

**Université de Montréal**

**Impacts des cannabinoïdes sur la vision: étude anatomique et fonctionnelle**

**par**

**Bruno Cécyre**

**École d'optométrie**

Thèse présentée aux études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en sciences de la vision  
option neurosciences de la vision et psychophysique

Septembre 2019

© Bruno Cécyre, 2019

Cette thèse intitulée:  
Impacts des cannabinoïdes sur la vision: étude anatomique et fonctionnelle

Présentée par:  
Bruno Cécyre

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

**Dr Matthieu Vanni**  
Président-rapporteur

**Dr Jean-François Bouchard**  
Directeur de recherche

**Dr Christian Casanova**  
Codirecteur

**Dr Pierre Beaulieu**  
Membre du jury

**Dr Marc Hébert**  
Examineur externe

## Résumé

---

Le système endocannabinoïde (eCB) est une cible thérapeutique intéressante pour traiter diverses conditions variées, allant de la modulation du système immunitaire à la prise en charge de la douleur neuropathique. De plus, le système eCB est impliqué dans les processus développementaux comme l'indique une exposition aux cannabinoïdes au cours du développement qui provoque des troubles neurofonctionnels. En raison de leur nature lipophile, les eCBs ne sont pas emmagasinés, mais sont plutôt synthétisés et dégradés sur demande par des enzymes. Ainsi, l'étude du patron d'expression de ces enzymes permettrait de mieux comprendre l'expression et ainsi le rôle joué par les eCBs pendant la formation du système nerveux central.

Le récepteur CB1 est grandement distribué dans le système nerveux, alors que le récepteur CB2 est traditionnellement associé au système immunitaire. La découverte récente de l'expression et de l'impact fonctionnel du récepteur CB2 dans certains neurones, notamment au niveau rétinien, modifie la vision traditionnelle des rôles des eCBs. Notamment, une étude de notre laboratoire a montré que la délétion du récepteur CB2 chez des souris transgéniques (*cnr2<sup>-/-</sup>*) provoque une augmentation de l'amplitude de l'onde a en électrorétinographie, celle-ci reflétant l'activité des photorécepteurs rétiniens. Cette étude a mis en évidence l'importance du récepteur CB2 dans la vision, du moins au niveau rétinien. Jusqu'à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des cannabinoïdes sur l'acuité visuelle.

Nous avons caractérisé la distribution rétinienne des enzymes diacylglycérol lipase alpha (DAGL $\alpha$ ) et monoacylglycérol lipase (MAGL), responsables respectivement de la synthèse et de la dégradation du ligand eCB 2-arachidonoyl glycérol (2-AG), pendant le développement postnatal. L'enzyme DAGL $\alpha$  est présente dès la naissance et est grandement distribuée dans la rétine, notamment dans les photorécepteurs, les cellules horizontales, amacrines et ganglionnaires. L'enzyme MAGL apparaît plus tardivement et est limitée aux cellules amacrines et de Müller.

Nos résultats fonctionnels indiquent que l'acuité visuelle des animaux *cnr2<sup>-/-</sup>* est plus élevée autant chez les adultes que pendant le développement postnatal. L'administration répétée d'un agoniste inverse du récepteur CB2 produit une augmentation de l'acuité visuelle similaire à la délétion du récepteur CB2 par génie génétique et inversement, l'administration d'un agoniste du récepteur CB2 diminue l'acuité visuelle. Enfin, l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme MAGL, responsable de la dégradation du 2-AG, induit une diminution de l'acuité visuelle similaire à celle obtenue par un agoniste du récepteur CB2 tandis que l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme DAGL, responsable de la synthèse du 2-AG, provoque une augmentation de l'acuité visuelle.

Ces résultats suggèrent que le 2-AG est fortement présent tôt lors du développement rétinien et qu'il pourrait être impliqué dans la maturation structurelle et fonctionnelle de la rétine. De plus, les expériences fonctionnelles ont démontré que les cannabinoïdes affectent non seulement la réponse rétinienne, mais aussi l'acuité visuelle de manière significative. En outre, ces résultats confirment que les cannabinoïdes induisent leurs effets sur la vision exclusivement par le récepteur CB2. Enfin, les résultats de cette thèse accroissent les connaissances actuelles dans un contexte de légalisation grandissante du cannabis à des fins récréatives, puisqu'ils mettent en évidence l'importance des impacts sur l'acuité visuelle.

**Mots-clés:** Acuité visuelle, électrorétinographie, DAGL, immunohistochimie, MAGL, microscopie confocale, récepteurs cannabinoïdes, réflexe optomoteur, rétine.

## Abstract

---

The endocannabinoid (eCB) system is a great therapeutic target for the treatment of many diseases, ranging from immune system modulation to pain management. This system is implicated in developmental processes as indicated by neurofunctional afflictions following developmental exposition to cannabinoids. Since eCBs are lipophilic, they are not stored in vesicles but rather synthesized and degraded on demand by specific enzymes. Thus, the expression pattern of these enzymes could help to better understand the expression of eCBs, and their role during central nervous system maturation.

The CB1 receptor is strongly distributed in the nervous system, while the CB2 receptor is traditionally associated with the immune system. The recent finding of the CB2 receptor expression and function in some neurons, especially in the retina, changes the dogma associated with cannabinoids. A study from our laboratory found that deletion of the CB2 receptor in transgenic mice (*cnr2<sup>-/-</sup>*) enhances the a-wave amplitude in electroretinography, this wave reflecting photoreceptor activity. This report highlighted the importance of the CB2 receptor in vision, at least in the retina. Until now, no study aimed at the impact of cannabinoids on visual acuity.

We characterized the retinal distribution of diacylglycerol lipase alpha (DAGL $\alpha$ ) and monoacylglycerol lipase (MAGL) enzymes, responsible for the synthesis and degradation of the eCB ligand 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) during postnatal development. The enzyme DAGL $\alpha$  is expressed since birth and is greatly distributed across the retina such as in photoreceptors, horizontal, amacrine and ganglion cells. The enzyme MAGL is expressed later during development and is present only in amacrine and Müller cells.

Our functional results show that the visual acuity of *cnr2<sup>-/-</sup>* mice is enhanced in adults and during postnatal development. The repeated administration of a CB2 receptor antagonist yielded a better visual acuity, and inversely a CB2 receptor agonist decreased the visual acuity. Furthermore, the administration of a MAGL inhibitor, the enzyme in charge of 2-AG degradation, induced a strong decrease in

visual acuity, similar to that obtained with a CB2 receptor agonist. Inversely, a DAGL inhibitor, the enzyme responsible for 2-AG synthesis, caused an increase in visual acuity.

These results suggest that 2-AG is strongly expressed early during retinal development and could be implicated in structural and functional maturation of the retina. Furthermore, we demonstrated that cannabinoids do not only affect retinal function, but also visual acuity. These results confirm that cannabinoids modulate their visual effects exclusively via the CB2 receptor. Finally, in recent years, many countries legalized cannabis for recreational and therapeutic use. The findings from this thesis increase the understanding of cannabinoids since they highlight the great impact of cannabinoids on the visual acuity.

**Keywords:** Cannabinoid receptors, confocal microscopy, DAGL, electroretinography, immunohistochemistry, MAGL, optomotor reflex, retina, visual acuity

# Table des matières

---

<b>Résumé</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Table des matières</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>14</b>
<b>Liste des sigles et des abréviations</b>	<b>16</b>
<b>Remerciements</b>	<b>20</b>
<b>1- Introduction</b>	<b>23</b>
1.1- <i>L'histoire des cannabinoïdes</i>	23
1.2- <i>Le système endocannabinoïde</i>	26
1.2.1- Les principaux endocannabinoïdes	26
1.2.1.1- L'arachidonoyléthanolamide	27
1.2.1.2- L'arachidonoylglycérol	28
1.2.2- Les récepteurs cannabinoïdes	30
1.2.2.1- Voies de signalisation	31
1.2.2.1.1- Voie des kinases activées par des agents mitogènes	31
1.2.2.1.2- Voie de l'adénylate cyclase	31
1.2.2.1.3- Modulation de canaux ioniques	32
1.2.2.2- Distribution des récepteurs cannabinoïdes	33
1.2.2.2.1- Distribution du récepteur CB1	33
1.2.2.2.2- Distribution du récepteur CB2	33
1.2.2.2.3- Distribution des autres récepteurs liés aux cannabinoïdes	34
1.2.2.2.3.1- Le récepteur GPR55	34
1.2.2.2.3.2- Les récepteurs TRP	34
1.2.3- Les fonctions physiologiques du système endocannabinoïde	35
1.2.3.1- Rôle des endocannabinoïdes dans la signalisation rétrograde	36
1.2.3.2- Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité synaptique à court terme	36
1.2.3.3- Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité à long terme	37
1.2.4- Le système endocannabinoïde et le développement	39
1.2.4.1- Expression et rôles du système endocannabinoïde au cours du développement	41

1.3- Le système visuel _____	42
1.3.1- La rétine _____	43
1.3.1.1- Anatomie de la rétine _____	43
1.3.1.1.1- Les photorécepteurs _____	44
1.3.1.1.1.1- Les cônes _____	45
1.3.1.1.1.2- Les bâtonnets _____	46
1.3.1.1.2- Les cellules bipolaires _____	48
1.3.1.1.3- Les cellules ganglionnaires _____	49
1.3.1.1.4- Les cellules horizontales _____	50
1.3.1.1.5- Les cellules amacrines _____	50
1.3.1.1.6- Les cellules gliales de la rétine _____	51
1.3.1.1.7- La transmission du signal des cônes _____	51
1.3.2- Aires visuelles cérébrales _____	52
1.3.2.1- Le corps genouillé latéral _____	52
1.3.2.2- Le cortex visuel primaire _____	53
1.3.2.3- Le colliculus supérieur _____	53
1.3.3- Comparaison anatomique de la rétine, du champ visuel et des voies de projection humaine et de rongeur _____	54
1.3.4- Évaluation de la fonction visuelle _____	55
1.3.4.1- Électrorétinographie _____	55
1.3.4.1.1- Les ondes extraites par électrorétinographie _____	56
1.3.4.1.2- La spécification des ondes et leur provenance _____	57
1.3.4.1.2.1- L'onde a _____	58
1.3.4.1.2.2- L'onde b _____	58
1.3.4.1.2.3- Les potentiels oscillatoires _____	59
1.3.4.2- Le réflexe optomoteur _____	59
1.3.4.2.1- Mesure du réflexe optomoteur _____	60
1.4- Les cannabinoïdes et le système visuel _____	62
1.4.1- Les cannabinoïdes et les tissus oculaires _____	62
1.4.2- Les cannabinoïdes et la vision _____	63
1.4.3- Les cannabinoïdes et les aires visuelles cérébrales _____	65
1.4.4- Les cannabinoïdes et la rétine _____	66
1.4.4.1- Les eCBs et leurs enzymes de synthèse et de dégradation _____	66
1.4.4.2- Les récepteurs cannabinoïdes _____	67
1.4.4.3- La fonction des cannabinoïdes dans la rétine _____	72



<b>2- Objectifs de recherche</b>	<b>75</b>
<b>3- Article 1</b>	<b>77</b>
3.1- Abstract	78
3.2- Introduction	79
3.3- Materials and methods	81
Animals	81
Tissue Preparation	81
Western blot	81
Immunohistochemistry	82
Validity of the sequential labeling	83
Antibody characterization	83
Confocal microscopy	86
3.4- Results	86
Western blot analysis	86
Cellular distribution of DAGL $\alpha$ and MAGL	89
Cone photoreceptors	89
Rod photoreceptors	92
Horizontal cells	94
Cone bipolar cells	95
Rod bipolar cells	97
Amacrine cells	99
Ganglion cells	100
Müller cells	101
Outer plexiform layer	103
Inner plexiform layer	103
Progenitor cells	106
Comparison of the temporal and spatial profiles of DAGL $\alpha$ and MAGL protein localization	108
3.5- Discussion	110
Temporal expression of DAGL $\alpha$ and MAGL	110
Cellular localization of DAGL $\alpha$ and MAGL	111
Cellular localization of DAGL $\alpha$	111
DAGL $\alpha$ localization in the OPL	111

DAGL $\alpha$ localization in the IPL _____	112
Cellular localization of MAGL _____	112
MAGL localization in the IPL _____	112
Functional considerations _____	113
<b>4- Article 2 _____</b>	<b>117</b>
4.1- Summary _____	118
4.2- Introduction _____	118
4.3- Methods _____	120
Animals _____	120
Optomotor Response Measurements _____	120
Electroretinography _____	121
Electroretinography Analysis _____	121
Drug Injections _____	122
Statistics _____	123
4.4- Results _____	123
<i>The Deletion of <i>cnr2</i> Enhances the Visual Acuity During the Development Through Adulthood</i> _____	123
<i>The Pharmacological Manipulation of CB2R Modulates Visual Acuity</i> _____	125
<i>The CB1R Does Not Modulate Visual Acuity</i> _____	125
<i>Endocannabinoids Also Modulate Visual Acuity</i> _____	127
<i>The Systemic Pharmacological Manipulation of CB1R and CB2R Does Not Modulate Retinal Function</i> _____	128
<i>Endocannabinoid Modulation Affects Retinal Function</i> _____	137
4.5- Discussion _____	143
<i>The CB2R Is Implicated in Visual Acuity</i> _____	143
<i>The CB1R Does Not Modulate Visual Acuity</i> _____	146
Endocannabinoids Can Act on Visual Acuity _____	146
<b>5- Discussion _____</b>	<b>149</b>
5.1- Résumé des résultats _____	149
5.1.1- Aspects de la localisation des enzymes DAGL $\alpha$ et MAGL dans la rétine de rat _____	149
5.1.2- Aspects de la modulation de l'acuité visuelle et de la fonction rétinienne par les cannabinoïdes _____	149

5.2- Aspects méthodologiques _____	150
5.2.1- Justification du modèle _____	150
5.3- Localisation des enzymes DAGLa et MAGL _____	151
5.4- Rôles du système eCB dans la rétine adulte _____	152
5.5- Synthèse globale _____	154
5.6- Futures directions _____	154
<b>6- Conclusion _____</b>	<b>156</b>
<b>7- Annexe _____</b>	<b>158</b>
<i>Collaboration sur des articles scientifiques au cours de la thèse:</i> _____	158
<i>Prix remportés au cours de la thèse:</i> _____	159
<i>Bourses reçues au cours de la thèse:</i> _____	159
<i>Responsabilités occupées au cours de la thèse:</i> _____	160
<i>Articles de revue</i> _____	161
7.1- Retinal Cannabinoids _____	161
Abstract _____	161
Marijuana and the Endocannabinoids _____	162
Synthesis and Release _____	162
Inactivation _____	163
Receptors _____	165
Distribution and Function _____	165
Cannabinoids and Ocular Tissues _____	166
Cannabinoids – Retinal Anatomy _____	167
Localization – Cannabinoid Receptors _____	168
Localization – Synthesizing and catabolic enzymes _____	169
Cannabinoids – Retinal Physiology _____	169
Effects on Transmitter Release _____	169
Effects on Ganglion cells _____	170
Effects on Amacrine cells _____	170
Effects on Bipolar Cells _____	171
Effects on Photoreceptors _____	171
Cannabinoids – Development and Neuroprotection _____	172
Development _____	172
Regeneration _____	174
Conclusion _____	174

See also	175
Glossary	175
Further Reading	176
Relevant Websites	176
Change history	176
<b>7.2- Expression and function of the endocannabinoid system in the retina and the visual</b>	
<b>brain</b>	<b>177</b>
Abstract	177
Cannabinoid expression in the visual system	179
Ocular tissues	179
Adult retina	180
Endocannabinoids	180
Cannabinoid receptors	181
Cannabinoid-like receptors	184
Synthesizing and catabolic enzymes	185
Cannabinoid system expression in the primary visual cortex	186
Cannabinoid function in the visual system	187
Retina	187
Epithelial cells	188
Photoreceptors	189
Bipolar cells	190
Amacrine cells	190
Retinal ganglion cells	191
Cannabinoid Function in the primary visual cortex	193
Endocannabinoid expression and Function during Retinal development	194
Retinal endocannabinoid expression	194
Endocannabinoid system Function	195
Future directions and implications	196
Conclusion	197
<b>Bibliographie</b>	<b>201</b>

---

## Liste des tableaux

---

<b>Table 3.1 Antibodies Used in This Study .....</b>	<b>116</b>
<b>Table 8.1 Endocannabinoid levels in the adult retina of various species.....</b>	<b>180</b>
<b>Table 8.2 Cannabinoid receptor type 1 protein distribution in the adult retina of various species. .....</b>	<b>182</b>
<b>Table 8.3 Cannabinoid receptor type 2 protein distribution in the adult retina.....</b>	<b>184</b>

# Liste des figures

---

Figure 1.1 Métabolisme des eCBs .....	30
Figure 1.2 Voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes.....	32
Figure 1.3 Mécanismes de la plasticité à court et à long terme liée aux endocannabinoïdes.....	39
Figure 1.4 Expression temporelle de composantes du système endocannabinoïde au cours du développement du système nerveux central. ....	40
Figure 1.6 La transmission du signal des bâtonnets dans la rétine .....	48
Figure 1.7 Les ondes caractéristiques de l'ERG .....	57
Figure 1.8 Représentation de la stimulation visuelle générée par l'équipement permettant la mesure du réflexe optomoteur. ....	62
Figure 1.9 Représentation de la distribution du récepteur CB1 dans la rétine adulte de plusieurs espèces. ....	69
Figure 1.10 Représentation de la distribution du récepteur CB2 dans la rétine adulte de plusieurs espèces. ....	72
Figure 3.1 Temporal patterns of protein contents of DAGL $\alpha$ and MAGL during retinal development. ....	88
Figure 3.2 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in the developing rat retina. ....	89
Figure 3.3 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in cone photoreceptors. ....	92
Figure 3.4 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in rod photoreceptors.....	94
Figure 3.5 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in horizontal cells.....	95
Figure 3.6 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in type 2 and 8 cone bipolar cells.....	96
Figure 3.7 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in rod bipolar cells. ....	98
Figure 3.8 Expression of DAGL $\alpha$ and MAGL in amacrine cells.....	100
Figure 3.9 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in ganglion cells.....	101
Figure 3.10 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in Müller cells. ....	103
Figure 3.11 DAGL $\alpha$ immunoreactivity in the outer and inner plexiform layers. ....	104
Figure 3.12 MAGL immunoreactivity in the inner plexiform layer.....	106
Figure 3.13 DAGL $\alpha$ and MAGL immunoreactivity in progenitor cells.....	108
Figure 3.14 Comparison of DAGL $\alpha$ and MAGL retinal localization. ....	110
Figure 4.1 CB2R deletion enhances visual acuity in adults and through postnatal development. ..	124
Figure 4.2 Only CB2R modulates visual acuity.....	127
Figure 4.3 The inhibition of 2-AG degradation decreases visual acuity.....	128
Figure 4.5 Systemic CB2R modulation does not affect retinal function in photopic conditions. ....	133

**Figure 4.6 Systemic CB1R modulation does not affect retinal function under scotopic conditions.**  
..... 135

**Figure 4.7 Systemic CB1R modulation does not affect retinal function in photopic conditions.....** 137

**Figure 4.8 Endocannabinoid modulation affects retinal function in scotopic conditions. ....** 139

**Figure 4.9 Endocannabinoid modulation affects retinal function in photopic conditions. ....** 141

**Figure 4.10 Endocannabinoid modulation affects the oscillatory potentials in scotopic conditions.**  
..... 143

**Figure 7.1.1 Chemical structures of endocannabinoids: arachidonoyl-ethanolamide (anandamide, AEA) and 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG).....** 162

**Figure 7.1.2 Metabolic pathways for AEA and 2-AG degradation.....** 164

**Figure 8.1 Schematic illustration representing the organization of the mouse retina. ....** 198

**Figure 8.2 Schematic illustration representing the distribution of CB1R in the adult retina of several species.....** 199

**Figure 8.3 Schematic illustration showing the expression of CB2R in the adult retina of several species. ....** 200

## Liste des sigles et des abréviations

---

Abhd4:  $\alpha,\beta$ -hydrolase 4

Abhd6:  $\alpha,\beta$ -hydrolase 6

Abhd12:  $\alpha,\beta$ -hydrolase 12

AEA: Anandamide ou N-arachidonoyléthanolamide

AMPC: Adénosine Monophosphate cyclique

ANOVA: Analyse de la variance

ARNm: Acide Ribonucléique Messenger

CBC: Cannabichromène

CBL: Cannabicyclol

CBD: Cannabidiol

CBE: Cannabielsoin

CBG: Cannabigérol

CBND: Cannabinodiol

CBN: Cannabinol

CBT: Cannabitriol

CB1: Récepteur cannabinoïde de type 1

CB2: Récepteur cannabinoïde de type 2

CGL: Corps Genouillé Latéral

CNS: *Central Nervous System* ou système nerveux central

COX-2: Cyclooxygénase-2

CS: Colliculus Supérieur

CtBP2: *C-terminal binding protein 2*

DAG: Diacylglycérol

DAGL: Diacylglycérol Lipase

DLT: dépression à long terme

DSE: Suppression de l'excitation induite par la dépolarisation ou *Depolarization-induced Suppression of Excitation*



DSI: Suppression de l'inhibition induite par la dépolarisation ou *Depolarization-induced Suppression of Inhibition*

eCB: Endocannabinoïde

ECL: *Enhanced Chemiluminescence* ou chimiluminescence améliorée

ERG: Électrorétinographie

FAAH: *Fatty Acid Amide Hydrolase*

GABA: Acide  $\gamma$ -aminobutyrique ou *Gamma-AminoButyric Acid*

GCL: Couche des cellules ganglionnaires ou *Ganglion Cell Layer*

GIRK: Canaux potassiques à courant entrant liés à une protéine G ou *G protein-coupled Inwardly-Rectifying Potassium channel*

GPCR: Récepteur lié à une protéine G ou *G-Protein Coupled Receptor*

GMPc: Guanosine Monophosphate Cyclique

GS: Glutamine Synthetase

HRP: *Horseradish Peroxidase* ou peroxydase de raifort

INL: Couche nucléaire interne ou *Inner Nuclear Layer*

IPL: Couche plexiforme interne ou *Inner Plexiform Layer*

ipRGC: *Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell* ou cellule ganglionnaire photosensible

ISCEV: *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*

MAGL: Monoacylglycérol lipase

MAPK: Protéines kinase activées par des agents mitogènes ou *Mitogen Activated Protein Kinases*

MAP2: *Microtubule-Associated Protein 2*

NA: *Numerical Aperture*

NAPE: N-Arachidonoyl Phosphatidyléthanolamine

NAPE-PLD: N-Arachidonoyl Phosphatidyléthanolamine-phospholipase D

NAT: N-Acyltransférase

NBL: *Neuroblast Layer*

NSC: Noyau Suprachiasmatique

P: *Postnatal day* ou jour postnatal

PBS: *Phosphate-Buffered Saline* ou tampon phosphate salin

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PKA: Protéine Kinase A

PO: Potentiel Oscillatoire

PSD95: *Postsynaptic density protein 95*

ONL: Couche nucléaire externe ou *Outer Nuclear Layer*

ONU: Organisation des Nations Unies

OPL: Couche plexiforme externe ou *Outer Plexiform Layer*

RPE: *Retinal Pigmented Epithelium* ou épithélium pigmentaire rétinien

RT-PCR: Réaction en chaîne par polymérase quantitative ou *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

SDS-PAGE: *Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis* ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SNC: Système Nerveux Central

TRP: *Transient Receptor Potential channel*

VGlut1: *Vesicular Glutamate Transporter 1*

V1: Cortex visuel primaire

$\Delta^8$ -THC:  $\Delta^8$ -Tétrahydrocannabinol

$\Delta^9$ -THC:  $\Delta^9$ -Tétrahydrocannabinol

2-AG: 2-Arachidonoylglycérol

À Umit Keysan, décédé il y a peu, cette thèse t'est dédiée. Puisse-t-elle être à la hauteur du mémoire de maîtrise que tu n'as pas eu le temps de terminer.

