Cancino, B. A., Fajardo-Valdez, A., Ruiz-Contreras, A. E., Mendez-Díaz, M. et Prospero-García, O. (2017). Advances in the Physiology of GPR55 in the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol*, 15(5), 771-778. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160729155441>
- Marichal-Cancino, B. A., Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Ruiz-Salinas, I., González-Hernández, A., Maassenvandenbrink, A. et Villalón, C. M. (2013, Dec 5). Analysis of anandamide- and lysophosphatidylinositol-induced inhibition of the vasopressor responses produced by sympathetic stimulation or noradrenaline in pithed rats. *Eur J Pharmacol*, 721(1-3), 168-177. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.039>
- Maroso, M., Szabo, G. G., Kim, H. K., Alexander, A., Bui, A. D., Lee, S. H., Lutz, B. et Soltesz, I. (2016, Mar 2). Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels. *Neuron*, 89(5), 1059-1073. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.023>
- Martínez-Pinilla, E., Aguinaga, D., Navarro, G., Rico, A. J., Oyarzábal, J., Sánchez-Arias, J. A., Lanciego, J. L. et Franco, R. (2019, Aug). Targeting CB(1) and GPR55 Endocannabinoid Receptors as a Potential Neuroprotective Approach for Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*, 56(8), 5900-5910. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1495-4>
- Martínez-Pinilla, E., Reyes-Resina, I., Oñatibia-Astibia, A., Zamarbide, M., Ricobaraza, A., Navarro, G., Moreno, E., Dopeso-Reyes, I. G., Sierra, S., Rico, A. J., Roda, E., Lanciego, J. L. et Franco, R. (2014, Nov). CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp Neurol*, 261, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.017>
- Mateos-Aparicio, P. et Rodríguez-Moreno, A. (2020). Calcium Dynamics and Synaptic Plasticity. *Adv Exp Med Biol*, 1131, 965-984. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1\\_38](https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_38)

- McCormick, D. A. et Prince, D. A. (1987, Dec). Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *J Physiol*, 393, 743-762. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016851>
- Meier, J., Akyeli, J., Kirischuk, S. et Grantyn, R. (2003, Aug). GABA(A) receptor activity and PKC control inhibitory synaptogenesis in CNS tissue slices. *Mol Cell Neurosci*, 23(4), 600-613. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00079-4](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00079-4)
- Miyawaki, H., Watson, B. O. et Diba, K. (2019). Neuronal firing rates diverge during REM and homogenize during non-REM. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36710-8>
- Morales, P., Lago-Fernandez, A., Hurst, D. P., Sotudeh, N., Brailoiu, E., Reggio, P. H., Abood, M. E. et Jagerovic, N. (2020). Therapeutic Exploitation of GPR18: Beyond the Cannabinoids? *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(23), 14216-14227. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00926>
- Moriconi, A., Cerbara, I., Maccarrone, M. et Topai, A. (2010). GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. *Curr Med Chem*, 17(14), 1411-1429. <https://doi.org/10.2174/092986710790980069>
- Morozov, Y. M., Torii, M. et Rakic, P. (2009, Jul). Origin, early commitment, migratory routes, and destination of cannabinoid type 1 receptor-containing interneurons. *Cereb Cortex*, 19 Suppl 1(Suppl 1), i78-89. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp028>
- Mozhayeva, M. G., Sara, Y., Liu, X. et Kavalali, E. T. (2002, Feb 1). Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci*, 22(3), 654-665. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-03-00654.2002>
- Mulder, J., Aguado, T., Keimpema, E., Barabás, K., Ballester Rosado, C. J., Nguyen, L., Monory, K., Marsicano, G., Di Marzo, V., Hurd, Y. L., Guillemot, F., Mackie, K., Lutz, B., Guzmán, M., Lu, H. C., Galve-Roperh, I. et Harkany, T. (2008, Jun 24). Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(25), 8760-8765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803545105>
- Nakahata, Y. et Yasuda, R. (2018). Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Front Synaptic Neurosci*, 10, 29. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00029>
- Ohno-Shosaku, T. et Kano, M. (2014, Dec). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*, 29, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.017>
- Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Mizushima, I., Yoneda, N., Zimmer, A. et Kano, M. (2002, May 15). Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci*, 22(10), 3864-3872. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-10-03864.2002>
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S. et Sugiura, T. (2007, Nov 3). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(4), 928-934. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.078>
- Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A. et Sugiura, T. (2009, Jan). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem*, 145(1), 13-20. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn136>

- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D. et Gross, C. T. (2011, Sep 9). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456-1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Papariello, A., Taylor, D., Soderstrom, K. et Litwa, K. (2021, Apr 30). CB(1) antagonism increases excitatory synaptogenesis in a cortical spheroid model of fetal brain development. *Sci Rep*, 11(1), 9356. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88750-2>
