

Université de Montréal

Rôle du récepteur aux cannabinoïdes CB2 sur la synaptogenèse

par

Pascal Fleury

École d'optométrie

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en Sciences de la vision

option Sciences fondamentales et appliquées

Août 2012

© Pascal Fleury, 2012

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle du récepteur aux cannabinoïdes CB2 sur la synaptogenèse

présentée par :
Pascal Fleury

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Bouchard, directeur de recherche
Maurice Ptito, membre du jury
Christian Casanova, président du jury

Résumé

Lors de cette étude, nous avons d'abord localisé les récepteurs CB1 et CB2 sur les structures neuronales. Nous avons montré que les récepteurs CB1 et CB2 sont présents sur les dendrites et les axones et les filopodes. Dans le même ordre d'idée, nous avons localisé le récepteur DCC sur les structures neuronales. Celui-ci est aussi présent sur les dendrites, les axones et les filopodes. Ces résultats suggèrent que le récepteur DCC serait impliqué non seulement dans le processus de synaptogenèse médié par le récepteur CB1, comme cela a été montré dans le laboratoire du professeur Bouchard, mais aussi dans celui, éventuellement, médié par le récepteur CB2.

Nous avons ensuite évalué l'effet des ligands du récepteur CB2. Nous n'avons détecté aucun effet clair des agonistes inverses (AM630 et JTE907) et des agonistes (JWH015 et JWH133) quant à la médiation du processus de synaptogenèse en terme de variation de la densité des filopodes et des points de contacts synaptiques. Nous avons obtenu des résultats variables. Ceux-ci furent non reproductibles. Nous avons obtenu des résultats différents des résultats originaux lorsque nous avons requantifié visuellement les mêmes photos à deux reprises

Nous avons développé une méthode informatisée de quantification qui nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles. Cependant, nous n'avons toujours pas détecté d'effets sur la synaptogenèse médiés par le récepteur CB2.

Ces résultats préliminaires ne nous permettent ni d'infirmer, ni de confirmer d'éventuels effets sur la synaptogenèse médiés par le récepteur CB2. Une étude exhaustive serait nécessaire pour le déterminer.

Mots clés : Synapogenèse, Récepteur aux cannabinoïdes CB1, Récepteur aux cannabinoïdes CB2, Deleted in Colorectal Cancer, nétrine-1, points de contacts synaptiques.

Abstract

During this study we first localised the receptors CB1 and CB2 on neuronal structures. We have shown that those receptors expressed on dendrites and filopodia. Likewise and based on Bouchard's previous laboratory results showing an implication of the netrin-1 receptor, Deleted in Colorectal Cancer (DCC), on the synaptogenesis process mediated by the receptor CB1 we localized the receptor DCC on neuronal structures. We have shown that the receptor DCC is expressed on dendrites, axons and filopodia. These results suggest an implication of the receptor DCC in a synaptogenesis process that would be mediated by the receptor CB2.

We then evaluated the effects triggered by the receptor CB2's ligands on the synaptogenesis process. We found no evidences of any effects on synaptogenesis mediated by the receptor CB2 inverse agonists (AM630 and JTE907) and agonists (JWH015 and JWH133) in term of filopodia density and synaptic contacts density variations. We witnessed highly variable results that were irreproducible. Visual quantifications of filopodia and synaptic contacts density were variable as we quantified two times the same set of photos.

We have therefore developed a computer based quantification method by which we were able to obtained reproducible results. Nevertheless we found no evidence of any implication of the receptor CB2 on the synaptogenesis process.

These preliminary results do not allow us neither to rule out nor to confirm eventual CB2 receptor effects on synaptogenesis. An exhaustive study is required to access possible CB2 receptors effect on synaptogenesis.

Keywords: Synaptogenesis, Cannabinoids receptor CB1, Cannabinoids receptor CB2, Deleted in Colorectal Cancer, netrin-1, filopodia, synaptic contacts.

Tables des matières

Liste des figures	vii
Liste des figures acronymes.....	ix
Chapitre 1 : Revue de la littérature	1
1.1 Synaptogenèse.....	1
1.1.1 Induction des synapses : contacts des protéines transsynaptiques	2
1.1.2 Formation des contacts pre- et postsynaptiques	4
1.1.3 Précurseurs synaptiques : filopodes	6
1.1.4 Contact stable entre les filopodes dendritiques et les axones	10
1.2 Plasticité synaptique	11
1.2.1 LTP et LTD : modulation du neurone postsynaptique	13
1.2.2 LTP : Modulation du neurone présynaptique.....	19
1.2.3 LTD : cannabinoïdes	20
1.3 Synaptogenèse et plasticité synaptique : rôle de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase A	21
1.3.1 Implication de l'AC dans la synaptogenèse	22
1.3.2 Plasticité synaptique : implication de l'AMPC, de la PKA et de l'Epac	23
1.4 Les cannabinoïdes.....	25
1.4.1 Les endocannabinoïdes.....	26
1.4.2 Récepteurs aux cannabinoïdes : CB1 et CB2.....	29
1.4.3 La plasticité à court terme : implication des eCB.....	33
Chapitre 2 : Rôle du récepteur aux cannabinoïdes CB2 sur la synaptogenèse	37
2.1 Introduction	37
2.1.1 Effet des cannabinoïdes sur la formation des filopodes.....	38

2.1.2	Effet du récepteur CB2 sur la formation des filopodes	42
2.1.3	Effet des cannabinoïdes sur la formation des contacts synaptiques	45
2.1.4	Effet du récepteur CB2 sur la formation des contacts synaptiques	46
2.1.5	Effet des cannabinoïdes sur la formation des synapses : fonctionnalité	46
2.1.6	Synaptogenèse : implication de nétrine-1 et de son récepteur DCC.....	47
2.1.7	Hypothèses	49
2.2	Matériel et méthodes	50
2.2.1	Réactifs, anticorps et agents pharmacologiques.....	50
2.2.2	Culture primaire de neurones corticaux.....	51
2.2.3	Stimulation des neurones en culture avec les agents pharmacologiques.....	53
2.2.4	Immunocytochimie	55
2.2.5	Prise de photos	57
2.2.6	Quantification de la densité des filopodes et des points synaptiques	57
2.3	Résultats.....	58
2.3.1	Localisation des récepteurs CB1 et CB2.....	59
2.3.2	Localisation du récepteur de la nétrine-1 : (Deleted in Colorectal Cancer) DCC.....	65
2.3.4	Effet modulé par le récepteur CB2 sur la densité des filopodes	70
2.3.5	Effet modulé par le récepteur CB2 sur la densité des points synaptiques.....	75
2.3.6	Nouvelle méthode permettant une quantification constante de la densité des points synaptiques.....	80
2.4	Discussion	85
2.4.1	Localisation des récepteurs CB1 et CB2.....	85
2.4.2	Variation des résultats quant à la densité des filopodes et la densité des points synaptiques	87
2.4.3	Conclusion.....	91

Chapitre 3 : Discussion générale.....	93
3.1 Stratégies expérimentales à venir	96
3.1.1 Observation des précurseurs synaptiques grâce à la microscopie électronique	97
3.1.2 Observation du développement des précurseurs synaptiques en temps réel.....	98
3.1.3 Expériences génétiques	100
3.1.4 Évaluation de la fonctionnalité des synapses : électrophysiologie	102
3.1.5 Mécanismes régulant la synaptogenèse en aval de CB2	103
3.1.5 Évaluation du processus de synaptogenèse médié par le récepteur CB2 <i>in vivo</i>	104
3.2 Conclusion.....	108
4. Bibliographie	xiii

Liste des figures

Figure 1. Schémas montrant la localisation des filopodes (A), leur formation (B) et leur rôle de précurseurs des épines dendritiques (C).	10
Figure 2. Schémas simplifiés montrant l'expression de la plasticité synaptique; figure adaptée de (Kauer and Malenka 2007).	18
Figure 3. Structure des récepteurs CB1 et CB2; figure adaptée de (Howlett 2002).....	30
Figure 4. Schéma simplifié des processus de DSI et de DSE; figure adaptée de (Kano, Ohno-Shosaku et al. 2002)	35
Figure 5. Tableau montrant la structure des agonistes, agonistes inverses et antagonistes des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2; les structures chimiques proviennent du site Web de Tocris Bioscience : www.tocris.com	41
Figure 6. Schémas montrant l'hypothèse principale stipulant que les agonistes inverses du récepteur CB2 augmenteraient la synaptogenèse, tandis que ses agonistes la diminueraient.	44
Figure 7. Le récepteur aux cannabinoïdes CB1 est exprimé par les neurones corticaux in vitro. Il est localisé à la fois sur les dendrites, les axones et les filopodes.	62
Figure 8. Le récepteur aux cannabinoïdes CB2 est exprimé par les neurones corticaux in vitro. Il est localisé à la fois sur les dendrites, les axones et les filopodes.	64
Figure 9. Le récepteur de netrine-1, DCC, est exprimé par les neurones corticaux in vitro. Il est localisé à la fois sur les dendrites, les axones et les filopodes.	67
Figure 10. Le récepteur de la nétrine-1, DCC, est exprimé par les neurones corticaux in vitro. Il est localisé sur les filopodes à proximité des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2.	69

Figure 11. L'effet des agents pharmacologiques (AM630, JTE907 et FSK) sur la densité des filopodes est non détectable par la méthode présentée ci-dessous. En outre, les quantifications dérivées de l'analyse des photos sont non reproductibles.....	74
Figure 12. L'effet des agents pharmacologiques (AM630, JTE907 et FSK) sur la densité des points synaptiques est non détectable par la méthode présentée ci-dessous. Les quantifications dérivées de l'analyse des photos sont très variables.....	78
Figure 13. L'effet de l'agent pharmacologique FSK sur la densité des points synaptiques est non détectable par la méthode présentée ci-dessous. Cependant, les quantifications dérivées de l'analyse des photos sont reproductibles.....	83
Figure 14. Schéma montrant un exemple de labyrinthe d'eau de Morris (MWM); adaptée de Wikipédia Commons (Samueljohn.de).....	107

Liste des figures acronymes

AC	Adénylate cyclase
AEA	Anandamide
2-AG	2-Arachidonylglycérol
AMPA	Acide propionique α -Amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxasole
AMPc	Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
APP	Protéine précurseur d'amyloïde
APLP2	Protéine similaire au précurseur d'amyloïde 2
Arp2/3	Complexe protéique 2/3 relié à l'actine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Ca ²⁺	Ion calcique
CAM	Molécule d'adhésion cellulaire
CaMKII	Kinase II dépendante du calcium/calmoduline
CapZ	Protéine cap
CB1	Récepteur aux cannabinoïdes 1
CB2	Récepteur aux cannabinoïdes 2
CRE	AMPc élément de réponse
CREB	Protéine se liant au CRE
DAG	(1,4,5)-triphosphate et le diacylglycérol
DAGL	Diacylglycérol lipase, l'enzyme de synthèse du 2-AG
DCC	Deleted in Colorectal Cancer, le récepteur de la nétrine-1
DCCfb	Anticorps bloquant la fonction du récepteur DCC

DIC	Contraste interférentiel différentiel
DIV	Days (jours) <i>in vitro</i>
DSE	Dépolarisation induite de la suppression de l'excitation
DSI	Dépolarisation induite de la suppression de l'inhibition
DMSO	Diméthylsulfoxyde
eCB	Endocannabinoïde
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique
Epac	Protéine d'échange directement activée par l'AMPC
FAAH	Fatty acid amide hydrolase, l'enzyme de dégradation de l'anandamide
F-actin	Actine filamenteuse
FBS	Sérum foetal bovin
FM1-43	Chromophore FM1-43
FSK	Forskoline
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GAP-43	Protéine associée à la croissance de 43 kDa
GFP	Protéine fluorescente verte
GluR1	Récepteur au glutamate 1
GRP55	Récepteur couplé à la protéine G-55
GTP	Guanosine Triphosphate
GTPase	Guanosine Triphosphatase
H89	Isoquinoline H89, inhibiteur de la PKA
KT5720	Dérivé hexylester de K-252a, inhibiteur sélectif de la PKA
JNM	Jonctions neuromusculaires

LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentiation à long terme
LRRTM	Protéines transmembranaires riches en répétition de leucines
MAP2	Protein associé aux microtubules 2
MAPK	Protéines kinases activées par des agents mitogènes
ME	Microscopie électronique
mEPSC	Courants postsynaptiques miniatures excitateurs
MGL	Lipase monoglycéride, l'enzyme de dégradation du 2-AG
MWM	Labyrinthe d'eau de Morris
N-Cadherin	Cadhérine neuronale
NCAM	Neural Cell Adhesion Molécule d'adhésion neuronal
NFM	Neurofilament de taille moyenne
NGL-3	Ligand nétrine G-3
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PBS	Tampon phosphate salin
PFA	Paraformaldéhyde
PKA	Protéine Kinase AMPc-dépendante
PKC	Protéine Kinase dépendante du calcium
PLC	Phospholipase C
PTPs	Protéines tyrosines phosphates
PSD95	Protéine postsynaptique de 05 kDa
RIM1- α	Molécule 1 α interagissant avec Rab3
SEM	Erreur standard de la moyenne

SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SVP-38	Protéine de vésicule de 38 kDa, synaptophysine
synCAM	Molécule synaptique d'adhésion moléculaire
synCAM1	Molécule synaptique d'adhésion moléculaire 1
synCAM2	Molécule synaptique d'adhésion moléculaire 2
Δ^9 -THC	Delta-9-tétrahydrocannabinol

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1 Synaptogenèse

La synaptogenèse consiste en la formation de sites de communication entre des cellules nerveuses et leurs cibles (cellules nerveuses, musculaires, épithéliales, etc.). Ces sites de communication sont appelés synapses; ils sont composés de terminaux pré- et postsynaptiques.

Le système nerveux est composé de plusieurs types de synapse, soit les synapses chimiques et les synapses électriques. Ce mémoire traitera principalement des synapses chimiques, plus particulièrement des synapses glutamatergiques. Ces synapses sont dites excitatrices, car elles dépolarisent les neurones cibles.

Bien que la synaptogenèse ait lieu tout au long de la vie d'un individu, celle-ci se produit principalement durant les stades précoces du développement (Tau and Peterson 2010). Les synapses sont des structures dynamiques qui peuvent être non seulement formées (synaptogenèse) tout au long de la vie d'un individu, mais aussi éliminées (Goda and Davis 2003). Ces processus d'assemblage et de désassemblage synaptiques constituent la base de la plasticité synaptique. Cette plasticité synaptique peut, entre autres, être observée de façon macroscopique par la manifestation de la mémoire et de l'apprentissage.

La synaptogenèse est hautement spécifique; elle est régulée au niveau moléculaire. Plusieurs facteurs moléculaires peuvent l'influencer, tels que des facteurs tropiques attractifs (chimioattractifs) ou répulsifs (chimiorépulsifs), des protéines d'adhésion cellulaire et des voies de signalisations moléculaires induisant les changements de morphologie nécessaire à celle-ci (Shen and Cowan 2010). En outre, la synaptogenèse est hautement spécifique quant à la spécialisation des synapses formées. En effet, on retrouve des synapses glutamatergiques (excitatrices) séparées de synapses gabaergiques (inhibitrices) par quelques microns seulement (Craig, Graf et al. 2006).

Bien qu'il existe plusieurs types de synapses découlant de la synaptogenèse, le texte qui suit portera principalement sur la formation des synapses chimiques interneuronales. La synapse chimique est essentiellement constituée d'un terminal présynaptique, d'une fente synaptique et d'un terminal postsynaptique.

1.1.1 Induction des synapses : contacts des protéines transsynaptiques

La formation de synapses est induite par des interactions à la fois homophiliques et hétérophiliques des protéines transsynaptiques. En effet, ces protéines transmembranaires, qui interagissent de part et d'autre de ce qui deviendra éventuellement des fentes synaptiques, induisent la formation de synapses.

D'une part, synCAM (Sara, Biederer et al. 2005) et la protéine précurseur d'amyloïde (APP) (Wang, Wang et al. 2009) peuvent, par exemple, induire la formation de contacts présynaptiques grâce à leurs interactions homophiliques. Néanmoins, il semblerait que les interactions de ces protéines ne soient pas exclusivement homophiliques, car des résultats expérimentaux suggèrent que synCAM1 interagit préférentiellement avec synCAM2 (Fogel, Akins et al. 2007), de même qu'APP interagit préférentiellement avec la protéine APLP2 (Wang, Wang et al. 2009).

D'autre part, nombreuses sont les protéines qui induisent la formation de synapse par des interactions hétérophiliques. À cet effet, il est intéressant de mentionner que l'interaction des neuroglines dendritiques avec les neurexines axonales soit suffisante pour induire à la fois de terminaux présynaptiques excitateurs et inhibiteurs (Scheiffele, Fan et al. 2000; Levinson, Chery et al. 2005). De même, les protéines transmembranaires riches en répétition de leucines (LRRTMs) situées sur les dendrites peuvent provoquer la formation de terminaux présynaptiques grâce à leurs interactions transsynaptiques avec les neurexines présentes à la surface des axones (de Wit, Sylwestrak et al. 2009; Linhoff, Lauren et al. 2009). Dans le même ordre d'idée, le ligand dendritique netrine-G-3 (NGL-3) interagit avec des protéines tyrosines phosphatases (PTPs) et induit ainsi la formation de terminaux présynaptiques (Kim, Burette et al. 2006; Kwon, Woo et al. 2010). De façon similaire, c'est en interagissant avec ces ligands (éphrin-B1 et B2) que le récepteur EphB2 induit la formation de terminaux présynaptiques (Dalva, McClelland et al. 2007).

Ainsi, de nombreuses preuves expérimentales ont montré que les interactions transsynaptiques protéine-protéine ont la capacité d'induire la formation de contacts synaptiques. Bien que très peu d'informations soient disponibles à ce jour quant aux mécanismes moléculaires, en aval de ces interactions transsynaptiques, générant la formation synaptique, on peut penser qu'il existe un mécanisme commun qui génère la formation des synapses, car on obtient la même induction de terminaux présynaptiques en échangeant les domaines cytoplasmiques des protéines APP et synCAM (Wang, Wang et al. 2009).

1.1.2 Formation des contacts pre- et postsynaptiques

Suite à un contact axodendritique initial, il peut y avoir formation de synapses dans un temps relativement court d'une à deux heures (Friedman, Bresler et al. 2000; Antonova, Arancio et al. 2001). Cette vitesse relativement élevée d'assemblage porte à croire que la synaptogenèse ne se fait complètement *de novo* à ce moment-là, mais qu'il y a déjà des composants réassemblés qui interviennent. Des résultats expérimentaux vont, en effet, dans ce sens; la présence de vésicules cytoplasmiques mobiles contenant des protéines de la zone synaptique active et des protéines synaptiques vésiculaires telles que piccolo, bassoon, N-cadhérin et des sous-unités de canaux calciques ont été observées le long d'axones en développement (Ahmari, Buchanan et al. 2000; Zhai, Vardinon-Friedman et al. 2001). L'insertion de ces protéines dans la membrane axonale des terminaux présynaptiques en

devenir se produit avant l'arrivée des vésicules présynaptiques transportant les neurotransmetteurs (Friedman, Bresler et al. 2000; Shapira, Zhai et al. 2003). D'une part, les composants ainsi insérés dans la membrane axonale ont été proposés comme étant à la base du recrutement des vésicules présynaptiques (Ahmari, Buchanan et al. 2000; Zhai, Vardinon-Friedman et al. 2001). D'autre part, ils ont été proposés comme étant à la base de la formation *de novo* de vésicules présynaptiques (Okabe, Miwa et al. 2001).

Cependant, qu'ils recrutent ou qu'ils engendrent la formation *de novo* des vésicules présynaptiques, il semblerait qu'il y ait d'autres joueurs d'impliqués, car l'accumulation de vésicules présynaptiques se fait uniquement aux points d'arrivés (sites actifs des terminaux présynaptiques), mais aucunement durant le transit des vésicules transportant des protéines de la zone active (Ahmari, Buchanan et al. 2000; Friedman, Bresler et al. 2000; Okabe, Miwa et al. 2001). Ainsi, il serait possible que les protéines transsynaptiques mentionnées plus haut collaborent avec ces composants du site actif dans le recrutement ou la formation *de novo* des vésicules présynaptiques.

La formation des terminaux postsynaptiques a lieu après celle des terminaux présynaptiques (Friedman, Bresler et al. 2000; Okabe, Miwa et al. 2001; Ziv and Garner 2001). La nature de ceux-ci est peut-être spécifiée par leur interaction avec les terminaux présynaptiques. En effet, celle-ci pourrait être déterminée, entre autres, par les protéines transsynaptiques (Dean and Dresbach 2006); plus spécifiquement par les neuroglines et les neurexines. Certains auteurs mentionnent aussi l'implication de la protéine PSD95 pendant la

formation des terminaux postsynaptiques excitateurs (Friedman, Bresler et al. 2000; Bresler, Ramati et al. 2001; McGee and Bredt 2003).

Bien que les avancées en biologie cellulaire et moléculaire des dernières années nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la synaptogenèse, il n'en demeure pas moins qu'il y a encore beaucoup plus d'interrogations que de réponses. Il est cependant intéressant et encourageant de constater que plusieurs joueurs moléculaires impliqués dans celle-ci sont désormais connus et que nous commençons à mettre à jour les mécanismes qui les régissent. L'avancement continu des connaissances dans ce domaine nous permettra certainement un jour de comprendre chaque rouage spécifiant le devenir et la nature (excitatrice ou inhibitrice) des terminaux pré- et postsynaptiques.

1.1.3 Précurseurs synaptiques : filopodes

Les filopodes sont des protubérances de 60 à 200 nm (figure 1A) de diamètre, riches en filaments d'actine (10 à 30 filaments d'actine retenus grâce aux protéines de fascine), émergeant à la fois des cônes de croissance et des dendrites durant les processus de croissance axonale et de différenciation de la morphologie cellulaire menant à la formation des synapses (Mattila and Lappalainen 2008). Ce sont des structures dynamiques et temporaires dont la croissance est influencée par le milieu intercellulaire et les facteurs de croissance (Svitkina and Borisy 1999). Ils agissent un peu comme des précurseurs en

détectant la nature du milieu extracellulaire et en modulant leur morphologie en conséquence (Davenport, Dou et al. 1993); ils ont la capacité de bouger de gauche à droite, de bas en haut, et de s'allonger ou de se rétracter (figure 1B).

La formation de filopodes (Faix and Rottner 2006) peut être produite *de novo* ou par le retrait des protéines Cap (Capping protein) (figure 1B). Lorsque celle-ci se produit *de novo*, elle est initiée par la nucléation à la fois modulée par les formines et le complexe protéiques Arp2/3. Les extrémités d'actine-F (+) se trouvant aux extrémités distales des filopodes provoquent la formation et l'élongation des filopodes par polymérisation. Plusieurs protéines coopèrent afin de promouvoir l'assemblage des filaments d'actine et augmentent la formation de faisceau à l'aide des protéines de fascines. L'élongation des filaments s'arrête lorsque ceux-ci sont capés à leur extrémité (+). Puis, le mouvement rétrograde continu des filaments d'actine et leur dépolymérisation produisent la rétraction des filopodes et éventuellement leur disparition complète. Ainsi, la longueur des filopodes est déterminée par l'équilibre qu'il y a entre la vitesse de polarisation des filaments d'actine et de leurs mouvements rétrogrades ainsi que de leurs dépolymérisations.

Plusieurs résultats expérimentaux (Dailey and Smith 1996; Ziv and Smith 1996; Luikart, Zhang et al. 2008; Mattila and Lappalainen 2008) suggèrent que les filopodes sont des précurseurs des épines dendritiques (figure 1C). Ainsi et étant donné que les épines dendritiques sont présentes dans la plupart des synapses glutamatergiques (Yuste and Bonhoeffer 2004), les filopodes peuvent être considérés, entre autres, comme étant des précurseurs synaptiques.

Localisées sur les dendrites, les épines dendritiques sont des protubérances riches en actine ayant généralement la forme de champignons. C'est-à-dire qu'elles possèdent une structure plutôt mince (environ 0.04 à 1 μm de diamètre) surmontée d'une protubérance bulbeuse (environ 0.5 à 2 μm de diamètre) (Calabrese, Wilson et al. 2006). Ces épines dendritiques augmentent la surface de contact des dendrites; ainsi, elles augmentent le nombre de synapses possibles (Nimchinsky, Sabatini et al. 2002).

En outre, il est intéressant de mentionner que les épines dendritiques sont potentiellement impliquées dans la facilitation de nouveaux contacts synaptiques excitateurs (synapses glutamatergiques) non seulement durant le développement, mais aussi lorsque le système nerveux a atteint sa maturité (Dailey and Smith 1993). Ainsi, ces filopodes stabilisés en épines dendritiques conserveraient une certaine plasticité.