## Remerciements

---

Je remercie d'abord le jury ayant corrigé cette thèse de doctorat. Je suis conscient de la charge de travail et de temps qu'implique la correction de ce travail et je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de le faire.

Ce travail n'aurait pu être effectué et n'aurait certainement pas été aussi agréable sans le soutien et l'aide de plusieurs personnes. Je tiens particulièrement remercier mes directeurs de recherche, Jean-François et Christian.

D'abord Jean-François, je me considère très chanceux d'avoir atterri au sein de ton laboratoire. Je n'aurais jamais cru lors de mon premier stage à l'été 2009, que je serais encore ici 10 ans plus tard. Ton enthousiasme légendaire n'a pas de frontières, que ce soit du côté scientifique où tu t'emballes rapidement à discuter d'expériences futures ou encore en réunion de laboratoire où tu nous transmets ta passion pour ta souffleuse et tes innombrables gadgets. Tant de belles histoires à raconter le jour où le prix du mentor scientifique du CRCQ te sera décerné... Enfin, merci de la confiance dont tu m'as témoignée au fil des années en me donnant la chance d'apprendre le travail de chercheur. Je peux dire qu'après avoir géré la plateforme d'imagerie, les colonies de souris transgéniques, supervisé 16 stagiaires, fait des demandes de permis, demandé un nombre incalculable de soumissions diverses, révisé de nombreux articles, effectué des commandes, aidé à compléter des demandes de fonds, écrit des demandes de comité d'éthique et collaboré à une foule de projets, j'ai été particulièrement bien formé!

Christian, je vous remercie d'avoir été mon codirecteur. Même si vous avez été très occupé par vos deux mandats en tant que directeur de l'école d'optométrie, votre dynamisme, votre passion et votre rigueur m'ont marqué. Merci de votre soutien pendant toutes ces années. J'espère avoir mérité l'honneur de vous tutoyer.

Toutes ces années au laboratoire n'auraient jamais été aussi marquantes si je n'avais pas été aussi bien entouré. En plus des très nombreuses personnes que j'ai côtoyées pendant ma maîtrise (Cécylre, B. (2013). *Caractérisation de l'anatomie et de la fonction du système endocannabinoïde dans la rétine adulte* (Mémoire de maîtrise,

Université de Montréal)), je tiens à remercier plusieurs personnes qui ont rendu ce long périple beaucoup plus agréable. Merci à Aurélie, Samuel, Philippe et Hosni qui, en plus d'avoir été un excellent public lorsque j'assouvissais mon envie irrésistible de mettre de la glace sèche dans un évier rempli d'eau chaude, ont été des coéquipiers et amis hors pairs. Merci aussi à mes collègues du laboratoire Casanova: Olivia pour son enthousiasme (notamment à boire une bière le jour du dépôt de ma thèse) et sa curiosité scientifique contagieuse, Nelson pour sa généreuse propension à acheter des gâteaux d'anniversaires, de même que Samuel et Bruno pour avoir été particulièrement agréables à côtoyer au laboratoire et à l'extérieur (notamment au McCarold's). Merci aussi à Jacqueline et Marie-Charlotte pour leur bonne humeur (ou pas toujours...). Merci également à Robin, de l'Institut de la vision à Paris, pour m'avoir aussi bien accueilli et aidé lors de mon court stage de travail dans son laboratoire. Mention spéciale à Anthéa qui a été d'un grand soutien au cours des derniers mois de ma thèse. La fin de mon parcours n'aurait certainement pas été aussi agréable sans ta présence rassurante. Merci d'être ma supportrice numéro un.

Je salue également les nombreux étudiants dont j'ai eu la chance d'être le superviseur de stage. La plupart d'entre vous avez été d'une grande aide et je suis très touché d'avoir pu vous connaître. Merci Francis, Frédérique, Marie-Michèle, François, Mylène, Stéfany, Romane, Aubert, Alexie, Ismaël et Chloé.

Je remercie l'équipe du secteur académique pour l'excellent soutien dont j'ai bénéficié. Merci à Sabine, qui est devenue plus qu'une amie, une grand-mère académique! Merci également à Micheline pour ta touche magique sur mes affiches et ton dévouement à me prendre en photo aux événements de l'école. Je remercie spécialement Fethy pour m'avoir rendu de nombreux services au cours de mes études. Ce fut un très grand plaisir de te côtoyer à l'école.

Je suis également très reconnaissant envers ma famille pour m'avoir encouragé dans mes études. Plus particulièrement, je remercie mes parents Lucie et Gaétan qui m'ont toujours encouragé à continuer en me demandant régulièrement: « Quand est-ce que tu finis? ». Je serai toujours reconnaissant de votre dévouement hors du commun.

J'aimerais remercier les organismes subventionnaires qui ont financé mes recherches. Merci aux études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal (Bourse d'excellence Banque TD et Bourse alma mater), au Fonds de recherche en santé du Québec (Bourse de doctorat) et au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (Bourse de doctorat).

Je termine avec une pensée spéciale pour Umit Keysan, un collègue et un ami qui nous a quitté beaucoup trop tôt. Ton engagement au sein du laboratoire, ton entraide avec les autres étudiants et ta grande curiosité m'ont profondément touché. Je garde de très bons souvenirs de nos discussions, de nos questionnements et des activités qu'on a faites ensemble, notamment au congrès de SfN à San Diego.

# 1- Introduction

---

## 1.1- L'histoire des cannabinoïdes

Depuis le début de l'humanité, les plantes ont été utilisées par l'homme pour une grande variété d'applications. Le cannabis est l'une des plus vieilles plantes cultivées, soit depuis plus de 4000 ans avant notre ère. Le cannabis était entre autres utilisé dans la confection de cordes, de tissu et de papier (1). Il était principalement utilisé en Chine et en Inde pour soigner une grande étendue de problèmes médicaux tels que la douleur rhumatoïde, la malaria, les infections, les constipations intestinales et l'inflammation (1).

Le cannabis a été introduit dans la médecine occidentale au 19<sup>e</sup> siècle et a atteint son apogée à la fin du 19<sup>e</sup> siècle. Plusieurs compagnies pharmaceutiques commercialisaient des extraits de cannabis comme agents sédatifs, hypnotiques, analgésiques ou pour stimuler l'appétit (1). Au début du 20<sup>e</sup> siècle, l'utilisation médicale du cannabis a significativement diminué en Occident en raison d'un manque de reproductibilité dans l'efficacité des préparations causé par la grande disparité des espèces de cannabis utilisées. À cette époque, l'ingrédient actif du cannabis n'était toujours pas connu et l'efficacité de la préparation de cannabis dépendait de plusieurs facteurs, dont l'origine, l'âge et le mode de préparation de l'extrait.

L'utilisation du cannabis connut un déclin marqué en raison de l'instauration d'une taxation sur l'importation, la production et l'utilisation industrielle ou médicinale de tout produit du chanvre. Bien qu'elle ne rendît pas criminel l'usage ou la vente de cannabis, cette loi, nommée *The Marijuana Tax Act of 1937*, a instauré de lourdes peines en cas d'infraction, ce qui a anéanti l'utilisation récréative, médicale et scientifique du cannabis. À la fin des années 1960, sous la pression du président américain Richard Nixon et de sa guerre contre les drogues, l'Organisation des Nations Unies (ONU) imposa une prohibition du cannabis à ses états membres. Ce contrôle mondial du cannabis engendra un ralentissement, voire un arrêt de la recherche sur les cannabinoïdes. De nombreux historiens évoquent que la prohibition

du cannabis avait surtout pour objectif de détruire l'industrie des produits issus du chanvre. En effet, les fibres de chanvre s'avéraient être des substituts plus abordables que la pâte de bois pour la fabrication de papier journal et que le nylon pour la fabrication de vêtements (2). La campagne menant à l'interdiction des produits du chanvre fut d'ailleurs soutenue par des groupes industriels liés aux industries du papier journal et du nylon (2).

La consommation à des fins récréatives a connu une hausse fulgurante dans les années 1960, ce qui suscita un regain d'intérêt pour la recherche portant sur le cannabis. De nos jours, le cannabis est une drogue couramment utilisée de manière récréative. De très nombreuses législations ont d'ailleurs décriminalisé et même autorisé sa consommation thérapeutique et récréative, démocratisant ainsi son utilisation à grande échelle.

Durant environ un siècle, plusieurs tentatives ont été réalisées afin d'isoler les constituants actifs de la marijuana et d'élucider leurs structures (3). L'arrivée de nouvelles techniques de séparation a permis d'isoler le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), le principal ingrédient actif du cannabis, par Yechiel Gaoni et Raphael Mechoulam en 1964 (4). Peu après, le  $\Delta^9$ -THC a été synthétisé (5) et le même groupe de recherche a démontré que le  $\Delta^9$ -THC est responsable des effets psychotropes des préparations de cannabis administrées chez des singes rhésus (6). Ces grandes découvertes ont contribué à raviver l'intérêt de la communauté scientifique pour cette plante, décuplant ainsi le nombre de publications sur le cannabis dans les années qui suivirent.

Les premières données montrant que les cannabinoïdes exerçaient leurs actions sur des récepteurs ont démontré que les cannabinoïdes inhibent la formation de l'adénylate cyclase (7) et que des sites de liaison aux cannabinoïdes étaient présents dans le cerveau (8). La distribution de ces sites de liaison était cohérente avec les propriétés psychotropes des cannabinoïdes (9). La découverte officielle des récepteurs cannabinoïdes vint de l'équipe de Tom Bonner, qui isola le récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1) à partir du cerveau de rat (10). En 1993, l'équipe de



Sean Munro parvint à isoler le récepteur cannabinoïde de type 2 (CB2) à partir de cellules myélocytaires HL60 (11).

La recherche sur les cannabinoïdes a connu un regain d'intérêt suite à l'identification et au clonage des récepteurs cannabinoïdes. En effet, cette découverte suggérait l'existence de molécules endogènes, pouvant se lier aux récepteurs cannabinoïdes. En raison de la nature lipophile des phytocannabinoïdes, l'équipe de Raphael Mechoulam présuma qu'une molécule cannabinoïde endogène serait également lipidique. C'est pourquoi leurs travaux portèrent sur les fractions lipidiques du cerveau de porc et identifèrent le composé N-arachidonoyléthanolamide (AEA), qu'ils rebaptisèrent anandamide en référence au mot sanskrit « ananda » qui signifie « bonheur intérieur » et à « amide » en référence à sa structure chimique (12).

Puisque les propriétés pharmacologiques de l'AEA ne correspondaient pas parfaitement aux effets comportementaux du  $\Delta^9$ -THC, l'existence d'un second ligand cannabinoïde endogène fut prédite. Ce second ligand, nommé 2-arachidonoylglycérol (2-AG), fut identifié en 1995 (13, 14).

Afin de rendre hommage à l'inspiration qu'ont eu les endorphines sur la découverte de ces nouveaux ligands endogènes cannabinoïdes, le chercheur Vincenzo Di Marzo proposa le terme endocannabinoïdes (eCBs) pour identifier ces composés (15). De ce mot est né le terme « système endocannabinoïde » pour identifier l'ensemble des récepteurs cannabinoïdes, de leurs ligands endogènes et des enzymes régulant l'expression de ces ligands.

De nos jours, plus de 545 composés naturels ont été identifiés dans le cannabis (16). Parmi ceux-ci, 144 ont été isolés et catégorisés en tant que phytocannabinoïdes, c'est-à-dire qu'ils possèdent une structure chimique apparentée aux cannabinoïdes (17), complexifiant ainsi le portrait classique voulant que le  $\Delta^9$ -THC soit le seul ingrédient actif du cannabis. Brièvement, les phytocannabinoïdes ont été répertoriés en 11 sous-classes selon leur structure chimique: cannabigérol (CBG),  $\Delta^9$ -THC, cannabidiol (CBD), cannabichromène (CBC), cannabinoïl (CBN),  $\Delta^8$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC), cannabicycloïl (CBL), cannabinoïdiol (CBND), cannabielsoïn (CBE), cannabitriol (CBT) et d'autres types variés (17). Toutes les

sous-classes dérivent des cannabinoïdes de la famille du CBG et ont ainsi une structure chimique similaire. Les classes du CBG, du  $\Delta^9$ -THC, du CBD et du CBC sont les seules à être synthétisées dans les plants de cannabis alors que les six autres sous-classes résultent d'une décomposition due à la lumière, à la chaleur ou à une oxydation (16, 17).

## **1.2- Le système endocannabinoïde**

Les cannabinoïdes agissent sur l'organisme par l'intermédiaire du système eCB. Celui-ci joue un rôle important dans la régulation de divers processus physiologiques fondamentaux comme l'inflammation, la cognition, le contrôle de l'alimentation et la nociception (18). Les récepteurs cannabinoïdes sont abondamment exprimés, et ce, dans plusieurs régions du corps. Notamment, le récepteur CB1 est fortement exprimé dans le système nerveux central (SNC) alors que le récepteur CB2 est traditionnellement associé au système nerveux périphérique et le système immunitaire (19).

Le système eCB inclut également les ligands endogènes, aussi appelés eCBs. Les principaux eCBs caractérisés, l'AEA et le 2-AG possèdent tous deux une structure lipidique, ont une courte demi-vie – de quelques secondes à quelques minutes selon diverses études (20, 21) – et sont catabolisés par des enzymes. Ces ligands sont produits suite à une augmentation de calcium intracellulaire dans différents tissus, notamment dans le SNC, où ils modulent la libération de neurotransmetteurs (22).

### **1.2.1- Les principaux endocannabinoïdes**

Les eCBs sont différents des neurotransmetteurs classiques. Ces derniers sont normalement synthétisés dans le cytoplasme des neurones, stockés dans des vésicules synaptiques et excrétés par exocytose dans la fente synaptique suite à une excitation de la terminaison nerveuse par des potentiels d'action. Les eCBs, quant à eux, sont produits sur demande à partir de la membrane plasmique (23). Ils sont

libérés par la cellule immédiatement après leur production et ne sont donc pas stockés (24).

Les eCBs sont lipophiles et sont nécessairement très peu solubles dans le milieu extracellulaire hydrophile (12). Conséquemment, leurs actions sont locales et dépendent directement de la localisation de leur site de production et de leurs récepteurs (25). Une fois relâchés, les eCBs voyagent de manière rétrograde vers la fente synaptique et se lient alors aux récepteurs cannabinoïdes présents sur les terminaux présynaptiques (26). Étant donné que les eCBs sont lipophiles et que la fente synaptique est hydrophile, leurs mouvements devraient être limités. Bien que le processus de leur diffusion n'est pas complètement élucidé, plusieurs études suggèrent que des protéines de transport agissent en tant que transporteurs, permettant à la fois la solubilisation et le transport des eCBs (27). Une fois leur action sur les récepteurs cannabinoïdes terminée, les eCBs sont récupérés par un processus de transport membranaire (28, 29). Une fois à l'intérieur de la cellule, les eCBs sont dégradés par les enzymes qui leur sont spécifiques (30, 31).

#### **1.2.1.1- L'arachidonoyléthanolamide**

L'arachidonoyléthanolamide, aussi connue sous le nom d'anandamide ou par son abréviation AEA, est plus fortement exprimée au niveau du cerveau et des tissus périphériques (32). Les niveaux les plus élevés sont observés dans le striatum et dans le tronc cérébral tandis que les plus faibles sont présents dans le cervelet et le cortex (voir Basavarajappa (33) pour une revue). L'AEA est retrouvée dans des régions du cerveau qui sont riches en récepteurs CB1, tels que l'hippocampe et le striatum. L'AEA est également présente dans certains tissus périphériques comme la rate, où sont fortement exprimés les récepteurs CB2 (34).

La synthèse de l'AEA commence en réponse à une élévation de calcium intracellulaire. Le précurseur immédiat de l'AEA est le N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine (NAPE), qui est synthétisé à partir de phospholipides par l'enzyme N-acyltransférase (NAT). Ensuite, le NAPE est converti en AEA par l'action de l'enzyme N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine-phospholipase D (NAPE-PLD) (35). Les voies de synthèse de l'AEA sont présentées à la Figure 1.1.

Étrangement, le développement d'une souris transgénique chez qui le gène codant pour cette enzyme a été inactivé ne démontre que très peu de changements dans la concentration en AEA (36). Plusieurs études soutiennent que la synthèse de l'AEA peut être accomplie par plusieurs voies. En effet, trois autres voies de synthèse ont été découvertes à ce jour. Deux de ces voies incluent respectivement les enzymes phospholipases A1/A2 et  $\alpha,\beta$ -hydrolase 4 (Abhd4) (37, 38). Une troisième voie implique l'hydrolyse du NAPE par l'enzyme phospholipase C, puis une déphosphorylation pour relâcher l'AEA (37, 39). Une autre étude a montré que l'élimination de l'enzyme Abhd4 seule ne causait que peu de changement dans les niveaux d'AEA. Par contre, l'élimination conjointe des enzymes NAPE-PLD et Abhd4 causait une baisse significative dans la concentration de l'AEA (40). En somme, les voies de synthèse de l'AEA ne sont pas encore totalement élucidées à ce jour.

Une fois l'AEA retirée de ses sites de liaison, elle est ensuite métabolisée principalement dans la cellule par les enzymes *Fatty Acid Amide Hydrolase* (FAAH) et cyclooxygénase-2 (COX-2) (35). La réaction chimique catalysée par l'enzyme FAAH est l'hydrolyse de l'AEA et les produits obtenus sont l'acide arachidonique et l'éthanolamide alors que le produit de la réaction catalysée par l'enzyme COX-2 est une variante de la prostaglandine E2 incorporant un groupement éthanolamide (41). L'enzyme FAAH est exprimée dans plusieurs organes, dont le cerveau et la rétine (42). Les mécanismes de dégradation de l'AEA sont détaillés à la Figure 1.1.

### **1.2.1.2- L'arachidonoylglycérol**

Le 2-AG se lie aussi bien au récepteur CB1 qu'au récepteur CB2. Les concentrations de 2-AG dans le cerveau sont entre 200 et 1000 fois plus importantes que celles de l'AEA (43). Le 2-AG est fortement exprimé dans le tronc cérébral, le striatum, dans le bulbe rachidien et dans l'hippocampe (44).