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. et Zukin, R. S. (1992, Sep 14). Are Ca(2+)-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosci Lett*, 144(1-2), 65-69. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90717-l](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90717-l)
- Pertwee, R. G. (2006, Jan). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S163-171. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406>
- Pertwee, R. G. (2015). Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. *Handb Exp Pharmacol*, 231, 1-37. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_1)
- Petitot, F., Donlan, M. et Michel, A. (2006, Mar). GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des*, 67(3), 252-253. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2006.00370.x>
- Pinto, M. J. et Almeida, R. D. (2016, Dec). Puzzling out presynaptic differentiation. *J Neurochem*, 139(6), 921-942. <https://doi.org/10.1111/jnc.13702>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., Mooney, R. D., Platt, M. L., White, L. E. P. D., Coquery, J.-M., Gailly, P. et Tajeddine, N. (2019). *Neurosciences* (6e édition. e éd.). De Boeck Supérieur. <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb45675678f>
- Rebecca C, E. a. H. T., Cline. (2009). NMDA Receptors and Brain Development. Dans A. M. VanDongen (dir.), *Biology of the NMDA receptor*. CRC Press. <http://www.crcnetbase.com/isbn/9781420044140>  
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=256955>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5283>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=frnrec>  
<https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=365190>  
<http://www.vlebooks.com/vleweb/product/openreader?id=none&isbn=9781420044157>  
[http://www.BIOSCIENCEnetBASE.com/ejournals/books/book\\_km.asp?id=7258](http://www.BIOSCIENCEnetBASE.com/ejournals/books/book_km.asp?id=7258)  
[https://nls.ldls.org.uk/welcome.html?ark:/81055/vdc\\_100045498598.0x000001](https://nls.ldls.org.uk/welcome.html?ark:/81055/vdc_100045498598.0x000001)  
<http://VH7QX3XE2P.search.serialsolutions.com/?V=1.0&L=VH7QX3XE2P&S=JCs&C=TC0000112091&T=marc&tab=BOOKS>
- Rezende, B., Alencar, A. K. N., de Bem, G. F., Fontes-Dantas, F. L. et Montes, G. C. (2023, Jan 19). Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/ph16020148>
- Richardson, G. A., Day, N. L. et Goldschmidt, L. (1995, Jul-Aug). Prenatal alcohol, marijuana, and tobacco use: infant mental and motor development. *Neurotoxicol Teratol*, 17(4), 479-487. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(95\)00006-d](https://doi.org/10.1016/0892-0362(95)00006-d)
- Rosenberg, E. C., Chamberland, S., Bazelot, M., Nebet, E. R., Wang, X., McKenzie, S., Jain, S., Greenhill, S., Wilson, M., Marley, N., Salah, A., Bailey, S., Patra, P. H., Rose, R., Chenouard, N., Sun, S. E. D., Jones, D., Buzsáki, G., Devinsky, O., Woodhall, G., Scharfman, H. E.,

- Whalley, B. J. et Tsien, R. W. (2023, Apr 19). Cannabidiol modulates excitatory-inhibitory ratio to counter hippocampal hyperactivity. *Neuron*, 111(8), 1282-1300.e1288. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.01.018>
- Ross, R. A. (2009, Mar). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci*, 30(3), 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.12.004>
- Rouach, N. et Nicoll, R. A. (2003, Aug). Endocannabinoids contribute to short-term but not long-term mGluR-induced depression in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 18(4), 1017-1020. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02823.x>
- Runge, K., Cardoso, C. et de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Front Synaptic Neurosci*, 12, 36. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00036>
- Russo, E. B., Burnett, A., Hall, B. et Parker, K. K. (2005, Aug). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. *Neurochem Res*, 30(8), 1037-1043. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1>
- Ryan, D., Drysdale, A. J., Lafourcade, C., Pertwee, R. G. et Platt, B. (2009, Feb 18). Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J Neurosci*, 29(7), 2053-2063. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4212-08.2009>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T. et Greasley, P. J. (2007, Dec). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152(7), 1092-1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Ryberg, E., Vu, H. K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T., Sjögren, S. et Greasley, P. J. (2005, Jan 3). Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB<sub>1</sub> receptor. *FEBS Lett*, 579(1), 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.085>
- Sales, A. J., Fogaça, M. V., Sartim, A. G., Pereira, V. S., Wegener, G., Guimarães, F. S. et Joca, S. R. L. (2019). Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 1070-1081. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1143-4>
- Sanderson, T. M., Georgiou, J. et Collingridge, G. L. (2020). Illuminating Relationships Between the Pre- and Post-synapse. *Front Neural Circuits*, 14, 9. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00009>
- Sanes, D. H., Reh, T. A., Harris, W. A. et Landgraf, M. (2019a). Chapter 6: Target Selection. Dans *Development of the nervous system* (Fourth edition.<sup>e</sup> éd.).