Figure 1

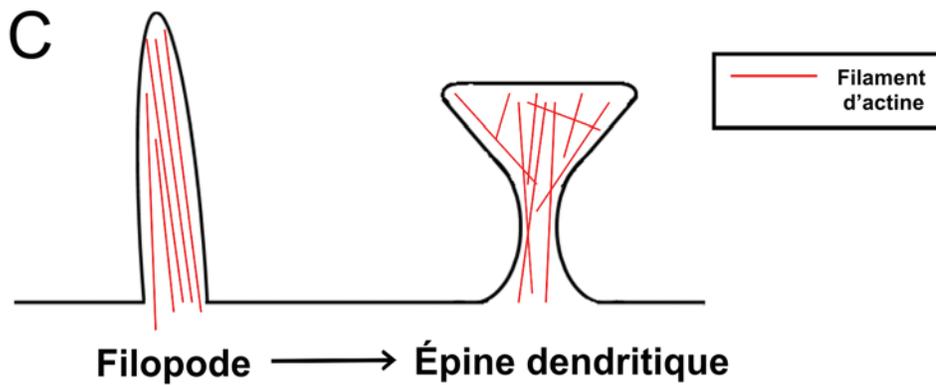
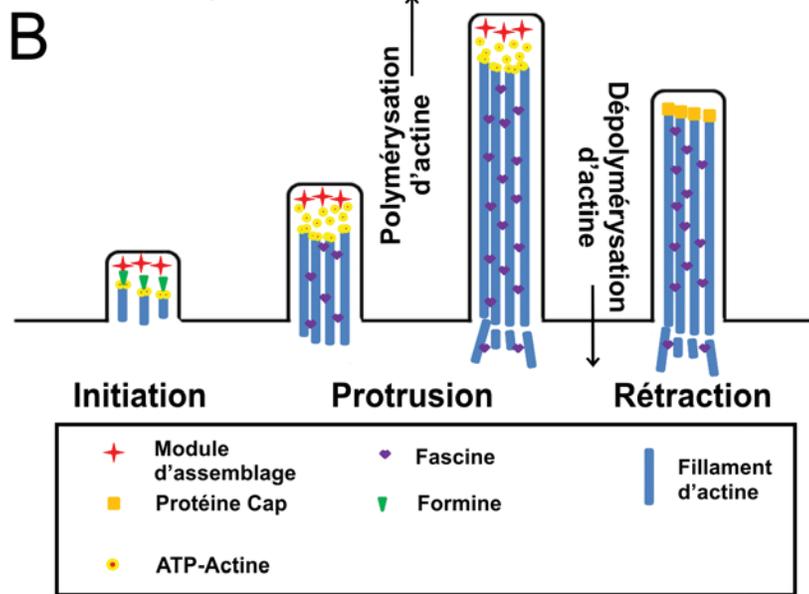
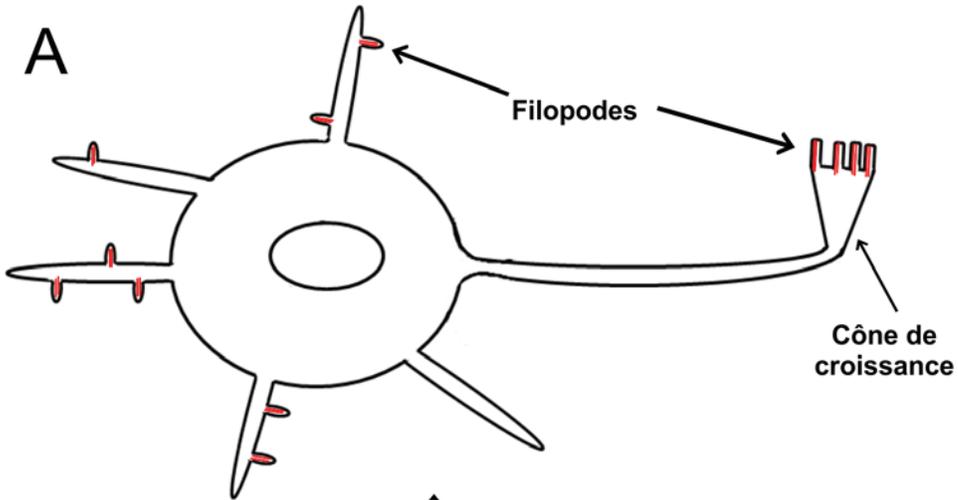


Figure 1. Schémas montrant la localisation des filopodes (A), leur formation (B) et leur rôle de précurseurs des épines dendritiques (C).

(A) Les filopodes sont localisés sur les dendrites et à l'extrémité du cône de croissance; figure inspirée de (Mattila and Lappalainen 2008).

(B) La formation des filopodes peut être divisée en 3 étapes : l'initiation, la protrusion et la rétraction; figure inspirée de (Faix and Rottner 2006).

(C) Les filopodes sont des précurseurs des épines dendritiques; figure inspirée de (Mattila and Lappalainen 2008).

1.1.4 Contact stable entre les filopodes dendritiques et les axones

La plupart des synapses chimiques interneuronales sont axo-dendritiques; c'est-à-dire qu'elles sont constituées de terminaux présynaptiques axonaux et de terminaux postsynaptiques dendritiques aussi appelés densités postsynaptiques (Sabo, Gomes et al. 2006). Néanmoins, on observe aussi la présence de synapses axo-axonique entre des neurones GABAergiques chandelier et sur les segments initiaux des axones des neurones excitateurs (Frotscher 1992; Sabo, Gomes et al. 2006). La grande majorité des synapses sont des synapses *en passant*; c'est-à-dire qu'elles sont généralement réparties tout le long des axones plutôt qu'aux terminaisons de celles-ci. Ainsi, cela implique que la formation des

synapses serait non seulement induite par le contact des cônes de croissance axonaux avec les dendrites, mais aussi par le contact des cônes de croissances dendritiques avec les axones, de même que par le contact des filopodes dendritiques avec les axones (Bury and Sabo 2010).

En effet, des études en imagerie *in vitro* et *in vivo* ont montré une occurrence élevée de la formation de synapses excitatrice à partir de contacts entre des filopodes dendritiques et des axones (Dailey and Smith 1996; Ziv and Smith 1996; Fiala, Feinberg et al. 1998; Jontes, Buchanan et al. 2000). Cependant, la plupart de ces contacts ne sont que temporaires; la source et les bases moléculaires de la stabilisation de ceux-ci et de leurs transformations en épines dendritiques demeurent, jusqu'à ce jour inconnues.

1.2 Plasticité synaptique

L'encéphale et l'ensemble du système nerveux ont ceci de particulier : ils sont structurellement très dynamiques. Ceci peut, du moins en grande partie, expliquer notre aptitude d'adaptation et la formation de nos souvenirs. Ce dynamisme vient de la capacité qu'on les connexions interneuronales (les synapses) à se modifier, voire aussi d'émerger et de disparaître. Cette capacité qu'ont les synapses de se former, de se désassembler, de

transformer leurs morphologies et/ou de changer leurs fonctions est appelée plasticité synaptique.

Hebb (Hebb 1949) fut le premier à mettre de l'avant la plasticité synaptique en énonçant son, désormais célèbre « postulat neurophysiologique »; qui stipule qu'il existe un mécanisme dépendant de l'activité qui ajuste la puissance des synapses. De façon plus concise, il affirme que lorsqu'un neurone A stimule un neurone B, il se produit un certain changement de métabolisme ou de la croissance des neurones A et/ou B qui rend la stimulation de B par A plus efficace. Ce n'est que plusieurs années plus tard, en 1973, que Bliss et Lømo mirent à jour des évidences expérimentales supportant le postulat de Hebb. En effet, ils montrèrent que les transmissions synaptiques dans l'hippocampe étaient maintenues durant plusieurs heures après une stimulation tétranique à haute fréquence (Bliss and Lomo 1973); ils nommèrent ce phénomène : potentialisation à long terme (LTP). Néanmoins, ce n'est que plusieurs années plus tard que des preuves expérimentales beaucoup plus convaincantes furent produites par Brown et ces collègues. En effet, ceux-ci montrèrent que la LTP dépendait du neurone postsynaptique, car lorsqu'ils hyperpolarisaient ce dernier, la LTP ne se produisait plus (Kelso, Ganong et al. 1986). Ainsi, les bases de la plasticité synaptique étaient jetées.

1.2.1 LTP et LTD : modulation du neurone postsynaptique

La potentiation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) des transmissions synaptiques sont des phénomènes très répandus qui se produisent possiblement pour chaque synapse (figure 2A et 2B). Plusieurs mécanismes moléculaires distincts seraient à la source de ces phénomènes (Bear and Malenka 1994). Une bonne quantité des recherches qui ont élucidé, en partie, les mécanismes sous-jacents à la LTP et à la LTD ont été effectuées sur des neurones postsynaptiques; plus spécifiquement, sur l'activation des récepteurs postsynaptiques AMPA (acide propionique α -amino-3-hydroxy-5-méthyle-4-isoxazolepropionique) et NMDA (*N*-méthyle-D-aspartate) (Bi and Poo 1998), sur les mécanismes activés et modulés par le calcium (Ghosh and Greenberg 1995) et plus récemment sur les transformations du cytosquelette et des épines dendritiques (Luscher, Nicoll et al. 2000; Hussain and Carpenter 2001; Irie and Yamaguchi 2002; Star, Kwiatkowski et al. 2002; Carlisle and Kennedy 2005; Rex, Lin et al. 2007; Bennett, Farnell et al. 2012).

Les principaux récepteurs postsynaptiques qui ont fait l'objet d'études quant à leurs implications dans la LTP et la LTD sont les récepteurs NMDA et AMPA. (Mayer and Armstrong 2004). Le récepteur AMPA est un récepteur-canal ionotropique qui laisse entrer principalement le sodium lorsqu'il est activé par la liaison du glutamate, tandis que le récepteur NMDA est un récepteur-canal ionotropique voltage-dépendant qui laisse entrer à la fois le sodium et le calcium lorsqu'il est activé par le glutamate à un potentiel

intermembranaire suffisamment élevé pour permettre l'expulsion du magnésium, situé du côté extracellulaire, qui bloque le récepteur-canal NMDA. (Ghosh and Greenberg 1995). Ainsi, la plupart des ions calciques pénétrant le neurone le font en transitant par les canaux NMDA (Garner, Zhai et al. 2002). Les récepteurs AMPA se trouvent à n'être impliqués dans la LTP et la LDP que de façon indirecte; c'est-à-dire en provoquant la dépolarisation membranaire qui, en collaboration avec le glutamate, permet l'ouverture des récepteurs-canaux NMDA, donc de l'entrée des ions calciques. En effet, le blocage complet des récepteurs NMDA élimine complètement la LTP et la LTD, tandis que le blocage partiel induit la LTD (Yang, Tang et al. 1999). De plus, il a été démontré qu'une forte stimulation calcique postsynaptique induit la LTP, tandis qu'une stimulation calcique modérée induit la LDP (Yang, Tang et al. 1999). Ainsi, la concentration de calcium au niveau du neurone postsynaptique jouerait un rôle primordial dans l'établissement du LTP et du LDP.

Le phénomène de potentialisation à long terme (LTP), le mieux connu est médié par le récepteur-canal NMDA (Kauer and Malenka 2007) (figure 2A). Son ouverture fait augmenter la concentration d'ions calciques dans le neurone postsynaptique, ce qui déclenche une série de cascades moléculaires complexes dont celle provoquée par l'activation de la kinase dépendante au calcium, CaMKII : protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (Malenka and Nicoll 1999). Il est intéressant de mentionner, qu'après une stimulation prononcée, cette kinase s'autophosphoryle et devient indépendante du calcium; dans cette forme hyperphosphorylée, CaMKII demeure active indépendamment de la concentration de calcium intracellulaire, donc indépendamment de l'état d'ouverture des récepteurs NMDA

(Lisman, Schulman et al. 2002). Ainsi, l'activité basale du neurone postsynaptique est modifiée. L'activation de CaMKII et des multiples cascades moléculaires dépendantes du calcium provoquent, entre autres, une augmentation de l'externalisation des récepteurs AMPA (Malenka and Nicoll 1999; Malenka and Bear 2004). C'est cette augmentation qui sensibilise le neurone postsynaptique aux synapses glutamatergiques. Néanmoins une synthèse protéique est nécessaire au maintien de la LTP (Lynch 2004) et il y a de plus en plus d'observations expérimentales qui montrent une association entre le grossissement des épines dendritiques et la LTP (Yuste and Bonhoeffer 2001; Malenka and Bear 2004; Matsuzaki, Honkura et al. 2004). En outre, il faut aussi garder en tête, qu'étant donné que la concentration intracellulaire d'ions calciques est en grande partie régulée par les récepteurs NMDA, qu'une variation du nombre de ceux-ci à la surface du terminal postsynaptique peut influencer le point limite d'induction de la LTP (Kauer and Malenka 2007). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que le type de sous-unités composant le récepteur NMDA fait varier sa perméabilité aux ions calciques et ainsi faire varier leur capacité d'induction de la LTP (Lau and Zukin 2007).

Le phénomène de plasticité synaptique de dépression à long terme (LTD) peut aussi être modulé par les récepteurs NMDA (figure 2B). En effet, il a été démontré qu'une faible activation des récepteurs NMDA qui résulte en une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calciques du neurone postsynaptique trop modeste pour induire la LTP engendre toutes fois la LTD (Malenka and Bear 2004). C'est en activant un autre groupe de molécules impliquées dans la signalisation que cette augmentation modeste de la

concentration d'ions calciques induit la LTD. Ce groupe de molécule inclus des phosphatases sérine/thréonine qui déphosphorylent des substrats clés incluant les récepteurs AMPA eux-mêmes (Malenka and Bear 2004). La diminution de la puissance du contact synaptique provient d'une diminution du nombre de récepteurs AMPA; cette diminution est modulée par un mécanisme d'endocytose faisant intervenir la dynamine et la clatherine (Carroll, Beattie et al. 2001; Malenka and Bear 2004).

Les expériences des soixante dernières années ont non seulement démontré la véracité du « postulat neurophysiologique » de Hebb mis de l'avant en 1949, mais elles ont aussi montré qu'il existe aussi des mécanismes produisant une diminution de la puissance des synapses qui sont regroupées sous l'appellation de LTD. La diminution de la puissance des synapses est nécessaire dans bien des cas. En effet, celle-ci peut empêcher un neurone de devenir saturé en termes de réception de signaux excitateurs et ainsi lui permettre de conserver sa sélectivité. En d'autres termes, elle permet une régulation fine des contacts synaptiques. Enfin, il est important de souligner, une autre fois, que la LTP et la LTD sont produites par plusieurs mécanismes distincts.

Figure 2

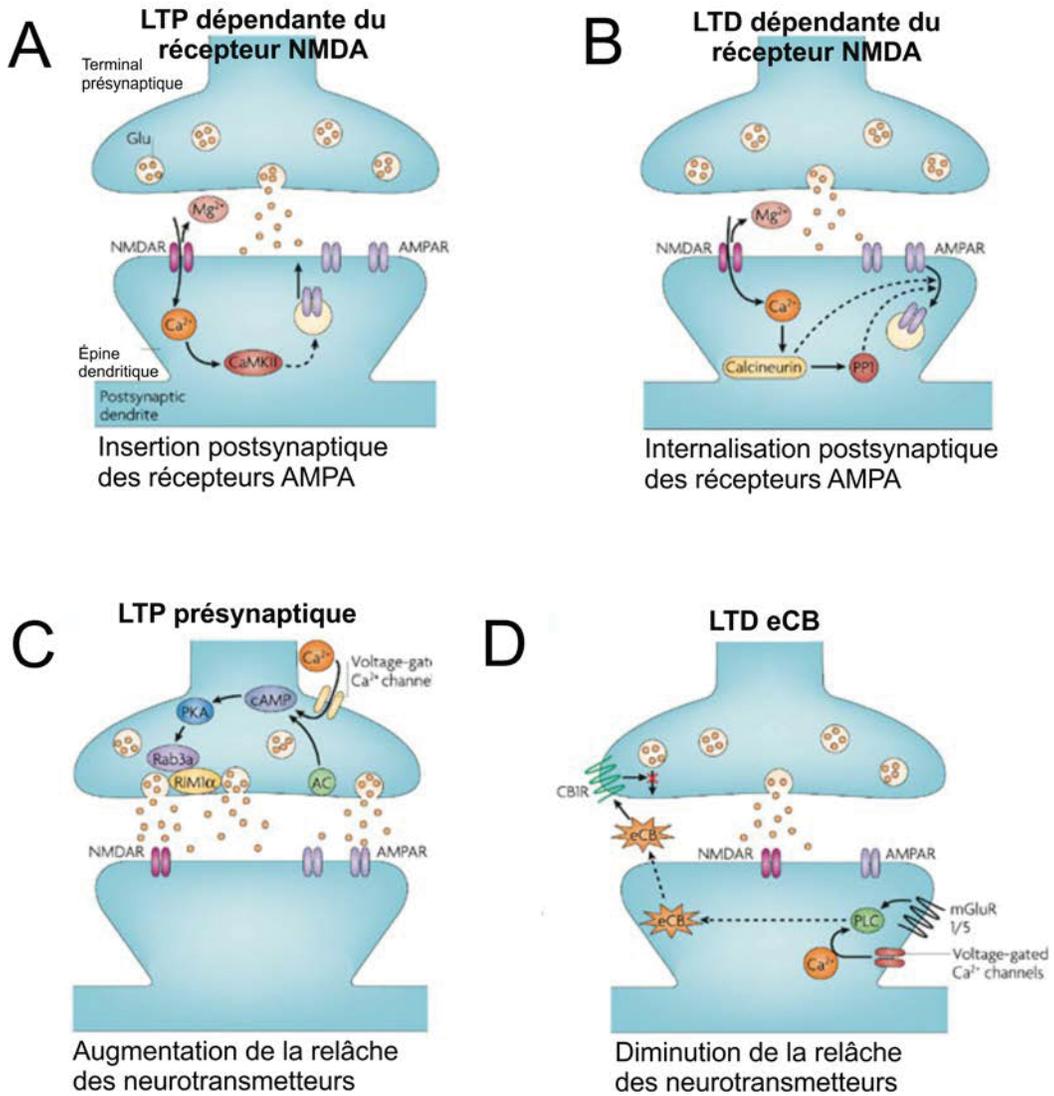


Figure 2. Schémas simplifiés montrant l'expression de la plasticité synaptique; figure adaptée de (Kauer and Malenka 2007).

(A) La LTP dépendante des récepteurs NMDA est initiée par la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante kinase II, CaMKII. En phosphorylant des molécules clés, CaMKII provoque une externalisation accrue des récepteurs AMPA augmentant ainsi la sensibilité au glutamate du neurone postsynaptique.

(B) La LTD dépendant des récepteurs NMDA est initié par une entrée modéré de Ca^{2+} provoquant une augmentation de l'activité de la phosphatase calcineurine et de la protéine phosphatase 1 (PP1). L'expression primaire de la LTD, suite à la phosphorylation de molécules clés, consiste en l'internalisation des récepteurs AMPA et en la régulation négative des récepteurs NMDA.

(C) Le LTP au niveau du neurone présynaptique provoque l'entrée de Ca^{2+} . Celui-ci active une enzyme sensible aux ions calciques, l'adénylate cyclase (AC). Cette dernière fait augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc, ce qui provoque l'activation de la protéine kinase A dépendante dépendante de l'AMPc (PKA). Ceci a pour effet de modifier les fonctions de Rab3a et de RIM1 α ce qui se traduit par une relâche augmentée et durable de glutamate.

(D) La LTD dépendante des endocannabinoïdes (eCB) est la forme la plus récente de LTD découverte. Soit une activation du récepteur métabotropique GluR1/5 provoquant l'activation de la phospholipase C, soit une augmentation intracellulaire de la concentration de Ca^{2+} , ou bien les deux initient la synthèse d'eCB dans le neurone postsynaptique. L'eCB est alors transporté du neurone postsynaptique au neurone présynaptique où il se lie au récepteur aux cannabinoïdes 1 (CB1) et possiblement aussi au récepteur aux cannabinoïdes 2 (CB2). L'activation prolongée des récepteurs aux cannabinoïdes provoque une diminution de la relâche des neurotransmetteurs.

1.2.2 LTP : Modulation du neurone présynaptique

Ne requérant pas les récepteurs NMDA ni aucun facteur postsynaptique, bien que cela demeure controversé (Yeckel, Kapur et al. 1999; Contractor, Rogers et al. 2002), il existe bel et bien une forme de LTP présynaptique (Bear and Malenka 1994; Nicoll and Schmitz 2005). La LTP présynaptique semble plutôt être induite par une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calciques au niveau du terminal présynaptique (figure 2C). L'augmentation de Ca^{2+} provoque l'activation de l'adénylate cyclase (AC) qui à son tour fait augmenter la concentration d'AMP cyclique (AMPC). Cette augmentation d'AMPC provoque l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Nicoll and Schmitz 2005). Ceci produit une augmentation du glutamate relâché par exocytose. Les protéines Rab3A et RIM1 α qui

sont impliquées dans la coordination des vésicules présynaptique semblent y jouer un rôle important (Castillo, Janz et al. 1997; Castillo, Schoch et al. 2002).

1.2.3 LTD : cannabinoïdes

Suite à la formation de contacts synaptiques dans le système nerveux central (SNC), il se produit, au niveau de plusieurs synapses glutamatergiques et GABAergique, une entrée d'ions calciques postsynaptique prononcée qui dans certains cas provoque l'activation des récepteurs métabotropique GluR ou des récepteurs muscariniques. Cela engendre la synthèse de molécules lipidiques, les endocannabinoïdes (eCB) (Kauer and Malenka 2007). Les principaux endocannabinoïdes qui ont été caractérisés sont l'anandamine (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) (Devane, Hanus et al. 1992; Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995) et leurs récepteurs les mieux connus sont le CB1 et le CB2 (Matsuda, Lolait et al. 1990; Munro, Thomas et al. 1993). Suite à leur synthèse, les endocannabinoïdes voyagent du terminal postsynaptique au terminal présynaptique où ils provoquent une diminution de la relâche des neurotransmetteurs suite à leur liaison au récepteur aux cannabinoïdes CB1, et ce, durant plusieurs secondes (Wilson and Nicoll 2002). De plus, une libération prolongée des endocannabinoïdes provoque une diminution durable (LTD) de la relâche des neurotransmetteurs (eCB-LTD) (Chevalyere, Takahashi et al. 2006) (figure 2D). Cependant, cette induction de eCB-LTD ne se produit qu'à certaines synapses. Des travaux récents suggèrent que la diminution temporaire de la relâche des neurotransmetteurs induite par les

eCB serait médiée par un mécanisme différent que celui qui médie l'eCB-LTD (Chevalleyre, Heifets et al. 2007). En effet, des expériences d'électrophysiologie ont démontré que l'implication de la protéine kinase A (PKA) est essentiel à l'induction d'eCB-LTD, tandis qu'elle ne l'est pas en ce qui concerne la diminution temporaire de la libération des neurotransmetteurs DSI : Depolarization-Induced suppression of inhibition provoquée par les eCB (Chevalleyre, Heifets et al. 2007). De même, l'implication de la protéine RIM1- α s'est avérée essentielle au eCB-LTD, mais non au DSI engendré par la libération d'eCB (Chevalleyre, Heifets et al. 2007).

1.3 Synaptogenèse et plasticité synaptique : rôle de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase A

L'adénylate cyclase (AC) et la protéine kinase A (PKA) sont des régulateurs potentiels de la synaptogenèse et la plasticité synaptique.

Dix isoformes de l'AC sont connus à ce jour; il y a 9 de ces isomères qui sont des protéines transmembranaires à 12 domaines transmembranaires, tandis qu'il y en a un qui est sous forme cytosolique. L'AC catalyse la réaction de conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AC est soumise à de multiples modulateurs tels que le calcium, la PKA, la PKC et les protéines G stimulante (G_s) et

inhibitrice (G_i) (Cooper and Crossthwaite 2006; Willoughby and Cooper 2007; Sadana and Dessauer 2009).

La PKA est une protéine kinase qui phosphoryle des protéines clé suite à son activation par l'AMPc; ce qui a pour effet de modifier leurs activités (Nguyen and Woo 2003). C'est une holoenzyme tétramérique composée de 2 sous-unités régulatrices et de 2 sous-unités catalytiques (Johnson, Akamine et al. 2001). Sous des conditions basales, les 4 sous-unités demeurent soudées et les 2 sous-unités régulatrices bloquent les 2 sous-unités catalytiques. Suite à une augmentation de l'AMPc, 2 molécules d'AMPc se lient à chaque sous-unité régulatrice, ce qui provoque la libération et du même coup, l'activation des sous-unités catalytiques (Johnson, Akamine et al. 2001).

1.3.1 Implication de l'AC dans la synaptogenèse

Bien qu'il y ait peu d'indications quant à l'implication directe de l'AC dans le processus de synaptogenèse, plusieurs recherches ont montré son implication dans le processus de formation des neurites, processus précurseur et essentiel à la synaptogenèse. En effet, son activation a généré la croissance de neurites sur de cellules PC12 en culture (Ravni, Vaudry et al. 2008), de même que sur les cellules AS583.8 (Kwon, Eves et al. 1996) et sur des cultures de neurones striés (Schmidt, Pilgrim et al. 1998). De plus, des expériences menées sur des

cultures de neurones corticaux d'embryons murins effectuées dans le laboratoire de Thayer (Kim and Thayer 2001) suggèrent une implication plus directe de l'AC dans le processus de synaptogenèse. En effet, ils ont observé une augmentation des courants postsynaptiques miniatures évoqués (mEPSC) après avoir préalablement incubé les neurones avec de l'AMPC; ainsi, ils ont constaté une augmentation de synapse fonctionnelle (Kim and Thayer 2001).

1.3.2 Plasticité synaptique : implication de l'AMPC, de la PKA et de l'Epac

Plusieurs études chez les vertébrés et les invertébrés ont démontré le rôle crucial de l'AMPC dans le processus de modification neuronale dépendant de l'activité (Ferguson and Storm 2004; Wang, Ferguson et al. 2004). Dans un même ordre d'idée, il a aussi été démontré que l'AMPC joue un rôle important en ce qui concerne la formation de mémoire (Abel and Nguyen 2008). De plus, de nombreuses publications démontrent l'implication de l'AC dans la plasticité synaptique; celle-ci jouerait, en effet, un rôle dans le LTP (Chetkovich, Gray et al. 1991; Weiskopf, Castillo et al. 1994; Jun, Choi et al. 1998; Villacres, Wong et al. 1998). Par exemple : une stimulation pharmacologique de l'AC induit le LTP dans l'hippocampe (Villacres, Wong et al. 1998) et induit une facilitation synaptique aux jonctions neuromusculaires (JNM) de la drosophile (Cheung, Atwood et al. 2006).