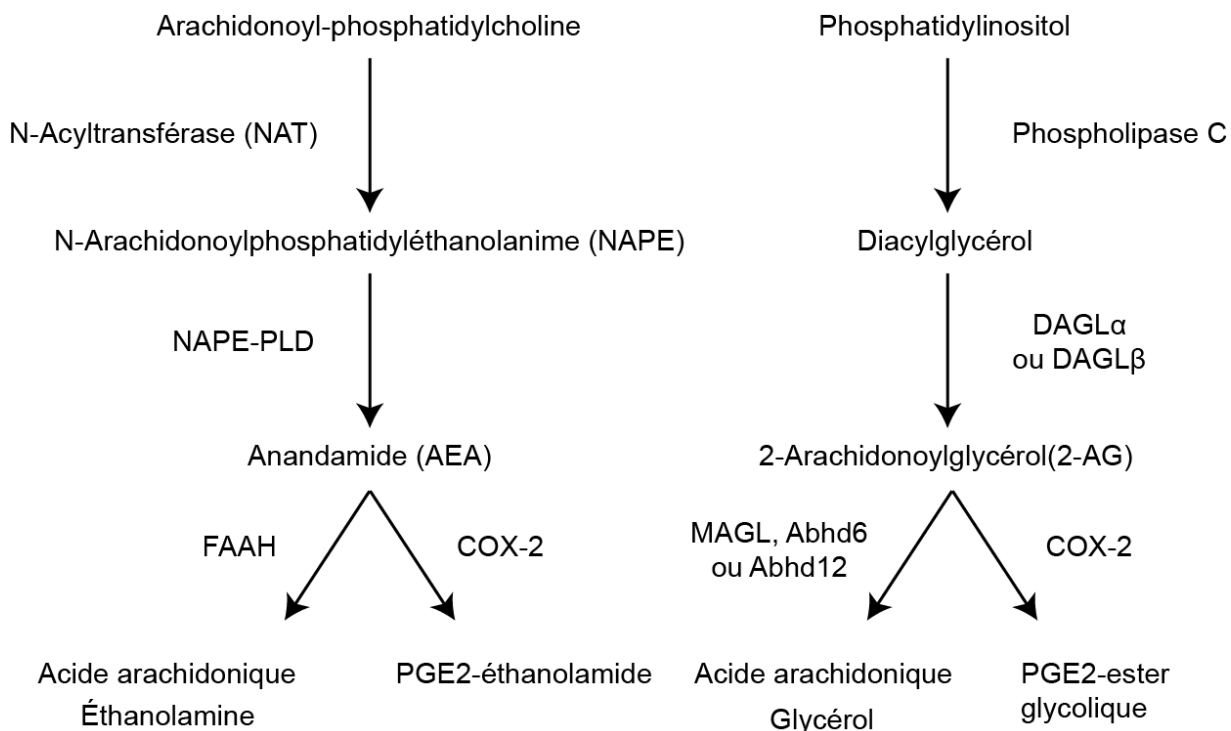
Étant donné que le 2-AG possède une courte demi-vie (45), la liaison du 2-AG aux récepteurs cannabinoïdes nécessite la présence rapprochée de son enzyme de synthèse. Ainsi, l'expression de cette enzyme est un bon indicateur de la localisation du 2-AG, de même que sa fonction. L'inhibition de la dégradation du 2-AG induit l'hypothermie, l'hypomotilité et l'analgésie (46).

Tout comme pour l'AEA, il existe plus d'une voie de synthèse du 2-AG. Ainsi, le 2-AG est synthétisé à partir de phospholipides membranaires contenant de l'acide arachidonique par l'enzyme phospholipase C. La molécule obtenue est le diacylglycérol (DAG). Celle-ci est par la suite hydrolysée par l'enzyme diacylglycérol lipase (DAGL) pour former le 2-AG (47). L'enzyme DAGL existe sous deux isoformes: DAGL $\alpha$  et DAGL $\beta$ . Deux modèles de souris transgéniques dont le gène codant pour l'enzyme DAGL $\alpha$  ou DAGL $\beta$  est inactif ont été développées (48, 49). Une baisse significative des niveaux de 2-AG a été observée chez ces deux lignées de souris. Celle-ci atteint 80% dans le cerveau et la moelle épinière de souris DAGL $\alpha^{-/-}$  et 50% dans le cerveau de souris DAGL $\beta^{-/-}$  (48). La différence la plus notable entre les souris DAGL $\alpha^{-/-}$  et DAGL $\beta^{-/-}$  est au niveau de la régulation de la transmission synaptique. Chez l'animal DAGL $\alpha^{-/-}$ , cette régulation est abolie tandis qu'elle est normale chez l'animal DAGL $\beta^{-/-}$  (48, 49). Les mécanismes de synthèse du 2-AG sont présentés à la Figure 1.1.

Tout comme l'AEA, le 2-AG est retiré de ses sites de liaison par recapture cellulaire, puis est métabolisé dans la cellule par l'enzyme monoacylglycérol lipase (MAGL) (35). Cette enzyme clive le 2-AG en acide arachidonique et en glycérol (30, 50). Approximativement 85% du métabolisme du 2-AG est attribuable à l'enzyme MAGL, tandis que le restant est partagé entre les enzymes  $\alpha,\beta$ -hydrolase 6 (Abhd6) et  $\alpha,\beta$ -hydrolase 12 (Abhd12) (51). La réaction catalysée par les enzymes Abhd6 et Abhd12 engendre les mêmes produits que celle provoquée par l'enzyme MAGL, soit de l'acide arachidonique et du glycérol. L'enzyme COX-2 est également en mesure de dégrader le 2-AG en prostaglandine E2 contenant de l'ester glycolique (52). Les voies de dégradation du 2-AG sont détaillées à la Figure 1.1.

L'enzyme MAGL est retrouvée dans tous les organes du rat (53). Sa distribution dans le cerveau du rat est hétérogène étant surtout exprimée dans les régions où le récepteur CB1 est abondant telles que l'hippocampe, le cortex et le cervelet (30). Curieusement, l'enzyme MAGL est exprimée sur les terminaux

présynaptiques (54) ce qui laisse suggérer un rôle dans la terminaison de la signalisation rétrograde sur les neurones présynaptiques (55).



**Figure 1.1** Métabolisme des eCBs

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

### 1.2.2- Les récepteurs cannabinoïdes

Le récepteur CB1 est le récepteur cannabinoïde le plus étudié dans le SNC puisque le récepteur CB2 a longtemps été catégorisé comme un récepteur « périphérique » (18). Cependant, de très nombreuses études ont montré que le récepteur CB2 joue également un rôle dans le SNC (56).

Étant donné que les récepteurs CB1 et CB2 sont les récepteurs cannabinoïdes qui sont les mieux caractérisés, cette thèse portera sur l'interaction de ces récepteurs sur le système visuel.

### **1.2.2.1- Voies de signalisation**

Les récepteurs CB1 et CB2 possèdent sept domaines transmembranaires et font partie de la famille des récepteurs liés à une protéine G (GPCR). Ils sont majoritairement couplés à une protéine  $G_{i/o}$ , mais peuvent être couplés à une protéine  $G_s$  et  $G_{q/11}$  dans certaines conditions. L'activation du récepteur CB1 engendre une inhibition de l'enzyme adénylate cyclase, une activation des enzymes *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK), l'inhibition de certains canaux calciques dépendant du voltage et de canaux potassiques à courant entrant liés à une protéine G (*G protein-coupled Inwardly-Rectifying Potassium channel* ou GIRK) (57). L'activation du récepteur CB2 engendre des effets similaires, à l'exception que la modulation des canaux ioniques est plus variable (57). Les voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes sont représentées à la Figure 1.2.

#### **1.2.2.1.1- Voie des kinases activées par des agents mitogènes**

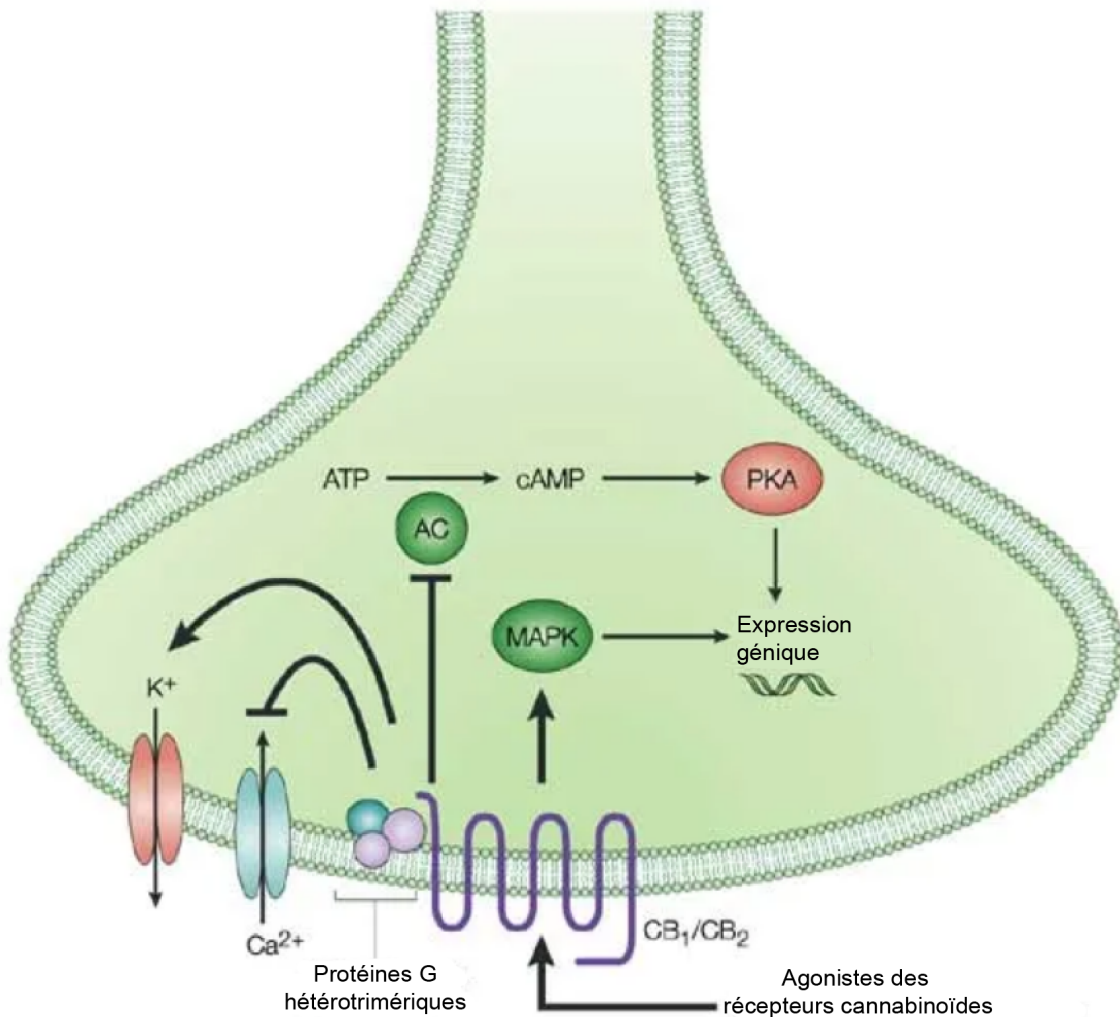
La voie de signalisation des MAPK est souvent activée après une stimulation des GPCRs. Elle est caractérisée par une cascade qui active une ou plusieurs protéines (Erk1/2, JNK, p38 ou Erk5) qui peuvent alors moduler l'expression de gènes immédiats. Par exemple, le  $\Delta^9$ -THC provoque dans l'hippocampe de souris l'expression de produits de gènes immédiats jouant un rôle important lors de la plasticité synaptique (58). La régulation de l'expression génique par l'activation des MAPKs est donc un mécanisme par lequel les cannabinoïdes modulent la plasticité synaptique.

#### **1.2.2.1.2- Voie de l'adénylate cyclase**

L'activation des récepteurs cannabinoïdes cause l'inhibition de l'adénylate cyclase, engendrant ainsi une diminution de la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), ce qui diminue l'activité de l'enzyme protéine kinase A (PKA) (59). La voie de l'adénylate cyclase est responsable de la régulation de plusieurs processus physiologiques tels que l'expression de gènes, la croissance cellulaire, la plasticité synaptique et l'activité de canaux ioniques.

### 1.2.2.1.3- Modulation de canaux ioniques

Les cannabinoïdes modulent l'activité des canaux calciques de type N et P/Q et les canaux potassiques Kir et A. Par exemple, l'activation des récepteurs cannabinoïdes cause un blocage des canaux calciques dépendant du voltage de type N et P/Q ce qui engendre une baisse de l'influx calcique dans la cellule (60, 61). L'activation des récepteurs cannabinoïdes entraîne également une augmentation du courant potassique entrant (61).



**Figure 1.2** Voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes

Ce schéma simplifié représente les voies de signalisation majoritairement associées à une activation des récepteurs cannabinoïdes. L'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> et la stimulation subséquente des protéines G<sub>i/o</sub> sont couplées à l'inhibition de



l'adénylate cyclase (AC) et à une inactivation correspondante de la phosphorylation de la PKA, ou à une stimulation de la voie des MAPKs. Figure modifiée d'après (62).

## **1.2.2.2- Distribution des récepteurs cannabinoïdes**

### **1.2.2.2.1- Distribution du récepteur CB1**

Le récepteur CB1 est majoritairement exprimé dans les systèmes nerveux central et périphérique, autant dans les cellules nerveuses que dans les cellules gliales (10, 63). Le récepteur CB1 est également présent dans les tissus périphériques tels que les poumons, les testicules, l'utérus, le système immunitaire, l'intestin, la vessie, et les cellules endothéliales (44); toutefois, le niveau d'expression y est beaucoup plus faible que dans le cerveau (64).

Les premières études portant sur la distribution du récepteur CB1 dans le SNC ont relevé une forte expression dans l'hippocampe, les couches profondes du bulbe olfactif, la partie latérale du striatum, le globus pallidus, la substance noire et la couche moléculaire du cervelet (9, 63). On dénote que l'expression du récepteur CB1 est uniforme dans le striatum, le thalamus, l'hypothalamus, le cervelet et la partie inférieure du tronc cérébral. Le récepteur CB1 est également exprimé dans certaines populations d'interneurones dans les aires somatosensorielles, motrices et visuelles primaires du cortex cérébral (65).

### **1.2.2.2.2- Distribution du récepteur CB2**

Le récepteur CB2 est exprimé essentiellement dans les cellules du système immunitaire, bien que son acide ribonucléique messenger (ARNm) ait été détecté dans d'autres tissus (66). Ainsi, le récepteur CB2 a été localisé dans la rate, le thymus, les amygdales, la moelle osseuse, le pancréas, les leucocytes sanguins ainsi que les macrophages spléniques (pour revue, voir Pertwee, Howlett (18)).

L'une des premières études à avoir décrit la présence du récepteur CB2 dans les neurones révélait qu'il était exprimé dans les cellules granulaires en culture, ainsi que dans les cellules granulaires et de Purkinje du cervelet (67). Depuis, plusieurs études ont révélé que le récepteur CB2 est présent en forte concentration dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, les tubercules olfactifs, le cortex cérébral, le

striatum, les noyaux thalamiques, l'amygdale, la substance noire, les colliculi inférieurs ainsi que la rétine, qui sera décrite de façon détaillée ultérieurement (68-72).

#### **1.2.2.2.3- Distribution des autres récepteurs liés aux cannabinoïdes**

Bien que les cannabinoïdes se lient majoritairement aux récepteurs CB1 et CB2, ils interagissent également à d'autres GPCRs et à des canaux ioniques. Parmi ces interactions figurent les récepteurs ionotropes TRP (*Transient Receptor Potential channels*), les récepteurs orphelins GPR55 et GPR18, plusieurs types de canaux potassiques et le récepteur ionotrope de type 5-HT3 (73).

##### **1.2.2.2.3.1- Le récepteur GPR55**

Le récepteur GPR55 est exprimé dans les organes périphériques comme la rate ainsi que dans certaines régions du cerveau telles que le thalamus, le cortex frontal, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet et la rétine (74-76). Le récepteur GPR55 n'est pas couplé aux protéines  $G_{i/o}$ , mais plutôt aux protéines  $G_{13}$  et par de petites protéines G monomériques de la famille Ras (74). Bien qu'il n'ait pas d'homologie structurelle avec les récepteurs CB1 et CB2, le récepteur GPR55 a des sites de liaison de forte affinité avec les cannabinoïdes. Il peut notamment être activé par des eCBs et des phytocannabinoïdes tels que le CBD (77). Étrangement, il est activé par un antagoniste du récepteur CB1, l'AM251. Le rôle du récepteur GPR55 est peu compris à ce jour. Des souris transgéniques ayant une délétion ciblée du gène codant pour le récepteur GPR55 ne montrent pas de phénotype spécifique (78).

##### **1.2.2.2.3.2- Les récepteurs TRP**

Plusieurs composés cannabinoïdes activent des récepteurs ionotropes de la famille des TRP, dont les récepteurs TRPV1 (principalement), TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 et TRPA1 (79). Cette famille de récepteurs ionotropiques est connue pour être activée par des molécules de la famille des vanilloïdes telles que la capsaïcine présente dans le piment. Par contre, plusieurs cannabinoïdes peuvent aussi s'y lier. L'AEA peut notamment agir en tant qu'agoniste sur le récepteur TRPV1,

mais pas le 2-AG et certains cannabinoïdes synthétiques (80). La distribution du récepteur TRPV1 est quant à elle sujette à débat. Une étude utilisant un traceur précis pour localiser TRPV1, soit une souris possédant un gène rapporteur pour TRPV1, a permis d'observer une faible expression générale dans le cerveau, avec les plus hauts niveaux d'expression dans l'hypothalamus (81). D'autres études utilisant des techniques moins précises ont relevé l'expression de TRPV1 dans d'autres régions; pour revue, voir (82).

### **1.2.3- Les fonctions physiologiques du système endocannabinoïde**

Comme les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 ont une vaste distribution dans le SNC et ailleurs dans l'organisme, leur activation affecte donc un grand nombre de fonctions physiologiques. L'une des propriétés fondamentales des récepteurs cannabinoïdes est la diminution de la transmission synaptique (42). Les récepteurs cannabinoïdes sont connus pour affecter des neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), la glycine, l'acétylcholine, l'adrénaline, la dopamine, la sérotonine et la cholécystokinine (42).

Le système eCB est également impliqué dans une foule d'autres activités et désordres du SNC tels que l'appétit, l'apprentissage, la mémoire, l'anxiété, la dépression, la schizophrénie, la neuro-dégénération, l'épilepsie et la dépendance (42, 83). Par exemple, bien qu'ils soient relativement peu exprimés dans l'hypothalamus, les récepteurs CB1 sont connus pour stimuler l'appétit (84). Similairement, les niveaux hypothalamiques en eCBs sont augmentés pendant un jeûne et retournent à la normale suite à la consommation de nourriture (85). Le rimonabant, un agoniste inverse des récepteurs CB1, présentait un remarquable potentiel pour le contrôle de l'appétit dans un traitement anti-obésité, mais des effets psychoactifs indésirables ayant notamment entraîné plusieurs suicides ont mené à son retrait du marché (86).

Il a entre autres été démontré que les récepteurs CB1 ont un effet neuro-protecteur contre l'excitotoxicité engendrée par divers stimuli (87). Par exemple, certaines maladies neuro-dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de

Parkinson et d'Huntington sont associées à une plus grande expression des récepteurs CB1 (83).

### **1.2.3.1- Rôle des endocannabinoïdes dans la signalisation rétrograde**

La présence des récepteurs cannabinoïdes au niveau des éléments présynaptiques des neurones excitateurs et inhibiteurs leur permet de détecter les eCBs libérés par les neurones postsynaptiques. L'activation rétrograde des récepteurs cannabinoïdes leur permet de diminuer l'activité des canaux calciques et potassiques et donc la relâche synaptique. L'une des conséquences de l'activation des récepteurs CB1 et CB2 est une diminution de la relâche synaptique au niveau des neurones inhibiteurs et excitateurs qui les expriment (88). Ainsi, les effets produits suite à l'activation des récepteurs cannabinoïdes dépendent de l'endroit où ils sont exprimés sur le neurone. Si les récepteurs sont situés du côté présynaptique et qu'ils inhibent la formation de GABA, le résultat net sera un effet excitateur. À l'inverse, si les récepteurs sont situés au niveau postsynaptique sur une synapse glutamatergique, alors ils produiront un effet inhibiteur (89). Cette fonction a été rapportée dans plusieurs régions du SNC dont le néocortex, l'hippocampe, le cervelet, les ganglions de la base et la rétine (42).