- Sanes, D. H., Reh, T. A., Harris, W. A. et Landgraf, M. (2019b). Chapter 8 Synapse Formation and Function. Dans *Development of the nervous system* (Fourth edition.<sup>e</sup> éd.).
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. H. Q., George, S. R. et O'Dowd, B. F. (1999, 1999/02/05/). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52,  $\Psi$ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain<sup>1</sup>Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under Accession Nos. AF096784-AF096786, AF100789.1. *Molecular Brain Research*, 64(2), 193-198. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00277-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00277-0)
- Scher, M. S., Richardson, G. A., Coble, P. A., Day, N. L. et Stoffer, D. S. (1988, Jul). The effects of prenatal alcohol and marijuana exposure: disturbances in neonatal sleep cycling and

- arousal. *Pediatr Res*, 24(1), 101-105. <https://doi.org/10.1203/00006450-198807000-00023>
- Seeman, P. (2016, Oct 18). Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Transl Psychiatry*, 6(10), e920. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.195>
- Sen, A., Hongpaisan, J., Wang, D., Nelson, T. J. et Alkon, D. L. (2016, Aug 5). Protein Kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) Promotes Synaptogenesis through Membrane Accumulation of the Postsynaptic Density Protein PSD-95. *J Biol Chem*, 291(32), 16462-16476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.730440>
- Shen, K. et Cowan, C. W. (2010). Guidance Molecules in Synapse Formation and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), a001842-a001842. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001842>
- Shen, S. Y., Yu, R., Li, W., Liang, L. F., Han, Q. Q., Huang, H. J., Li, B., Xu, S. F., Wu, G. C., Zhang, Y. Q. et Yu, J. (2022, Jul). The neuroprotective effects of GPR55 against hippocampal neuroinflammation and impaired adult neurogenesis in CSDS mice. *Neurobiol Dis*, 169, 105743, article n<sup>o</sup> 6059. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105743>
- Shi, Q. X., Yang, L. K., Shi, W. L., Wang, L., Zhou, S. M., Guan, S. Y., Zhao, M. G. et Yang, Q. (2017, Aug 11). The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress. *Mol Brain*, 10(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0318-7>
- Shiono, P. H., Klebanoff, M. A., Nugent, R. P., Cotch, M. F., Wilkins, D. G., Rollins, D. E., Carey, J. C. et Behrman, R. E. (1995, Jan). The impact of cocaine and marijuana use on low birth weight and preterm birth: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol*, 172(1 Pt 1), 19-27. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0002-9378(95)90078-0)
- Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D. et Ferrara, P. (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*, 270(8), 3726-3731. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med3&NEWS=N&AN=7876112>
- Smith, A. M., Fried, P. A., Hogan, M. J. et Cameron, I. (2004, Jul-Aug). Effects of prenatal marijuana on response inhibition: an fMRI study of young adults. *Neurotoxicol Teratol*, 26(4), 533-542. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.04.004>
- Smith, A. M., Fried, P. A., Hogan, M. J. et Cameron, I. (2006, Mar-Apr). Effects of prenatal marijuana on visuospatial working memory: an fMRI study in young adults. *Neurotoxicol Teratol*, 28(2), 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2005.12.008>
- Sobczyk, A., Scheuss, V. et Svoboda, K. (2005, Jun 29). NMDA receptor subunit-dependent [Ca<sup>2+</sup>] signaling in individual hippocampal dendritic spines. *J Neurosci*, 25(26), 6037-6046. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1221-05.2005>
- Spitzer, N. C. et Lamborghini, J. E. (1976, May). The development of the action potential mechanism of amphibian neurons isolated in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(5), 1641-1645. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.5.1641>
- Stempel, A. V., Stumpf, A., Zhang, H. Y., Özdoğan, T., Pannasch, U., Theis, A. K., Otte, D. M., Wojtalla, A., Rácz, I., Ponomarenko, A., Xi, Z. X., Zimmer, A. et Schmitz, D. (2016, May 18).

- Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. *Neuron*, 90(4), 795-809. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.034>
- Stil, A., Liberelle, B., Guadarrama Bello, D., Lacomme, L., Arpin, L., Parent, P., Nanci, A., Dumont É, C., Ould-Bachir, T., Vanni, M. P., De Crescenzo, G. et Bouchard, J. F. (2023). A simple method for poly-D-lysine coating to enhance adhesion and maturation of primary cortical neuron cultures in vitro. *Front Cell Neurosci*, 17, 1212097. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1212097>
- Südhof, T. C. (2018). Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron*, 100(2), 276-293. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.040>
- Südhof, T. C. (2021). The cell biology of synapse formation. *Journal of Cell Biology*, 220(7). <https://doi.org/10.1083/jcb.202103052>
- Sun, M. K. et Alkon, D. L. (2009, Dec). Protein kinase C activators as synaptogenic and memory therapeutics. *Arch Pharm (Weinheim)*, 342(12), 689-698. <https://doi.org/10.1002/ardp.200900050>
- Sutherland, M. L., Delaney, T. A. et Noebels, J. L. (1996, Apr 1). Glutamate transporter mRNA expression in proliferative zones of the developing and adult murine CNS. *J Neurosci*, 16(7), 2191-2207. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-07-02191.1996>
- Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. A. et Rusakov, D. A. (2013, Mar 26). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(13), 5193-5198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211204110>
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J. et Sulzer, D. (2014, Sep 3). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*, 83(5), 1131-1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
- Taylor, S. C. et Posch, A. (2014). The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*, 2014, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/361590>
- Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A. et Pertwee, R. G. (2007, Mar). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*, 150(5), 613-623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707133>
- Tovar, K. R. et Westbrook, G. L. (1999, May 15). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*, 19(10), 4180-4188. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-10-04180.1999>
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D. et Sharkey, K. A. (2005, Oct 14). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310(5746), 329-332. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>
- Vitalis, T., Lainé, J., Simon, A., Roland, A., Leterrier, C. et Lenkei, Z. (2008, Nov). The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *Eur J Neurosci*, 28(9), 1705-1718. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06484.x>



- Westfall, R. E., Janssen, P. A., Lucas, P. et Capler, R. (2009, 2009/11/01/). Reprint of: Survey of medicinal cannabis use among childbearing women: Patterns of its use in pregnancy and retroactive self-assessment of its efficacy against 'morning sickness'. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15(4), 242-246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.07.001>
- Wladyka, C. L. et Kunze, D. L. (2006, Aug 15). KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J Physiol*, 575(Pt 1), 175-189. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.113308>
- Wright, A. et Vissel, B. (2012). The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front Mol Neurosci*, 5, 34. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00034>
- Wu, C. S., Chen, H., Sun, H., Zhu, J., Jew, C. P., Wager-Miller, J., Straiker, A., Spencer, C., Bradshaw, H., Mackie, K. et Lu, H. C. (2013). GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One*, 8(4), e60314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060314>
- Wu, C. S., Jew, C. P. et Lu, H. C. (2011, Jul 1). Lasting impacts of prenatal cannabis exposure and the role of endogenous cannabinoids in the developing brain. *Future Neurol*, 6(4), 459-480. <https://doi.org/10.2217/fnl.11.27>
- Wu, C. S., Zhu, J., Wager-Miller, J., Wang, S., O'Leary, D., Monory, K., Lutz, B., Mackie, K. et Lu, H. C. (2010, Sep). Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci*, 32(5), 693-706. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07337.x>
- Wu, G., Malinow, R. et Cline, H. T. (1996, Nov 8). Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science*, 274(5289), 972-976. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.972>
- Yaari, Y., Hamon, B. et Lux, H. D. (1987, Feb 6). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science*, 235(4789), 680-682. <https://doi.org/10.1126/science.2433765>
- Yang, H., Zhou, J. et Lehmann, C. (2016, May 1). GPR55 - a putative "type 3" cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 27(3), 297-302. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0080>
- Yasuda, R., Hayashi, Y. et Hell, J. W. (2022). CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 23(11), 666-682. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00624-2>
- Zhang, H. Y., Bi, G. H., Li, X., Li, J., Qu, H., Zhang, S. J., Li, C. Y., Onaivi, E. S., Gardner, E. L., Xi, Z. X. et Liu, Q. R. (2015, Mar). Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. *Neuropsychopharmacology*, 40(4), 1037-1051. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.297>
- Zou, S. et Kumar, U. (2018, Mar 13). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>