Une augmentation de l'AMPC provoque l'activation de la PKA et du facteur protéique d'échange directement activé par l'AMPC (Epac), dont l'activation serait requise au déclenchement des événements cellulaires de traduction et de transcription modulés par la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK) et par le facteur de transcription : cAMP response element-binding protein (CREB) (Abel and Nguyen 2008). Conséquemment, une augmentation et une diminution de l'activité de la CREB provoquent respectivement une amélioration et une détérioration de la mémoire (Yin, Wallach et al. 1994). Cela suggère l'implication d'Epac (protéine d'échange directement activée par l'AMPC) et de CREB dans le processus de plasticité synaptique. De plus, l'augmentation de l'activité d'Epac provoque une augmentation de la rétention de la mémoire associée à la peur (Ma, Abel et al. 2009). Dans un ordre d'idée, la réduction de l'activité de la PKA provoquée par la surexpression de RAB (une forme dominante négative de la sous-unité régulatrice de PKA chez la souris) produit un déficit de la mémoire spatiale (Abel, Nguyen et al. 1997). Ainsi, la plasticité synaptique induite par une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC, elle-même dépendante de l'activité de l'AC, serait médiée à la fois par l'Epac, le CREB et la PKA.

1.4 Les cannabinoïdes

Le *cannabis sativa* est utilisé depuis des milliers d'années à des fins récréatives ou médicinales telles que pour le traitement de la douleur, la stimulation de l'appétit, le traitement de nausées, de la fièvre et des infections et comme traitement des troubles gynécologiques (Adams and Martin 1996; Lambert 2001). Il est composé de plus de 60 molécules psychoactives, dont la principale et la plus abondante est la molécule de tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC).

Les cannabinoïdes peuvent être divisés en trois catégories : les cannabinoïdes exogènes naturels, les cannabinoïdes exogènes synthétiques (produits en laboratoire) et les endocannabinoïdes (ceux produits de façon endogène par l'organisme) (Lambert and Fowler 2005). La seule plante connue qui produit des cannabinoïdes, en quantité appréciable, est la plante de *cannabis sativa*. Les cannabinoïdes sont particulièrement concentrés chez le plant femelle dans une résine visqueuse produite dans des structures granulaires, trichomes, qui sont communément appelés « cocotte ». En outre, cette résine est riche en terpènes qui de par leur nature volatile sont responsables en grande partie de l'odeur intense et caractéristique des trichomes (Adams and Martin 1996). Les cannabinoïdes naturels sont lipophiles; c'est-à-dire qu'ils peuvent être dissous dans des solvants organiques non polaires, mais non dans des solvants aqueux.

Étant donné la nature lipophile du (Δ^9 -THC), on serait tenté de croire qu'il produise son effet psychoactif en déstabilisant la fluidité des membranes neuronale, plutôt qu'en agissant sur des récepteurs spécifiques. Néanmoins, la découverte du récepteur au cannabinoïde 1 (CB1) en 1990 par Matsuda (Matsuda, Lolait et al. 1990) suivie par celle du récepteur aux cannabinoïdes 2 (CB2) (Munro, Thomas et al. 1993) ont changé la donne. Les cannabinoïdes d'origines végétales agissaient donc par le biais de récepteurs naturellement présents à la surface des cellules humaines; la table était mise quant à la recherche des ligands endogènes de ces récepteurs, les endocannabinoïdes.

1.4.1 Les endocannabinoïdes

Les principaux endocannabinoïdes qui ont été isolés du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) sont l'anandamide (AEA) (Devane, Breuer et al. 1992) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG)(Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995). Les endocannabinoïdes sont des molécules lipidiques, donc hydrophobes. Ils sont les ligands endogènes qui se lient aux récepteurs CB1 et CB2 qui ont été le mieux caractérisés (Piomelli, Giuffrida et al. 2000).

L'anandamide et le 2-AG ne sont pas des neurotransmetteurs standards. En effet, ceux-ci ne peuvent pas être entreposés dans des vésicules présynaptiques et relâchés dans la fente synaptique suite à un potentiel d'action, car ils ne peuvent être dissous en solution aqueuse. Ils sont plutôt produits sur demande à partir de précurseurs lipidiques membranaires (Piomelli, Beltramo et al. 1998).

L'anandamide est produite par l'hydrolyse d'une espèce N-acylatée de la phosphatidylethanolamine (PE), la N-arachydonyl PE. Ce processus est catalysé par la phospholipase D (Piomelli, Beltramo et al. 1998). Cette réaction semble avoir uniquement lieu dans les neurones postsynaptiques (Wilson and Nicoll 2002) et est stimulée par l'interaction de neurotransmetteurs classiques, tel que la dopamine par exemple, avec leurs récepteurs (Giuffrida, Parsons et al. 1999). Suite à sa synthèse, les molécules d'anandamides pourraient voyager non seulement du terminal postsynaptique au terminal présynaptique où elles se lient aux récepteurs aux cannabinoïdes, mais elles pourraient possiblement demeurer dans le neurone présynaptique et être entreposé via un système de transport passif indépendant des ions sodiques (Beltramo, Stella et al. 1997). Néanmoins, malgré que la sélectivité de ce système ait été documentée (Piomelli, Beltramo et al. 1999), les acteurs moléculaires impliqués demeurent inconnus.

La voie de synthèse du 2-AG implique la cascade enzymatique qui catalyse la formation des seconds messagers : le (1,4,5)-triphosphate et le diacylglycérol (DAG). En effet, la phospholipase C (PLC) agit sur phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate et génère ainsi le DAG qui est par la suite transformé en 2-AG par la DAG-lipase (Stella, Schweitzer et al. 1997) (DGL). Deux DGL hautement similaires ont été clonées : la DGL α et la DGL β (Bisogno, Howell et al. 2003). La formation de 2-AG est, tout comme la formation d'anandamide, stimulée par l'activité neuronale (Stella, Schweitzer et al. 1997). De plus, un système de transport commun à l'anandamide semble jouer un rôle dans le transport du 2-AG (Piomelli, Beltramo et al. 1999).

D'une part, l'anandamide est dégradée en acide arachidonique et en éthanamide dans un neurone postsynaptique ou dans une cellule gliale par une enzyme liée à la membrane cellulaire : fatty acid amidohydrolase (FAAH) (Sugiura, Kobayashi et al. 2002; McKinney and Cravatt 2005). D'autre part, le 2-AG est dégradé en acide arachidonique et en glycérol par le neurone présynaptique par la monoacylglycérol lipase (MGL) (Sugiura, Kobayashi et al. 2002).

L'anandamide a une affinité différente pour les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2. En effet, l'anandamide se lie avec plus d'affinité au récepteur CB1; une affinité 4 fois supérieure pour le récepteur CB1 par rapport au récepteur CB2 (Sagan, Venance et al. 1999). Le 2-AG se lie aux récepteurs CB1 et CB2 avec une affinité similaire (Stella, Schweitzer et al. 1997).

1.4.2 Récepteurs aux cannabinoïdes : CB1 et CB2

Les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 font partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux complexes de protéines G. Ils possèdent un domaine extracellulaire N-terminal où l'on retrouve des sites de glycolisation et un domaine intracellulaire C-terminal couplé au complexe de protéines G (Bramblett, Panu et al. 1995) (figure 3).

Figure 3

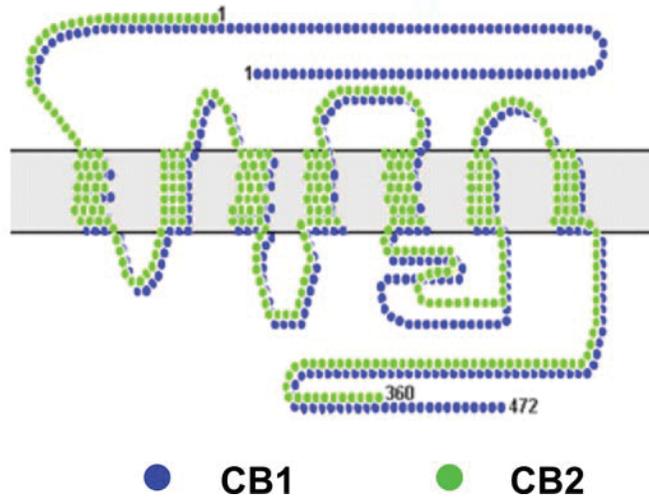


Figure 3. Structure des récepteurs CB1 et CB2; figure adaptée de (Howlett 2002).

Il y a présentement deux récepteurs des cannabinoïdes connus : le récepteur CB1 et le récepteur CB2. Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Leurs séquences protéiques présentent 44% d'homologie.

On a d'abord cru que le récepteur CB1 devait être présent de façon prédominante dans l'encéphale, tandis que le récepteur CB2 devait être localisé dans les tissus périphériques dérivés du système immunitaire (Ameri 1999). Cependant, des recherches plus récentes ont montré la présence du récepteur CB1 dans de nombreux tissus périphériques tels que dans le système cardiovasculaire et reproducteur, de même que dans le tractus

gastro-intestinal (Croci, Manara et al. 1998; Batkai, Jarai et al. 2001; Coutts, Anavi-Goffer et al. 2001). Dans le même ordre d'idée, le récepteur CB2 a été retrouvé dans SNC, et ce, autant au niveau de la microglie que des neurones (Ashton, Friberg et al. 2006).

Les récepteurs CB1 et CB2 sont tout couplés aux complexes protéiques $G_{i/o}$. Ainsi, ils régulent donc l'AC négativement et la protéine kinase activée par le mitogène (MAPK) positivement (Howlett and Mukhopadhyay 2000). De même, ils régulent négativement les canaux calciques des terminaux présynaptiques.

En effet, il a été démontré dans les terminaux présynaptiques que le récepteur CB1 couplé au complexe $G_{i/o}$ transduit le signal initié par les cannabinoïdes en activant la MAPK et en régulant négativement l'activité de l'AC. Ceci se traduit par une diminution de l'AMPc intracellulaire. Ainsi, l'activité de la PKA s'en trouve diminué (Pertwee 1997; Howlett and Mukhopadhyay 2000; Mukhopadhyay, McIntosh et al. 2000), de même que l'activité de CREB et d'Epac (Abel and Nguyen 2008). En l'absence d'activation de CB1, PKA phosphoryle les canaux potassiques, ce qui provoque une diminution de leur perméabilité; la sortie de potassium se trouve donc réduite. En présence de cannabinoïdes, c'est le contraire qui se produit; la sortie de potassium est augmentée (Svizenska, Dubovy et al. 2008). L'activation de CB1 inhibe les canaux calciques présynaptiques, provoquant ainsi une diminution de la relâche des neurotransmetteurs. Il a, en effet, été démontré que les cannabinoïdes inhibent

dans certains cas la relâche du glutamate (Shen, Piser et al. 1996), de l'acétylcholine (Gifford, Tang et al. 1997) et de la noradrénaline, du GABA, de la dopamine, etc. (Schlicker, Timm et al. 1997).

De façon similaire, le récepteur CB2 est aussi couplé aux complexes protéiques $G_{i/o}$ et il régule aussi négativement l'AC (Howlett 2002) et positivement la MAPK (Ho, Uezono et al. 1999). De plus, le récepteur a récemment été détecté dans le système nerveux, ce qui pourrait vouloir dire qu'il joue un rôle similaire au rôle joué par CB1 en diminuant la relâche des neurotransmetteurs.

En outre, il pourrait bien avoir un troisième récepteur aux cannabinoïdes : le récepteur GPR55. Celui-ci a été identifié comme un candidat potentiel pour la première fois *in silico* sur la base de son homologie avec les domaines de CB1 et de CB2 se liant aux cannabinoïdes (Baker, Pryce et al. 2006). La séquence d'acides aminés du récepteur GPR55 est identique à celle de CB1 à 13,5 % et à celle de CB2 à 14,4% (Ryberg, Larsson et al. 2007). Le rôle de ce récepteur demeure, jusqu'à ce jour, inconnu. Les souris possédant une délétion ciblée au niveau du GPR55 n'exhibent aucun phénotype particulier (Johns, Behm et al. 2007). Néanmoins, il a été démontré que le Δ^9 -THC et le cannabidiol interagissent avec le récepteur GPR55 (Oka, Nakajima et al. 2007).

1.4.3 La plasticité à court terme : implication des eCB

La suppression de l'inhibition causée par la dépolarisation (DSI) fut découverte dans les années 90, et ce, dans plusieurs types de neurones (Llano, Leresche et al. 1991; Pitler and Alger 1992; Ohno-Shosaku, Sawada et al. 1998). C'est en 1992 que la dénomination DSI fut introduite par le groupe d'Alger suite à leur découverte du phénomène sur des neurones CA1 de l'hippocampe (Pitler and Alger 1992). La DSI est causée par l'augmentation de Ca^{2+} au niveau du terminal postsynaptique, mais agit au niveau du terminal présynaptique en diminuant la relâche de neurotransmetteurs qui sont, dans ce cas-ci, des molécules de GABA (Llano, Leresche et al. 1991; Ohno-Shosaku, Sawada et al. 1998). Ainsi, cet effet engendré par la dépolarisation du terminal présynaptique, mais produit sur le terminal postsynaptique mit les chercheurs sur la piste d'un messager rétrograde. Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que le messager rétrograde fut mis à jour. En effet, c'est en 2001 que les eCB ont été identifiés comme médiateur de la DSI, et ce, sur plusieurs types de neurones (Kreitzer and Regehr 2001; Ohno-Shosaku, Maejima et al. 2001; Wilson and Nicoll 2001). Le terminal présynaptique détecte les eCB principalement grâce au récepteur CB1, car la concentration de celui-ci est plus élevée que la concentration du récepteur CB2 dans le SNC (Matsuda, Bonner et al. 1993; Egertova and Elphick 2000; Farquhar-Smith, Egertova et al. 2000).

La suppression de l'excitation causée par la dépolarisation (DSE) fut découverte à la même époque que la DSI (Kreitzer and Regehr 2001; Alger 2002; Chevaleyre, Takahashi et al. 2006). La DSE est très similaire au DSI (figure 4). En effet, celle-ci est initiée par l'entrée d'ions calciques dans le terminal postsynaptique et son effet est médié de façon rétrograde jusqu'au terminal présynaptique par les eCB (Kreitzer and Regehr 2001).

Figure 4

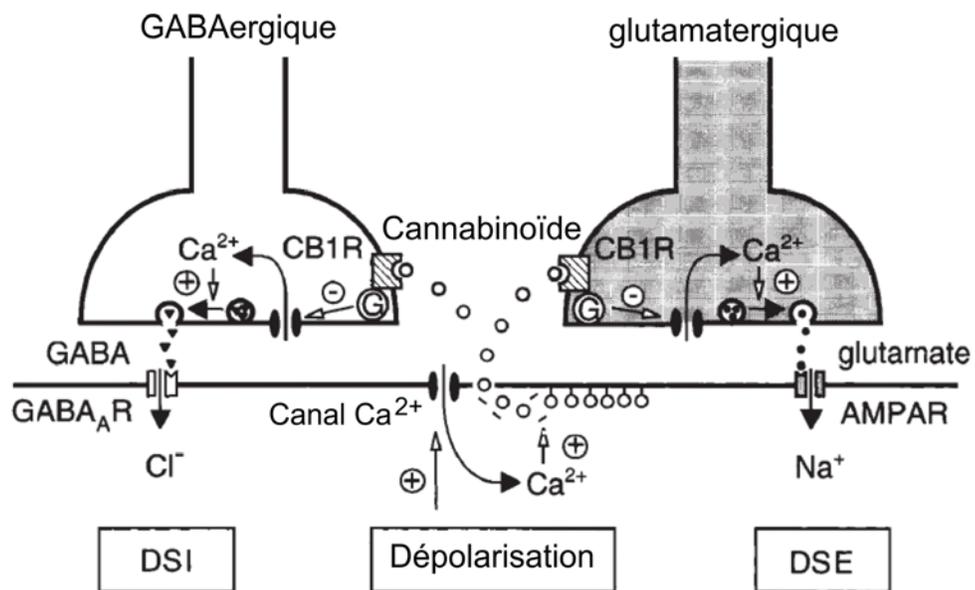


Figure 4. Schéma simplifié des processus de DSI et de DSE; figure adaptée de (Kano, Ohno-Shosaku et al. 2002)

La DSI est montrée à gauche (synapse inhibitrice), tandis que la DSE (synapse excitatrice) est illustrée à droite. La dépolarisation, cause une ouverture des canaux Ca^{2+} voltage dépendant, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration calcique dans le terminal postsynaptique. Ce changement de concentration provoque la synthèse des endocannabinoïde et leur relâche. Par un mécanisme demeurant inconnu, les endocannabinoïdes voyagent du terminal postsynaptique au terminal présynaptique, où ils activent le récepteur CB1 provoquant ainsi l'activation d'une cascade moléculaire qui inhibe l'entrée d'ions calciques dans le terminal présynaptique et une diminution de la concentration calcique se traduit par une diminution de la relâche des neurotransmetteurs. Dans le cas de la DSI, une diminution de la relâche de GABA est observée, tandis que diminution de la relâche de glutamate est observée dans le cas de la DSE.

Des résultats expérimentaux suggèrent fortement que le 2-AG, mais non l'anandamide serait impliqué dans les processus de la DSI et de la DSE (Gao, Vasilyev et al. 2010). En effet, il a été observé que l'inhibition de l'enzyme de dégradation du 2-AG, la monoacylglycérol lipase (MGL) provoque une prolongation de la DSI et de la DSE, tandis qu'il n'en est rien dans le cas de l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'anandamide, la FAAH (Gao, Vasilyev et al. 2010).

En outre, la façon dont l'élévation de la concentration calcique au niveau du terminal postsynaptique provoque la relâche de 2-AG demeure, jusqu'à ce jour, très peu connue. De même, le mécanisme de transport des endocannabinoïdes reste à découvrir.

Chapitre 2 : Rôle du récepteur aux cannabinoïdes CB2 sur la synaptogenèse

2.1 Introduction

Bien que le système des endocannabinoïdes soit étudié depuis plus de deux décennies, il semble qu'il ne nous ait révélé qu'une part de ses secrets. En effet, dû à sa grande distribution, et ce, dès le début du développement, aussi tôt que durant la formation de l'ovocyte (Peralta, Agirregoitia et al. 2011) et jusqu'à sa présence chez les individus matures, il est raisonnable de croire que ce système joue plusieurs rôles, et ce, tout au long de la vie incluant les phases précoces du développement. De plus, l'expression du récepteur CB1 dans certaines régions de l'encéphale est, par exemple, beaucoup plus élevée durant le stade foetal et néonatal qu'à l'âge adulte (Glass, Dragunow et al. 1997).

Le récepteur CB1 fut tout d'abord considéré comme étant prédominant dans le SNC par rapport au récepteur CB2, qui lui, était considéré comme étant plutôt périphérique (Ameri 1999). Le récepteur CB1 est exprimé dans plusieurs régions de l'encéphale incluant l'hippocampe, le cervelet, et les ganglions basaux (Johnson, Rice et al. 1992). Néanmoins la présence du récepteur CB1 a été dernièrement observée dans plusieurs tissus périphériques tels que dans le système cardiovasculaire et reproducteur, de même que dans le tractus gastro-intestinal (Crocì, Manara et al. 1998; Batkai, Jarai et al. 2001; Coutts, Anavi-Goffer et

al. 2001). Dans le même ordre d'idée, le récepteur CB2 a récemment été retrouvé dans le SNC (Ashton, Friberg et al. 2006). Ainsi, les récepteurs CB1 et CB2 sont exprimés dans virtuellement presque tous les tissus de l'organisme.

De plus en plus de preuves portent à penser que les récepteurs aux cannabinoïdes seraient impliqués au cours du développement humain (Fernandez-Ruiz, Berrendero et al. 2000). Il est donc raisonnable de penser que le récepteur CB1 pourrait éventuellement jouer un rôle dans le processus de synaptogenèse et que le récepteur CB2 pourrait faire de même étant donné leur localisation dans le SNC. Néanmoins, cela reste à prouver.

2.1.1 Effet des cannabinoïdes sur la formation des filopodes

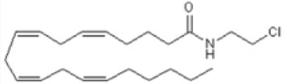
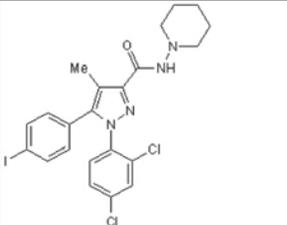
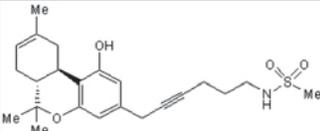
Les contacts initiaux entre les dendrites et les neurones sont suffisants pour engendrer la formation de contacts synaptiques (Ziv and Smith 1996). Ainsi, une formation accrue des filopodes pourrait influencer la formation des synapses, car une augmentation de la quantité de filopodes provoque une augmentation des probabilités d'observer des contacts axo-dendritiques. Des expériences récentes effectuées dans le laboratoire du professeur Bouchard (Hamzeh and Bouchard 2009) ont montré grâce à des expériences *in vitro* sur des cultures de neurones corticaux obtenus d'embryons murins que des agonistes inverses du récepteur CB1, l'AM251 et l'O2050, faisaient augmenter la densité des filopodes,

tandis que l'agoniste ACEA la faisait diminuer. En outre, ils ont aussi démontré que cet effet était médié par la voie de signalisation de l'AC/PKA. En effet, l'augmentation de la densité des filopodes provoquée par les agonistes inverses du récepteur CB1, ainsi que la diminution de la densité de filopodes provoquée par l'agoniste de ce récepteur n'ont pas eu lieu dans le cas où les neurones ont été préalablement incubés avec les inhibiteurs spécifiques de la PKA : KT5720 et H89 (Hamzeh and Bouchard 2009). Dans le même ordre d'idée, ils ont aussi démontré à l'aide de souris KO pour le gène codant pour DCC que ce dernier était essentiel à l'effet des cannabinoïdes sur la densité des filopodes. En effet, l'AM251, l'O2050, et l'ACEA n'ont produit aucun effet quant à la densité des filopodes sur les neurones corticaux d'embryons murins provenant de ces souris *dcc*-KO.

Des expériences préliminaires, tout à fait similaires à celles effectuées pour montrer l'effet de l'agoniste et des agonistes inverses du récepteur CB1, effectuées dans le laboratoire du professeur Bouchard (Bouchard et Gillet, données non publiées) suggèrent que les agonistes inverse du récepteur aux cannabinoïdes CB2, l'AM630 et le JTE907, provoqueraient une augmentation de la densité des filopodes, tandis que les agonistes du récepteur CB2, le JWH015 et le JWH133, diminueraient de celle-ci. Veuillez consulter la figure 5 pour apprécier les structures chimiques des agonistes et agonistes inverses des récepteurs CB1 et CB2 discutées ci-haut.

Figure 5

A

Nom	Structure	Fonction
ACEA		Agoniste du récepteur CB1
AM251		Agoniste inverse du récepteur CB1
O2050		Antagoniste du récepteur CB1

B

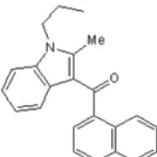
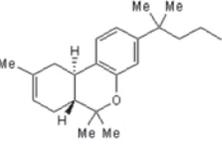
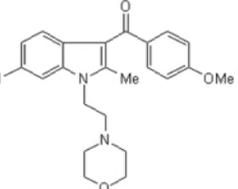
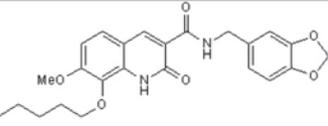
Nom	Structure	Fonction
JWH015		Agoniste du récepteur CB2
JWH133		Agoniste du récepteur CB2
AM630		Agoniste inverse du récepteur CB2
JTE907		Agoniste inverse du récepteur CB2

Figure 5. Tableau montrant la structure des agonistes, agonistes inverses et antagonistes des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2; les structures chimiques proviennent du site Web de Tocris Bioscience : www.tocris.com.

(A) Structure chimique des ligands du récepteur CB1 : arachidonyle -2'-chloroethylamide (ACEA), N- (pipéridine-1-yle) -5- (4-iodophényle) -1- (2,4-dichlorophényl) -4- méthyle -1H- pyrazole -3- carboxamide (AM251), (6aR,10aR) -3- (1-Méthanesulfonylamino -4- hexyn-6-yl) -6a,7,10,10a -tétrahydro -6,6,9- triméthyle-6H-dibenzo[*b,d*]pyran (O2050).

(B) Structure chimique des ligands du récepteur CB2 : (2- Methyl -1- propyle -1H-indol -3- yle) -1- naphthalenylméthanone (JWH015), (6aR,10aR) -3- (1,1-Diméthylbutyle) -6a,7,10,10a- tétrahydro -6,6,9- triméthyle -6H- dibenzo[*b,d*]pyrane (JWH133), 6- Iodo -2- méthyle -1- [2- (4- morpholinyle)éthyl] -1H- indol -3- yle](4-méthoxyphényle)méthanone (AM630), N- (1,3- Benzodioxol -5- ylméthyl) -1,2-dihydro -7- méthoxy -2- oxo -8- (pentyloxy) -3- quinolinec arboxamide (JTE907).

2.1.2 Effet du récepteur CB2 sur la formation des filopodes

Le récepteur CB2 a été localisé non seulement dans le système immunitaire, mais aussi dans le SNC (Ashton, Friberg et al. 2006). En outre, il a aussi été démontré que celui-ci est, tout comme le récepteur CB1, couplé au complexe de protéine G (Bramblett, Panu et al. 1995). En prenant cela en considération et en se basant sur les résultats quant à la médiation de la formation des filopodes régie par le récepteur CB1 et sur les résultats préliminaires obtenus en ce sens en ce qui concerne le récepteur CB2, nous avons émis l'hypothèse que les agonistes inverses de CB2 pourraient vraisemblablement faire augmenter la densité de filopodes, tandis que ces agonistes pourraient la faire diminuer, et ce, par un mécanisme requérant l'activation de la PKA (voir la figure 6A). En effet, étant donné que le récepteur CB2 régule négativement l'AC tout comme le récepteur CB1 (Howlett 2002), il se pourrait fort bien qu'il médie les précurseurs synaptiques que sont les filopodes par la voie de signalisation AC/PKA.