### **1.2.3.2- Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité synaptique à court terme**

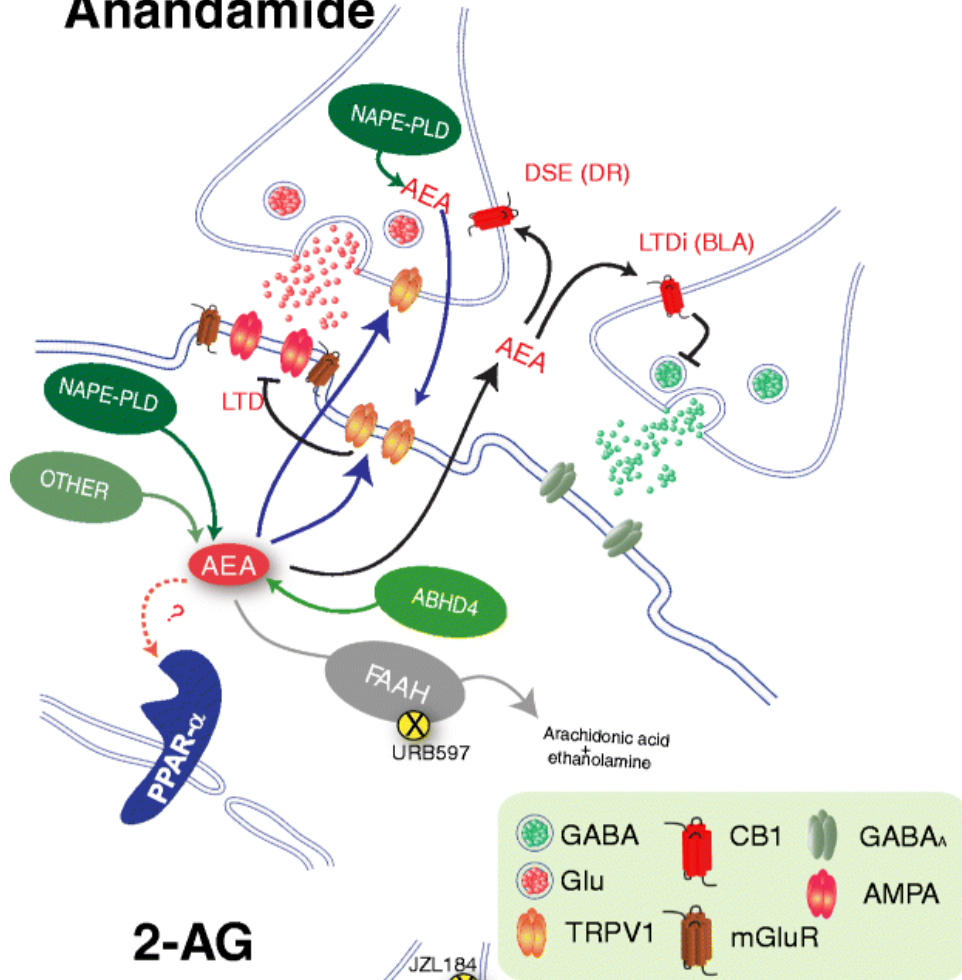
La libération d'eCBs induit généralement une diminution de courte durée de la relâche de neurotransmetteurs. Il s'agit d'une forme de plasticité synaptique à court terme appelée suppression de l'inhibition induite par une dépolarisation ou DSI (*depolarization-induced suppression of inhibition*). Ce phénomène est caractérisé par une forte dépolarisation d'un neurone postsynaptique qui provoque la libération de signaux agissant sur les récepteurs CB1 présynaptiques et inhibe ainsi la libération de GABA de manière temporaire. Un phénomène similaire a été observé dans la transmission synaptique glutamatergique dans les cellules de Purkinje, démontrant que les eCBs étaient impliqués dans le phénomène de suppression de l'excitation induite par une dépolarisation ou DSE (*depolarization-induced suppression of*

*excitation*) (26, 90). Plusieurs études ont montré que le 2-AG, mais pas l'AEA, est le principal eCB impliqué au niveau de la régulation de la plasticité synaptique induite par l'activation des récepteurs cannabinoïdes (91). Les mécanismes de la modulation de la plasticité synaptique à court terme sont schématisés à la Figure 1.3.

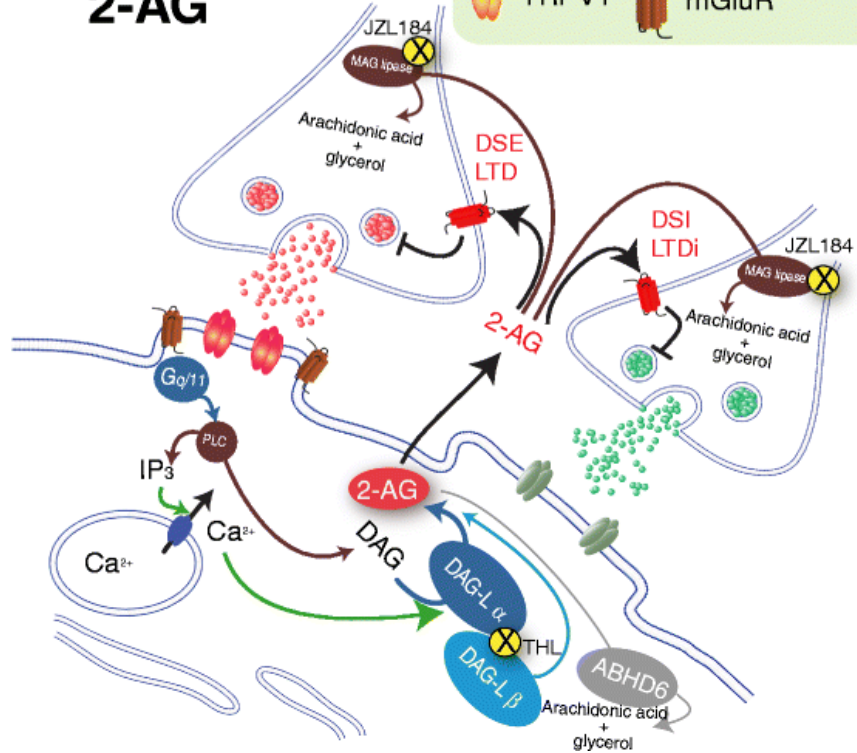
### **1.2.3.3- Rôle des endocannabinoïdes dans la plasticité à long terme**

Les eCBs induisent également des modifications au niveau de la transmission synaptique à long terme, celle-ci prenant la forme d'une dépression à long terme (DLT). Ce phénomène peut être induit dans plusieurs régions du cerveau, autant au niveau des terminaisons glutamatergiques que GABAergiques (92). L'induction de la DLT requiert la présence et l'activation des récepteurs CB1, mais aussi celle des récepteurs D2 de la dopamine (93, 94).

# Anandamide



# 2-AG

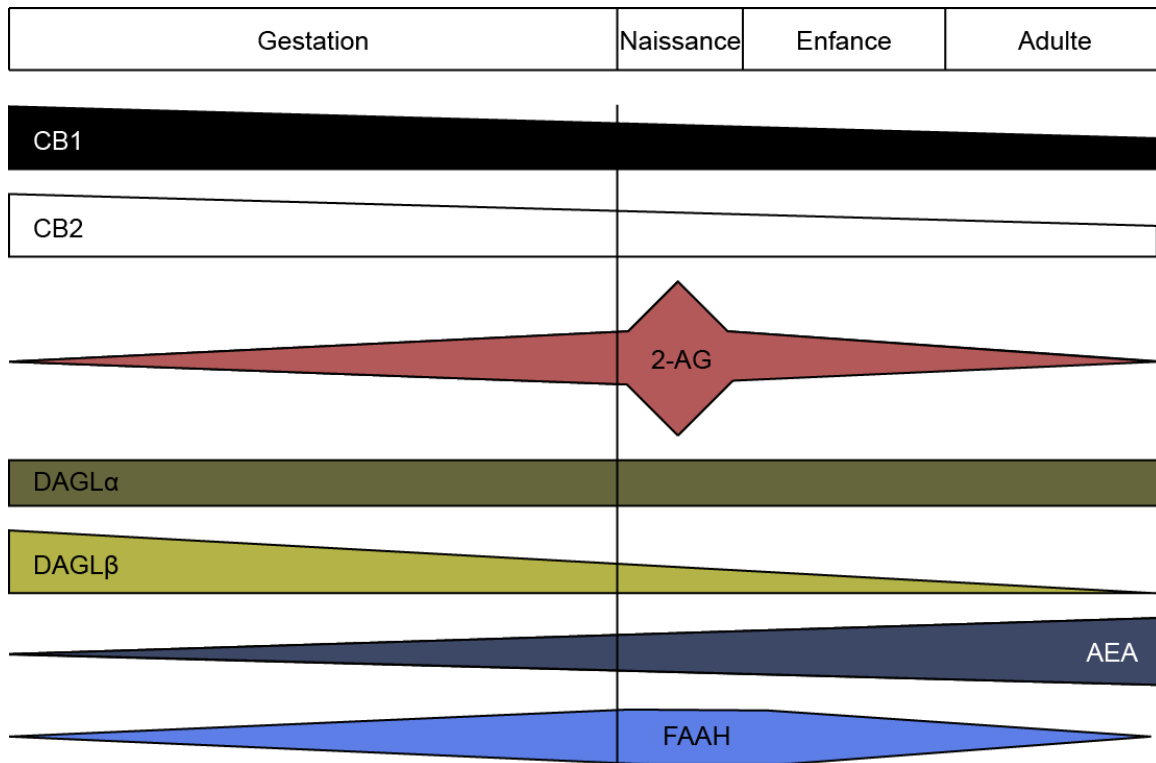


**Figure 1.3** Mécanismes de la plasticité à court et à long terme liée aux endocannabinoïdes

Les eCBs sont produits sur demande au niveau postsynaptique suite à une dépolarisation de la membrane neuronale suivant une entrée de calcium. Ils sont relâchés dans la fente synaptique et activent des récepteurs CB1 présynaptiques. LTD: *long-term depression*. Figure tirée de (23).

#### **1.2.4- Le système endocannabinoïde et le développement**

Le rôle des eCBs comme modulateurs de la transmission synaptique et de la plasticité neuronale est bien établi. Ce système de neuromodulation affecte également plusieurs processus développementaux. L'expression et l'activité de certains éléments du système eCB bien avant l'âge adulte ont poussé les chercheurs à étudier le rôle de ce système dans le développement du SNC. Bien que certains aspects de ce rôle soient encore méconnus, plusieurs fonctions développementales semblent déjà émerger. Les eCBs et leurs récepteurs sont grandement exprimés durant le développement du SNC. Pendant la période foetale, l'AEA est exprimée, mais sa concentration est 1000 fois inférieure à celle du 2-AG (95). De plus, le patron d'expression temporel de ces deux eCBs est très différent: alors que la concentration de l'AEA augmente progressivement jusqu'à l'âge adulte, le niveau de 2-AG augmente graduellement durant la période foetale, culmine immédiatement après la naissance et se stabilise au cours du développement postnatal (96, 97). Cette différence d'expression entre les deux eCBs laisse penser que le 2-AG pourrait jouer un rôle plus important que l'AEA au cours du développement du SNC. L'expression développementale de plusieurs composantes du système eCB est exposée à la Figure 1.4.



**Figure 1.4** Expression temporelle de composantes du système endocannabinoïde au cours du développement du système nerveux central.

Les changements temporels de l'expression des constituants du système eCB sont illustrés à différents stades développementaux. Les niveaux de récepteurs CB1 sont substantiellement plus élevés chez le fœtus que chez l'adulte. Les niveaux de 2-AG (nmol/g) excèdent ceux d'AEA (pmol/g) dans le cerveau en développement. Les niveaux de 2-AG atteignent un sommet juste après la naissance. Les deux isoformes de l'enzyme DAGL sont exprimées au cours du développement et chez l'adulte dans le SNC. L'expression de l'enzyme DAGL $\alpha$  est constante au cours du développement du cerveau, tandis que l'enzyme DAGL $\beta$  est plus fortement exprimée au cours du développement embryonnaire. L'expression de FAAH est à son apogée au début du développement postnatal et diminue progressivement par la suite, ce qui correspond avec l'augmentation de l'AEA au même stade (schéma modifié de (98)).



#### **1.2.4.1- Expression et rôles du système endocannabinoïde au cours du développement**

L'expression de plusieurs composantes du système eCB a été démontrée dans le cerveau de fœtus et de rats nouveau-nés (95). Le système eCB subit des changements significatifs dans l'expression et l'activité de ses composantes au cours des différentes phases développementales.

L'expression développementale du récepteur CB1 a d'abord été étudiée à l'aide de l'hybridation *in situ*. Cette technique à faible résolution a révélé que l'ARNm du récepteur CB1 est présent chez le rat dès le 14<sup>e</sup> jour gestationnel dans plusieurs régions du cerveau en développement telles que le néocortex, le bulbe olfactif, le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe, le colliculus supérieur, le cervelet, le pont de Varole et la moelle épinière (99). Le début de l'expression du récepteur CB1 à ce moment coïncide avec l'expression phénotypique de la plupart des neurotransmetteurs. Les niveaux de récepteurs CB1 sont substantiellement plus élevés chez le fœtus que chez le rat adulte (96). Le récepteur CB1 est également davantage exprimé dans le cerveau humain en développement que chez l'adulte, démontrant ainsi la forte implication du système eCB pendant le développement (100).

Des études anatomiques ont montré la localisation cellulaire précise du récepteur CB1, qui est exprimé dans les axones et les cônes de croissance d'une grande variété de neurones dans le cerveau en développement (101-103). Les enzymes NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , Abhd4, FAAH, de même que les récepteurs CB1 et certains eCBs sont de plus en plus exprimés au cours du développement (104, 105). D'autres études ont montré que les enzymes DAGL $\alpha$  et DAGL $\beta$  sont exprimées dans les mêmes axones et les mêmes cônes de croissance que le récepteur CB1 (47, 101). Enfin, les enzymes DAGL $\alpha$  et DAGL $\beta$  sont surtout exprimées sur les axones en croissance de neurones pyramidaux au cours du développement (102) tandis qu'elles sont présentes sur les dendrites chez l'adulte (106). Ces résultats indiquent que le rôle du système eCB pourrait être différent au cours du développement par rapport à l'animal adulte.

Étant donné que les cannabinoïdes sont en mesure de traverser la barrière hémato-placentaire et qu'ils sont sécrétés dans le lait maternel, la probabilité qu'ils atteignent le système nerveux foetal est élevée (107). De nombreuses études ont montré qu'une exposition périnatale aux cannabinoïdes synthétiques ou d'origine végétale peut agir de manière délétère sur le développement du cerveau. Ceux-ci modifient la maturation des systèmes de neurotransmission et leurs comportements associés (95, 108-110).

De plus en plus d'études montrent que l'exposition aux cannabinoïdes au cours des périodes critiques de la maturation du cerveau affecte le développement de plusieurs systèmes de neurotransmission (111). En particulier, plusieurs études ont mis en évidence les effets des cannabinoïdes sur la maturation des systèmes catécholaminergique (112), sérotonergique (113, 114), glutamatergique (115) et opioïdurgique (116).

Une étude montre également que l'absence de l'enzyme DAGL $\alpha$  chez le poisson-zèbre cause des anomalies dans la croissance axonale (104). Ces aberrations axonales sont moins sévères lorsqu'un analogue du 2-AG est ajouté, démontrant l'effet bénéfique et essentiel des eCBs au cours du développement.

### **1.3- Le système visuel**

L'étude des voies visuelles est un bon modèle pour étudier la connectivité entre plusieurs structures cérébrales. La rétine est la porte d'entrée de l'information visuelle. Elle consiste en un empilement de trois couches cellulaires; l'une d'elles contient les photorécepteurs, des cellules sensibles à la lumière. La lumière est convertie par ces photorécepteurs en signal électrique qui est transmis jusqu'aux cellules ganglionnaires, qui elles projettent vers le cerveau. Les axones des cellules ganglionnaires quittent la rétine par le nerf optique, croisent ou non au niveau du chiasme optique (selon l'espèce, plus de détails à la section 1.3.3) avant d'atteindre leurs cibles primaires: le corps genouillé latéral (CGL) et le colliculus supérieur (CS). Le CGL est un noyau qui effectue une analyse de bas niveau de l'information visuelle avant de la transférer au cortex visuel primaire. Le CS, quant à lui, est une structure

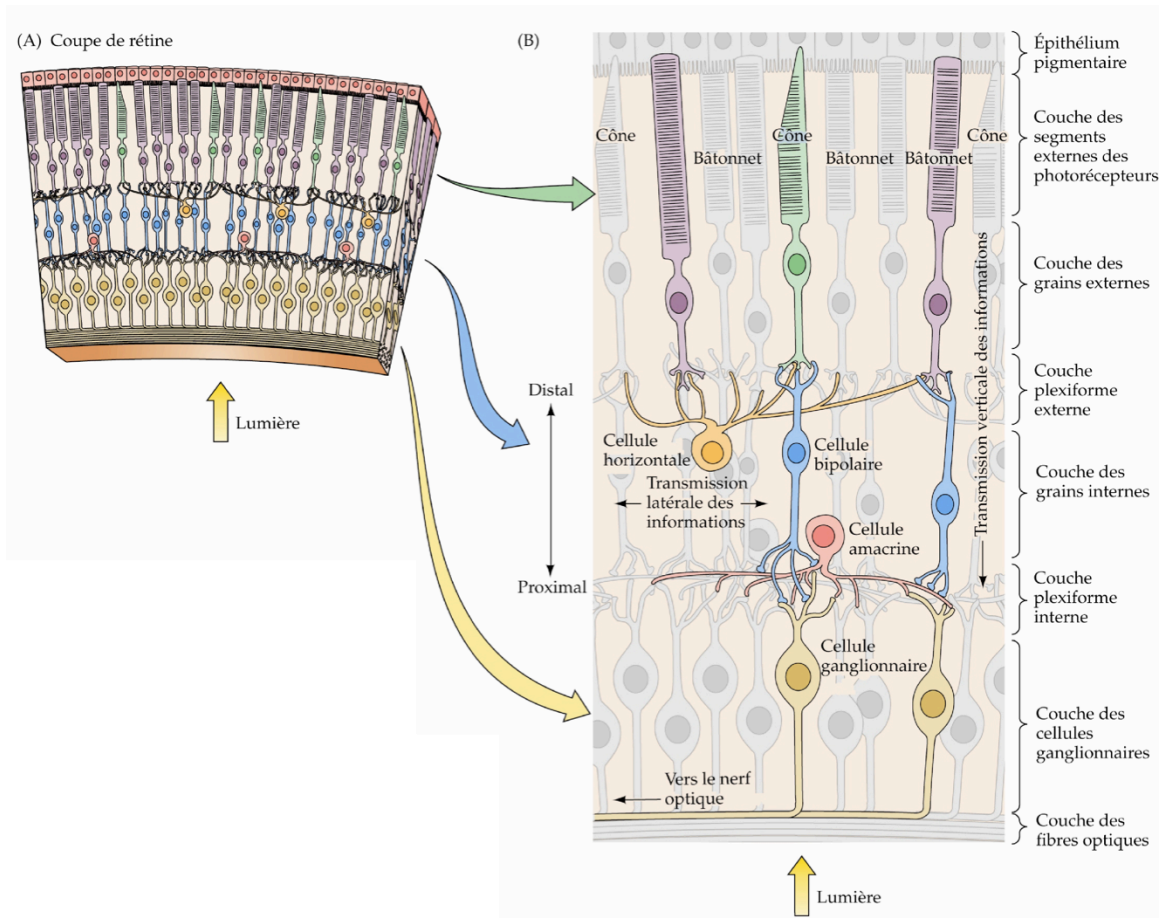
multimodale qui se caractérise par une très grande sensibilité au mouvement et qui est impliquée dans le contrôle visuomoteur (117). Le cortex visuel primaire (V1) est la première aire corticale à recueillir l'information visuelle; elle reçoit les afférences du CGL. Le signal visuel passe de couche en couche dans des neurones connectés par des synapses et atteint ensuite les aires visuelles voisines, qui transmettent à leur tour des informations à plusieurs autres aires corticales. Étant donné que l'organisation est différente entre plusieurs espèces animales, notamment entre l'humain et les rongeurs, cette section se concentrera sur le système visuel des rongeurs tels que le rat et la souris puisqu'ils ont été les modèles utilisés pour cette thèse.

### **1.3.1- La rétine**

La rétine est une mince membrane tapissant le fond de l'œil qui contient des cellules permettant de capter les rayons lumineux et de les transformer en influx nerveux. La rétine est un modèle facilement accessible pour l'étude de la neurotransmission, tant chez l'animal adulte que pendant le développement neuronal. Cette structure possède l'avantage de contenir six types de cellules neuronales et un type de cellules gliales, organisées en trois couches cellulaires et deux couches synaptiques.

#### **1.3.1.1- Anatomie de la rétine**

La rétine est une structure constituée de trois couches nucléaires et deux couches synaptiques. Il s'agit d'une part, des couches nucléaires interne et externe (INL, ONL) et de la couche des cellules ganglionnaires (GCL) et d'autre part, des couches plexiformes interne et externe (IPL, OPL). Les sept types cellulaires se répartissent dans ces couches selon le même schéma chez différentes espèces animales. La structure de la rétine est présentée à la Figure 1.5.



**Figure 1.5** Structure de la rétine

A) Une section de la rétine montre l'arrangement des couches cellulaires et synaptiques. B) Diagramme de la circuiterie de la rétine. Une chaîne de trois neurones (photorécepteur – cellule bipolaire – cellule ganglionnaire) est la voie directe pour transmettre l'information visuelle au cerveau. Les cellules horizontales et amacrines relaient les interactions latérales dans les couches plexiformes externe et interne, respectivement. Les cellules ganglionnaires envoient l'information visuelle par leurs axones, qui composent le nerf optique (image tirée de Purves, Augustine (118)).

### 1.3.1.1.1- Les photorécepteurs

Les photorécepteurs constituent la porte d'entrée de l'information visuelle. Ils sont formés de deux types de cellules spécialisées dont le rôle est de transformer l'influx lumineux en influx électrique, soit les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets

sont dédiés à la vision dans des conditions de faible luminosité et ils sont très sensibles. Les cônes sont responsables de la vision de jour, ils sont beaucoup moins sensibles que les bâtonnets, mais présentent une meilleure résolution spatiale et temporelle. Les photorécepteurs sont très actifs d'un point de vue métabolique puisqu'ils consomment de trois à quatre fois plus d'oxygène que les neurones moyens du CNS (119).

Les deux types de photorécepteurs possèdent des structures morphologiques relativement similaires. Tous deux sont formés de quatre compartiments fonctionnels: le segment externe, le segment interne, le corps cellulaire et la terminaison synaptique. Le segment externe est composé d'un empilement de disques qui contiennent une très grande concentration de pigments visuels. Chez les rongeurs, ces pigments sont la rhodopsine pour les bâtonnets, ainsi que les opsines M (*medium wavelength*; longueur d'onde moyenne) et S (*short wavelength*; longueur d'onde courte) pour les cônes. Le segment interne est composé du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Le corps cellulaire contient essentiellement le noyau de la cellule. La terminaison synaptique est la structure responsable de la transmission de l'influx nerveux aux neurones de second ordre: les cellules bipolaires et horizontales (120).

#### 1.3.1.1.1- Les cônes

Les cônes sont environ 1000 fois moins sensibles à la lumière que les bâtonnets, mais leur réponse est beaucoup plus rapide (121, 122). Tout comme les bâtonnets, les cônes génèrent un courant d'obscurité passant du segment interne vers le segment externe. Les cônes sont dépolarisés en conditions d'obscurité par l'entrée de sodium via les canaux ioniques des segments externes et sécrètent en conséquence du glutamate vers les cellules bipolaires (123).

Deux cellules bipolaires sont associées à chaque cône: une ON et une OFF. Les cellules bipolaires ON forment le départ de la voie visuelle ON, qui fournit de l'information concernant les stimuli plus clairs que l'arrière-plan. À l'inverse, la voie OFF permet la détection d'images foncées sur un arrière-plan clair. Les cellules bipolaires ON fonctionnent de la même manière avec les cônes qu'avec les

bâtonnets: elles sont hyperpolarisées en présence de glutamate, soit en obscurité. Les cellules bipolaires OFF sont dépolarisées en présence de glutamate, indiquant ainsi l'absence de lumière. Ainsi, les cellules OFF sont hyperpolarisées et les ON sont dépolarisées en présence de lumière. À l'inverse, ces mêmes cellules sont respectivement dépolarisées et hyperpolarisées en conditions d'obscurité.

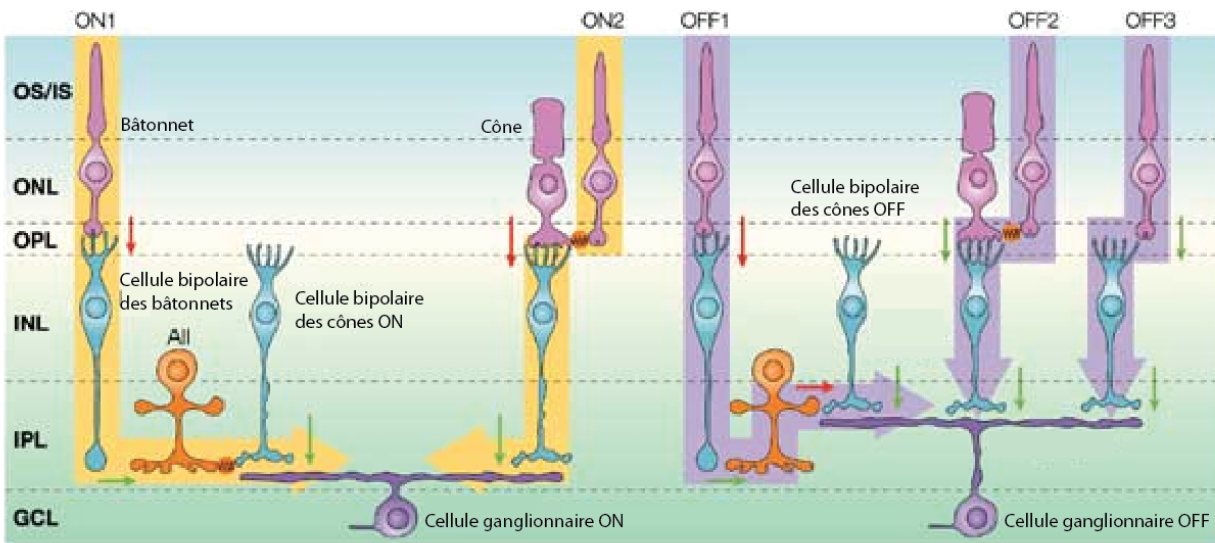
#### 1.3.1.1.1.2- Les bâtonnets

En obscurité, les bâtonnets génèrent un courant électrique, nommé courant d'obscurité. La cellule maintient cette charge en raison de l'entrée incessante de sodium par les canaux ioniques situés dans le segment externe à l'aide de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui est continuellement produite. L'entrée de sodium est équilibrée par la sortie de potassium au niveau du segment interne, ce qui crée le courant d'obscurité. Les bâtonnets sont connectés aux cellules bipolaires de type ON. En conditions d'obscurité, les bâtonnets sont dépolarisés et libèrent du glutamate vers les cellules bipolaires, provoquant l'hyperpolarisation de ces dernières (124).

La capture d'un photon cause la suppression locale du courant d'obscurité dans le segment externe par la fermeture de canaux ioniques. Les photons sont captés par la rhodopsine, ce qui cause son activation. La rhodopsine activée stimule ensuite plusieurs centaines de molécules de transducine, une protéine G de la membrane du disque qui active à son tour des centaines de molécules de phosphodiesterase, une enzyme qui clive le GMPc, provoquant la fermeture des canaux sodiques. La fermeture de ces canaux empêche l'entrée de sodium dans la cellule et provoque une hyperpolarisation du bâtonnet et une diminution de la libération de glutamate. La diminution du glutamate provoque alors une dépolarisation d'une cellule bipolaire ON et ainsi d'une cellule amacrine AII, une classe de cellules amacrines formant un lien permettant le passage de l'information visuelle aux cellules ganglionnaires en condition de faible luminosité. Cette cellule amacrine AII se connecte ensuite aux cellules bipolaires ON et OFF des cônes afin de supprimer la cellule ganglionnaire OFF et activer la cellule ganglionnaire ON. L'arrêt de la phototransduction se fait par la phosphorylation de la rhodopsine qui

provoque l'arrêt des mécanismes en cours, ce qui favorise la production de GMPc et ainsi la réouverture des canaux ioniques (124).

Contrairement aux cônes, les bâtonnets transmettent leur signal exclusivement par un mécanisme ON. Ainsi, ils font synapse avec les cellules bipolaires ON qui elles, se connectent aux cellules amacrines AII. Celles-ci intègrent l'information de plusieurs cellules bipolaires liées aux bâtonnets et la transfèrent aux terminaux des cellules bipolaires liées aux cônes ON et OFF respectivement grâce à des synapses électriques et chimiques. Enfin, les cellules bipolaires liées aux cônes transfèrent l'information visuelle aux cellules ganglionnaires ON et OFF (voir pour revue Wässle (125)). La transmission du signal des bâtonnets est décrite à la Figure 1.6.



**Figure 1.6** La transmission du signal des bâtonnets dans la rétine

Les chemins « traditionnels » de la transmission du signal sont ON1 et OFF1. Dans la voie ON1, les bâtonnets sont hyperpolarisés par la lumière et transfèrent leurs signaux aux dendrites des cellules bipolaires des bâtonnets. Étant donné que les cellules bipolaires des bâtonnets expriment le récepteur glutamatergique mGluR6, le signal est inversé à la synapse (flèche rouge), ce qui cause la dépolarisation de ces cellules. Elles transfèrent le signal par une synapse glutamatergique (flèche verte) aux cellules amacrines All. Celles-ci font des jonctions communicantes (*gap junctions*) avec les axones des cellules bipolaires des cônes, qui elles-mêmes font synapse (flèche verte) avec les cellules ganglionnaires ON. Dans la voie OFF1, la portion allant des bâtonnets aux cellules amacrines All est identique à la voie ON1. Les cellules All des synapses glycinergiques inverses (flèche rouge) avec les axones des cellules bipolaires des cônes OFF, qui elles-mêmes font synapse (flèche verte) avec les cellules ganglionnaires OFF. Dans la voie ON2, le signal des bâtonnets est transmis au pédicule des cônes et suit ensuite la voie des cônes jusqu'aux cellules ganglionnaires ON. La voie OFF2 est similaire à la voie ON2, avec la seule différence qu'elle passe par les cellules ganglionnaires OFF. Dans la voie OFF3, les cellules bipolaires des cônes OFF font synapse directement avec les sphérules des bâtonnets et transfèrent le signal directement aux cellules ganglionnaires OFF (figure tirée de Wässle (125)).

**1.3.1.1.2- Les cellules bipolaires**

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

Si l'on compare les cellules bipolaires par leur fonction, on dénote deux groupes distincts: les cellules bipolaires ON et les OFF (126). Ces deux groupes de cellules répondent différemment à la lumière: les ON se dépolarisent alors que les OFF s'hyperpolarisent, créant ainsi des canaux parallèles de transfert d'information. Cette différence existe en raison de la présence de deux types de récepteurs glutamatergiques dans les dendrites des cellules bipolaires. Le glutamate



hyperpolarise les cellules bipolaires ON par les récepteurs métabotropiques mGluR6 (127, 128) tandis qu'il dépolarise les cellules bipolaires OFF par les récepteurs ionotropiques AMPA/kaïnate (129). Les synapses des cellules bipolaires se stratifient à différents niveaux dans l'IPL: les OFF dans la strate a (la moitié supérieure de l'IPL) et les ON dans la strate b (la moitié inférieure de l'IPL).

Si l'on compare les cellules bipolaires par leur cellule présynaptique, on compte deux groupes: les cellules bipolaires liées aux bâtonnets et celles associées aux cônes (130). En utilisant des critères morphologiques, on dénombre entre dix et douze types de cellules bipolaires selon les espèces animales (131, 132). Bien que les cônes soient beaucoup moins nombreux que les bâtonnets, la quasi-totalité des cellules bipolaires leur sont associées (11 types sur 12). Ceci est explicable par la grande sensibilité à la lumière de la voie des bâtonnets. Il existe une convergence de plusieurs bâtonnets pour une seule cellule bipolaire liée aux bâtonnets ainsi que de plusieurs cellules bipolaires ON pour une cellule amacrine AII, augmentant encore la force du signal par convergence. Par ce mécanisme, la sensibilité d'une cellule bipolaire liée aux bâtonnets peut être jusqu'à vingt fois supérieure à celle d'un bâtonnet. À l'inverse, chaque cône fait synapse avec une cellule bipolaire liée aux cônes de chaque sous-type, formant ainsi des canaux parallèles de transmission et d'intégration de l'information (125).

#### **1.3.1.1.3- Les cellules ganglionnaires**

Les cellules ganglionnaires reçoivent l'information des cellules bipolaires et de certaines cellules amacrines. Comme les cellules bipolaires, elles ont des propriétés ON et OFF. Ainsi, les cellules bipolaires ON font synapse avec les cellules ganglionnaires à centre ON tandis que les cellules bipolaires OFF se connectent aux cellules ganglionnaires à centre OFF. Elles sont responsables de la transmission de l'information visuelle aux structures sous-corticales, dont le CGL et le CS. Les cellules ganglionnaires varient en termes de taille, de connectivité et de réponses à une stimulation visuelle. Selon les critères morphologiques, il existe entre 15 et 22 types de cellules ganglionnaires (133). Les cellules ganglionnaires sont responsables de la détection du mouvement, de fins détails et de la couleur (134). Une famille de

cellules ganglionnaires photosensibles représente 2,5% de toutes les cellules ganglionnaires. Celles-ci expriment le photopigment mélanopsine et sont notamment impliquées dans la stimulation de l'horloge biologique située dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) et les changements pupillaires (135). Les axones des cellules ganglionnaires, qui forment le nerf optique, projettent dans deux régions sous-corticales majeures chez la souris: le CS et le CGL.

#### **1.3.1.1.4- Les cellules horizontales**

Il existe deux classes d'interneurones inhibiteurs rétiniens: les cellules horizontales et amacrines. Les cellules horizontales sont situées en dessous de l'OPL, leurs dendrites s'étendant latéralement dans la couche synaptique de sorte que chaque cellule horizontale reçoive des afférences de plusieurs cônes. Elles modulent le transfert de l'information entre les cônes et les cellules bipolaires en agissant au niveau du pédicule du cône et des dendrites des cellules bipolaires. Les cellules horizontales jouent un rôle important dans l'adaptation rétinienne à la lumière, car grâce à leur rétroaction elles modulent la sensibilité des cônes et contribuent à la formation des champs récepteurs des cellules bipolaires et ganglionnaires (136, 137).

#### **1.3.1.1.5- Les cellules amacrines**

Les cellules amacrines modulent le transfert de l'information entre les cellules bipolaires et ganglionnaires en agissant sur les terminaisons synaptiques des cellules bipolaires et les dendrites des ganglionnaires. Elles forment une population hétérogène jouant un rôle important dans l'analyse visuelle de la rétine interne en modulant les paramètres spatiaux et temporels du transfert de l'information visuelle (138). Les cellules amacrines occupent la moitié la plus profonde de l'INL, mais elles peuvent également se retrouver dans la couche des cellules ganglionnaires, elles sont alors appelées cellules amacrines déplacées.

#### **1.3.1.1.6- Les cellules gliales de la rétine**

En plus de contenir de la microglie, la rétine possède deux types de macroglie: les astrocytes et les cellules de Müller. Les astrocytes sont produits dans le cerveau et migrent à travers le nerf optique dans la couche des fibres des cellules ganglionnaires (139). Les cellules de Müller sont produites à partir des cellules progénitrices de la rétine et s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine. Ces cellules sont d'une grande utilité, car, en raison de leur contact avec la totalité des types de neurones rétinien, elles sont en mesure d'interagir avec tous les types cellulaires de la rétine. Elles fournissent notamment un soutien trophique aux neurones rétinien en plus d'être responsables de l'élimination des déchets métaboliques de la rétine. Les cellules de Müller sont les plus importantes cellules gliales de la rétine, car elles forment des éléments essentiels pour la défense immunitaire. Ces cellules jouent également un rôle homéostatique, car elles contrôlent la concentration des ions potassiques qui sont relâchés massivement dans le milieu extracellulaire par les neurones (140).

#### **1.3.1.1.7- La transmission du signal des cônes**

Tout comme les bâtonnets, les cônes répondent à la lumière par une hyperpolarisation graduée et une diminution de la relâche glutamatergique au niveau de leur pédicule. Le pédicule est en contact avec huit types de cellules bipolaires liées aux cônes et avec les cellules horizontales. Les cellules horizontales et bipolaires OFF sont hyperpolarisées par la lumière alors que les cellules bipolaires ON sont dépolarisées. Les chemins de signalisation constitués par les cellules bipolaires sont donc regroupés en deux groupes: ON et OFF. Les cellules ON répondent à une augmentation de la lumière et font synapse avec les cellules ganglionnaires ON dans la partie inférieure de l'IPL. Les cellules bipolaires OFF réagissent à une diminution lumineuse et font synapse avec les cellules ganglionnaires OFF dans la partie supérieure de l'IPL (voir pour revue Wässle (125)).

### **1.3.2- Aires visuelles cérébrales**

Lorsque les axones du nerf optique atteignent le cerveau, la majorité d'entre eux croisent au niveau du chiasme optique. La proportion d'axones croisant varie selon les espèces et est plus grande chez les animaux dont les yeux sont orientés latéralement, comme la souris. Près de 97% des axones croisent de manière contralatérale chez la souris, alors que 60% le font chez l'humain (118, 141). Ainsi, le champ visuel binoculaire est étroit chez la souris et plus large chez l'humain. Le fait d'avoir les yeux orientés de manière frontale permet une meilleure perception visuelle de la profondeur, ce qui est utile pour des espèces prédatrices devant localiser une proie et l'attraper du premier coup. À l'inverse, les animaux dont les yeux sont orientés latéralement possèdent des champs visuels plus larges, permettant d'être l'affût d'un prédateur (pour revue, voir (142)).

Les axones formant le nerf optique ciblent principalement quelques régions du cerveau: le CGL situé dans le thalamus, le CS localisé dans le mésencéphale, les NSC au niveau de l'hypothalamus et l'aire prétectale située entre le thalamus et le mésencéphale (118). Le CGL est une station relais où les signaux visuels sont acheminés à l'aire V1 via le tractus optique. Le CS est responsable de coordonner le mouvement de la tête et des yeux suite à des stimuli sensoriels. Les NSC sont responsables de la réponse circadienne à la lumière et l'aire prétectale est principalement responsable du réflexe pupillaire à la lumière.

#### **1.3.2.1- Le corps genouillé latéral**

Le CGL est une structure située dans le thalamus dont la fonction est d'une grande importance dans la formation de l'image. Le CGL montre une organisation en six couches de cellules distinctes. Les six couches superposées du CGL se replient autour de tractus optique comme l'articulation du genou, d'où l'origine du nom. Chez la souris, le CGL est divisé en deux sections, soit ventrale et dorsale. Cette dernière reçoit l'information en provenance de la rétine. Le CGL projette ensuite l'information visuelle à l'aire V1 via des cellules relais (143).

Malgré la grande influence qu'a l'innervation rétinienne sur l'organisation du CGL, près de 80% des connexions excitatrices qui entrent dans le CGL ne proviennent pas de la rétine, mais de l'aire V1 et d'autres structures sous-corticales. Ainsi, le cortex visuel primaire exerce une rétroaction importante sur le CGL.

### **1.3.2.2- Le cortex visuel primaire**

Le cortex visuel primaire est l'aire recevant l'information qui provient du CGL. Le cortex V1 de la souris est composé de six couches superposées. Les neurones de la partie dorsale du CGL y projettent des axones qui se terminent principalement dans la couche 4, mais aussi dans les couches 1, 3 et 5/6 (122). Le cortex V1 relaie par la suite l'information visuelle à d'autres aires visuelles de plus haut niveau, telles que les aires postérieures, latéro-médiales, antéro-latérales, rostro-latérales et antéro-médiales (144). L'organisation hiérarchique entre le cortex V1 et les aires secondaires est très complexe. Étant donné que le sujet de cette thèse ne porte pas sur l'organisation des cortex visuels, cette partie ne sera pas approfondie davantage.

### **1.3.2.3- Le colliculus supérieur**

Le CS est une structure du mésencéphale divisée en sept couches. Les couches superficielles sont exclusivement visuelles et reçoivent des afférences de la rétine et du cortex V1. Les couches intermédiaires et profondes reçoivent des influx de plusieurs aires sensorielles corticales et sous-corticales ainsi que des couches superficielles (145). Puisqu'il est connecté par diverses afférences sensorielles, le CS joue un rôle important dans l'intégration sensori-motrice, notamment des mouvements oculaires, des mouvements de la tête, de l'attention visuelle et de l'activité locomotrice (146).

### **1.3.3- Comparaison anatomique de la rétine, du champ visuel et des voies de projection humaine et de rongeur**

L'anatomie de l'œil humain n'est pas très différente de celle du rongeur, à quelques exceptions comme par exemple la taille du cristallin. Chez l'homme, il prend la forme d'une lentille biconvexe et le corps vitré occupe près de 80% du volume total de l'œil (147). Chez les rongeurs, le cristallin est sphérique et occupe la majorité de la cavité vitréenne.

D'un point de vue structurel, la rétine de rongeur est très similaire à celle de l'humain. La plus grande différence provient du fait que les rongeurs ne possèdent pas de macula ni de fovéa. De plus, les cônes sont répartis uniformément sur toute la rétine plutôt que d'être regroupés dans la fovéa comme chez l'humain. Cette disposition réduit grandement l'acuité visuelle des rongeurs.

La densité des cellules ganglionnaires varie entre les zones centrales et périphériques chez l'humain. Au niveau de la fovéa, il y a davantage de cellules ganglionnaires puisque les cônes sont liés individuellement à une cellule ganglionnaire. Cette organisation fournit un plus grand nombre d'informations visuelles et améliore ainsi la résolution de l'image. Comme la rétine de rongeur ne possède pas de fovéa, les cellules ganglionnaires sont uniformément réparties sur toute la rétine (148).

La densité des photorécepteurs est aussi bien différente entre la rétine humaine et celle des rongeurs. En effet, alors que l'humain compte environ 150 000 photorécepteurs par millimètre carré, la souris en compte 520 000 (149). L'humain compte également sur trois types de cônes ayant une sensibilité plus grande à certaines longueurs d'onde comprises entre 400 et 700 nm : les cônes dits bleus ou S (en référence au terme *short*, en référence à la longueur d'onde), les cônes dits verts ou M et les cônes dits rouges ou L. Les rongeurs possèdent quant à eux des cônes S et M (149).