Figure 6

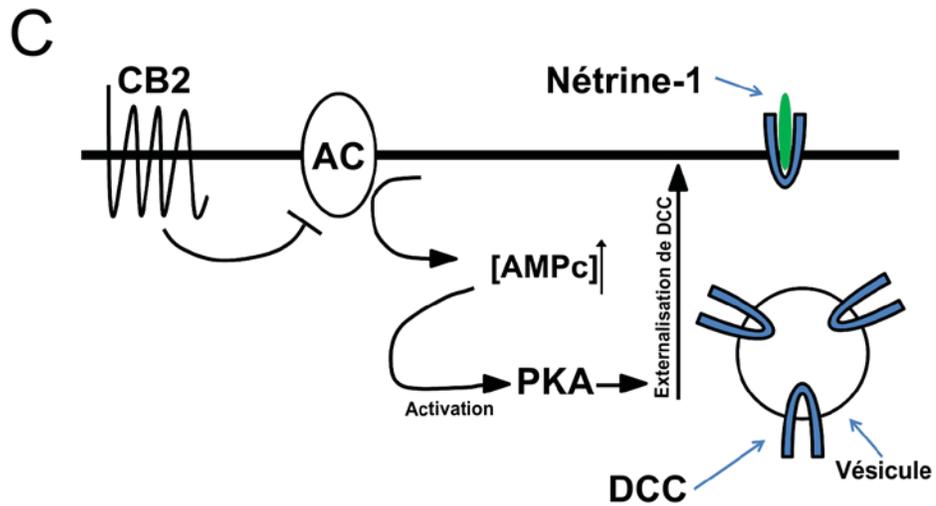
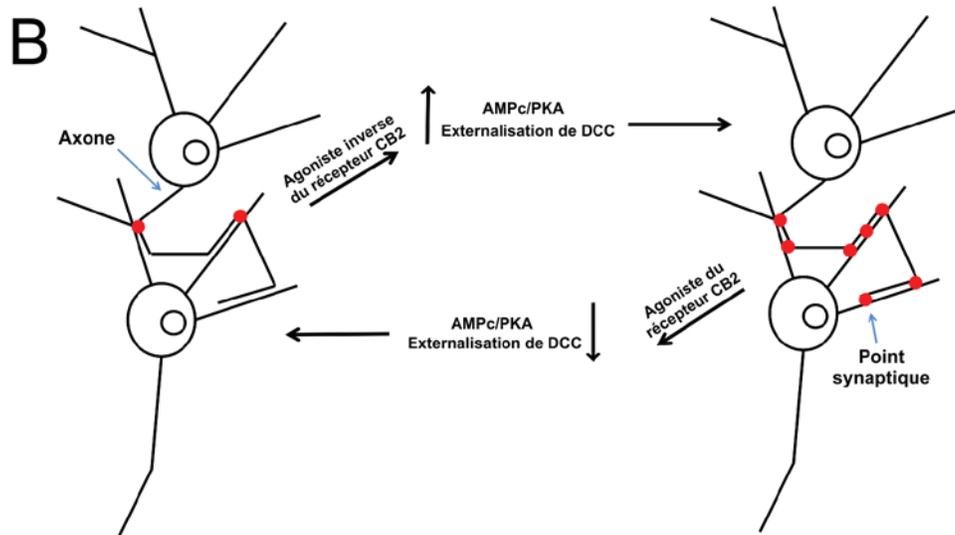
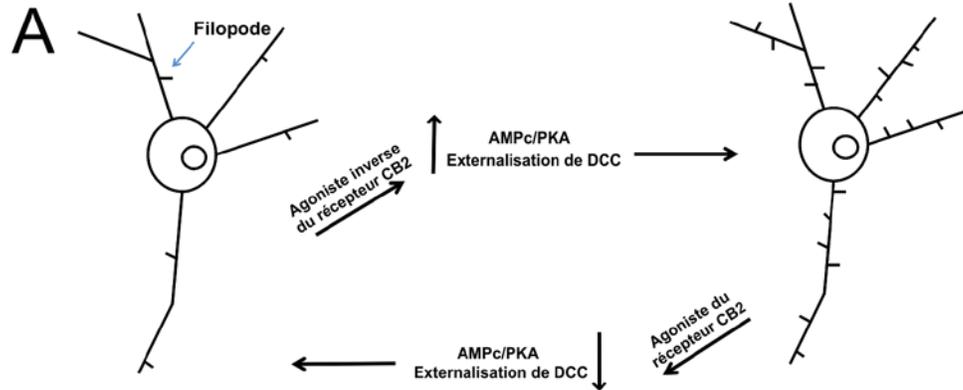


Figure 6. Schémas montrant l'hypothèse principale stipulant que les agonistes inverses du récepteur CB2 augmenteraient la synaptogenèse, tandis que ses agonistes la diminueraient.

(A) Les agonistes inverses du récepteur CB2 tels que l'AM630 et le JTE907 feraient augmenter la densité des filopodes, tandis que ses agonistes le JWH015 et le JWH133 la feraient diminuer.

(B) Les agonistes inverses du récepteur CB2 tels que l'AM630 et le JTE907 augmenteraient la densité des contacts synaptiques, tandis que ses agonistes JWH015 et JWH133 la diminueraient.

(C) La modulation de la synaptogenèse par le récepteur CB2 serait transmise par la voie de signalisation de l'AC/PKA et par le biais du récepteur DCC. C'est-à-dire que lorsque le récepteur CB2 est bloqué, l'activité de l'augmentation de l'activité de l'AC provoque l'activation de la PKA qui elle induit l'externalisation du récepteur DCC qui produit en fin de compte une augmentation de la synaptogenèse.

2.1.3 Effet des cannabinoïdes sur la formation des contacts synaptiques

Les contacts synaptiques peuvent être détectés par immunocytochimie en marquant la protéine associée aux vésicules présynaptiques (SVP38) et la sous-unité du récepteur AMPA, GluR1 et en observant leur apposition. Des quantifications récentes de l'apposition de ces protéines effectuées dans le laboratoire du professeur Bouchard (Bouchard et Hamzeh 2009) sur des neurones d'embryon murins ont montré que les agonistes inverses (AM251 et O2050) du récepteur CB1 faisaient augmenter la densité des points synaptiques, tandis que l'agoniste (ACEA) la faisait diminuer. De plus, ils ont aussi montré que cet effet était médié par la voie de l'AC/PKA. En effet, après avoir préalablement incubé les neurones avec des inhibiteurs de la PKA (KT5720 ou H89), ils n'ont observé aucune augmentation de la densité des points synaptiques après la stimulation avec les agonistes inverses de CB1. Dans le même ordre d'idée, l'utilisation d'un activateur de l'AC, la forskoline, s'est traduite par une augmentation de densité des points synaptiques.

2.1.4 Effet du récepteur CB2 sur la formation des contacts synaptiques

Des expériences préliminaires effectuées dans le laboratoire du professeur Bouchard (Gilet et Bouchard, données non publiées) avec les agonistes inverses et les agonistes du récepteur CB2, ont suggérés une implication du récepteur CB2 quant à la modulation de la densité des points synaptiques. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse suivante : Les agonistes inverses de CB2 provoqueraient une augmentation de la densité des points synaptiques, tandis que les agonistes produiraient une diminution de ceux-ci, et ce, par le biais de la voie de signalisation de l'AC/PKA (voir la figure 6B)

2.1.5 Effet des cannabinoïdes sur la formation des synapses : fonctionnalité

Des expériences, permettant d'apprécier la recapture synaptique et d'ainsi évaluer le nombre de synapses fonctionnelles, effectuées sur des neurones d'hippocampe en culture, ont montrées une augmentation des synapses fonctionnelles provoquée par un activateur de l'AC, la forskoline (Kim and Thayer 2001). De plus, ils ont aussi montré que des agonistes du récepteur tels que le WIN55212-2 et l'ACEA inhibait l'augmentation de la formation de synapses fonctionnelles provoquée par la forskoline. En outre, ils ont aussi montré qu'une augmentation intracellulaire de l'AMPC provoquait une augmentation de la formation de synapses fonctionnelles. En effet, ils ont observé une augmentation de la formation de

synapses fonctionnelles lorsqu'ils incubaient les neurones avec un analogue de l'AMPC perméable à la membrane cellulaire, le Sp-AMPC (Kim and Thayer 2001).

Ainsi, ces expériences suggèrent que l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes, plus particulièrement l'activation du récepteur CB1, provoque une diminution de la formation de synapses fonctionnelles et que cette diminution est reliée à une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPC.

2.1.6 Synaptogenèse : implication de nétrine-1 et de son récepteur DCC

La famille protéique des nétrines est généralement connue pour son implication dans le guidage axonal (Manitt and Kennedy 2002; Briancon-Marjollet, Ghogha et al. 2008). Il y a trois types de nétrines qui sont solubles (nétrine-1, nétrine-3/2 et -4/B), tandis qu'il y en a deux types qui sont ancrés à la membrane par le biais de protéines glucophosphatidylinositol (GPI) : nétrine-G1 et nétrine-G2 (Mehlen and Llambi 2005).

Le récepteur DCC (Deleted in Colorectal Cancer) est une protéine membranaire qui fut découverte en 1990 (Fearon, Cho et al. 1990). Le récepteur DCC est non seulement connu pour sa qualité de gène suppresseur de tumeur, mais aussi pour son implication dans le

processus de guidage axonal en réponse à son ligand, nétrine-1 (Keino-Masu, Masu et al. 1996; Leonardo, Hinck et al. 1997; Moore and Kennedy 2006; Argaw, Duff et al. 2011). En outre, il a été démontré que l'activation de la PKA provoque une externalisation du récepteur DCC tout en accentuant à la fois le guidage et la croissance axonale médiés par nétrine-1 (Bouchard, Moore et al. 2004; Moore and Kennedy 2006; Bouchard, Horn et al. 2008). Dans le même ordre d'idée, des résultats expérimentaux récents ont montré que la croissance axonale induite par les agonistes inverses du récepteur CB1 (AM251 et O2050) étaient inhibés lorsque le récepteur DCC était bloqué par le biais d'un anticorps : DCCfb (DCC fonction blocking). De plus, des expériences menées dans le laboratoire du professeur Bouchard ont aussi montré que les agonistes inverses de CB1 (AM251 et O2050) faisaient augmenter la quantité de récepteurs DCC présents à la surface cellulaire; le même effet fut produit par l'inhibition de la voie de signalisation AC/PKA (Hamzeh and Bouchard 2009). De plus, il est très intéressant de mentionner que les effets positifs des agonistes inverses du récepteur CB1 sur la synaptogenèse (augmentation de la densité des filopodes et de la densité des contacts synaptiques) furent inhibés par le blocage du récepteur DCC (Hamzeh et Bouchard).

Ainsi, plusieurs données expérimentales suggèrent que l'effet des cannabinoïdes serait non seulement médié par la voie de l'AC/PKA, mais aussi par une modulation de la présence de DCC à la surface cellulaire. Ce qui suggère également une implication du récepteur DCC dans le processus de synaptogenèse.

2.1.7 Hypothèses

À partir des résultats expérimentaux mentionnés ci-haut et à partir du fait que l'effet récepteur CB2 est, tout comme celui du récepteur CB1, modulé par la voie de l'AC/PKA (Howlett and Mukhopadhyay 2000), nous avons émis les hypothèses suivantes :

- **Les agonistes inverses du récepteur CB2 augmenteraient la densité des filopodes, tandis que ses agonistes la feraient diminuer.**
- **Les agonistes inverses du récepteur CB2 augmenteraient la densité des contacts synaptiques, tandis que ses agonistes la diminueraient.**
- **Ces effets seraient médiés par la voie de la PKA; c'est-à-dire que l'activation de celle-ci serait nécessaire à l'augmentation de la densité des filopodes et à l'augmentation de la densité des points de contacts synaptiques.**
- **La formation des précurseurs synaptiques induite par l'inactivation du récepteur CB2 serait dépendante du récepteur DCC.**

La figure 6 présente un sommaire de ces hypothèses qui peuvent être résumées comme suit : Les agonistes inverses du récepteur CB2 augmenteraient la synaptogenèse, tandis que ces agonistes la feraient diminuer.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Réactifs, anticorps et agents pharmacologiques

Les réactifs nécessaires à la culture cellulaire et à la dissection des embryons tels que le Neurobasal, la solution tampon minimale HEPES, la solution saline HBSS (Hank-Balanced Salt Solution), la solution de médium essentiel minimum S-MEM, la poly-D-lysine les suppléments (B27, N2, Glutamine (Glutamax)) les antibiotiques P/S (pénicilline, streptomycine) et le FBS (sérum foetal de bovin) furent obtenus d'Invitrogen Canada (Burlington, Ontario).

Les anticorps primaires dirigés contre le récepteur CB1, contre la protéine associée aux vésicules (SVP38) et contre la protéine associée aux microtubules (MAP2) furent achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario). Ceux dirigés contre le marqueur associé à la croissance (GAP43), la sous-unité du récepteur AMPA (GLUR1) et contre la protéine des neurofilaments de taille moyenne (NFM) proviennent de Chemicon (Temecula, Californie), tandis que ceux dirigés contre le récepteur de nétrine-1 (DCC) ont été achetés chez BD Pharmigen (San Diego, Californie). Les anticorps secondaires, dirigés contre la souris ou le lapin, Alexa 546 et Alexa 488 couplés à des chromophores rouge et vert respectivement furent obtenus chez Molecular Probes (Eugene, Oregon).

Les antagonistes (AM251 et O2050) et l'agoniste (ACEA) du récepteur CB1 et les antagonistes (AM630 et JTE907) et les agonistes (JWH015 et JWH133) du récepteur CB2 furent obtenus chez Tocris Bioscience (Ellisville, Missouri), tandis que l'activateur de l'adénylate cyclase, la forskoline (FSK), les inhibiteurs de la PKA, KT5720 et H89, de même que le marqueur nucléaire, HOE 33258 (Bis-benzamide) furent obtenus chez Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario).

Les souris *M. musculus* (CD1) gestantes d'embryon E14/E15 furent obtenues chez Charles River Laboratories (St-Constant, Québec).

2.2.2 Culture primaire de neurones corticaux

Toutes les manipulations sur les souris furent effectuées selon les règles établies par CCPA (Conseil canadien de protection des animaux). Les animaux furent tous euthanasiés par incubation au CO₂ quelques heures après leur livraison.

Brièvement, des cultures cellulaires furent préparées selon les grandes lignes établies par Brewer et Al.(Brewer, Torricelli et al. 1993) et par Banker et Goslin(Banker and Goslin 1991; Banker and Goslin 1998).

Des lamelles de 12 mm furent désinfectées à l'alcool 70% avant d'être déposées dans des plaques des 24 puits. Elles furent alors incubées en présence d'une solution de poly-D-Lysin (20 µg/ml) durant 3 heures à température pièce pour rendre leurs surfaces adhérentes.

Pendant ce temps, les cortex d'embryon E14/E15 furent extraits par dissection en milieu stérile et recueillis dans du HBSS à 4 °C. Les cortex furent, alors, incubés pendant 15 minutes dans une solution de S-MEM contenant 0.25% de trypsine et 0.001% de DNase dans un incubateur à température (37 °C) et pression de CO₂ (5 %) contrôlées dans le but de dissocier les neurones. La trypsine et la DNase furent inactivées par une incubation de 5 minutes des neurones dans une solution de S-MEM contenant 10% de FBS. Suite à cette incubation, les neurones furent définitivement séparés les uns des autres grâce à une trituration effectuée à l'aide de pipettes pasteurs dont les embouts furent préalablement rétrécis et polis à la flamme. Les neurones furent alorsensemencés dans les plaques de 24 puits, après que la solution de poly-D-lysine y soit retirée et que celles-ci aient été lavées à l'eau double distillée, à raison de 15 000 par cm² dans un volume total de 1 ml de Neurobasal supplémenté (1 % de B27; 0,5 % de N2; 2mM de glutamine; 1 unité/ml de pénicilline et de 1 µg/ml de streptomycine).

Les cultures cellulaires furent maintenues dans des incubateurs à température (37 °C) et pression de CO₂ (5 %) contrôlées. Prenez note que le CO₂ permet un maintien stable du

pH auquel les neurones sont exposés. La moitié du volume du médium de culture (0,5 ml par puits) fut remplacée aux 3^e et 6^e jours de culture dans le cas des neurones utilisés à la fois pour les expériences après 8 (DIV 8) ou après 10 (DIV 10) jours de culture *in vitro*.

Seules les cultures présentant une bonne viabilité furent utilisées pour les expériences de localisation et de quantification.

2.2.3 Stimulation des neurones en culture avec les agents pharmacologiques

Les neurones ont été stimulés tel que stipulé dans la section des résultats par l'ajout de 300 nM, d'AM630, d'AM251, de JWH015, de JWH133 ou de JTE907; de 200 nM de KT5720 ou de H89; de 50 nM d'ACEA ou de 10 µM de FSK selon le cas.

Prenez note que les divers agents pharmacologiques ont été, dans un premier temps, dilués dans du DMSO (sauf l'ACEA qui a été dilué dans l'éthanol). Dans un deuxième temps, des volumes de 200 µl de milieu de culture ont été prélevés dans chaque puits et mélangés avec les quantités d'agents pharmacologiques (préalablement mélangé au DMSO ou à l'éthanol) requises pour obtenir les concentrations finales mentionnées ci-haut dans un

volume de 1ml. Puis, ces solutions ont été réintégrées dans leurs puits respectifs. Cette opération fut effectuée pour permettre aux solutions supplémentées des divers agents pharmacologiques contenant du DMSO ou de l'éthanol d'être bien mélangées avec les volumes de 200 μ l de milieu de culture prélevés pour permettre ainsi une stimulation homogène des neurones par les divers agents pharmacologiques.

Dans des incubateurs à température (37 °C) et pression de CO₂ (5 %) contrôlées, les neurones ont été stimulés durant une période d'une heure dans le cas des expériences portant sur la densité des filopodes, tandis qu'ils ont été stimulés durant une période de 24 heures pour les expériences portant sur la densité des points synaptiques.

2.2.4 Immunocytochimie

Les neurones furent fixés, à 4 ou 37 °C tel que spécifié dans la section des résultats, avec une solution de 4 % de PFA (paraformaldéhyde) dilué dans du PBS (phosphate buffered saline) au pH de 7,4 durant une période de 15 minutes à température pièce. Toutes les autres solutions furent utilisées à une température de 4 °C et toutes les incubations ont été effectuées à température pièce (environ 20 °C) à moins qu'il ne soit indiqué autrement.

Après un lavage au PBS, les neurones fixés furent traités avec une solution de blocage (Blocking buffer : 0.1 % Tween-20, 2 % BSA (Bovin serum albumin), 2 % goat serum dans du PBS 0,1 M à pH 7,4) durant 30 minutes.

Puis, les neurones fixés furent incubés durant 18 heures à 4 °C avec les anticorps primaires dilués dans la solution bloquante aux ratios suivant tel qu'indiqué dans la section des résultats : anti-CB1 (1 :1000), anti-CB2 (1 :1000), anti-DCC (1 :500), anti-GAP43 (1 :2000), anti-SVP38 (1 :500), anti-GluR1 (1 :500), anti-MAP2 (1 :5000) et anti-NFM (1 :5000).

Après cette incubation, les neurones furent lavés une fois avec du PBST (PBS avec 0.1 % de Tween-20) pendant 5 minutes, puis encore 3 fois avec du PBST durant 20 minutes à chaque fois.

Les neurones furent alors incubés durant 2 heures à la noirceur avec les anticorps secondaires Alexa 488 (1 :2000) et/ou Alexa 546 (1 :2000) selon le cas.

Suite à cela, les neurones furent incubés à la noirceur durant 20 minutes avec une solution de HOE 33258 (1 :100 000), puis lavés 3 fois, toujours à la noirceur, avec du PBST (durant 20 minutes à chaque fois).

Les lamelles furent alors retirées délicatement, rincées à l'eau double distillée, montées à raison de 3 par lame sur un milieu de montage Dabco-PVD, laissées au repos à la noirceur durant 18 heures, puis congelées à -20 °C jusqu'à la prise de photos.

2.2.5 Prise de photos

Les photos montrant la localisation des récepteurs CB1 et CB2 sur les dendrites, les axones et les filopodes, de même que leur proximité avec le récepteur DCC furent obtenues grâce à un microscope droit Olympus BX51w1 couplé logiciel d'analyse Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics), tandis que les photos des neurones utilisés pour la quantification de la densité des filopodes et la quantification des points synaptiques furent obtenues grâce à un microscope inversé Olympus IX71 couplé au logiciel Image Pro Plus 5.1.

2.2.6 Quantification de la densité des filopodes et des points synaptiques

La densité des filopodes par neurite fut établie en comptant le nombre de filopodes (protubérances de moins de 10 μm de long) sur une distance de 30 μm à partir du corps cellulaire puis en divisant ce nombre par la surface du neurite.

Dans un premier temps, la densité des points synaptiques (apposition des marqueurs GluR1 et SVP38) par neurite fut établie de façon similaire. C'est-à-dire que le nombre de points synaptiques fut compté sur une distance de 30 μm à partir du corps cellulaire, puis divisé par la surface du neurite.

Dans un deuxième temps, les points synaptiques ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ et de la macro Punctae Analyser (développé par Bary Wark) à l'intérieur d'un cercle de 80 μm de diamètre centré sur le corps cellulaire selon les grandes lignes de la méthode (Ippolito and Eroglu 2010) développée par le groupe de recherche de Cagla Eroglu *et al.*

Au moins 40 neurites (figure 5 et 6) ou 30 neurones (figure 7) ont été analysés pour chaque expérience, soit la densité des filopodes, la densité des points synaptiques.

2.3 Résultats

Dans le but d'évaluer l'effet des cannabinoïdes médié par le récepteur CB2, nous avons d'abord évalué la localisation de celui-ci sur des neurones d'embryons murins E14/E15 cultivés *in vitro* pendant 8 jours (DIV8). De même, nous avons aussi évalué la localisation du récepteur DCC. De plus, nous avons aussi évalué la localisation du récepteur CB1. Nous avons poursuivi en quantifiant, à l'aide de neurones en culture, DIV8, l'effet des cannabinoïdes médié par le récepteur CB2 sur la densité des filopodes et la densité des points synaptiques.

2.3.1 Localisation des récepteurs CB1 et CB2

C'est grâce à la microscopie et à l'immunocytochimie que nous avons localisé les récepteurs CB1 et CB2. Veuillez prendre note que nous avons effectué ces localisations sur des cultures de neurones d'embryons murins E14/E15 cultivés pour des périodes de 6 (données non présentées) (DIV6) et 8 jours *in vitro* (DIV8). Les neurones utilisés furent cultivés à faible densité, c'est-à-dire à raison de 15 000 par cm² pour faciliter l'observation de neurones isolés. Dans un premier temps, nous avons utilisé un marqueur associé au cytosquelette et restreint aux dendrites, la MAP2, ainsi qu'un marqueur restreint aux axones, le NFM pour apprécier la localisation axono-dendritique des récepteurs CB1 et CB2. Ces deux récepteurs aux cannabinoïdes ont été détectés à la fois sur les dendrites et les axones (voir les figures 7A, 7B, 8A et 8B). En effet, on observe la présence du récepteur CB1 à la fois sur les dendrites (marquées par MAP2) et sur les axones (non marqués MAP2) (figure 7A). De plus, cette présence à la fois dendritique et axonale a été confirmée par la détection du récepteur CB1 sur les axones (marqués par NFM), de même que sur les dendrites (non marqués par NFM) (figure 7B). Veuillez prendre note que le récepteur CB2 aussi été détecté de la même façon sur les dendrites et les axones (figure 8A et 8B). Grâce à cette méthode, les récepteurs CB1 et CB2 ont aussi été détectés à la fois sur les dendrites et les axones sur des neurones cultivés pendant 6 jours (DIV6) (données non présentées). Il est intéressant de mentionner que les résultats obtenus quant à la localisation du récepteur CB1 confirment les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire du professeur Bouchard (Hamzeh et Bouchard, 2009).

Dans un autre ordre d'idée, mais toujours dans le but d'apprécier l'implication des cannabinoïdes dans la synaptogenèse, nous avons évalué la présence des récepteurs CB1 et CB2 dans les précurseurs synaptiques que sont les filopodes (voir figure 7C et 8C). Pour ce faire, nous avons utilisé un marqueur associé aux filaments d'actine fortement présent dans les filopodes, GAP43, afin de pouvoir confirmer ou infirmer leur présence sur les filopodes. Comme on peut le voir sur les exemples des figures 7C et 8C, les récepteurs CB1 et CB2 furent détectés sur les filopodes marqués par GAP43. Ainsi, cela suggère leur implication dans le processus de synaptogenèse.