Étant donné que les yeux de rongeurs sont positionnés de manière latérale, leur vision binoculaire centrale est étroite (50 degrés) et est entourée de deux grandes régions monoculaires tandis que la zone de vision binoculaire est de 135

degrés chez l'humain (150). Cette différence est compréhensible dans la mesure où le CS contribue à la coordination des mouvements des yeux et de la tête afin d'adapter rapidement le regard aux différents stimuli. Cette fonction particulière est essentielle aux rongeurs puisqu'ils représentent des proies et leur permet de rester à l'affût d'un prédateur pouvant les attaquer.

### **1.3.4- Évaluation de la fonction visuelle**

L'évaluation de la fonction visuelle, chez l'animal de surcroît, n'est pas une tâche aussi directe que pour l'humain. Quelques techniques ont été développées afin de mesurer quantitativement la vision, dont certaines reposent sur l'étude du comportement de l'animal. Voici deux de ces techniques, elles ont été utilisées pour cette thèse.

#### **1.3.4.1- Électrorétinographie**

L'activation des photorécepteurs et la transmission neuronale des signaux visuels se traduisent par des modifications du potentiel électrique de la rétine. L'électrorétinographie (ERG) est une technique mesurant la modification du potentiel électrique de la rétine à la suite d'un stimulus lumineux. Il s'agit d'un moyen non invasif permettant d'étudier facilement la fonction rétinienne et couramment utilisé chez l'humain. La réponse enregistrée par l'ERG représente la réponse globale de la rétine à une stimulation lumineuse (151).

L'ERG à champ ouvert (*full-field*) permet d'enregistrer la variation du potentiel électrique de la rétine en conditions scotopiques (rétine adaptée à l'obscurité) ou en conditions photopiques (rétine adaptée à la lumière) et ce, en réponse à diverses intensités de stimuli lumineux. Ceux-ci sont transmis à l'aide d'un diffuseur (*ganzfeld*) pour assurer la répartition uniforme de la lumière dans la rétine. Une électrode est placée sur chaque œil de l'animal et celle-ci sert à capter les potentiels électriques émis lors d'une réponse suite à un flash lumineux. Étant donné que ce potentiel

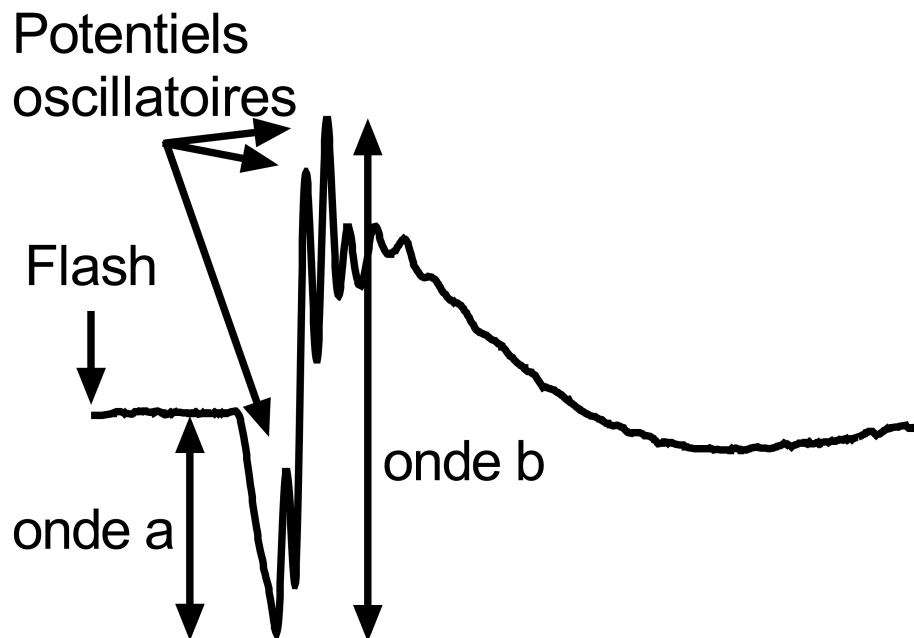
électrique est de faible intensité, celui-ci est amplifié par le biais d'amplificateurs et il est ensuite enregistré avec un logiciel informatique spécialisé.

#### **1.3.4.1.1- Les ondes extraites par électrorétinographie**

La réponse ERG typique se compose d'une onde négative appelée onde a suivie d'une onde positive plus proéminente appelée onde b. De plus, il est possible d'observer des potentiels oscillatoires (POs), soit des ondes de haute fréquence qui composent la pente ascendante de l'onde b. Un enregistrement typique d'ERG est présenté à la Figure 1.7.

Afin d'étudier les ondes obtenues, les standards de l'*International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV) prévoient de mesurer l'amplitude et le temps nécessaire à l'atteinte de l'amplitude maximale (temps de culmination) (152). L'amplitude de l'onde a se mesure à partir du niveau de base avant la stimulation lumineuse jusqu'au point le plus négatif. L'amplitude de l'onde b se mesure du creux de l'onde a jusqu'au point le plus élevé. Le temps de culmination, aussi appelé latence, est la durée entre l'apparition du flash lumineux et l'amplitude maximale de la réponse observée pour l'onde a et b respectivement (151, 153).





**Figure 1.7** Les ondes caractéristiques de l'ERG

Réponse représentative à l'ERG scotopique mixte d'une souris adulte C57BL/6J soumise à un flash lumineux intense. L'onde a correspond au pic négatif suivant le flash tandis que l'onde b est le pic ascendant suivant l'onde a.

#### 1.3.4.1.2- La spécification des ondes et leur provenance

Il existe plusieurs méthodes pour séparer la réponse émanant des cônes et des bâtonnets. Étant donné que les photorécepteurs rétiniens sont principalement composés de bâtonnets (97% chez les rongeurs), la réponse rétinienne à un flash lumineux est dominée par la réponse des bâtonnets. Il est possible d'isoler l'activité des cônes et des bâtonnets de plusieurs moyens dont l'adaptation au noir du sujet, l'illumination de l'arrière-plan et la modification de l'intensité, de la fréquence ou de la couleur de la stimulation lumineuse.

La méthode de séparation des réponses provenant des cônes et des bâtonnets dépend principalement de l'équipement de stimulation utilisé. Ainsi, comme la sensibilité optimale des cônes et des bâtonnets est respectivement de 560 et 510

nm, il est possible de discerner leur apport à la réponse rétinienne en utilisant des filtres de couleur ou en utilisant des diodes électroluminescentes colorées. De plus, comme les cônes ont une vitesse de récupération plus rapide que les bâtonnets, l'utilisation d'un double flash rapide permet d'isoler la réponse émanant des cônes.

Dans cette thèse, nous avons utilisé une méthode simple et adaptée à l'équipement de stimulation disponible. Les animaux ont d'abord été adaptés au noir afin qu'ils soient en conditions scotopiques pures. Dans de telles conditions, la réponse est générée uniquement par les bâtonnets et seule l'onde b est enregistrable. Par la suite, l'augmentation graduelle de l'intensité du flash lumineux augmente l'amplitude de l'onde b jusqu'à l'atteinte d'une saturation. Lors de l'apparition de l'onde a, soit en conditions scotopiques mixtes, la réponse est générée à la fois par les cônes et les bâtonnets. L'augmentation de l'intensité des flashes entraîne une élévation de l'amplitude des ondes a et b. Une fois les conditions scotopiques mixtes terminées, l'animal est exposé à un fond lumineux supérieur à 30 cd/m<sup>2</sup> permettant de saturer les bâtonnets. On parle alors de conditions photopiques. Une fois l'animal adapté à ces conditions photopiques, des flashes lumineux sont transmis en présence de ce fond lumineux et la réponse obtenue est une réponse des cônes.

#### 1.3.4.1.2.1- L'onde a

L'onde a provient de l'activation des photorécepteurs. L'activation des photorécepteurs par un stimulus lumineux cause une hyperpolarisation de ces cellules en raison de la fermeture des canaux sodiques, ce qui explique la pente négative de l'onde a (154). En conditions scotopiques mixtes, l'onde a provient de la somme des hyperpolarisations des cônes et des bâtonnets. Le temps de culmination de l'onde a diminue selon l'intensité des flashes.

#### 1.3.4.1.2.2- L'onde b

Bien que les cellules bipolaires semblent être directement responsables de l'onde b (155), certains auteurs croient que les cellules de Müller y sont également impliquées, dans la mesure où elles reflètent les courants extracellulaires dus au

changement de potassium causé par l'activité de dépolarisation des cellules bipolaires et sont impliquées dans la synthèse du glutamate (156).

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

En conditions photopiques, l'onde b résulte de l'action concertée de la dépolarisation des cellules bipolaires-ON associées aux cônes et de l'hyperpolarisation des cellules bipolaires-OFF des cônes L et M (153). Les cellules de Müller sont également impliquées dans la genèse de cette onde, car elles servent de réservoir d'ions durant l'hyperpolarisation des photorécepteurs et reflètent les changements de concentrations de potassium lors de la dépolarisation des cellules bipolaires.

#### 1.3.4.1.2.3- Les potentiels oscillatoires

Presque toutes les cellules, dont les cellules amacrines et les cellules formant la couche plexiforme interne ou le nerf optique contribuent à la genèse des POs, à l'exception des photorécepteurs et des cellules de Müller (157). Certaines études démontrent même que chaque PO serait généré par une composante rétinienne différente et indépendante ou du moins, que les POs scotopiques et photopiques émergeraient de différents circuits (151).

#### **1.3.4.2- Le réflexe optomoteur**

Lorsque du mouvement est présent dans l'environnement, des réflexes provoquent le suivi involontaire du corps et/ou de la tête (réflexe optomoteur) ou des yeux (réflexe optocinétique) (158). L'origine physiologique du réflexe optomoteur est encore sujette à débat, puisque certaines études ont trouvé des résultats divergents suite à des lésions causées au niveau de V1 (159-161). En résumé, il était d'abord cru que le réflexe optomoteur était exclusivement d'origine sous-corticale, mais de

plus en plus d'études montrent qu'une composante corticale est probablement présente. Le réflexe optomoteur est indépendant entre chaque œil, puisqu'il est produit lorsqu'un stimulus se déplace de manière temporelle vers nasale. Des barres en rotation en sens horaire sont perçues par l'œil gauche alors que l'œil droit est responsable de la détection de barres tournant en sens antihoraire.

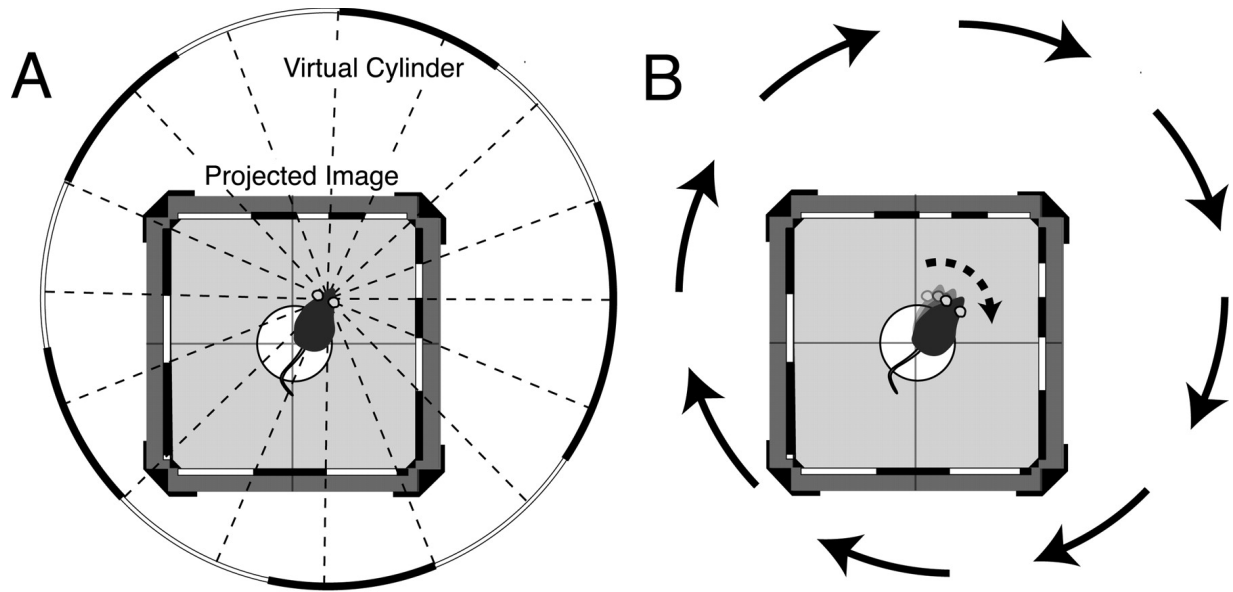
L'un des avantages de la mesure de l'acuité visuelle par le réflexe optomoteur est qu'il est non-invasif, rapide, et qu'il ne nécessite pas d'entraînement préalable de l'animal. En effet, l'animal n'est pas anesthésié et peut bouger librement sur une plateforme surélevée à l'intérieur de l'appareil, lui induisant ainsi un minimum de stress qui pourrait biaiser les résultats. Cependant, ce test repose sur un observateur expérimenté, induisant un possible biais d'utilisateur. De plus en plus de systèmes sont conçus avec un processus d'analyse automatisé, enlevant du coup le besoin d'un observateur. Bien qu'ils ne soient pas totalement au point, ces systèmes prometteurs le seront très bientôt surtout suite à la démocratisation des systèmes d'apprentissage basés sur l'intelligence artificielle.

#### **1.3.4.2.1- Mesure du réflexe optomoteur**

Le réflexe optomoteur peut être utilisé en tant que test comportemental mesurant l'aptitude de l'animal à distinguer différentes fréquences spatiales ou contrastes. La façon la plus commune d'induire ce réflexe est de présenter un stimulus visuel constitué de barres verticales noires et blanches à l'animal. Comme les souris ont un champ visuel de 270° sur le plan horizontal (162), l'animal est placé au centre d'un cylindre (ou d'un cylindre simulé par ordinateur) présentant des barres noires et blanches. Il est ainsi possible de mesurer, selon le système utilisé, les mouvements des yeux ou de la tête.

Les premiers appareils mesurant le réflexe optomoteur utilisaient un cylindre motorisé pouvant être implémenté avec diverses cartes imprimées ayant des motifs de barres verticales noires et blanches de fréquence spatiale constante. Plus récemment, des systèmes générant des cylindres virtuels, tel que le système OptoMotry produit par la compagnie Cerebral Mechanics, permettent de produire les mêmes stimuli que les cylindres physiques tout en ayant une plus grande précision

(Figure 1.8). Le logiciel du système OptoMotry présente des barres verticales rotatives, tournant à une vitesse constante et à une distance définie de la tête de l'animal (163). Les mesures sont obtenues en faisant varier l'une des deux variables des stimuli visuels, soit la fréquence spatiale pour mesurer l'acuité visuelle ou le contraste des barres pour mesurer la sensibilité au contraste. Si l'acuité visuelle est mesurée, le contraste est réglé à une valeur constante de 100%. Un observateur évalue si l'animal a suivi ou non de la tête les barres en mouvement au moyen d'une caméra placée sur le dessus de l'appareil. Au début de l'expérience, les barres verticales sont d'une faible fréquence spatiale, c'est-à-dire qu'elles sont très larges. Au fur et à mesure que l'expérience se déroule et que l'animal suit les stimuli de la tête, les barres deviennent de plus en plus minces jusqu'à ce que l'animal ne puisse plus les percevoir. L'acuité visuelle représente donc le seuil de fréquence spatiale perceptible par l'animal. Similairement, la sensibilité au contraste utilise des barres verticales d'une fréquence spatiale constante, mais d'un contraste décroissant. Au début de l'expérience, les barres sont noires et blanches et deviennent de plus en plus grises au fur et à mesure de l'expérience. La sensibilité au contraste correspond donc au plus faible contraste perceptible par l'animal.



**Figure 1.8** Représentation de la stimulation visuelle générée par l'équipement permettant la mesure du réflexe optomoteur.

(A) Un cylindre virtuel est projeté sur quatre écrans d'ordinateur placés en carré autour d'une plateforme surélevée sur laquelle se trouve une souris. Ce cylindre virtuel est centré par rapport à la tête de la souris. (B) Lorsque le cylindre virtuel est en mouvement, la souris suit du regard les barres défilant devant elle. Ce mouvement de tête est enregistré par une caméra située sur le dessus de l'appareil (figure tirée de (163)).

## 1.4- Les cannabinoïdes et le système visuel

Le rôle des eCBs dans la fonction visuelle est de plus en plus étudié. Plusieurs observations permettent de croire que le système eCB pourrait jouer un rôle dans le système visuel.

### 1.4.1- Les cannabinoïdes et les tissus oculaires

Il est connu depuis longtemps que la consommation de marijuana cause une vasodilatation des vaisseaux sanguins de la conjonctive (reconnaissable par les yeux rouges) et une réduction de la pression intraoculaire (164). Initialement, les

chercheurs croyaient que la marijuana exerçait ses effets de manière systémique par le SNC. Il est maintenant clair que les effets du  $\Delta^9$ -THC et d'autres cannabinoïdes réduisent entre autres la pression intraoculaire par une action locale sur les récepteurs CB1 présents au niveau de l'œil (165). De plus, des études physiologiques et biochimiques montrent la présence des eCBs et de leurs effets dans une foule de tissus oculaires dont le corps ciliaire, l'iris, la choroïde et le trabéculum et ce chez plusieurs espèces animales comprenant entre autres le porc, le bovin, le primate en plus de l'humain (166).

Également, les niveaux d'AEA et de 2-AG ont été mesurés dans certains tissus oculaires de l'humain (167). Il a été découvert que les concentrations en eCBs varient dans certaines pathologies, ce qui laisse suggérer qu'ils pourraient être importants dans le maintien de l'homéostasie oculaire. Les niveaux de 2-AG sont notamment diminués dans le corps ciliaire de patients atteints de glaucome (167). Similairement, les niveaux d'AEA sont plus élevés chez les patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge et de rétinopathie diabétique (168).

#### **1.4.2- Les cannabinoïdes et la vision**

Il existe assez peu de données sur l'effet du cannabis sur la perception visuelle. Il a été rapporté que le temps de rétablissement après un éblouissement pouvait être prolongé par la prise de  $\Delta^9$ -THC (164). La consommation aiguë de marijuana peut également causer une réduction de l'acuité visuelle et altérer la vision des couleurs (169, 170). Une étude a rapporté des effets anecdotiques observés chez des pêcheurs jamaïcains consommant du cannabis afin d'améliorer leur vision nocturne (171). Ces résultats ont été corroborés par une autre étude ayant mesuré précisément la vision nocturne chez des pêcheurs marocains utilisant le cannabis pour mieux voir durant la nuit (172). Les auteurs ont noté des améliorations de la vision nocturne suite à l'administration de  $\Delta^9$ -THC ou de cannabis. Ils croient également que ces effets sont dose-dépendants et sont causés au niveau de la rétine.

Depuis quelques années, le groupe de recherche mené par Vincent Laprevote s'intéresse à l'impact de la consommation régulière de cannabis sur la vision. Une de leurs études utilise un appareil d'électrorétinographie multifocale, enregistrant la réponse de la rétine centrale et permettant l'évaluation de multiples réponses locales comparativement à l'électrorétinographie plein champ qui ne permet qu'une mesure globale de la fonction rétinienne. L'étude montre que les consommateurs chroniques de cannabis présentent une augmentation de la latence des principales ondes composant l'ERG multifocal et une diminution de l'amplitude de l'onde N1, émanant majoritairement de l'activation des cellules bipolaires OFF, suggérant ainsi que la consommation régulière de cannabis cause un délai dans la transmission du signal des cônes dans la rétine centrale (173).

Une autre étude menée par le groupe de Vincent Laprevote note des changements dans la réponse rétinienne mesurée par l'électrorétinographie à damier (*pattern*), étudiant l'activité des cellules ganglionnaires, ainsi qu'avec l'électrorétinographie plein champ chez des consommateurs chroniques de cannabis. En effet, la réponse des cellules bipolaires et ganglionnaires est légèrement plus lente chez les consommateurs de cannabis (174).

Une autre étude du même groupe trouve cette fois-ci une diminution du seuil de sensibilité au contraste à faible fréquence spatiale chez les consommateurs chroniques de cannabis (175). C'est donc dire que les consommateurs réguliers de cannabis discernent moins bien les contrastes lorsque la largeur des stimuli est grande.

Par contre, il faut bien prendre soin de relativiser les résultats rapportés par le groupe de Laprevote. Il faut savoir que les sujets utilisés dans leurs études sont faiblement apparentés entre les deux groupes (consommateurs de cannabis et non-consommateurs), notamment au niveau de la consommation d'alcool, significativement supérieure chez les consommateurs de cannabis étudiés dans leurs études. De plus, bien que des différences statistiquement significatives aient été trouvées, celles-ci sont peu nombreuses par rapport à la quantité de paramètres mesurés et surtout, sauf exception, les différences mesurées sont peu significatives d'un point de vue clinique. C'est donc dire que l'utilisation de consommateurs



chroniques de cannabis est peu intéressante pour une étude portant sur l'effet des cannabinoïdes sur la vision puisqu'ils consomment, dans ce cas-ci, davantage d'alcool que les sujets témoins. Maintenant que l'usage récréatif de cannabis est décriminalisé et même légalisé dans plusieurs régions du monde, il serait plus facile et intéressant de tester l'effet aigu de cannabinoïdes sur la vision en contrôlant mieux les biais expérimentaux.