Figure 7

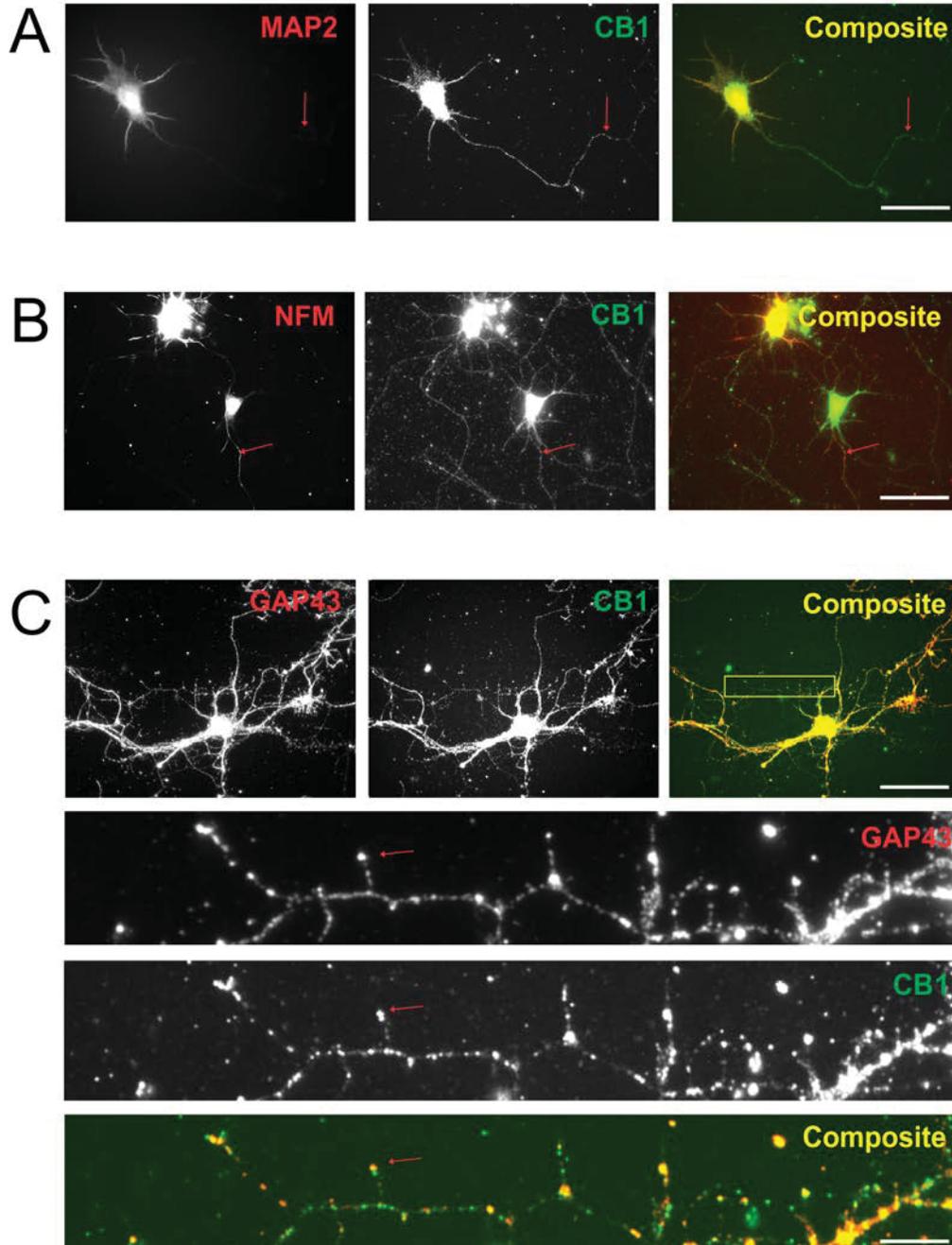


Figure 7. Le récepteur aux cannabinoïdes CB1 est exprimé par les neurones corticaux in vitro. Il est localisé à la fois sur les dendrites, les axones et les filopodes.

Les neurones corticaux ont été prélevés d'embryons murins E14/E15 et cultivés *in vitro* durant 8 jours (DIV 8) sous atmosphère contrôlée dans du milieu de culture Neurobasal supplémenté. Par immunocytochimie, le récepteur CB1 est teint en vert, tandis que le marqueur de dendrites MAP2, le marqueur d'axones NFM et le marqueur de filopodes GAP43 sont teints en rouge montrent les photos différents marqueurs tels qu'indiqué.

(A) Le récepteur CB1 est non seulement présent sur les dendrites tout comme MAP2, mais aussi sur l'axone tel qu'indiqué par la flèche rouge.

(B) Comme indiqué par la flèche, le récepteur CB1 est localisé sur l'axone tout comme NFM; de même, il est localisé sur les dendrites.

(C) Le récepteur CB1 est localisé sur les filopodes marqués GAP43, tel qu'indiqué sur les grossissements.

(Les barres d'échelle représentent une longueur de 50 μm dans tous les panneaux, sauf dans les panneaux du bas où elles représentent une longueur de 6 μm .)

Figure 8

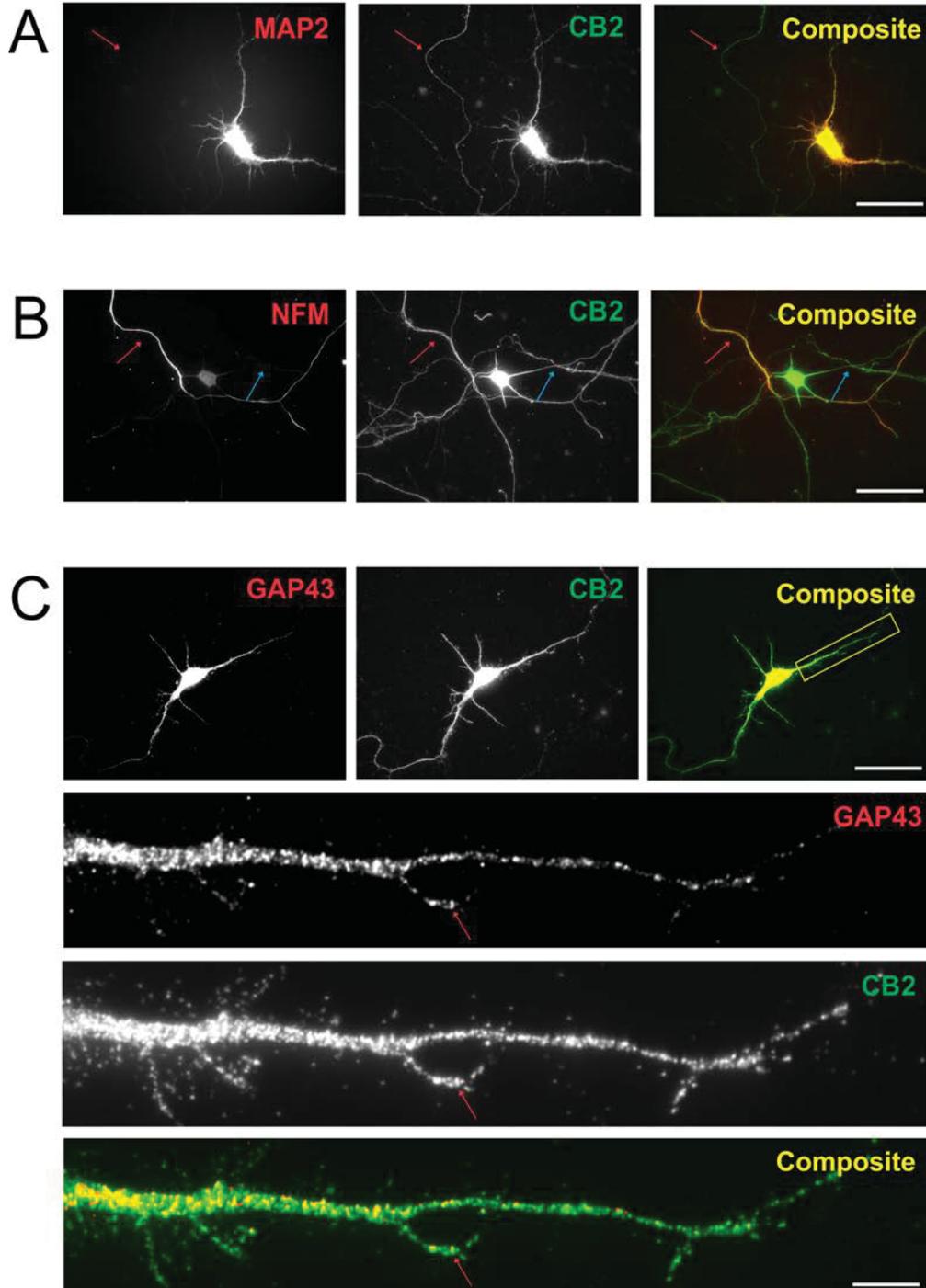


Figure 8. Le récepteur aux cannabinoïdes CB2 est exprimé par les neurones corticaux *in vitro*. Il est localisé à la fois sur les dendrites, les axones et les filopodes.

Les neurones corticaux ont été prélevés d'embryons murins E14/E15 et cultivés *in vitro* pendant 8 jours (DIV 8) sous atmosphère contrôlée dans du milieu de culture Neurobasal supplémenté. Grâce à l'immunocytochimie, le récepteur CB2 est marqué en vert, tandis que le marqueur de dendrites MAP2, le marqueur d'axones NFM et le marqueur de filopodes GAP43 sont teints en rouge. Les différents panneaux montrent les photos des marqueurs tel qu'indiqué.

(A) Le récepteur CB2 est non seulement présent sur les dendrites marquées par la protéine MAP2, mais aussi sur l'axone tel qu'indiqué par la flèche rouge.

(B) Comme indiqué par la flèche rouge, le récepteur CB2 est localisé sur l'axone tout comme NFM; de même, tel qu'indiqué par la flèche bleue, il est localisé sur les dendrites.

(C) Le récepteur CB2 est localisé sur les filopodes marqués par GAP43, tel qu'indiqué sur les grossissements.

(La barre d'échelle représente une longueur de 50 μm dans tous les panneaux, sauf dans les photos du bas du panneau C où elle représente une longueur de 6 μm .)

2.3.2 Localisation du récepteur de la nétrine-1 : (Deleted in Colorectal Cancer) DCC

Dans le but de comprendre l'éventuelle implication du récepteur DCC sur la synaptogenèse modulée par les récepteurs CB1 et CB2, nous avons déterminé la localisation de celui-ci. Tout comme dans le cas des récepteurs CB1 et CB2, c'est à l'aide de la microscopie et de l'immunocytochimie que le récepteur DCC a été localisé, et ce, sur des neurones d'embryons murins E14/E15 cultivés pour une période de 8 jours *in vitro* (DIV8) à faible densité (15 000 par cm²) pour permettre l'observation de neurones isolés. C'est à l'aide du marqueur de neuro filament, NFM, que nous avons pu apprécier la présence du récepteur DCC à la fois dans les dendrites et les axones. En effet, comme on peut l'observer sur la figure 9A, le récepteur DCC est à la fois localisé sur les dendrites (voir la flèche bleue) et sur les axones (voir la flèche rouge), tandis que le marqueur NFM est bien entendu uniquement localisé sur les axones (voir la flèche rouge).

Nous avons aussi vérifié la présence du récepteur DCC sur les précurseurs synaptiques que sont les filopodes. Pour ce faire, nous avons utilisé le marqueur GAP43 fortement présent dans les filopodes. Ainsi, nous avons constaté la présence du récepteur DCC dans les filopodes (voir les grossissements de la figure 9).

Figure 9

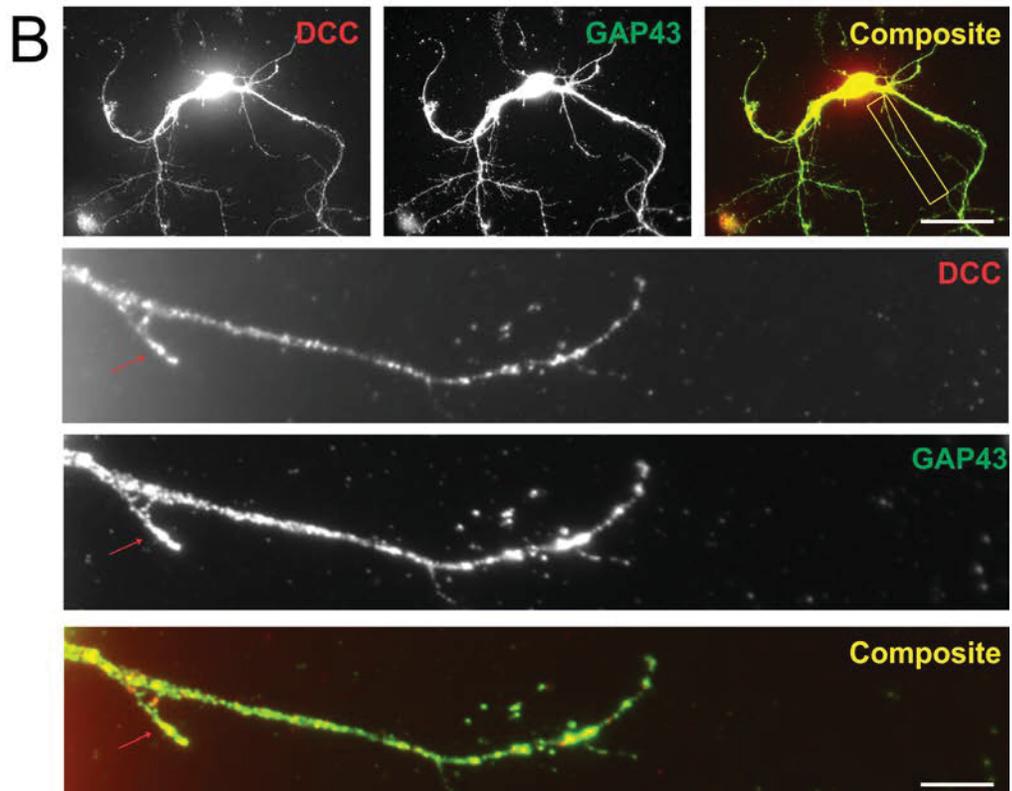
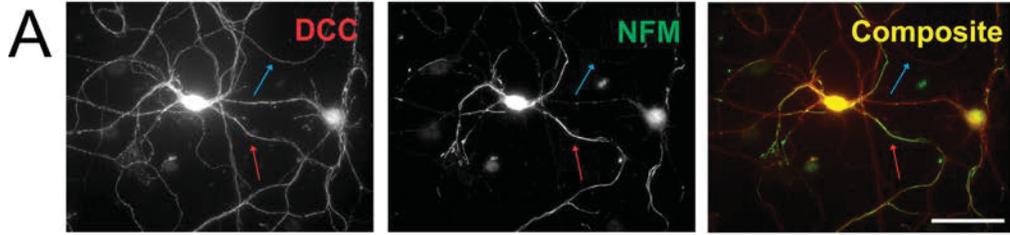


Figure 9. Le récepteur de netrine-1, DCC, est exprimé par les neurones corticaux *in vitro*. Il est localisé à la fois sur les dendrites, les axones et les filopodes.

C'est dans du milieu de culture Neurobasal supplémenté que les neurones corticaux ont été prélevés d'embryons murins E14/E15 et cultivés *in vitro* durant 8 jours (DIV 8) sous atmosphère contrôlée. Par immunocytochimie, le récepteur DCC est teint en rouge, tandis que le marqueur de dendrites MAP2, le marqueur d'axones NFM et le marqueur de filopodes (GAP43) sont teints en vert. Les différents panneaux montrent les photos des marqueurs tel qu'indiqué.

(A) Comme indiqué par la flèche rouge, le récepteur DCC est localisé sur l'axone; de même, tel qu'indiqué par la flèche bleue, il est localisé sur les dendrites.

(B) Le récepteur DCC est présent sur les filopodes à proximité de GAP43, le marqueur associé aux filaments d'actine, tel qu'indiqué sur les grossissements.

(La barre d'échelle représente une longueur de 50 μm dans les panneaux supérieurs et une longueur de 6 μm dans les panneaux inférieurs (panneaux de grossissement)).

Figure 10

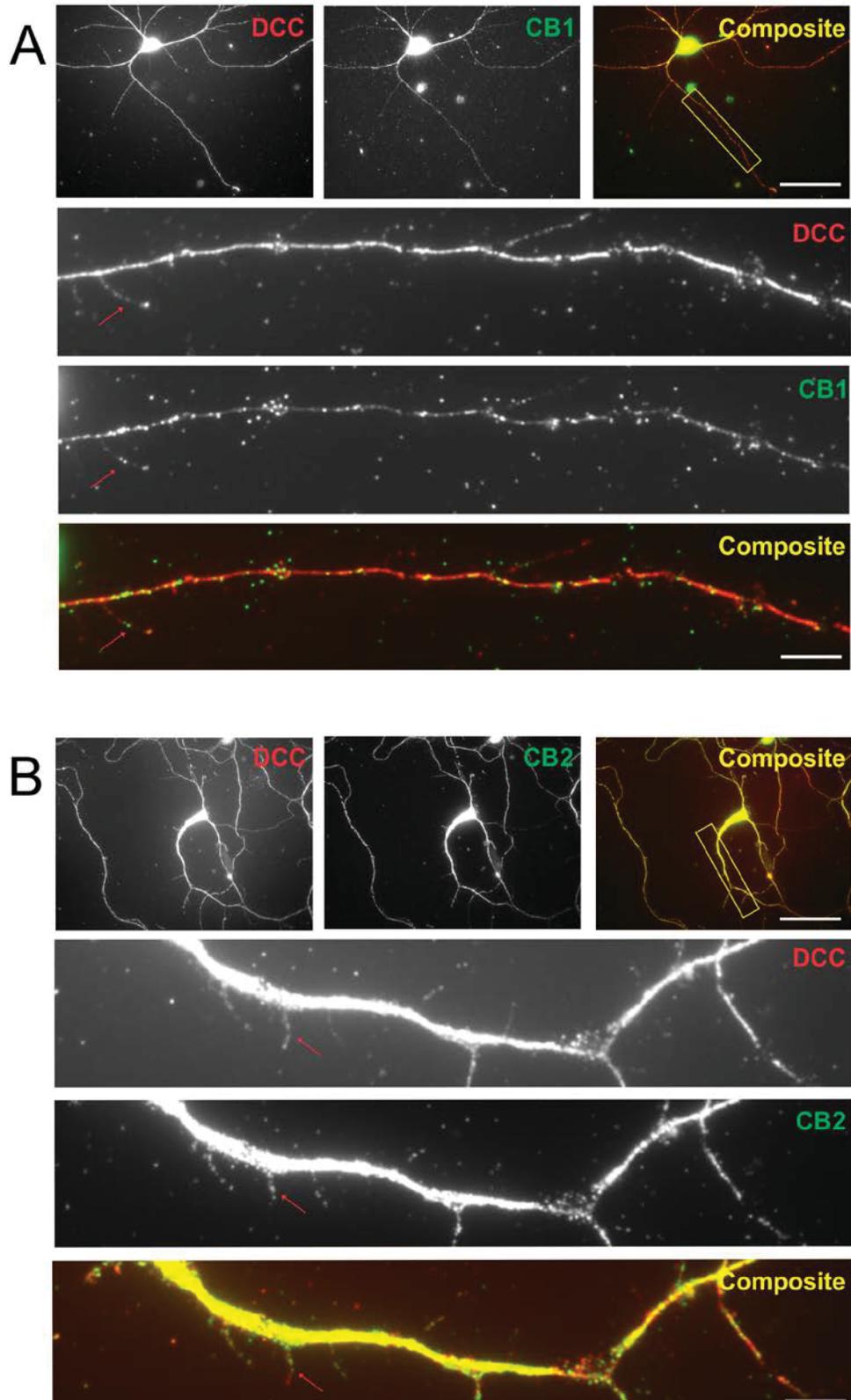


Figure 10. Le récepteur de la nétrine-1, DCC, est exprimé par les neurones corticaux *in vitro*. Il est localisé sur les filopodes à proximité des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2.

Les neurones corticaux provenant d'embryons murins E14/E15 et cultivés *in vitro* durant 8 jours (DIV 8) sous atmosphère contrôlée dans du milieu de culture Neurobasal supplémenté. Grâce à l'immunocytochimie, le récepteur DCC est teint en rouge, tandis que les récepteurs CB1 sont teints en vert tel qu'indiqué.

(A) Le récepteur DCC est présent dans les filopodes à proximité du récepteur CB1 tel qu'indiqué par la flèche rouge sur les panneaux de grossissement.

(B) Le récepteur DCC est présent dans les filopodes à proximité du récepteur CB2 tel qu'indiqué par la flèche rouge sur les panneaux de grossissement.

(La barre d'échelle représente une longueur de 50 μm dans les panneaux supérieurs et une longueur de 6 μm dans les panneaux inférieurs (panneaux de grossissement).)

Toujours dans le but de vérifier l'implication du récepteur DCC dans la synaptogenèse médiée par les récepteurs CB1 et CB2, nous avons évalué sa localisation dans les filopodes par rapport aux récepteurs aux cannabinoïdes. Pour ce faire, nous avons marqué par immunocytochimie les récepteurs CB1, CB2 et DCC (voir la figure 10). Comme on peut le voir dans les grossissements de la figure 4A et 4B, le récepteur DCC est localisé dans les filopodes, et ce, à proximité des récepteurs CB1 et CB2. Ainsi la présence de DCC à proximité des récepteurs aux cannabinoïdes évoque la possibilité de son implication dans le processus de synaptogenèse.

2.3.4 Effet modulé par le récepteur CB2 sur la densité des filopodes

Récemment, des expériences, *in vitro* sur des neurones corticaux d'embryons murins, menées dans le laboratoire du professeur Bouchard ont montré que l'activation du récepteur CB1 par l'agoniste ACEA faisait diminuer la densité des filopodes, tandis que les agonistes inverses, AM251 et O2050, provoquaient le contraire, c'est-à-dire qu'ils faisaient augmenter la densité des filopodes (Hamzeh et Bouchard, 2009).

C'est en se basant sur ces résultats que nous avons décidé d'évaluer l'effet modulé par le récepteur CB2 sur la densité des filopodes grâce à la même technique expérimentale. Ainsi, nous avons stimulé des neurones corticaux d'embryons murins E14/E15, cultivés pendant 8 jours (DIV8), avec les agonistes de CB2, JWH015 ou JWH133, ou avec les agonistes inverses de celui-ci, AM630 ou JTE907, pendant 1 heure (voir la figure 11 et la section Méthode) pour ensuite fixer les neurones pour observer la densité de filopodes grâce au marqueur GAP43. En premier lieu, nous avons observé beaucoup de variation à l'intérieur des groupes eux-mêmes. Ainsi, on peut, par exemple, remarquer une grande différence quant à la densité des filopodes sur les 2 neurones provenant du groupe témoins présentés sur la figure 11A. Nous n'avons détecté aucun effet sur la densité des filopodes provoqué par les agonistes ou les agonistes inverses de CB2 (voir figure 11B). Ce que nous avons observé, c'est que la densité des filopodes variait grandement d'une expérience à l'autre (figure 11B, expérience 1 à 5) et qu'aucun effet notable n'était observé lorsqu'on combinait les résultats de ces 5 expériences (figure 11C). Au moins 40 neurites par expériences furent quantifiées.

C'est à partir de ces résultats non attendus et de la difficulté à faire la différence entre ce qui pouvait être des filopodes ou simplement des impuretés causées par le marquage non spécifique de GAP43, que nous avons décidé de requantifier, toujours à l'aveugle, les mêmes photos déjà quantifiées des groupes témoins et des groupes stimulés à la forskoline des expériences numéro 2 et numéro 5 (figure 11D et 11E). C'est ainsi, que nous avons constaté que notre difficulté à affirmer la présence de filopodes ou non avec certitude représentait un

problème réel, car nous avons obtenu pour les mêmes photos, quantifiées à 2 reprises, des variations allant jusqu'à plus de 20% quant à la densité des filopodes (figure 11D et 11E). Ainsi, nous ne pouvons ni confirmer, ni infirmer l'hypothèse de départ stipulant que les agonistes de CB2 feraient diminuer la densité des filopodes, tandis que les agonistes inverses la feraient augmenter.

Figure 11

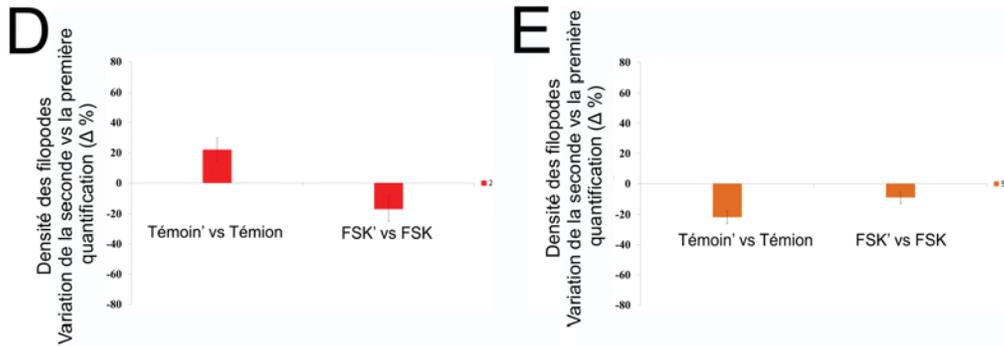
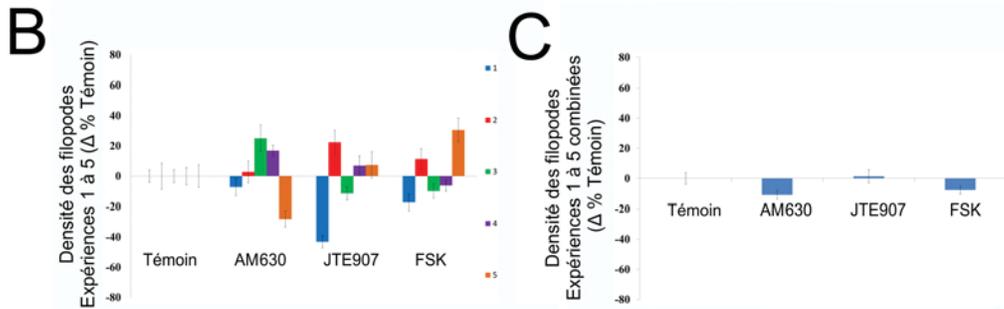
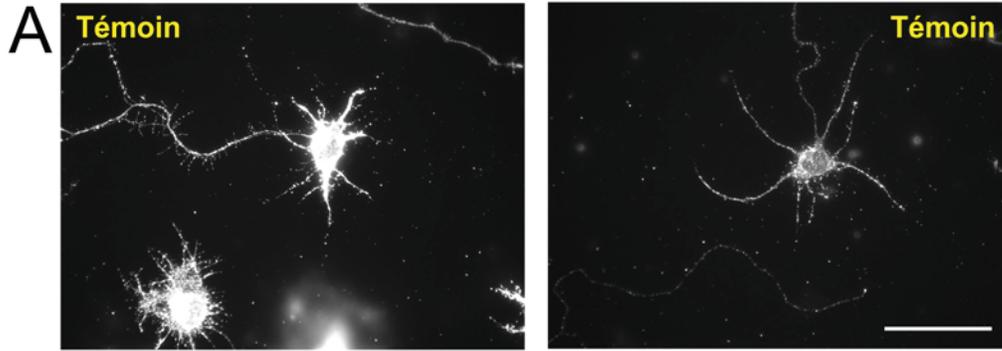


Figure 11. L'effet des agents pharmacologiques (AM630, JTE907 et FSK) sur la densité des filopodes est non détectable par la méthode présentée ci-dessous. En outre, les quantifications dérivées de l'analyse des photos sont non reproductibles.

Pour réaliser ces quantifications, des neurones corticaux ont été prélevés d'embryons murins E14/E15 et cultivés *in vitro* durant 8 jours (DIV8) sous atmosphère contrôlée dans du milieu de culture Neurobasal supplémenté. Les neurones ont été stimulés pendant une heure avec les agonistes inverses du récepteur CB2, l'AM630 (300 nM) ou le JTE907 (300nM) ou par l'activateur de l'adénylate cyclase (AC), la forskoline (FSK). Les neurones ont été fixés à une température de 4° C à DIV8.

Les filopodes ont pu être observés grâce au marqueur GAP43. Le nombre de filopodes par μm^2 (densité des filopodes) a été quantifié à l'aveugle sur les dendrites et les axones proximaux sur une distance de 30 μm .

(A) Exemple de neurones du groupe témoin montrant la grande variabilité de la densité des filopodes. (Barre d'échelle = 50 μm)

(B) Effet variable, d'une expérience à l'autre (1 à 5), des divers agents pharmacologiques sur la densité des filopodes. Au moins 40 neurites furent quantifiées pour chaque expérience.

(C) Moyenne des variations des expériences 1 à 5 montrant l'absence d'effet significatif détectable des divers agents pharmacologiques.

(D-E) Requantifications (nommées prime) à l'aveugle des photos des groupes témoins et des groupes FSK des expériences 2 **(D)** et 5 **(E)** comparées aux quantifications originales montrant une grande variation des résultats de quantification allant jusqu'à plus de 20%.

2.3.5 Effet modulé par le récepteur CB2 sur la densité des points synaptiques

Tout comme dans le cas de la densité des filopodes, des expériences récentes effectuées *in vitro* sur des neurones corticaux d'embryons murins ont montré que l'activation du récepteur CB1 par l'agoniste ACEA faisait diminuer la densité des points synaptiques, tandis que les agonistes inverses, AM251 et O2050, provoquaient le contraire, c'est-à-dire qu'ils augmentaient la densité des points synaptiques (Hamzeh et Bouchard, 2009).

Dans le but d'évaluer l'effet produit par le récepteur CB2, nous avons stimulé des neurones corticaux d'embryons murins E14/E15, cultivés pendant 8 jours (DIV8), avec les agonistes de CB2, JWH015 ou JWH133, ou avec les agonistes inverses de celui-ci, AM630 ou JTE907, pendant 1 heure (voir la figure 11 et la section Méthode) pour ensuite les fixer afin

d'observer la densité des points synaptiques. Ceux-ci consistent en l'apposition des vésicules présynaptiques, observées grâce au marqueur SVP38, et des terminaux postsynaptiques, observés grâce au marqueur GLUR1. Tout comme dans le cas de l'évaluation de la densité des filopodes, les neurones ont présenté une grande variabilité quant à la densité des points synaptiques. Un exemple de cette variabilité est présenté sur la figure 12A. Les agonistes ou les agonistes inverses de CB2 (figure 12B) n'ont produit aucun effet significatif sur la densité des points synaptiques; nous avons observé que la densité des filopodes variait grandement d'une expérience à l'autre (figure 12B, expérience 1 à 6) sans qu'il n'y ait aucune tendance qui en ressorte. La variation semble être aléatoire. De plus, aucun effet notable ne fut observé en combinant les résultats des 6 expériences (figure 12C). Au moins 40 neurites furent quantifiées pour chaque expérience.

À partir de ces résultats, nous avons décidé, tout comme nous avons fait dans le cas de la densité des filopodes de quantifier à nouveau, toujours à l'aveugle, les mêmes photos déjà quantifiées des groupes témoins et des groupes stimulés à la forskoline des expériences numéro 4 et numéro 6 (figure 12D et 12E). Pour les mêmes photos, quantifiées à 2 reprises, nous avons obtenu des variations allant jusqu'à plus de 25% quant à la densité des points synaptiques (figure 12D et 12E). Ainsi, il apparaissait clairement que nous ne pouvions distinguer avec certitude les points synaptiques. Nous ne pouvons donc ni confirmer, ni infirmer l'hypothèse de départ stipulant que les agonistes de CB2 feraient diminuer la densité des points synaptiques et que les agonistes inverses la feraient augmenter.

Figure 12

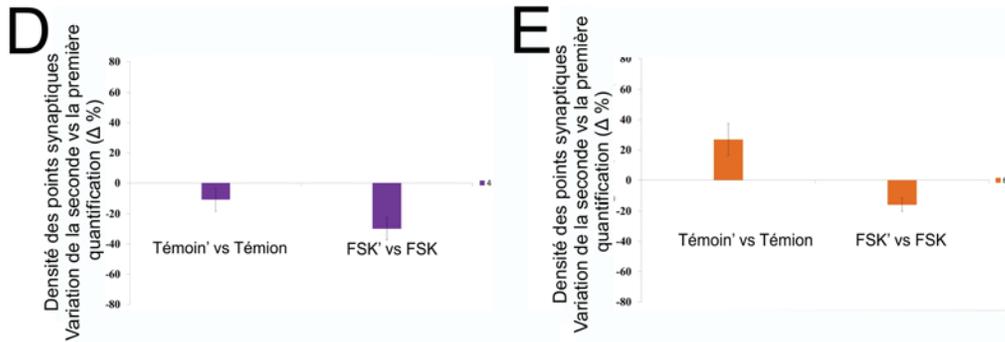
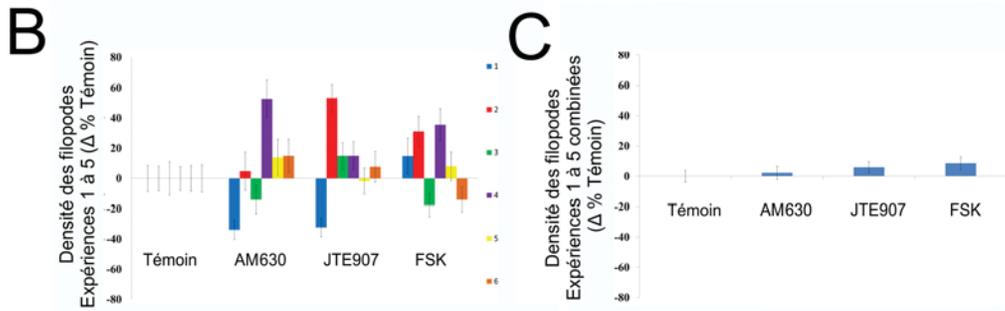
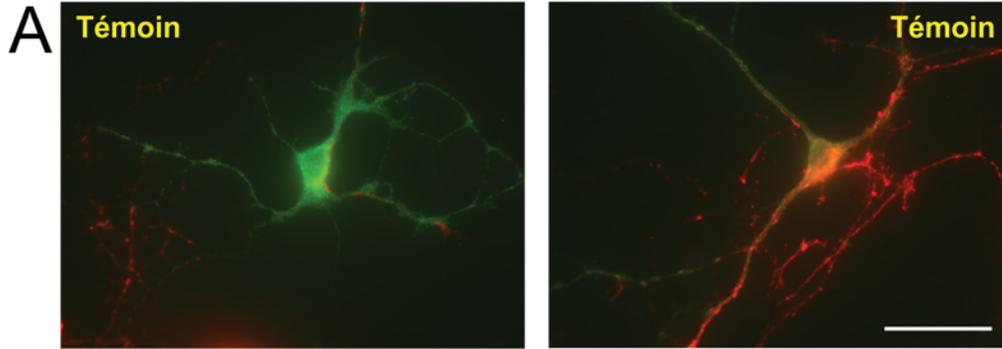


Figure 12. L'effet des agents pharmacologiques (AM630, JTE907 et FSK) sur la densité des points synaptiques est non détectable par la méthode présentée ci-dessous. Les quantifications dérivées de l'analyse des photos sont très variables.

Pour réaliser ces quantifications, des neurones corticaux ont été prélevés d'embryons murins E14/E15 et cultivés *in vitro* durant 10 jours (DIV10) sous atmosphère contrôlée dans du milieu de culture Neurobasal supplémenté. Après une période de 9 jours en culture *in vitro* (DIV9) les neurones ont été stimulés durant 24 heures à l'aide d'agonistes inverses du récepteur CB2, l'AM630 (300 nM) et le JTE907 (300nM) et par l'activateur de l'adénylate cyclase (AC), la forskoline (FSK). Les neurones ont été fixés à une température de 4° C à DIV 10.

Par immunocytochimie, la protéine associée aux vésicules présynaptique, la SVP38, est marquée en rouge, tandis que la sous-unité GluR1 du récepteur glutaminergique AMPA associée aux terminaux postsynaptiques est marquée en vert. Le nombre de points synaptiques (apposition de SVP38 et GluR1) par μm^2 (densité des points synaptiques) a été quantifié à l'aveugle sur les dendrites et les axones proximaux sur une distance de 30 μm .

(A) Exemple de neurones du groupe témoin montrant la grande variabilité de la densité des points synaptiques. (Barre d'échelle = 50 μm)

(B) Effet variable, d'une expérience à l'autre (1 à 6), des divers agents pharmacologiques sur la densité des points synaptiques. Au moins 40 neurites furent quantifiées pour chaque expérience.

(C) Moyenne des variations des expériences 1 à 6 montrant l'absence d'effet significatif détectable des divers agents pharmacologiques.

(D-E) Re-quantifications (nommées prime) à l'aveugle des photos des groupes témoins et des groupes FSK des expériences 4 **(D)** et 6 **(E)** comparées aux quantifications originales montrant une grande variation des résultats de quantification allant jusqu'à plus de 25%.

2.3.6 Nouvelle méthode permettant une quantification constante de la densité des points synaptiques

Tout d'abord, dans le but d'obtenir une préparation de niveau supérieur, nous avons fixé les neurones avec une solution contenant de la PFA (4%) préalablement chauffée à 37°C pour augmenter la vitesse de fixation et amoindrir le changement de température abrupte et ainsi potentiellement éviter la dégradation des structures cellulaires. De plus, les neurones ont été fixés par perfusion; c'est-à-dire que le milieu de culture fut retiré progressivement au moment de l'ajout progressif de la PFA. Ceci permet de limiter les changements de morphologie cellulaire dus aux variations de températures et d'osmolarités abruptes, ainsi que des perturbations mécaniques qui en découlent (Ippolito and Eroglu 2010; Cholewa 2011).

Étant donné que le signal émis par l'anticorps secondaire couplé au marqueur SVP38, apparaît sous forme de points ayant environ 0,5 µm de diamètre et que le chromophore de l'anticorps Alexa 546 (rouge) se décolore rapidement sous l'effet de la lumière polarisée du microscope, nous avons décidé d'utiliser l'anticorps secondaire Alexa 488 (vert), qui possède un chromophore plus résistant à la lumière polarisée, pour marquer la protéine SVP38 et l'anticorps Alexa 546 pour marquer la sous-unité du récepteur AMPA associé aux terminaux postsynaptiques, car celle-ci étant plus nombreuse, l'effet de décoloration s'en trouve

amoindrie. Ces deux modifications au protocole nous ont permis d'obtenir des images d'une plus grande qualité (voir la photo de droite de la figure 13A).

Enfin, nous avons utilisé le logiciel ImageJ ainsi que la macro « punctae analyser » développée par Barry Wark pour quantifier la densité des points synaptiques. Nous avons quantifié celle-ci à l'intérieur d'un cercle de 80 μm centré sur le corps cellulaire tel qu'illustré sur la photo de droite de la figure 13A, et ce, selon la méthode utilisée par le laboratoire de la professeure Eroglu (Ippolito and Eroglu 2010).

Les résultats de 3 expériences réalisées grâce à cette méthode comparant le groupe témoins au groupe FSK sont présentés sur la figure 13B. De même, les résultats combinés de ces expériences sont présentés sur la figure 13C.

Les photos de l'expérience numéro 2 ont été quantifiées une seconde fois, comme présenté sur la figure 13D, et la différence entre les 2 quantifications est inférieure à 2 %. Ainsi, les résultats obtenus à l'aide du logiciel ImageJ et de la macro « punctae analyser » sont reproductibles contrairement aux quantifications visuelles.

Figure 13

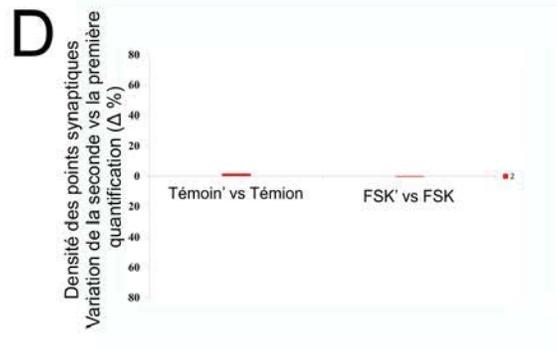
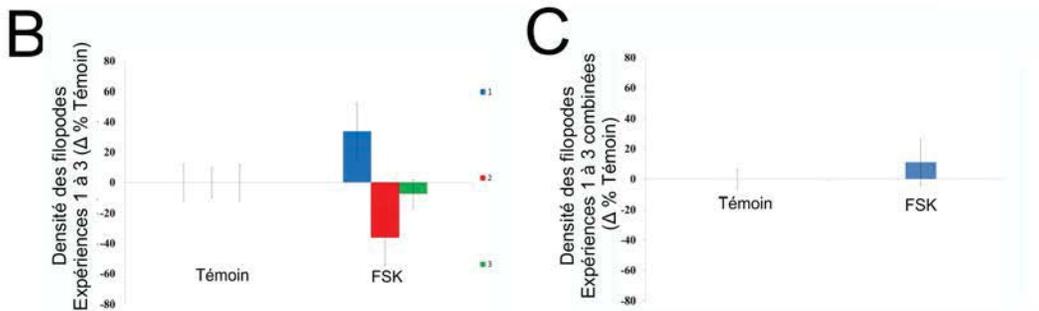
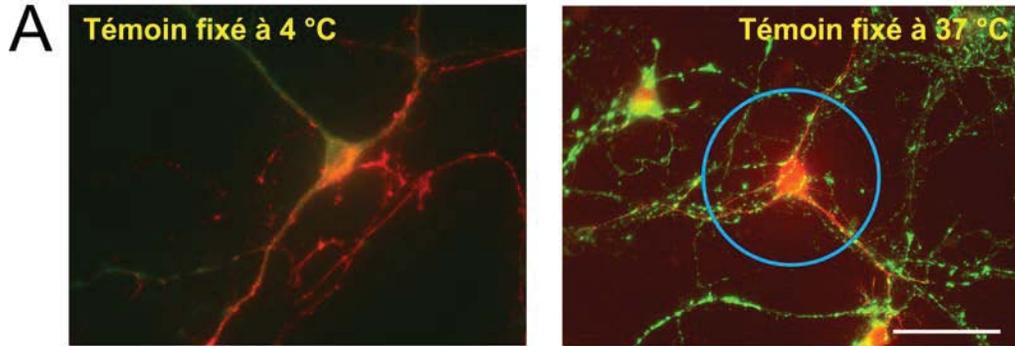


Figure 13. L'effet de l'agent pharmacologique FSK sur la densité des points synaptiques est non détectable par la méthode présentée ci-dessous. Cependant, les quantifications dérivées de l'analyse des photos sont reproductibles.

Les neurones corticaux ont été prélevés d'embryons murins E14/E15 et cultivés *in vitro* durant 10 jours (DIV 10) sous atmosphère contrôlée dans du neurobasal supplémenté. Après une période de 9 jours en culture *in vitro* (DIV 9) les neurones ont été stimulés par l'activateur de l'adénylate cyclase (AC), la FSK, pendant 24 heures tel qu'indiqué sur les graphiques (B et C). Les neurones ont été fixés à une température de 37° C à DIV 10. Par immunocytochimie, la protéine associée aux vésicules présynaptiques, SVP38, est marquée en vert, tandis que la sous-unité GluR1 du récepteur glutaminergique AMPA associé aux terminaux postsynaptiques est marquée en rouge. Le nombre de points synaptiques (apposition de SVP38 et GluR1) a été quantifié sur chaque neurone à l'intérieur d'un cercle de 80 µm de diamètre centré sur le corps cellulaire grâce au logiciel ImageJ et à la macro « *puntae analyser* »(Ippolito and Eroglu 2010).

(A) Comparaison de la qualité photographique des cellules fixées à 4 °C (GluR1 en vert et SVP38 en rouge) dans le panneau de gauche à celles fixées à 37 °C (GluR1 en rouge et SVP38 en vert) dans le panneau de droite (cette méthode fut utilisée pour réaliser les expériences présentées ici. (Barre d'échelle = 50 µm)

(B) Effet variable, d'une expérience à l'autre (1 à 3), des divers agents pharmacologiques sur la densité des points synaptiques tels qu'indiqué. Au moins 30 neurones furent quantifiés pour chaque expérience.

(C) Moyenne des variations des expériences 1 à 3 montrant l'absence d'effet significatif détectable de FSK.

(D) Requantifications (prime) à l'aveugle des photos du groupe témoin et du groupe FSK de l'expérience numéro 2 comparées aux quantifications originales montrant la reproductibilité des résultats (variation < 2 %)

2.4 Discussion

Étant donné la nature des résultats obtenus, nous n'avons pu n'y infirmer ni confirmer nos hypothèses. Nous n'avons pu vérifier si la modulation de la synaptogenèse produite par le récepteur aux cannabinoïdes, CB2, était régulée par la voie de signalisation de l'AC/PKA, de même que par l'externalisation du récepteur DCC, car nous n'avons détecté aucune modulation significative de la synaptogenèse engendrée par les agonistes et les agonistes inverses du récepteur CB2 en ce qui a trait à la densité des filopodes et la densité des points synaptiques. Néanmoins, les expériences effectuées sont préliminaires et un raffinement de la méthode expérimentale est nécessaire pour infirmer ou confirmer ces hypothèses hors de tous doutes.

2.4.1 Localisation des récepteurs CB1 et CB2

Comme on peut le constater sur les figures 7 à 10, les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 sont localisés de façon tout à fait similaire. En effet, ceux-ci sont présents à la fois sur les dendrites et les axones, de même que sur les filopodes (figure 7 et 8). De plus, tous deux sont localisés à proximité du récepteur DCC sur les filopodes (figure 7C et 8C).

Ainsi, en considérant les expériences effectuées sur le récepteur CB1 quant à la densité des filopodes et la densité des points synaptiques dans le laboratoire du professeur

Bouchard (Hamzeh et Bouchard, 2009) et le fait que les deux récepteurs (CB1 et CB2) soient couplés à la protéine $G_{i/o}$ (Bramblett, Panu et al. 1995), il est étonnant qu'un effet médié par le récepteur CB1 quant à la densité des filopodes et la densité des points synaptiques ait été détecté (Hamzeh et Bouchard), tandis que nous n'avons détecté aucun effet pour le récepteur CB2. Néanmoins, il est tout à fait possible que la synaptogenèse soit médiée par le récepteur CB1, mais non par le récepteur CB2. Cela dit et étant donné la nature très variable des résultats que nous avons obtenus dans le cas du récepteur CB2, il serait vraisemblablement plus sage de reproduire les expériences montrant la modulation de la synaptogenèse par le biais du récepteur CB1 et du même coup tester les effets du récepteur CB2 avant d'assumer que le récepteur CB1 module la synaptogenèse et que le récepteur CB2 ne la module pas.

Bien que nous ayons effectué les manipulations avec le plus grand soin et que nous avons méthodiquement vérifié les dates de péremption des divers agents pharmacologiques utilisés, il n'est pas impossible que la variabilité des résultats ait été causée par des erreurs expérimentales telles que, par exemple, le dosage des agents pharmacologiques, de même que par une éventuelle dégradation de ceux-ci. Dans le même ordre d'idée, il n'est pas impossible que la variabilité soit due à une variation de la qualité des cultures cellulaires, et ce, même si nous avons évalué et approuvé visuellement la qualité de chaque culture qui a été utilisée dans le cadre de ces expériences.

2.4.2 Variation des résultats quant à la densité des filopodes et la densité des points synaptiques

Plusieurs facteurs peuvent être à la source de la variation des résultats. Tout d'abord, il apparaît clairement, grâce aux expériences desquelles les photos ont été quantifiées à deux reprises (figure 11D et figure 12D), qu'une des sources de variation est la difficulté d'évaluer la présence ou non des structures cellulaires que sont les filopodes et les points de contacts synaptiques. De plus, ces variations peuvent atteindre jusqu'à près de 40 % lorsqu'elles sont combinées. En effet, lorsque la variation de la seconde quantification de la densité synaptique est de plus de 20 % supérieure pour le groupe témoin et de près de 20% inférieure pour le groupe FSK, on obtient variation d'environ 40% lorsqu'on compare le groupe FSK au groupe témoin (par rapport à la première quantification, voir la figure 11D). Ce problème de variation lié au jugement humain peut être réglé possiblement de deux façons. Premièrement, un marquage d'une plus grande qualité, ainsi que des photos ayant une meilleure définition pourrait éventuellement permettre une quantification visuelle reproductible. Deuxièmement, une quantification numérique donnant des résultats identiques et reproductibles pourrait résoudre le problème, et ce, même si celle-ci est imparfaite en termes absolus, étant donné que les erreurs générées par celle-ci seraient jusqu'à un certain degré constantes.

Ainsi donc, nous avons décidé d'utiliser une méthode améliorée pour la fixation des cellules (voir la figure 13 et la section des résultats). Nous avons utilisé cette méthode pour déterminer la densité des points synaptiques; elle nous a permis d'obtenir des photos de meilleure qualité. En effet, nous avons constaté une amélioration notable de la qualité des photos lorsque nous avons utilisé cette méthode, tel qu'on peut l'observer sur la figure 13A. Néanmoins, l'identification visuelle des points synaptiques avec certitude nous a tout de même semblé ambiguë. C'est pourquoi nous avons opté pour une méthode de quantification numérique; nous avons utilisé le logiciel ImageJ et la macro « punctae analyser » (Ippolito and Eroglu 2010). Il très intéressant de mentionner que nous avons ainsi obtenu des résultats de quantification reproductibles. En effet, nous avons obtenu une variation de moins de 2 % lorsque nous avons analysé les mêmes photos à 2 reprises comme on peut le constater sur la figure 13D. Néanmoins, nous avons malheureusement obtenu des résultats variables quant à la densité des points synaptiques des groupes stimulés par la FSK. Prenez note qu'il y a aussi des variations entre les groupes témoins (données non présentées). Ceux-ci sont ramenés à 0 % sur la figure 13, de même que sur les figures 5 et 6, car ces figures présentent les résultats de façon relative par rapport aux groupes témoins. Ainsi, ces résultats variables (figure 13B), malgré le fait d'une reproduction fiable des quantifications (figure 13D), suggèrent que d'autres facteurs, mis à part le jugement humain, sont à la source des variations.

En effet, plusieurs autres facteurs peuvent être à la source des variations. D'une part, il se peut par exemple que les agents pharmacologiques utilisés aient été périmés, et ce, malgré toute la minutie et les précautions que nous avons adoptées. Néanmoins, cela est peu probable, car ça ne peut expliquer les différences observées d'un groupe témoin à l'autre. D'autre part, il est plus probable que la viabilité des neurones en culture ait, en partie, causé ces variations. Et ce, malgré le fait que les puits de cultures utilisés pour les différentes expériences ont été préalablement sélectionnés grâce à une évaluation visuelle de la qualité de la viabilité des neurones, car cette évaluation demeure qualitative et imparfaite.

En outre, il serait intéressant d'optimiser la méthode de quantification présentée ci-haut, car celle-ci détecte parfois des contacts synaptiques qui ne peuvent être confirmés à l'œil. De même, celle-ci omet parfois la détection de ce qui semble visuellement être des contacts synaptiques.

Il se peut également que la densité de 15 000 par cm^2 n'ait pas été optimale. En effet, il serait intéressant de faire une étude exhaustive quant à l'effet de la densité des neurones en culture sur la formation des filopodes et des points synaptiques. Ainsi, il serait peut-être possible de déterminer la densité cellulaire optimale pour laquelle les groupes témoins sont le plus stables possible quant à la densité de leurs filopodes et de leurs points synaptiques.

Tout récemment, un groupe de recherche s'est posé une question similaire et il s'est attaqué à cette question pour combler notre lacune quant à la nature du modèle utilisé; c'est-à-dire un modèle de neurone en culture. Ils ont effectué des expériences sur des neurones d'hippocampe de rat en culture qui ont montré que la densité cellulaire était directement proportionnelle aux nombres de points synaptiques (Ivenshitz and Segal 2010). De plus, il apparaît logique qu'une culture cellulaire plus dense produise plus de points de contacts synaptiques, car il y a statistiquement plus de change de contact entre les axones et les dendrites. Ainsi, il est raisonnable de penser que non seulement la densité globale d'une culture de neurones (nombre de neurones par cm^2 pour l'ensemble d'un puits), mais aussi la densité locale par rapport à un neurone observé (densité de neurone dans un rayon précis du neurone observé) ait un effet sur la connectivité interneuronale : sur le nombre de synapses.

Finalement, il se peut aussi que les effets du récepteur CB2 sur la synaptogenèse soit détectables que pour des échantillons plus élevés. En effet, nous avons analysé plus de 40 neurites ou plus de 30 neurones (nouvelle méthode) pour chaque expérience, mais jamais plus de 100 neurites ou 40 neurones pour chaque agent pharmacologique à l'étude, et ce, pour chaque expérience. Ainsi, il est fort possible qu'un échantillonnage plus élevé fasse ressortir les effets modulés par le récepteur CB2 sur la synaptogenèse. Néanmoins, il n'en demeure pas moins important que les quantifications soient reproductibles. De même, il serait aussi intéressant de pouvoir apprécier l'étendue des effets, modulés par le récepteur

CB2, sur la synaptogenèse en parallèle aux effets sur la synaptogenèse modulés par la densité globale et locale des neurones en culture.