Une étude s'est même intéressée à l'effet causé par l'absence de l'enzyme DAGL $\alpha$  sur la vision en mesurant le réflexe optomoteur sur le poisson-zèbre. Les auteurs ont observé qu'aussi bien le seuil de sensibilité au contraste, le seuil de fréquence spatiale et temporelle sont inférieurs lorsque DAGL $\alpha$  est absente (104). De plus, la même étude a montré que ces animaux pour qui l'enzyme DAGL $\alpha$  est absente ont une locomotion déficiente puisqu'ils se déplacent plus de 3 fois moins que la normale, démontrant l'impact fonctionnel d'une altération des niveaux en eCBs.

### **1.4.3- Les cannabinoïdes et les aires visuelles cérébrales**

Des études récentes montrent l'effet de l'activation ou de l'inhibition du récepteur CB1 sur la plasticité durant le développement dans le cortex visuel primaire (176, 177). Une autre étude a montré l'effet des cannabinoïdes sur l'activité du CGL (178). Les auteurs de cette étude ont démontré que le récepteur CB1 maintenait un effet modulateur sur l'information visuelle qui est envoyée vers le cortex visuel primaire. Une étude a montré la présence du récepteur CB1 dans les couches II/III de l'aire V1 de la souris (179). Les auteurs ont également déterminé que le récepteur CB1 y était plus exprimé au cours du développement et que la distribution laminaire du récepteur CB1 apparaissait vers le 20<sup>e</sup> jour postnatal (P20) et demeurait la même jusqu'à l'âge adulte.

Une étude produite au sein de notre laboratoire montre que le récepteur CB1 est exprimé dans le CGL chez le primate avec un marquage proéminent dans les couches magnocellulaires (180). Cette expression marquée dans ces couches pourrait expliquer certains effets comportementaux des cannabinoïdes associés à la

localisation spatiale, la perception des mouvements et les basses fréquences spatiales.

#### **1.4.4- Les cannabinoïdes et la rétine**

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

La présence des deux principaux eCBs a été rapportée par plusieurs études dans la rétine de bovins (181), de rongeurs (182) et d'humains (167). Les quantités de 2-AG et d'AEA rapportées varient respectivement entre 1400 et 3000 pmol/g et 4,5 à 100 pmol/g selon les espèces.

La localisation des enzymes DAGL $\alpha$  et  $\beta$  a été effectuée par Hu, Arnold (183) chez la souris. Les auteurs ont noté que l'enzyme DAGL $\alpha$  est présente dans les deux couches synaptiques de la rétine. Elle s'exprime intensément dans les dendrites de cellules bipolaires OFF liées aux cônes. Les auteurs rapportent que cette enzyme est aussi présente dans les dendrites d'autres cellules bipolaires, mais sans en préciser le type. L'enzyme DAGL $\alpha$  est également présente dans l'IPL, mais il n'est pas spécifié dans quels types de neurones elle est exprimée. Finalement, les auteurs ont établi que l'enzyme DAGL $\beta$  est présente exclusivement dans les vaisseaux sanguins de la rétine.

L'enzyme FAAH a été localisée par plusieurs groupes de recherche dans la rétine de rongeurs (183-185) et de primates (186). Chez le rat adulte, l'enzyme FAAH est présente dans les cônes, les cellules bipolaires des bâtonnets et quelques cellules ganglionnaires.

L'enzyme MAGL a également été localisée dans la rétine par quelques groupes de recherche (166, 183). L'étude de Yazulla (166) conclut que l'enzyme MAGL est exprimée dans les cellules bipolaires ainsi que dans certaines cellules ganglionnaires de la rétine de souris. L'étude de Hu, Arnold (183) a également été réalisée chez la souris et donne davantage de détails en localisant l'expression de l'enzyme MAGL au niveau des sphérules des bâtonnets et des pédicules des cônes. Les auteurs notent également un marquage dans l'IPL formant deux strates qui ne

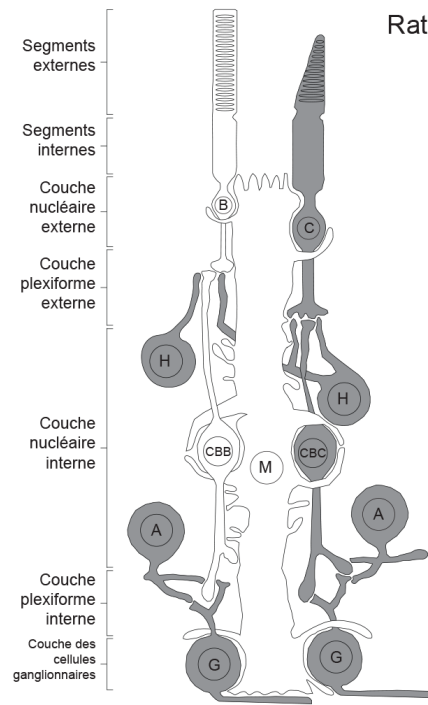
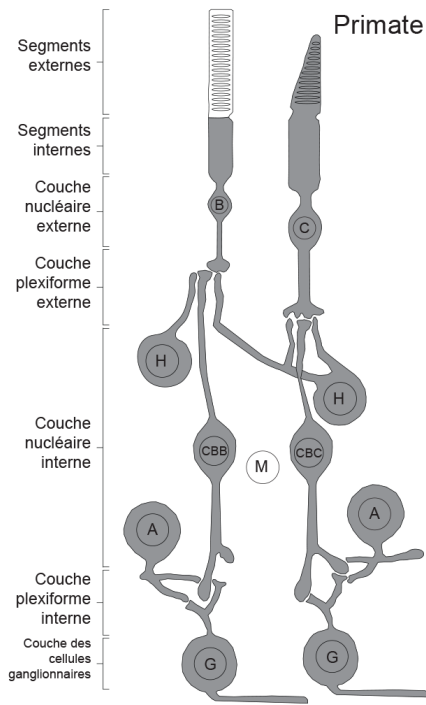
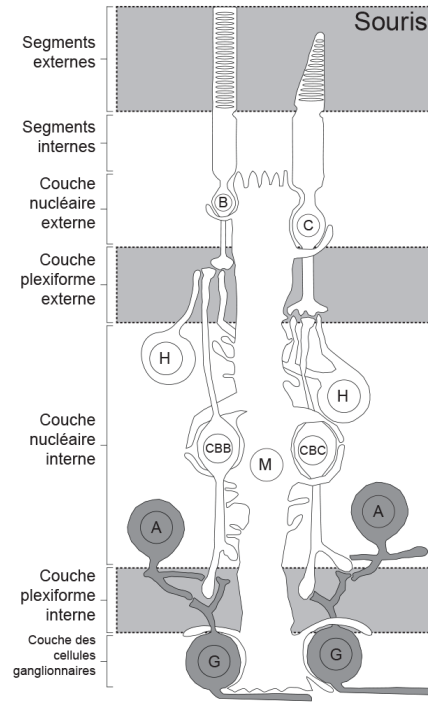
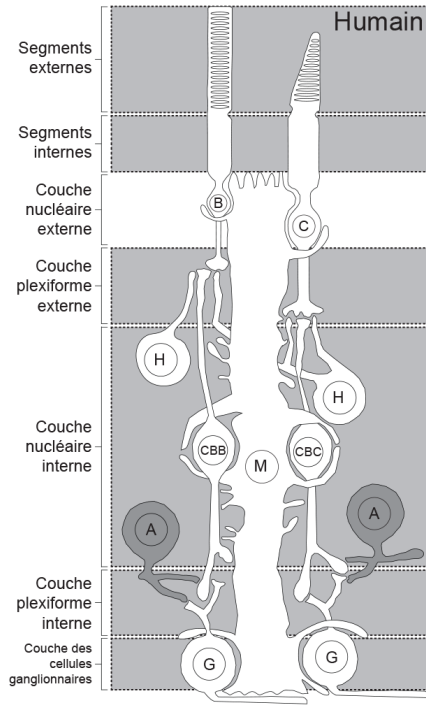
colocalisent pas avec les synapses des cellules amacrines GABAergiques. Les cellules ganglionnaires expriment également l'enzyme MAGL.

L'expression de l'enzyme Abhd6 a également été étudiée par Hu, Arnold (183). Les auteurs ont localisé l'enzyme dans les cellules amacrines GABAergiques, les cellules ganglionnaires de même que leurs dendrites et dans les dendrites des cellules amacrines déplacées.

Étant donné que le système eCB est fortement impliqué dans les processus développementaux, il serait particulièrement intéressant de connaître l'expression rétinienne des différentes enzymes composant le système eCB pendant le développement. Ce sujet sera abordé en profondeur dans le premier article de cette thèse.

#### **1.4.4.2- Les récepteurs cannabinoïdes**

L'expression du récepteur CB1 a été étudiée chez plusieurs espèces animales à l'aide de plusieurs techniques telles que l'hybridation *in situ*, la réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-PCR), l'immunobuvardage et l'immunohistochimie. Buckley et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer la présence de l'ARNm du récepteur CB1 dans la rétine de rat (99). Ils ont noté son expression dans le GCL et l'INL. D'autres équipes de chercheurs ont par la suite caractérisé l'expression du récepteur CB1 dans la rétine (165, 182-184, 186-189). Un schéma résumant l'expression rétinienne du récepteur CB1 chez plusieurs espèces est présenté à la Figure 1.9.



**Figure 1.9** Représentation de la distribution du récepteur CB1 dans la rétine adulte de plusieurs espèces.

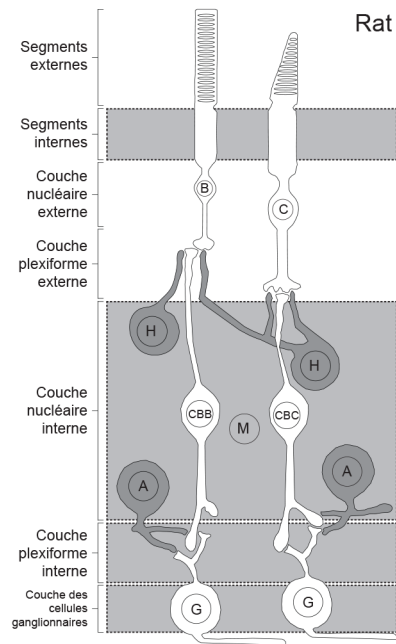
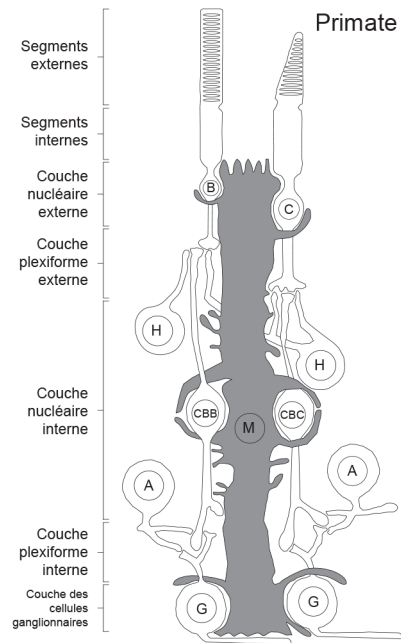
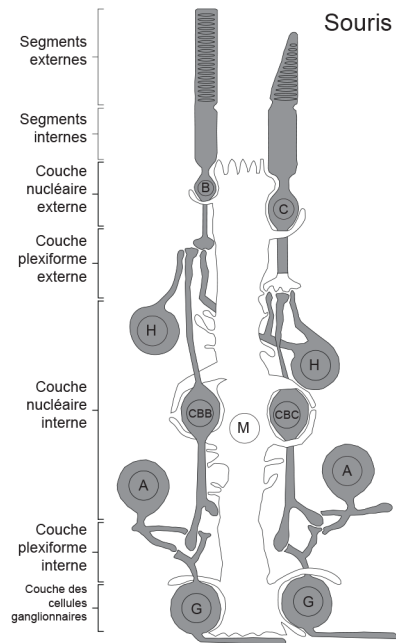
L'expression du récepteur CB1 a été démontrée pour les cellules colorées en gris, alors que la présence de CB1 a été observée dans les couches rétinienne en gris pâle, sans localisation plus précise. B, bâtonnets; C, cônes; H, cellules horizontales; CBC, cellules bipolaires des cônes; CBB, cellules bipolaires de bâtonnets; A, cellules amacrines; G, cellules ganglionnaires, M, cellules de Müller.

Les recherches portant sur la localisation du récepteur CB2 ont été moins nombreuses que celles portant sur le récepteur CB1. Dans un premier temps, Buckley, Hansson, Hasta et Mezey (1998) rapportent que l'ARNm du récepteur CB2 n'est pas présent dans la rétine au cours du développement embryonnaire du rat. Une étude subséquente découvre que l'ARNm du récepteur CB2 est présent dans la rétine de souris adulte (71). Les auteurs notent que le récepteur CB2 est distribué dans la GCL, l'INL et dans les segments internes des photorécepteurs.

Quelques groupes de recherche ont par la suite étudié l'expression du récepteur CB2 au moyen d'anticorps. Malheureusement, dans la majorité des cas, la spécificité de l'anticorps ciblant le récepteur CB2 n'a pas été vérifiée, remettant en doute la validité des découvertes (70). Plus récemment, une étude provenant de notre laboratoire a montré l'expression du récepteur CB2 dans la rétine de souris au moyen d'un anticorps dont la spécificité a été vérifiée avec un animal transgénique, ce qui représente la meilleure manière de tester la validité d'un anticorps (190, 191). En bref, le récepteur CB2 est exprimé au niveau des cônes, des bâtonnets, des cellules horizontales, bipolaires, ganglionnaires et certains types de cellules amacrines. Par contre, les résultats de cette étude n'ont pas entraîné un consensus au sujet de l'expression du récepteur CB2 dans des neurones. En effet, bien que certains groupes aient apprécié l'effort réalisé en publiant des lettres en ce sens (192), d'autres groupes restent toujours perplexes. C'est que l'anticorps utilisé, le #101550 produit par Cayman Chemical, montre beaucoup de variabilité entre les différents lots. En fait, seul un lot d'anticorps fut spécifique et tous les lots ayant été produits par la suite n'étaient pas spécifiques.

Récemment, le groupe d'Alex Straiker, qui conteste le plus fortement la présence du récepteur CB2 dans les neurones rétiniens, a publié une étude dans laquelle une souris transgénique a été étudiée et pour laquelle une molécule fluorescente a été conjuguée au gène codant pour le récepteur CB2. Ainsi, cette souris transgénique ne nécessite pas d'anticorps puisque le récepteur CB2 est couplé directement avec une molécule fluorescente. Bien que les auteurs n'aient pas trouvé de marquage au niveau de la rétine, cela ne clôt pas le débat au sujet de la présence neuronale du récepteur CB2 (193). Ce sujet sera abordé en profondeur dans l'article #2.

Le récepteur CB2 a également été trouvé dans la rétine de primates par Bouskila, Javadi, Casanova, Ptito et Bouchard (2013). Les auteurs ont observé que le récepteur CB2 est exclusivement présent dans les cellules de Müller, chez le singe Vervet adulte. Un schéma résumant l'expression rétinienne du récepteur CB2 chez plusieurs espèces est présenté à la Figure 1.10.



**Figure 1.10** Représentation de la distribution du récepteur CB2 dans la rétine adulte de plusieurs espèces.

L'expression du récepteur CB2 a été démontrée pour les cellules colorées en gris, alors que la présence de CB2 a été observée dans les couches rétiniennes en gris pâle, sans localisation plus précise. B, bâtonnets; C, cônes; H, cellules horizontales; CBC, cellules bipolaires des cônes; CBB, cellules bipolaires de bâtonnets; A, cellules amacrines; G, cellules ganglionnaires, M, cellules de Müller.

#### **1.4.4.3- La fonction des cannabinoïdes dans la rétine**

Fan et Yazulla (2003) rapportent un effet biphasique de la réponse des cônes suite à une exposition avec l'agoniste des récepteurs cannabinoïdes WIN55212-2. Ces auteurs mettent en évidence une augmentation des courants potassiques, chloriques et calciques dans les cônes lorsqu'ils sont exposés à une faible concentration de cet agoniste. Par contre, lorsqu'exposés à des concentrations supérieures, ces mêmes courants sont inhibés. Cependant, comme l'agoniste utilisé se lie autant au récepteur CB1 qu'au récepteur CB2, il n'est pas possible de déterminer si ces effets sont dus à l'un des deux récepteurs.

Straiker et Sullivan (2003) ont obtenu des résultats similaires à ceux énumérés ci-dessus. Leurs résultats suggèrent que l'activation des récepteurs cannabinoïdes cause une augmentation de la relâche synaptique qui diminue la sensibilité rétinienne.

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

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



courants potassiques sont inhibés dans les cellules bipolaires ON suite à l'exposition avec l'agoniste WIN55212-2.

Warrier et Wilson (2007) rapportent que l'activation du récepteur CB1 cause une augmentation de la relâche synaptique spontanée dans certaines cellules amacrines GABAergiques embryonnaires. Lalonde, Jollimore, Stevens, Barnes et Kelly (2006) montrent que l'activation du récepteur CB1 cause une diminution des courants calciques dans les cellules ganglionnaires et diminue ainsi l'excitabilité de ces cellules. Enfin, Middleton et Protti (2011) rapportent que l'administration de l'agoniste WIN55212-2 altère la transmission synaptique spontanée émanant des cellules ganglionnaires. De plus, ce même agoniste réduit l'activité spontanée des cellules ganglionnaires ON alors que l'agoniste inverse AM251 produit l'effet opposé, soit une augmentation de l'activité spontanée (200).

Une étude provenant de notre laboratoire a montré que l'absence du récepteur CB2 cause une augmentation de l'amplitude de l'onde a en conditions scotopiques d'électrorétinographie. De plus, contrairement aux propriétés classiques des cannabinoïdes, le récepteur CB1 ne joue pas un rôle très important au niveau rétinien puisque son absence ne provoque aucun changement à l'électrorétinogramme (191).

Enfin, une étude récente menée par le groupe d'Alex Straiker a confirmé que l'absence de récepteur CB2 augmente l'amplitude de l'onde a et surtout qu'une administration prolongée d'un agoniste inverse du récepteur CB2 cause un effet similaire à l'absence du récepteur CB2 (193). Cette étude vient donc confirmer l'implication du récepteur CB2 dans la vision.

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

En bref, la plupart des études s'intéressant à l'impact des cannabinoïdes sur la vision ont été menées sur des sujets humains et, dans le cas des études les plus récentes, n'apportent aucun nouvel éclairage en raison de la faiblesse des groupes

expérimentaux. Les études menées sur des animaux de laboratoire se sont surtout intéressées à l'impact des cannabinoïdes sur la fonction rétinienne étant donné que l'acuité visuelle était difficile à évaluer chez les animaux jusqu'à tout récemment. L'article 2 de cette thèse remplira ce manque puisqu'il s'intéresse à l'impact des cannabinoïdes sur l'acuité visuelle. Pour ce faire, des moyens sophistiqués tels que des souris transgéniques et des ligands pharmacologiques hautement spécifiques seront utilisés.

## 2- Objectifs de recherche

---

L'implication du système eCB dans la fonction neuronale de plusieurs structures cérébrales a été démontrée par plusieurs équipes de recherche. La présence des composantes du système eCB a été observée dans la rétine de plusieurs espèces, des poissons aux primates. Notre laboratoire a notamment montré la présence anatomique et l'impact fonctionnel des cannabinoïdes dans le système visuel de rat, de souris, de hamster et même de singe.

Plusieurs études se sont attardées à l'expression des récepteurs CB1 et CB2. Par contre, les connaissances actuelles au sujet de l'expression des eCBs sont plus restreintes, notamment au niveau de la rétine. De plus, les études montrant l'impact des cannabinoïdes sur la fonction visuelle n'ont souvent porté que sur le niveau rétinien de la vision. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'étude de l'impact des cannabinoïdes sur la vision, mais mesurée en conditions contrôlées et de surcroît, en utilisant un test comportemental ne nécessitant aucune anesthésie ou contention de l'animal pouvant affecter les résultats obtenus.

Le premier objectif de cette thèse est d'étudier le patron d'expression des enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL, respectivement responsables de la synthèse et de la dégradation du 2-AG, dans la rétine au cours du développement postnatal. En fonction des connaissances actuelles de la littérature scientifique, nous nous attendons à ce que ces deux enzymes clés soient présentes dans la rétine bien qu'il soit hasardeux de prédire leur distribution. Pour ce faire, nous devons dans un premier temps démontrer la spécificité des anticorps contre les protéines DAGL $\alpha$  et MAGL.

Le second objectif de cette thèse est d'étudier l'impact des cannabinoïdes sur l'acuité visuelle et la fonction rétinienne. Plus précisément, nous étudierons l'effet d'une modulation génétique ou pharmacologique des cannabinoïdes sur la vision. Nous prévoyons que les cannabinoïdes affecteront l'acuité visuelle et la fonction rétinienne. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs approches dont l'étude anatomique des tissus rétiniens par immunohistochimie, la biologie moléculaire, la

microscopie confocale, la mesure de l'acuité visuelle par le réflexe optomoteur et l'électrorétinographie.