2.4.3 Conclusion

Les expériences de localisation ont montré que les récepteurs CB1 et CB2 sont présents à la fois sur les dendrites, les axones et les filopodes (figures 7 et 8). De même, ces expériences ont aussi montré que le récepteur de la nétrine-1, DCC, est également présent sur les dendrites, les axones et les filopodes (figure 9). De plus, le récepteur DCC est localisé à proximité des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 (figure 10). Étant donné que les filopodes sont des précurseurs synaptiques, ces résultats suggèrent une implication des récepteurs CB1 et CB2 dans le processus de synaptogenèse.

Contrairement aux résultats obtenus dans le laboratoire du professeur Bouchard (Hamzeh et Bouchard, 2009) quant aux ligands du récepteur CB1. Nous n'avons détecté aucun effet clair des agonistes et des agonistes inverses du récepteur CB2 faisant varier la densité des filopodes ou la densité des points de contacts synaptiques (figure 11 et 12). Nous avons plutôt obtenu une grande variabilité des résultats et ceux-ci se sont avérés non reproductibles. De plus, la quantification visuelle de la densité des filopodes ou des points de contacts synaptiques s'est avérée inefficace (figure 11 et 12). En effet, nous avons obtenu

des résultats différents des résultats originaux lorsque nous avons requantifié visuellement les mêmes photos utilisées pour la quantification visuelle originale (figure 11 et 12).

Ainsi, nous avons adapté une méthode (Ippolito and Eroglu 2010) informatisée de quantification nous permettant d'obtenir des résultats reproductibles (figure 13). Néanmoins, nous n'avons pas encore détecté d'effets médiés par le récepteur CB2 quant à la densité des filopodes ou la densité des contacts synaptiques. Prenez note que des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer l'efficacité de cette méthode.

Nous ne pouvons ni confirmer ni infirmer la médiation de tels effets par le récepteur CB2, car des expériences supplémentaires à échantillonnage vraisemblablement plus élevé sont nécessaires pour conclure, sans l'ombre d'un doute, à cet égard.

Chapitre 3 : Discussion générale

Les récepteur CB1 et CB2 ont été le sujet d'études diverses et variées touchant des domaines tels que la neurogenèse, la plasticité du SNC, la dépendance, l'apprentissage et la formation de mémoire, l'obésité, la suppression de la douleur et le contrôle des fonctions moteur (Cenni, Blandina et al. 2006; Mackie 2006; Mackie 2006; Cabral and Griffin-Thomas 2009; Hamzeh and Bouchard 2009; Riedel, Fadda et al. 2009; Argaw, Duff et al. 2011).

Lors de cette étude, nous nous sommes penchés, plus particulièrement, sur la possibilité d'une éventuelle médiation de la synaptogenèse par le récepteur CB2. Nous avons basé nos hypothèses, entre autres, sur le fait qu'une étude menée dans le laboratoire du professeur Bouchard (Hamzeh and Bouchard 2009) ait démontré l'implication du récepteur CB1 dans la médiation de la synaptogenèse et sur le fait que les récepteurs CB1 et CB2 sont tous deux impliqués dans le guidage axonal en faisant appel aux mêmes mécanismes moléculaires (Argaw, Duff et al. 2011). En effet, ces deux récepteurs influencent le guidage axonal par le biais de la même voie moléculaire : la voie de l'AC/PKA (Argaw, Duff et al. 2011). De plus, la présence du récepteur DCC à la surface cellulaire est nécessaire pour que l'effet sur la synaptogenèse, de ces deux récepteurs, ait lieu. Ces deux récepteurs sont activés par des ligands qui leur sont propres, mais ils semblent transmettre leur signal exclusivement par la même voie de signalisation (Argaw, Duff et al. 2011).

Ainsi, malgré le fait que nous n'avons détecté aucun effet notable engendré par le récepteur CB2 sur la synaptogenèse, nous pensons qu'une méthode plus élaborée produisant des résultats reproductibles nous permettrait de constater que celui-ci module bel et bien la synaptogenèse. En effet, un échantillonnage plus élevé ferait peut-être ressortir les effets, médiés par celui-ci, sur la synaptogenèse. Une analyse plus approfondie de la densité des neurones en culture tant au niveau globale que locale nous permettrait sûrement d'apprécier avec plus de précision le processus de synaptogenèse médié par le récepteur CB2, s'il y a lieu.

Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant d'analyser des cultures neuronales dans leur ensemble dans le but de mieux comprendre le phénomène de synaptogenèse *in vitro* à une échelle plus globale. Cette analyse pourrait être fait en prenant plusieurs photos d'une culture neuronale, qui s'enjambent et qui couvrent une grande surface de l'ordre d'environ 250 000 μm^2 et de combiner les photos en une seule et ainsi être en mesure d'analyser la synaptogenèse à l'échelle d'un réseau neuronal plutôt qu'à une échelle limitée à un échantillon de neurones photographiés et analysés individuellement.

En effet, si un neurone est entouré de cinq neurones dans un rayon de 200 μm , par exemple, les possibilités qu'il ait une forte densité de précurseurs synaptiques sont beaucoup plus élevées que pour le cas d'un neurone qui serait entouré que d'un seul autre neurone dans un rayon de 200 μm . Ainsi, nous serions en mesure de mieux comprendre le réseau neuronal et les effets de la densité des neurones à la fois au niveau global (densité des neurones sur l'ensemble du puits ou sur l'ensemble photographié : par exemple 250 000 μm^2) et à divers niveaux de densité locale (rayon de 80, 120, 160, 200, 300, 400 μm^2 , etc.) Nous pensons qu'une telle analyse nous conférerait une bien meilleure connaissance de la nature du modèle utilisé (neurones corticaux d'embryons murins en culture) et nous permettrait donc une meilleure compréhension des effets engendrés sur ces cultures par divers agents pharmacologiques tels que les cannabinoïdes.

Néanmoins, une telle approche requiert un temps considérable étant donné le nombre considérable de prises de photos qu'elle implique et ne pourrait être donc qu'être effectuée par une équipe composée de plusieurs étudiants et techniciens. Nous pensons que cela en vaudrait, cependant, le coût.

3.1 Stratégies expérimentales à venir

Outre l'évaluation et l'étude du modèle de neurones corticaux au niveau des densités locales et globales telles qu'illustrées précédemment, plusieurs autres options s'offrent à nous pour éventuellement être en mesure d'infirmer ou de confirmer la médiation de la synaptogenèse par le biais du récepteur CB2. Premièrement, il est fort possible qu'une analyse à échantillonnage élevé ($n = 200$ ou plus) de la densité des filopodes et de la densité des points de contact synaptiques nous permette de détecter un effet médiateur de la synaptogenèse engendré par l'activation ou le blocage du récepteur CB2. Deuxièmement, l'influence du récepteur CB2 sur la morphologie des précurseurs synaptique pourrait être étudiée grâce à la microscopie électronique (ME). Troisièmement, l'influence de l'activation et de la désactivation du récepteur CB2 pourrait être étudiée en observant la formation des précurseurs synaptiques en temps réel.

En outre, nous pourrions aussi nous assurer que les effets observés aient bien été causés par la modulation de l'activation du récepteur CB2 en effectuant des expériences sur des neurones extraits d'une souche mutante du récepteur CB2 (*cnr2* knockout). De même, nous pourrions aussi évaluer la redondance des effets sur la synaptogenèse médiés par les récepteurs CB1 et CB2 en effectuant des expériences sur des neurones extraits d'une souche mutante du récepteur CB1 (*cnr1* knockout). De plus, nous pourrions évaluer la fonctionnalité des synapses grâce à la technique d'électrophysiologie; plus particulièrement grâce à la

technique de « patch clamp » en configuration cellule entière. Il serait aussi très intéressant d'évaluer l'implication de la voie de l'AC/PKA, ainsi que du récepteur DDC dans le processus de synaptogenèse médié par le récepteur CB2. Enfin, l'effet de médiation du récepteur CB2 pourrait être évalué *in vivo*. Cela nous permettrait non seulement de mieux comprendre la synaptogenèse, mais cela nous aiderait aussi à potentiellement développer de nouveau médicament pour traiter des traumatismes neurologies ou des maladies neurodégénératives.

3.1.1 Observation des précurseurs synaptiques grâce à la microscopie électronique

La microscopie électronique (ME) est un outil puissant qui pourrait être utilisé pour observer les effets provoqués par l'activation ou le blocage du récepteur CB2 sur la morphologie des précurseurs synaptiques au niveau de la modification des structures fine que sont les filopodes par exemple. En effet, cette technique de microscopie permettrait d'observer des changements de morphologie des filopodes qui sont invisibles lorsque ceux-ci sont observés grâce à la microscopie optique, car la ME permet un grossissement de près de 2 millions de fois par opposition à un grossissement de 2000 fois obtenu par la microscopie optique. De plus, la ME permettrait d'affirmer la présence ou l'absence de filopodes avec certitude et ainsi éviter la non-reproductibilité des résultats causée par le jugement humain. En outre, la ME pourrait aussi être utilisée pour l'étude morphologique des précurseurs synaptiques en relation avec la densité globale et locale des neurones en culture.

Néanmoins, la ME exige beaucoup plus de temps que la microscopie optique. Ainsi, le nombre de précurseurs synaptiques qui peut être observés grâce à la ME est très limité par rapport à celui qui peut être observé grâce à la microscopie optique. De ce, il se peut que cette méthode ne permette pas de détecter un effet potentiel sur le nombre de précurseurs synaptiques médiés par le récepteur CB2.

3.1.2 Observation du développement des précurseurs synaptiques en temps réel

Une étude complémentaire en temps réel du développement des précurseurs synaptiques tel que le développement des filopodes nous permettrait de mieux apprécier les effets de la modulation du récepteur CB2 sur la synaptogenèse. Les filopodes sont des structures dynamiques dont la morphologie change à une vitesse relativement rapide. En effet, la formation des filopodes peut être observée dans une période aussi courte qu'une heure (Mallavarapu and Mitchison 1999).

Ainsi, il serait intéressant de filmer la formation des filopodes en temps réel en utilisant une méthode similaire à celle utilisée dans le laboratoire du professeur Bouchard pour étudier le guidage axonal (Argaw, Duff et al. 2011). En effet, les neurones corticaux d'embryons murins pourraient être cultivés sur des lamelles dans des chambres expérimentales gardées à 37 °C et 5 % de CO₂ durant une période de 8 jours pour ensuite être filmés durant une heure, toujours à la même température et la même quantité de CO₂,

après avoir été simulés avec les agonistes et les agonistes inverses du récepteur CB2 selon le cas. Cette méthode nous permettrait non seulement d'apprécier la formation des filopodes, mais aussi le dynamisme avec lequel cela se produit.

Étant donné que les filopodes sont des structures très petites (moins de 0,2 μm de diamètre) et donc difficilement observables, les neurones devraient être filmés à l'aide d'un système optique de performance supérieure. Nous pourrions par exemple utiliser un système optique de contraste d'interférence différentielle (DIC optique) couplé à un système informatique (processeur d'image à haute vitesse) tel qu'utilisé par le groupe de recherche de Terakawa (Manivannan and Terakawa 1994) pour être en mesure d'observer à un niveau de résolution acceptable la formation des filopodes et le dynamisme avec lequel cela se produit.

Nous pourrions aussi préalablement transfecter les neurones pour qu'ils expriment la protéine fluorescente verte (GFP) et ainsi être en mesure de mieux voir la formation des filopodes. Néanmoins, nous préconisons une approche optique qui n'implique aucune transfection, car celle-ci pourrait interférer avec le processus de formation des filopodes et ainsi fausser notre observation.

3.1.3 Expériences génétiques

Dans le cas où il s'avérerait que les agonistes et les antagonistes du récepteur CB2 provoquent bel et bien une diminution et une augmentation, respectivement, des précurseurs synaptiques que sont les filopodes et les points de contacts synaptiques, il serait pertinent de vérifier que ces effets sont directement associés à l'activation et au blocage du récepteur CB2. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des souris mutantes pour le gène du récepteur CB2 : *cnr2*; c'est-à-dire des souris knockouts. En effet, dans le cas où le récepteur CB2 modulerait la synaptogenèse, cette modulation n'aurait pas lieu lorsque des neurones extraits d'embryons de souris *cnr2* knockouts seraient soumis aux agonistes et aux agonistes inverses du récepteur CB2. De plus, nous nous attendons à une augmentation de la densité des précurseurs synaptiques exprimés par les neurones extraits d'embryons *cnr2* knockouts non stimulés par rapport à ceux extraits d'embryons de type sauvage (WT) non stimulé, car les neurones *cnr2* knockouts ne subiraient aucune modulation négative de la densité des précurseurs synaptiques provoquée par l'activité basale du récepteur CB2.

Dans le même ordre d'idée, nous pourrions aussi bloquer la traduction du récepteur CB2 grâce à la technique de siRNA (small interfering RNA). En effet, après que la traduction du récepteur CB2 grâce serait bloquée, nous pourrions stimuler les neurones avec les agonistes et les agonistes inverses du récepteur CB2, évaluer et quantifier la densité des filopodes et points synaptiques et comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus dans le cas de

neurones dont la traduction du récepteur CB2 n'ait pas été bloquée. Ainsi, nous ne devrions pas observer d'effets provoqués par les agonistes et les antagonistes du récepteur CB2, lorsque la traduction de celui-ci est bloquée. De plus, tout comme dans le cas des neurones extraits d'embryon *cnr2* knockout, nous devrions observer une augmentation de la densité des précurseurs synaptiques, par le simple fait de bloquer la traduction du récepteur CB2, car l'activité basale de celui-ci n'aurait pas lieu.

Dans un autre ordre d'idée, il serait intéressant d'effectuer des expériences sur des neurones corticaux extraits d'embryons de souris mutante pour le récepteur CB1 (*cnr1* knockout) afin de s'assurer que d'éventuels effets engendrés par les ligands du récepteur CB2 ne soient pas causés en partie par le récepteur CB1. Néanmoins, nous nous attendons à ce que le niveau basal de la densité des précurseurs synaptiques des neurones non stimulés soit augmenté, car l'activité basale du récepteur CB1 faisant diminuer la densité des précurseurs synaptiques n'aurait pas lieu. De plus, il serait intéressant de tester l'effet des ligands du récepteur CB2 sur des neurones extraits d'embryons murins *cnr1* et *cnr2* knockout pour être en mesure d'évaluer si les effets sur la synaptogenèse médiés par les récepteurs CB1 et CB2 sont complémentaires ou additifs.

3.1.4 Évaluation de la fonctionnalité des synapses : électrophysiologie

Le nombre de synapses glutamatergiques fonctionnelles peut être évalué en quantifiant le nombre d'événements synaptiques spontanés. Ces transmissions synaptiques spontanées ont lieu en l'absence de potentiel d'action (Katz and Miledi 1963; Miledi 1967); ainsi, le nombre de synapses glutamatergiques fonctionnelles peut être évalué en mesurant les courants électriques dépolarisants générés sur un neurone postsynaptique; ces courants électriques sont appelés mEPSC (minature Excitatory Post Synaptic Currents). Plus le nombre de mEPSCs est élevé sur un neurone postsynaptique, plus le nombre de synapses glutamatergiques fonctionnelles auxquelles il est soumis est élevé.

Ainsi, nous pourrions évaluer l'effet des ligands du récepteur CB2 sur la formation de synapses glutaminergiques fonctionnelles en stimulant des neurones corticaux en culture, puis en mesurant les mEPSC. Néanmoins, la densité globale, de même que la densité locale de neurones devraient être prises en compte lors de ces expériences pour éviter que l'influence de celles-ci sur la formation des synapses fonctionnelles vienne brouiller l'effet produit par les ligands du récepteur CB2. De plus, l'évaluation de la fonctionnalité des synapses pourrait aussi être effectuée sur des neurones d'embryons *cnr2* knockouts et sur des neurones dont la traduction aurait été bloquée par siRNA. Dans ces cas spécifiques, nous nous attendons à ce que le nombre de synapses fonctionnelles soit augmenté, car l'absence

du récepteur CB2 provoquerait une absence de son activité basale qui inhibe potentiellement la formation de synapse.

3.1.5 Mécanismes régulant la synaptogenèse en aval de CB2

Étant donné que le récepteur CB2 est couplé aux protéines transmembranaires $G_{i/o}$ et que l'activation de celle-ci provoque une augmentation de l'AMPc en activant l'AC, nous pensons que la synaptogenèse médiée par le récepteur CB2 serait régulée en aval par la voie de l'AC/PKA. Ainsi, quand nous aurons établi l'effet, médié par le récepteur CB2, sur la synaptogenèse, nous pourrions évaluer l'implication de cette voie de signalisation en la bloquant, par exemple, grâce aux inhibiteurs de la PKA : KT5720 et O2050, puis en évaluant le nombre de précurseurs synaptiques. De plus, nous pourrions vérifier l'implication du récepteur de la nétrine-1, DCC, en bloquant celui-ci avec, par exemple, un anticorps ayant la particularité de bloquer le récepteur. Des expériences récentes (Hamzeh et Bouchard, 2009) ont montré l'implication de cette voie de signalisation moléculaire (AC/PKA et externalisation du récepteur DCC) dans le processus de médiation de la synaptogenèse par le récepteur CB1. Ainsi, il serait intéressant de vérifier l'implication de cette voie de signalisation dans le processus de synaptogenèse médié par le récepteur CB2 s'il y a lieu.

De plus, l'implication du récepteur DCC pourrait aussi être évaluée en effectuant des expériences sur des neurones extraits de souris DCC knockouts. Dans ce cas, nous nous attendons à ce que la densité des précurseurs synaptiques soit diminuée lorsque les neurones ne sont pas stimulés, car nous pensons que l'externalisation du récepteur DCC est nécessaire à la médiation de la synaptogenèse par le récepteur CB2, tout comme dans le cas de la médiation par le récepteur CB1. Pour la même raison, nous nous attendons à ce que les neurones stimuler avec les agonistes ou les agonistes inverses du récepteur CB2, nous nous attendons à n'observer aucune variation par rapport au groupe non stimulé.

3.1.5 Évaluation du processus de synaptogenèse médié par le récepteur CB2 *in vivo*

Pour évaluer l'effet du récepteur CB2 sur la synaptogenèse, nous pourrions utiliser la lignée de souris transgénique pour la protéine verte fluorescente (GFP-M), la stimuler par voie oral ou par injection avec les agonistes et les agonistes inverse du récepteur CB2, pour ensuite l'euthanasier, extraire son hippocampe et procéder à l'évaluation de la densité des structures synaptiques que sont les épines dendritiques sur la région CA1 grâce à la microscopie confocale selon une méthode inspirée de celle utilisée par le groupe de recherche de Wallace (Feng, Mellor et al. 2000). De plus, nous pourrions combiner cette étude sur les souris GFP-M stimulées par les ligands du récepteur CB2 à une étude comportementale évaluant la mémoire des individus.

Nous pourrions, par exemple, utiliser le labyrinthe d'eau de Morris (MWM : Morris Water Maze) (figure 14) pour tester la mémoire de référence spatiale de souris ou de rats ayant été stimulés par des ligands du récepteur CB2, puis nous pourrions comparer ces résultats à la densité des épines dendritiques de la région CA1 de l'hippocampe pour chaque animal à l'étude.

La méthode du MWM a atteint un niveau surprenant de popularité au cours des dernières années. Cette méthode permet, entre autres, d'évaluer la mémoire de référence spatiale (voir figure 14). Celle-ci consiste à entraîner des animaux, pendant plusieurs sessions étalées sur plusieurs jours, à naviguer dans un bassin circulaire rempli d'eau, à l'aide d'un indice visuel, vers une plateforme immergée, et donc cachée, leur permettant d'avoir pied à terre. Puis, après une période de repos de 24h ou plus, les animaux sont filmés et chronométrés lorsqu'ils accomplissent la tâche. Ainsi, il est possible de comparer les performances d'animaux stimulés par divers agents pharmacologiques aux performances d'animaux non stimulés (Vorhees and Williams 2006).

Figure 14

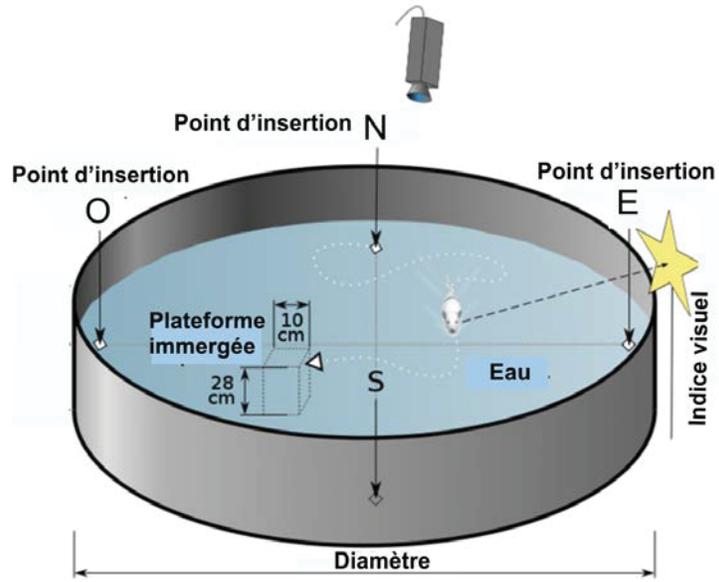


Figure 14. Schéma montrant un exemple de labyrinthe d'eau de Morris (MWM); adaptée de Wikipédia Commons (Samueljohn.de).

Le rat ou la souris est d'abord placé à l'un des points d'insertion face à la paroi du bassin, pour éviter que l'animal puisse analyser la situation avant d'être relâché. Le bassin contient une plateforme d'évasion immergée de quelques mm et un indice visuel permettant à l'animal de s'orienter. Le bassin a généralement de 1,2 à 1,8 mètre de diamètre et 60 cm de profondeur; il est rempli d'eau jusqu'à une hauteur de 30 cm; la paroi de 30 cm restante empêche l'animal de s'évader en grippant celle-ci. Prenez note que ces dimensions varient selon divers protocoles (Vorhees and Williams 2006). Plusieurs paramètres peuvent être mesurés, grâce à une caméra, lorsque l'animal est relâché : le temps passé dans chaque cadran, le temps requis pour atteindre la plateforme et la distance totale parcourue. L'augmentation de la performance des animaux se produit grâce à la construction de leur mémoire spatiale. Pour de plus amples informations quant aux différentes variations de ce protocole, veuillez consulter la revue littéraire des auteurs suivants : (Vorhees and Williams 2006).

Prenez-note note que cette méthode a montré une diminution de la mémoire de référence spatiale chez des animaux préalablement stimulés au Δ^9 -THC et que cette diminution n'eut pas lieu chez les animaux stimulés à la fois par le Δ^9 -THC et un antagoniste du récepteur CB1 : SR141716A (Varvel, Hamm et al. 2001; Howlett, Barth et al. 2002); un effet similaire pourrait bien être produit par des antagonistes ou des agonistes inverses du récepteur CB2. Ainsi, il serait très intéressant d'évaluer l'effet des ligands du récepteur CB2 sur la mémoire de référence spatiale grâce à cette méthode. De plus, en couplant cette méthode à une analyse de la densité des épines dendritiques de la région CA1 de l'hippocampe de chaque animal étudié, nous serions éventuellement en mesure de faire corrélation entre l'effet des ligands du récepteur CB2 sur la mémoire de référence spatiale et sur la formation des épines dendritiques.

3.2 Conclusion

Le cannabis est utilisé en médecine depuis des millénaires. Selon les connaissances actuelles, nous pensons que son utilisation à des fins médicales remontrait à plus de 5000 ans et aurait débuté en Chine sous le règne de l'empereur Chen Nung (Hanus 2009). En effet, l'usage pharmaceutique du cannabis nous est rapporté dans la plus ancienne pharmacopée connue à ce jour : « Pents'ao ching » (Touw 1981). Il était utilisé pour traiter des patients atteints de troubles aussi divers que la douleur chronique et le manque de fertilité chez les femmes (Touw 1981).

Dans le même ordre d'idée, celui-ci fut amplement utilisé en Inde à des fins médicinales comme antibiotique, anticonvulsivant, analgésique, tranquillisant et stimulant de l'appétit, (Touw 1981) et ce, depuis plus de 1000 ans.

L'usage du cannabis à des fins médicinales n'a été introduit en occident qu'au milieu du 19^e siècle par le psychiatre français Jacques-Joseph Moreau et par le médecin d'origine irlandaise Wiliam B. O'Shaughensy. Il fut alors essentiellement utilisé comme analgésique et comme stimulant de l'appétit. Plus récemment, plusieurs compagnies pharmaceutiques telles que, par exemple, Merck, Bristol-Meyers et Squibb ont commercialisé des extraits du chanvre pour traiter des troubles divers tels le diabète, la digestion, l'impuissance et les palpitations cardiaques.

Cependant, son usage à des fins médicinales a grandement diminué en occident durant le 20^e siècle principalement dû à l'ostracisations de cette plante par le gouvernement américain. La consommation de cannabis était associée aux classes pauvres et à la culture africaine. Cette ostracisations débuta plus officiellement en 1937, aux États-Unis, par le biais du « Marihuana Tax Act » qui consistait en une surtaxation du cannabis et de ces produits dérivés, puis par la criminalisation de celui-ci dans plusieurs états dans le milieu des années 30s (Zuardi 2006).

L'intérêt médical pour le chanvre eut un regain à la fin du 20^e siècle. En effet, la découverte de récepteurs naturels au Δ^9 -THC relança non seulement cet intérêt, mais aussi l'intérêt pour la recherche fondamentale quant au fonctionnement de ces récepteurs. Le récepteur au cannabinoïde 1 fut découvert en 1990 par Matsuda (Matsuda, Lolait et al. 1990) suivi de près par la découverte du récepteur aux cannabinoïdes 2 (Munro, Thomas et al. 1993). Plus récemment, des études ont démontré l'implication de ces récepteurs dans les processus d'apprentissage et de formation de la mémoire (Ranganathan and D'Souza 2006; Solowij and Battisti 2008). De même, des études récentes ont aussi montré l'implication de ces récepteurs dans le développement et la plasticité du SNC (Svizenska, Dubovy et al. 2008; Hamzeh and Bouchard 2009; Argaw, Duff et al. 2011)

Ainsi, nous croyons que l'avancement de la recherche fondamentale quant aux effets médiés par les récepteurs CB1 et CB2 pourrait éventuellement relancer de façon fulgurante l'utilisation du cannabis, de ces dérivés ou du moins des agents pharmacologiques affectant les récepteurs CB1 et CB2 pour les biens faits de la médecine.

En effet, la caractérisation des effets médiés par les récepteurs CB1 et CB2, notamment sur le guidage axonal et le processus de synaptogenèse, pourrait nous permettre de faire un bond de géant quant à la compréhension de la formation et de la plasticité du système nerveux. Cette compréhension accrue pourrait ouvrir la voie sur de nouvelles possibilités

quant au traitement des personnes atteintes de traumatisme neurologique ou de maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer et la sclérose en plaque, par exemple. En effet, il est raisonnable de croire que le développement d'agents pharmacologiques permettant la régénérescence du système nerveux puisse permettre aux patients atteints d'éventuellement de recouvrer totalement ou en partie leur capacité de mémorisation et leur motilité. Ainsi nous sommes optimistes et pensons que la recherche fondamentale sur les cannabinoïdes, le développement et la plasticité du système nerveux central et périphérique permettra un jour d'améliorer la qualité de vie d'une multitude d'individus et de leurs familles.

Bien que nous n'ayons pas été en mesure de déterminer les effets, médiés par le récepteur CB2, sur la synaptogenèse, nous pensons qu'une méthode expérimentale plus élaborée nous permettrait d'évaluer pleinement ces effets s'il y a lieu. Nos résultats montrant la présence des récepteurs CB2 et CB1 sur les axones, les dendrites et les précurseurs synaptiques que sont les filopodes et nos résultats montrant la présence du récepteur de nétrine-1 sur les axones, les dendrites et les filopodes, et ce, à proximité des récepteurs CB1 et CB2, ainsi que les résultats obtenus lors d'études antérieures effectuées dans le laboratoire du professeur Bouchard (Hamzeh and Bouchard 2009; Argaw, Duff et al. 2011) suggèrent fortement l'existence d'une médiation de la synaptogenèse par le récepteur CB2.

Enfin, nous pensons qu'une compréhension approfondie du processus de synaptogenèse nous ouvrira la porte sur l'excitante possibilité de pouvoir interférer de manière ciblée sur la formation du SNC. Et ce, tant au cours du développement que pendant l'âge adulte. Ainsi, nous espérons un jour être en mesure d'améliorer la plasticité et la capacité d'auto-guérison du système nerveux.

4. Bibliographie

- Abel, T. and P. V. Nguyen (2008). "Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase." Prog Brain Res **169**: 97-115.
- Abel, T., P. V. Nguyen, et al. (1997). "Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory." Cell **88**(5): 615-626.
- Adams, I. B. and B. R. Martin (1996). "Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans." Addiction **91**(11): 1585-1614.
- Ahmari, S. E., J. Buchanan, et al. (2000). "Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets." Nat Neurosci **3**(5): 445-451.
- Alger, B. E. (2002). "Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids." Prog Neurobiol **68**(4): 247-286.
- Ameri, A. (1999). "The effects of cannabinoids on the brain." Prog Neurobiol **58**(4): 315-348.
- Antonova, I., O. Arancio, et al. (2001). "Rapid increase in clusters of presynaptic proteins at onset of long-lasting potentiation." Science **294**(5546): 1547-1550.
- Argaw, A., G. Duff, et al. (2011). "Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance." J Neurosci **31**(4): 1489-1499.
- Ashton, J. C., D. Friberg, et al. (2006). "Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study." Neurosci Lett **396**(2): 113-116.
- Baker, D., G. Pryce, et al. (2006). "In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor." Trends Pharmacol Sci **27**(1): 1-4.
- Banker, G. and K. Goslin (1991). Culturing nerve cells. Cambridge, Mass., MIT Press.
- Banker, G. and K. Goslin (1998). Culturing nerve cells. Cambridge, Mass., MIT Press.
- Batkai, S., Z. Jarai, et al. (2001). "Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis." Nat Med **7**(7): 827-832.
- Bear, M. F. and R. C. Malenka (1994). "Synaptic plasticity: LTP and LTD." Curr Opin Neurobiol **4**(3): 389-399.
- Beltramo, M., N. Stella, et al. (1997). "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition." Science **277**(5329): 1094-1097.
- Bennett, M. R., L. Farnell, et al. (2012). "A model of neuregulin control of NMDA receptors on synaptic spines." Bull Math Biol **74**(3): 717-735.

- Bi, G. Q. and M. M. Poo (1998). "Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type." J Neurosci **18**(24): 10464-10472.
- Bisogno, T., F. Howell, et al. (2003). "Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain." J Cell Biol **163**(3): 463-468.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.
- Bouchard, J. F., K. E. Horn, et al. (2008). "Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1." J Neurochem **107**(2): 398-417.
- Bouchard, J. F., S. W. Moore, et al. (2004). "Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension." J Neurosci **24**(12): 3040-3050.
- Bramblett, R. D., A. M. Panu, et al. (1995). "Construction of a 3D model of the cannabinoid CB1 receptor: determination of helix ends and helix orientation." Life Sci **56**(23-24): 1971-1982.
- Bresler, T., Y. Ramati, et al. (2001). "The dynamics of SAP90/PSD-95 recruitment to new synaptic junctions." Mol Cell Neurosci **18**(2): 149-167.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-576.
- Briancon-Marjollet, A., A. Ghogha, et al. (2008). "Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance." Mol Cell Biol **28**(7): 2314-2323.
- Bury, L. A. and S. L. Sabo (2010). "How it's made: the synapse." Mol Interv **10**(5): 282-292.
- Cabral, G. A. and L. Griffin-Thomas (2009). "Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation." Expert Rev Mol Med **11**: e3.
- Calabrese, B., M. S. Wilson, et al. (2006). "Development and regulation of dendritic spine synapses." Physiology (Bethesda) **21**: 38-47.
- Carlisle, H. J. and M. B. Kennedy (2005). "Spine architecture and synaptic plasticity." Trends Neurosci **28**(4): 182-187.

- Carroll, R. C., E. C. Beattie, et al. (2001). "Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **2**(5): 315-324.
- Castillo, P. E., R. Janz, et al. (1997). "Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus." Nature **388**(6642): 590-593.
- Castillo, P. E., S. Schoch, et al. (2002). "RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation." Nature **415**(6869): 327-330.
- Cenni, G., P. Blandina, et al. (2006). "Differential effect of cannabinoid agonists and endocannabinoids on histamine release from distinct regions of the rat brain." Eur J Neurosci **24**(6): 1633-1644.
- Chetkovich, D. M., R. Gray, et al. (1991). "N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(15): 6467-6471.
- Cheung, U., H. L. Atwood, et al. (2006). "Presynaptic effectors contributing to cAMP-induced synaptic potentiation in *Drosophila*." J Neurobiol **66**(3): 273-280.
- Chevalyere, V., B. D. Heifets, et al. (2007). "Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha." Neuron **54**(5): 801-812.
- Chevalyere, V., K. A. Takahashi, et al. (2006). "Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS." Annu Rev Neurosci **29**: 37-76.
- Cholewa (2011). The Importance of Quick Fixation for Optimal Labeling of Cell Structures. Life Technologies Corporation. All rights reserved..
- Contractor, A., C. Rogers, et al. (2002). "Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP." Science **296**(5574): 1864-1869.
- Cooper, D. M. and A. J. Crossthwaite (2006). "Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases." Trends Pharmacol Sci **27**(8): 426-431.
- Coutts, A. A., S. Anavi-Goffer, et al. (2001). "Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons." J Neurosci **21**(7): 2425-2433.
- Craig, A. M., E. R. Graf, et al. (2006). "How to build a central synapse: clues from cell culture." Trends Neurosci **29**(1): 8-20.
- Croci, T., L. Manara, et al. (1998). "In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum." Br J Pharmacol **125**(7): 1393-1395.
- Dailey, M. E. and S. J. Smith (1993). "Confocal imaging of mossy fiber growth in live hippocampal slices." Jpn J Physiol **43 Suppl 1**: S183-192.

- Dailey, M. E. and S. J. Smith (1996). "The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices." J Neurosci **16**(9): 2983-2994.
- Dalva, M. B., A. C. McClelland, et al. (2007). "Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse." Nat Rev Neurosci **8**(3): 206-220.
- Davenport, R. W., P. Dou, et al. (1993). "A sensory role for neuronal growth cone filopodia." Nature **361**(6414): 721-724.
- de Wit, J., E. Sylwestrak, et al. (2009). "LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation." Neuron **64**(6): 799-806.
- Dean, C. and T. Dresbach (2006). "Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function." Trends Neurosci **29**(1): 21-29.
- Devane, W. A., A. Breuer, et al. (1992). "A novel probe for the cannabinoid receptor." J Med Chem **35**(11): 2065-2069.
- Devane, W. A., L. Hanus, et al. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." Science **258**(5090): 1946-1949.
- Egertova, M. and M. R. Elphick (2000). "Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB." J Comp Neurol **422**(2): 159-171.
- Faix, J. and K. Rottner (2006). "The making of filopodia." Curr Opin Cell Biol **18**(1): 18-25.
- Farquhar-Smith, W. P., M. Egertova, et al. (2000). "Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord." Mol Cell Neurosci **15**(6): 510-521.
- Fearon, E. R., K. R. Cho, et al. (1990). "Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers." Science **247**(4938): 49-56.
- Feng, G., R. H. Mellor, et al. (2000). "Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP." Neuron **28**(1): 41-51.
- Ferguson, G. D. and D. R. Storm (2004). "Why calcium-stimulated adenylyl cyclases?" Physiology (Bethesda) **19**: 271-276.
- Fernandez-Ruiz, J., F. Berrendero, et al. (2000). "The endogenous cannabinoid system and brain development." Trends Neurosci **23**(1): 14-20.
- Fiala, J. C., M. Feinberg, et al. (1998). "Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1." J Neurosci **18**(21): 8900-8911.
- Fogel, A. I., M. R. Akins, et al. (2007). "SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion." J Neurosci **27**(46): 12516-12530.

- Friedman, H. V., T. Bresler, et al. (2000). "Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment." Neuron **27**(1): 57-69.
- Frotscher, M. (1992). "Specificity of interneuronal connections." Ann Anat **174**(5): 377-382.
- Gao, Y., D. V. Vasilyev, et al. (2010). "Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice." J Neurosci **30**(6): 2017-2024.
- Garner, C. C., R. G. Zhai, et al. (2002). "Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis." Trends Neurosci **25**(5): 243-251.
- Ghosh, A. and M. E. Greenberg (1995). "Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences." Science **268**(5208): 239-247.
- Gifford, A. N., Y. Tang, et al. (1997). "Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices." Neurosci Lett **238**(1-2): 84-86.
- Giuffrida, A., L. H. Parsons, et al. (1999). "Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum." Nat Neurosci **2**(4): 358-363.
- Glass, M., M. Dragunow, et al. (1997). "Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain." Neuroscience **77**(2): 299-318.
- Goda, Y. and G. W. Davis (2003). "Mechanisms of synapse assembly and disassembly." Neuron **40**(2): 243-264.
- Hamzeh and Bouchard (2009). "A Novel Role of Cannabinoids in Synaptogenesis."
- Hanus, L. O. (2009). "Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids." Med Res Rev **29**(2): 213-271.
- Hebb, D. O. (1949). The organization of behavior; a neuropsychological theory. New York,, Wiley.
- Ho, B. Y., Y. Uezono, et al. (1999). "Coupling of the expressed cannabinoid CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels." Receptors Channels **6**(5): 363-374.
- Howlett, A. C. (2002). "The cannabinoid receptors." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 619-631.
- Howlett, A. C., F. Barth, et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.
- Howlett, A. C. and S. Mukhopadhyay (2000). "Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol." Chem Phys Lipids **108**(1-2): 53-70.

- Hussain, R. J. and D. O. Carpenter (2001). "Development of synaptic responses and plasticity at the SC-CA1 and MF-CA3 synapses in rat hippocampus." Cell Mol Neurobiol **21**(4): 357-368.
- Ippolito, D. M. and C. Eroglu (2010). "Quantifying synapses: an immunocytochemistry-based assay to quantify synapse number." J Vis Exp(45).
- Irie, F. and Y. Yamaguchi (2002). "EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP." Nat Neurosci **5**(11): 1117-1118.
- Ivenshitz, M. and M. Segal (2010). "Neuronal density determines network connectivity and spontaneous activity in cultured hippocampus." J Neurophysiol **104**(2): 1052-1060.
- Johns, D. G., D. J. Behm, et al. (2007). "The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects." Br J Pharmacol **152**(5): 825-831.
- Johnson, D. A., P. Akamine, et al. (2001). "Dynamics of cAMP-dependent protein kinase." Chem Rev **101**(8): 2243-2270.
- Johnson, M. R., K. C. Rice, et al. (1992). "The cannabinoid receptor-pharmacologic identification, anatomical localization and cloning." NIDA Res Monogr **119**: 86-90.
- Jontes, J. D., J. Buchanan, et al. (2000). "Growth cone and dendrite dynamics in zebrafish embryos: early events in synaptogenesis imaged in vivo." Nat Neurosci **3**(3): 231-237.
- Jun, K., G. Choi, et al. (1998). "Enhanced hippocampal CA1 LTP but normal spatial learning in inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase(A)-deficient mice." Learn Mem **5**(4-5): 317-330.
- Katz, B. and R. Miledi (1963). "A Study of Spontaneous Miniature Potentials in Spinal Motoneurons." J Physiol **168**: 389-422.
- Kauer, J. A. and R. C. Malenka (2007). "Synaptic plasticity and addiction." Nat Rev Neurosci **8**(11): 844-858.
- Keino-Masu, K., M. Masu, et al. (1996). "Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor." Cell **87**(2): 175-185.
- Kelso, S. R., A. H. Ganong, et al. (1986). "Hebbian synapses in hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5326-5330.
- Kim, D. and S. A. Thayer (2001). "Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture." J Neurosci **21**(10): RC146.
- Kim, S., A. Burette, et al. (2006). "NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation." Nat Neurosci **9**(10): 1294-1301.

- Kreitzer, A. C. and W. G. Regehr (2001). "Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids." J Neurosci **21**(20): RC174.
- Kreitzer, A. C. and W. G. Regehr (2001). "Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells." Neuron **29**(3): 717-727.
- Kwon, J. H., E. M. Eves, et al. (1996). "Beta-adrenergic receptor activation promotes process outgrowth in an embryonic rat basal forebrain cell line and in primary neurons." Eur J Neurosci **8**(10): 2042-2055.
- Kwon, S. K., J. Woo, et al. (2010). "Trans-synaptic adhesions between netrin-G ligand-3 (NGL-3) and receptor tyrosine phosphatases LAR, protein-tyrosine phosphatase delta (PTPdelta), and PTPsigma via specific domains regulate excitatory synapse formation." J Biol Chem **285**(18): 13966-13978.
- Lambert, D. M. (2001). "[Medical use of cannabis through history]." J Pharm Belg **56**(5): 111-118.
- Lambert, D. M. and C. J. Fowler (2005). "The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications." J Med Chem **48**(16): 5059-5087.
- Lau, C. G. and R. S. Zukin (2007). "NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders." Nat Rev Neurosci **8**(6): 413-426.
- Leonardo, E. D., L. Hinck, et al. (1997). "Guidance of developing axons by netrin-1 and its receptors." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **62**: 467-478.
- Levinson, J. N., N. Chery, et al. (2005). "Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroigin-induced synaptic specificity." J Biol Chem **280**(17): 17312-17319.
- Linhoff, M. W., J. Lauren, et al. (2009). "An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers." Neuron **61**(5): 734-749.
- Lisman, J., H. Schulman, et al. (2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." Nat Rev Neurosci **3**(3): 175-190.
- Llano, I., N. Leresche, et al. (1991). "Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents." Neuron **6**(4): 565-574.
- Luikart, B. W., W. Zhang, et al. (2008). "Neurotrophin-dependent dendritic filopodial motility: a convergence on PI3K signaling." J Neurosci **28**(27): 7006-7012.
- Luscher, C., R. A. Nicoll, et al. (2000). "Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane." Nat Neurosci **3**(6): 545-550.

- Lynch, M. A. (2004). "Long-term potentiation and memory." Physiol Rev **84**(1): 87-136.
- Ma, N., T. Abel, et al. (2009). "Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A." Learn Mem **16**(6): 367-370.
- Mackie, K. (2006). "Cannabinoid receptors as therapeutic targets." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 101-122.
- Mackie, K. (2006). "Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength." Int J Obes (Lond) **30 Suppl 1**: S19-23.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." Neuron **44**(1): 5-21.
- Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" Science **285**(5435): 1870-1874.
- Mallavarapu, A. and T. Mitchison (1999). "Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction." J Cell Biol **146**(5): 1097-1106.
- Manitt, C. and T. E. Kennedy (2002). "Where the rubber meets the road: netrin expression and function in developing and adult nervous systems." Prog Brain Res **137**: 425-442.
- Manivannan, S. and S. Terakawa (1994). "Rapid sprouting of filopodia in nerve terminals of chromaffin cells, PC12 cells, and dorsal root neurons induced by electrical stimulation." J Neurosci **14**(10): 5917-5928.
- Matsuda, L. A., T. I. Bonner, et al. (1993). "Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain." J Comp Neurol **327**(4): 535-550.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, et al. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." Nature **346**(6284): 561-564.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, et al. (2004). "Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines." Nature **429**(6993): 761-766.
- Mattila, P. K. and P. Lappalainen (2008). "Filopodia: molecular architecture and cellular functions." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(6): 446-454.
- Mayer, M. L. and N. Armstrong (2004). "Structure and function of glutamate receptor ion channels." Annu Rev Physiol **66**: 161-181.
- McGee, A. W. and D. S. Bredt (2003). "Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization." Curr Opin Neurobiol **13**(1): 111-118.
- McKinney, M. K. and B. F. Cravatt (2005). "Structure and function of fatty acid amide hydrolase." Annu Rev Biochem **74**: 411-432.

- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." Biochem Pharmacol **50**(1): 83-90.
- Mehlen, P. and F. Llambi (2005). "Role of netrin-1 and netrin-1 dependence receptors in colorectal cancers." Br J Cancer **93**(1): 1-6.
- Miledi, R. (1967). "Spontaneous synaptic potentials and quantal release of transmitter in the stellate ganglion of the squid." J Physiol **192**(2): 379-406.
- Moore, S. W. and T. E. Kennedy (2006). "Protein kinase A regulates the sensitivity of spinal commissural axon turning to netrin-1 but does not switch between chemoattraction and chemorepulsion." J Neurosci **26**(9): 2419-2423.
- Mukhopadhyay, S., H. H. McIntosh, et al. (2000). "The CB(1) cannabinoid receptor juxtamembrane C-terminal peptide confers activation to specific G proteins in brain." Mol Pharmacol **57**(1): 162-170.
- Munro, S., K. L. Thomas, et al. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." Nature **365**(6441): 61-65.
- Nguyen, P. V. and N. H. Woo (2003). "Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases." Prog Neurobiol **71**(6): 401-437.
- Nicoll, R. A. and D. Schmitz (2005). "Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses." Nat Rev Neurosci **6**(11): 863-876.
- Nimchinsky, E. A., B. L. Sabatini, et al. (2002). "Structure and function of dendritic spines." Annu Rev Physiol **64**: 313-353.
- Ohno-Shosaku, T., T. Maejima, et al. (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals." Neuron **29**(3): 729-738.
- Ohno-Shosaku, T., S. Sawada, et al. (1998). "Properties of depolarization-induced suppression of inhibitory transmission in cultured rat hippocampal neurons." Pflugers Arch **435**(2): 273-279.
- Oka, S., K. Nakajima, et al. (2007). "Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor." Biochem Biophys Res Commun **362**(4): 928-934.
- Okabe, S., A. Miwa, et al. (2001). "Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules." J Neurosci **21**(16): 6105-6114.
- Peralta, L., E. Agirregoitia, et al. (2011). "Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes." Reprod Biomed Online **23**(3): 372-379.

- Pertwee, R. G. (1997). "Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Pharmacol Ther **74**(2): 129-180.
- Piomelli, D., M. Beltramo, et al. (1998). "Endogenous cannabinoid signaling." Neurobiol Dis **5**(6 Pt B): 462-473.
- Piomelli, D., M. Beltramo, et al. (1999). "Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5802-5807.
- Piomelli, D., A. Giuffrida, et al. (2000). "The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs." Trends Pharmacol Sci **21**(6): 218-224.
- Pitler, T. A. and B. E. Alger (1992). "Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells." J Neurosci **12**(10): 4122-4132.
- Ranganathan, M. and D. C. D'Souza (2006). "The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review." Psychopharmacology (Berl) **188**(4): 425-444.
- Ravni, A., D. Vaudry, et al. (2008). "A cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neuriteogenesis through Egr1 in PC12 cells." Mol Pharmacol **73**(6): 1688-1708.
- Rex, C. S., C. Y. Lin, et al. (2007). "Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus." J Neurosci **27**(11): 3017-3029.
- Riedel, G., P. Fadda, et al. (2009). "Synthetic and plant-derived cannabinoid receptor antagonists show hypophagic properties in fasted and non-fasted mice." Br J Pharmacol **156**(7): 1154-1166.
- Ryberg, E., N. Larsson, et al. (2007). "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor." Br J Pharmacol **152**(7): 1092-1101.
- Sabo, S. L., R. A. Gomes, et al. (2006). "Formation of presynaptic terminals at predefined sites along axons." J Neurosci **26**(42): 10813-10825.
- Sadana, R. and C. W. Dessauer (2009). "Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies." Neurosignals **17**(1): 5-22.
- Sagan, S., L. Venance, et al. (1999). "Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes." Eur J Neurosci **11**(2): 691-699.
- Sara, Y., T. Biederer, et al. (2005). "Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly." J Neurosci **25**(1): 260-270.

- Scheiffele, P., J. Fan, et al. (2000). "Neuroigin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons." Cell **101**(6): 657-669.
- Schlicker, E., J. Timm, et al. (1997). "Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **356**(5): 583-589.
- Schmidt, U., C. Pilgrim, et al. (1998). "Differentiative effects of dopamine on striatal neurons involve stimulation of the cAMP/PKA pathway." Mol Cell Neurosci **11**(1-2): 9-18.
- Shapira, M., R. G. Zhai, et al. (2003). "Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles." Neuron **38**(2): 237-252.
- Shen, K. and C. W. Cowan (2010). "Guidance molecules in synapse formation and plasticity." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(4): a001842.
- Shen, M., T. M. Piser, et al. (1996). "Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures." J Neurosci **16**(14): 4322-4334.
- Solowij, N. and R. Battisti (2008). "The chronic effects of cannabis on memory in humans: a review." Curr Drug Abuse Rev **1**(1): 81-98.
- Star, E. N., D. J. Kwiatkowski, et al. (2002). "Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity." Nat Neurosci **5**(3): 239-246.
- Stella, N., P. Schweitzer, et al. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." Nature **388**(6644): 773-778.
- Sugiura, T., Y. Kobayashi, et al. (2002). "Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **66**(2-3): 173-192.
- Svitkina, T. M. and G. G. Borisy (1999). "Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia." J Cell Biol **145**(5): 1009-1026.
- Svizenska, I., P. Dubovy, et al. (2008). "Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review." Pharmacol Biochem Behav **90**(4): 501-511.
- Tau, G. Z. and B. S. Peterson (2010). "Normal development of brain circuits." Neuropsychopharmacology **35**(1): 147-168.

- Touw, M. (1981). "The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet." J Psychoactive Drugs **13**(1): 23-34.
- Varvel, S. A., R. J. Hamm, et al. (2001). "Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice." Psychopharmacology (Berl) **157**(2): 142-150.
- Villacres, E. C., S. T. Wong, et al. (1998). "Type I adenylyl cyclase mutant mice have impaired mossy fiber long-term potentiation." J Neurosci **18**(9): 3186-3194.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." Nat Protoc **1**(2): 848-858.
- Wang, H., G. D. Ferguson, et al. (2004). "Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP." Nat Neurosci **7**(6): 635-642.
- Wang, Z., B. Wang, et al. (2009). "Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis." J Neurosci **29**(35): 10788-10801.
- Weisskopf, M. G., P. E. Castillo, et al. (1994). "Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP." Science **265**(5180): 1878-1882.
- Willoughby, D. and D. M. Cooper (2007). "Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains." Physiol Rev **87**(3): 965-1010.
- Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses." Nature **410**(6828): 588-592.
- Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2002). "Endocannabinoid signaling in the brain." Science **296**(5568): 678-682.
- Yang, S. N., Y. G. Tang, et al. (1999). "Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic [Ca²⁺]_i elevation." J Neurophysiol **81**(2): 781-787.
- Yeckel, M. F., A. Kapur, et al. (1999). "Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism." Nat Neurosci **2**(7): 625-633.
- Yin, J. C., J. S. Wallach, et al. (1994). "Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila." Cell **79**(1): 49-58.
- Yuste, R. and T. Bonhoeffer (2001). "Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **24**: 1071-1089.
- Yuste, R. and T. Bonhoeffer (2004). "Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies." Nat Rev Neurosci **5**(1): 24-34.

- Zhai, R. G., H. Vardinon-Friedman, et al. (2001). "Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle." Neuron **29**(1): 131-143.
- Ziv, N. E. and C. C. Garner (2001). "Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees." Curr Opin Neurobiol **11**(5): 536-543.
- Ziv, N. E. and S. J. Smith (1996). "Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation." Neuron **17**(1): 91-102.
- Zuardi, A. W. (2006). "History of cannabis as a medicine: a review." Rev Bras Psiquiatr **28**(2): 153-157.