### 3- Article 1

---

#### **Localization of diacylglycerol lipase alpha and monoacylglycerol lipase during postnatal development of the rat retina**

Bruno Cécyre<sup>1, 2</sup>, Marjorie Monette<sup>1</sup>, Liza Beudjekian<sup>1</sup>, Christian Casanova<sup>2</sup>, Jean-François Bouchard<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Neuropharmacologie, <sup>2</sup>Laboratoire des Neurosciences de la vision, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Running title: Retinal distribution of 2-AG related enzymes

Correspondence:

Dr Jean-François Bouchard  
Laboratoire des Neurosciences de la vision  
École d'optométrie, Université de Montréal,  
C.P. 6128 Succursale Centre-Ville  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7  
Tel: (514) 343-6111 X4083  
Fax: (514) 343-2382  
E-mail: [jean-francois.bouchard@umontreal.ca](mailto:jean-francois.bouchard@umontreal.ca)

Cet article a été publié dans le journal *Frontiers in Neuroanatomy* en décembre 2014. J'ai participé à l'élaboration de l'étude, la cueillette et à l'analyse des résultats de même qu'à l'écriture du manuscrit.

### 3.1- Abstract

In recent decades, there has been increased interest in the physiological roles of the endocannabinoid (eCB) system and its receptors, the cannabinoid receptor types 1 (CB1R) and 2 (CB2R). Exposure to cannabinoids during development results in neurofunctional alterations, which implies that the eCB system is involved in the developmental processes of the brain. Because of their lipophilic nature, eCBs are synthesized on demand and are not stored in vesicles. Consequently, the enzymes responsible for their synthesis and degradation are key regulators of their physiological actions. Therefore, knowing the localization of these enzymes during development is crucial for a better understanding of the role played by eCBs during the formation of the central nervous system.

In this study, we investigated the developmental protein localization of the synthesizing and catabolic enzymes of the principal eCB, 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the retinas of young and adult rats. The distribution of the enzymes responsible for the synthesis (DAGL $\alpha$ ) and the degradation (MAGL) of 2-AG was determined for every retinal cell type from birth to adulthood.

Our results indicate that DAGL $\alpha$  is present early in postnatal development. It is highly expressed in photoreceptor, horizontal, amacrine, and ganglion cells. MAGL appears later during the development of the retina and its presence is limited to amacrine and Müller cells. Overall, these results suggest that 2-AG is strongly present in early retinal development and might be involved in the regulation of the structural and functional maturation of the retina.

Keywords: endocannabinoid system, 2-arachidonoylglycerol, cannabinoid, immunohistochemistry, distribution, western blot, confocal microscopy, antibody

## 3.2- Introduction

Cannabinoid receptors and their ligands constitute an endogenous signaling system that is particularly expressed in the CNS (12, 63, 201). This system is activated by exogenous cannabinoids such as  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) and is composed of cannabinoid receptors type 1 (CB1R) and 2 (CB2R), the endogenous agonists of these receptors, the endocannabinoids (eCBs) anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), and the enzymes responsible for the biosynthesis and degradation of eCBs (18). The eCBs are modulators of synaptic transmission throughout the CNS. They act as retrograde inhibitors of neurotransmission and mediate the long-term depression of synaptic responses (90, 202, 203). The levels of 2-AG in rodent brains are 800-fold higher than those of anandamide (14). Although anandamide binds to CB1R and CB2R with higher affinities than does 2-AG (204), it acts only as a partial agonist, while 2-AG acts as a full agonist (205, 206). On the basis of these differences between 2-AG and anandamide and on recent electrophysiological and anatomical studies, it is currently believed that 2-AG is the most potent natural ligand of cannabinoid receptors and is the key eCB for retrograde signaling in the brain (49, 207, 208). 2-AG is poorly soluble in the hydrophilic extracellular matrix (12, 25) and has a brief half-life (45). Consequently, its actions are local and dependent on the location of its biosynthesis site and receptors (25). The synthesis of 2-AG is catalyzed primarily by diacylglycerol lipase alpha (DAGL $\alpha$ ) (48); 85% of its degradation is controlled by monoacylglycerol lipase (MAGL), and the enzymes alpha-beta hydrolase domain 6 (ABHD6) and alpha-beta hydrolase domain 12 (ABHD12) hydrolyze the remaining 15% (51).

The eCB system plays an important role in CNS development that includes neuron differentiation (209), neuronal migration, axon guidance (210, 211), positioning of cortical interneurons, morphogenesis and the specification and survival of neural progenitors (212, 213) (see (214) for review). CB1R mRNA expression varies in the forebrain, brainstem and cerebellum during brain development (215). It has also been demonstrated that 2-AG levels progressively increase in the CNS

throughout embryonic development, peak immediately after birth and stabilize during postnatal development (96, 97).

Several constituents of the eCB system are located in the retinas of numerous species from fishes to primates (see (166) for review). In adult rodents, CB1R, CB2R, DAGL $\alpha$  and MAGL are present in the retina (183, 189, 191). To our knowledge, very few studies have examined the localization and/or effects of eCB biosynthesis and degradative enzymes in the developing retina. The consequences of CB1R modulation in the retinal cells of embryonic and young animals were studied by Lalonde, Jollimore (198) and Warriar et Wilson (197). Briefly, these authors reported that CB1R activation modulates GABA release from amacrine cells and inhibits high-voltage-activated calcium channel currents in cultured ganglion cells, thereby affects the excitability of cells. Recently, our research group investigated the spatiotemporal distributions of CB1R and FAAH during postnatal development (185, 189). Our results demonstrated a different distribution of CB1R and FAAH during this period. Apart from CB1R and FAAH, the expression and distribution patterns of retinal eCB system proteins during development remain unknown.

Because DAGL $\alpha$  and MAGL localization dictates 2-AG function, we investigated the spatiotemporal protein expression of DAGL $\alpha$  and MAGL in the rat retina during postnatal development until adulthood. The rodent retina represents a valuable model for the study of development because it includes several cell classes that comprise neuronal and glial cell types and because retinal cells have well-known developmental timelines (216). The results reported here show that DAGL $\alpha$  is constantly present during postnatal development. However, MAGL protein content is weak until postnatal day (P) 11, after which it increases until the adult age, and its distribution is not uniform throughout the retina. These results are consistent with the hypothesis that the eCB system is involved in the development of the retina during the postnatal period.



### **3.3- Materials and methods**

#### **Animals**

All procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the ethics committee on animal research of the Université de Montréal. The adult gestating Long-Evans rats were obtained from Charles River (St-Constant, QC) and maintained on a 12-hour light/dark cycle. At least three pups from three litters were used at each age for the experiments.

#### **Tissue Preparation**

The rats were euthanized at various ages; i.e., P1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 21, 30, 45 and as adults ( $\geq$  P60). The animals were deeply anesthetized either by hypothermia (pups younger than P5) or with excess of isoflurane inhalation. One eye was immediately removed for western blot analysis. The retina was dissected on ice, promptly frozen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing. Simultaneously, a transcardiac perfusion was conducted with phosphate-buffered 0.9% saline (PBS; 0.1 M, pH 7.4) followed by phosphate-buffered 2% formaldehyde. The nasal part of the second eye was marked with a suture and removed. Two small holes were made in the cornea prior to an initial post-fixation in 2% formaldehyde for 1.5 to 2 hours depending on the age of the animal (longer times were used for older animals). The cornea and lens were removed, and the eyecups were postfixed for 10 to 30 minutes in 2% formaldehyde. The eyecups were washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose overnight, embedded in Neg 50 tissue Embedding Media (Fisher Scientific, Ottawa, ON), flash-frozen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sections (14  $\mu\text{m}$  thick) were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Concord, ON) and placed on gelatin/chromium coated slides.

#### **Western blot**

The retinas were homogenized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0, 1% NP-40 (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), 0.1% sodium dodecyl sulfate

(SDS), 1mM EDTA), supplemented with a protease inhibitor mixture (aprotinin, leupeptin, pepstatin at 1 µg/ml- and phenylmethylsulfonyl fluoride at 0.2 mg/ml -; Roche Applied Science, Laval, QC). Thirty micrograms of protein/sample of the homogenate were resolved with 8 or 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred onto a nitrocellulose membrane, blocked with 5% skim milk and incubated overnight with antibodies directed against DAGL $\alpha$ , MAGL or  $\beta$ -actin, the latter served as a loading control. The blots were exposed to the appropriate HRP-coupled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Detection was performed using homemade ECL western blotting detection reagent (final concentrations: 2.5 mM luminol, 0.4 mM p-coumaric acid, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 0.018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The densitometric analyses were performed using ImageJ software (version 1.47b) (217) on scanned films obtained from a series of seven independent blots. Each analysis was performed with retinal samples from distinct experimental groups. The analyses were conducted following the recommendations of a number of reports (218, 219). Briefly, a standard curve was produced from a serial dilution series to determine the linear dynamic range of detection of each antibody (220). Several exposure times were tested and only blots exposed below saturation were quantified. The DAGL $\alpha$ / $\beta$ -actin and MAGL/ $\beta$ -actin ratios were calculated to compensate for the variability in the loading and concentration of the samples.

## **Immunohistochemistry**

Frozen sections were washed in PBS, postfixed for 10 minutes in cold acetone, washed, and then blocked in 1% bovine serum albumin (Fisher Scientific, Ottawa, ON), bovine gelatin and 0.5% Triton X-100 in PBS for 1 hour. The sections were incubated overnight in rabbit anti-DAGL $\alpha$  or anti-MAGL solution with an antibody against one of various retinal markers (see Table 3.1). The sections were subsequently washed in PBS, blocked for 30 minutes, and incubated for 1 hour with the appropriate secondary antibodies, washed and mounted with PVA-Dabco mounting medium. Because antibodies to several retinal cell markers were raised in

the same host as those for DAGL $\alpha$  and MAGL (recoverin, mouse cone-arrestin, calbindin, CtBP2 and VGlut1), these combinations required sequential incubations as previously described by our research group (185, 189) and others (221). Briefly, the sections were labeled in a serial manner: the exposure to the first primary antibody was conducted as described above, followed by incubation in a goat anti-Fab fragment solution (Jackson Immunoresearch Laboratories). This allowed us to tag the first primary antibody as a goat rather than a rabbit. The sections were revealed with a secondary Alexa donkey anti-goat 633. The sections were then exposed to a second primary antibody overnight, and the latter was revealed with an Alexa donkey anti-rabbit 488 the following day. The dilution factors, immunogens, and provenance of the antibodies are provided in Table 3.1.

### **Validity of the sequential labeling**

The validity of the sequential labeling was verified for the rabbit-rabbit co-labeling with two controls. Briefly, 1) the second primary antibody was omitted, which yielded strong labeling with the goat secondary 633 and no labeling with the rabbit secondary 488, and 2) the first secondary and second primary antibodies were omitted, which yielded no signal for the goat secondary 633 and a low residual signal for the rabbit secondary 488. These control experiments demonstrated the specificity of the sequential Fab fragment protocol and were conducted systematically (data not show). Identical results have been presented in recent reports from our research group (185, 189).

### **Antibody characterization**

The DAGL $\alpha$  and MAGL antibodies have been fully characterized in the hippocampi of DAGL $\alpha$  and MAGL knockout mice (222, 223). Although DAGL $\alpha$  and MAGL share 100% homology in their protein sequence between rats and mice, we tested their specificities in the rat retina using western blotting. The anti-DAGL $\alpha$  and the anti-MAGL reacted with bands at approximately 120 and 33-kDa, respectively (Fig 3.1A), as described by other authors (30, 48, 223-225). When the antibodies were

pre-adsorbed with their respective blocking peptide, no immunoreactivity was detected in the adult rat retina (Fig 3.1B).

The mouse monoclonal antibody against beta-actin ( $\beta$ -actin) was raised against a slightly modified  $\beta$ -cytoplasmic actin N-terminal peptide (DDDIAAVIANGSGL). During western blotting, the  $\beta$ -actin antibody detects a single band at the expected molecular weight of 42 kDa (226, 227).

The rabbit polyclonal antibody against mouse cone-arrestin was directed against the C-terminus epitope of the mCAR protein and detects a single band at 44 kDa in the mouse retina (228-230). This antibody labels cone photoreceptors in the rat retina (231, 232).

The rabbit polyclonal antibody against recoverin was raised against recombinant human protein and recognizes a 25-kDa protein in the mouse retina. This calcium-binding protein has been detected in photoreceptors and cone bipolar cells of the retina, including the retinas of primates (233, 234) and rats (235-237).

The rabbit polyclonal antibody against calbindin was directed against recombinant rat calbindin D-28K protein. This antibody detects a 28-kDa band on immunoblots and labels horizontal, ON cone bipolar cells and amacrine cell processes (238-242). It labels horizontal cells (243, 244) and amacrine cell processes in the rat retina (245).

The mouse monoclonal antibody against PKC $\alpha$  is specifically expressed in rod bipolar cells and dopaminergic amacrine cells (246). Mouse anti-PKC $\alpha$  has been shown to exclusively recognize rod bipolar cells in the rat retina (189, 247, 248). This antibody recognizes PKC $\alpha$  at approximately 80-kDa (249). The immunoreactive pattern that we observed was similar to that reported in previous studies (246, 250).

The mouse monoclonal antibody against syntaxin-1 has been recognized as a specific marker of retinal amacrine cells by several research teams (251, 252). Mouse anti-syntaxin recognizes syntaxin-1, which is a 35-kDa protein, in hippocampal, retinal and cortical neurons (Inoue et al., 1992). This antibody labels amacrine cells in the rat retina (189, 253). The immunoreactive pattern observed in the present study was similar to that which has previously been reported (254).

The mouse monoclonal antibody against Brn-3a labels only retinal ganglion cells in the retinas of several species (255-257). According to the manufacturer, this antibody detects a 46-kDa band, does not recognize Brn-3b or Brn-3c, and does not label tissue from Brn-3a knockout mice. Brn-3a expression has been shown in the rat retina (189, 258). Brn-3a labels the vast majority of ganglion cells but does not label intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) (259).

The expression of glutamine synthetase (GS) in Müller cells has been demonstrated, and it has been established that the mouse monoclonal anti-GS labels a single 45-kDa band in adult rat retinal tissue (260). The labeling obtained with this antibody was comparable to that published elsewhere (261, 262).

The rabbit polyclonal antibody against the C-terminal binding protein 2 (CtBP2) recognizes ribbons in mammalian retina and produces a distinctive immunoreactivity pattern of horseshoe-shaped synaptic ribbons in the outer nuclear layer (OPL) and dense punctae in the inner plexiform layer (IPL). The antiserum recognizes a 110-120-kDa protein band and a 50-kDa protein band (263), and has been tested in the rat retina (264).

The mouse monoclonal antibody to postsynaptic density protein 95 (PSD-95) detects a single band at approximately 100 kDa, which corresponds to the apparent molecular weight of PSD-95 on SDS-PAGE immunoblots from rat, mouse and bovine brains (manufacturer's data sheet). The antibody also detects a minor band at approximately 75 kDa on western blots of mouse and rat brain extracts (manufacturer's data sheet). In the rat retina, PSD-95 immunoreactivity is localized to photoreceptor terminals (265, 266).

The rabbit polyclonal antibody against vesicular glutamate transporter 1 (VGlut1) was raised against a fusion protein containing amino acid residues 456-560 of rat VGlut1. This antibody recognizes a single 60-kDa band on western blots from the synaptic vesicle fraction of rat brains (267). VGlut1 immunoreactivity is visible in photoreceptor and bipolar cell terminals of the rat retina (268, 269).

The mouse monoclonal antibody against microtubule-associated protein 2 (MAP2) recognizes a single 220-kDa band of rat brain (manufacturer's data sheet)

and specifically labels cell bodies and processes of ganglion cells in the rat retina (270, 271).

The mouse monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was chosen as a progenitor cell marker because it provides the least false positive and negative immunolabeling of progenitor cells in the retina (272). This antibody has been shown to label progenitor cell in the rat retina (189, 273). The specificity of this antibody has been fully characterized, and it recognizes a single band at 36 kDa (274-276).

### **Confocal microscopy**

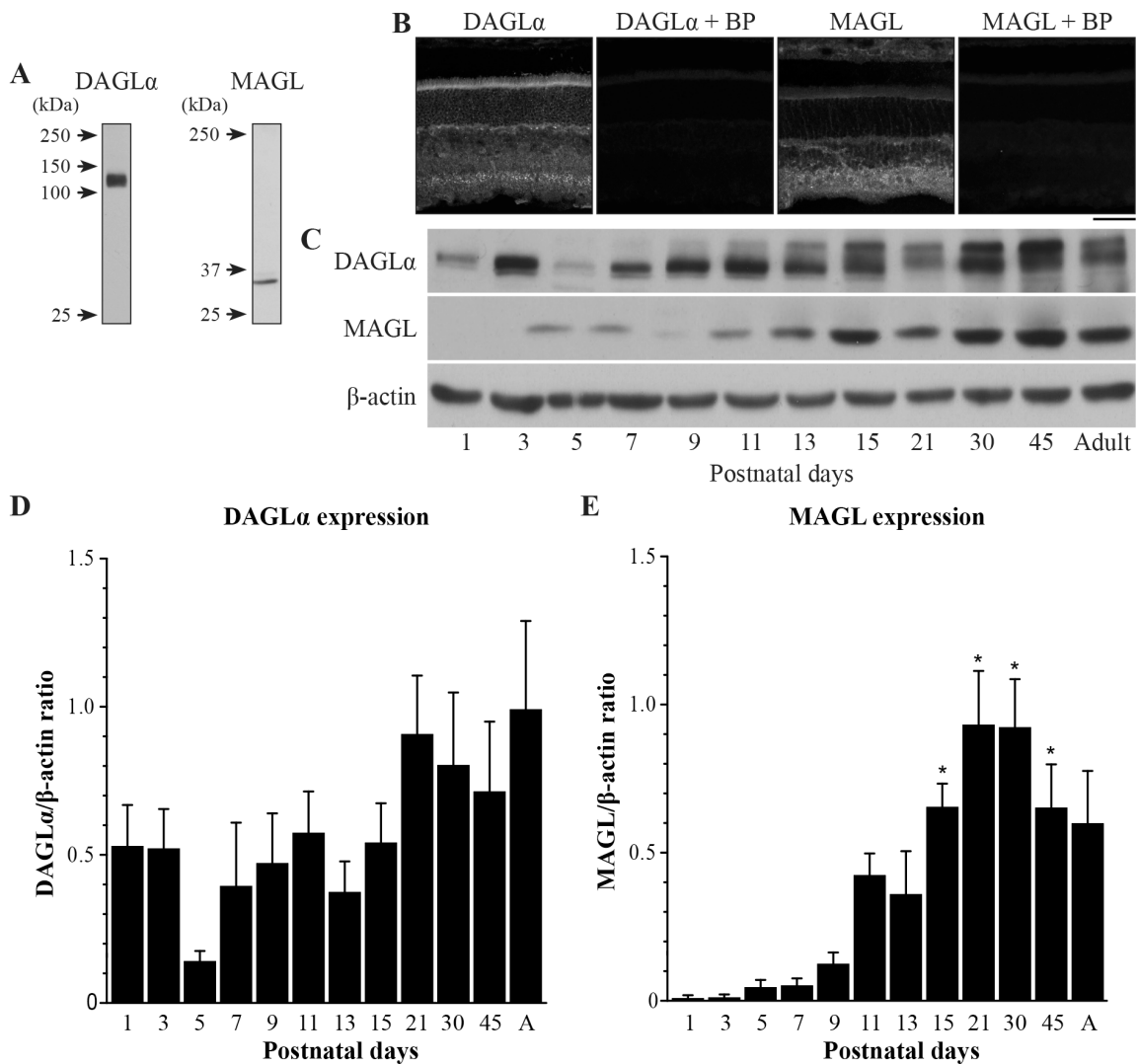
Images of the central retina (within 200  $\mu\text{m}$  of the optic nerve head) were taken using a laser scanning confocal microscope (TCS SP2, Leica Microsystems) with 40X (NA: 1.25) or 100X (NA: 1.40) oil immersion objectives and 488 and 633nm lasers. Image stacks (1,024 x 1,024 pixels x 0.5  $\mu\text{m}$  per stack) were captured with a frame average of 3 using the LCS software (version 2.6.1; Leica Microsystems). Offline processing was performed with the Fiji software (version 1.47g) (277). The stack images were taken sequentially and in distant wavelengths to ensure no “bleed-through” between channels. All images in which labeling intensities were compared were obtained under identical conditions of gain intensity. The Gaussian noise from the images was partially removed using the PureDenoise plugin for Fiji (278), and the stacks were collapsed into projection images. Because gray scale photographs provide better contrast and more detail, individual channels are presented in gray scale, and the merged images are presented in color.

## **3.4- Results**

### **Western blot analysis**

The temporal patterns of expression of two elements of the eCB system in the retina were investigated by evaluating the total amounts of DAGL $\alpha$  and MAGL at various postnatal time points from P1 to adulthood. Representative examples of each enzyme are presented in Figure 3.1C. The lower blot displays the protein content of

$\beta$ -actin and demonstrates equal loading in all lanes. The averaged ratios of the optical densities are presented in Figure 3.1D and E, respectively. These proteins varied across development and exhibited different patterns. The DAGL $\alpha$  protein content was fairly stable from P1 to adulthood (no significant differences compared to P1, one-way ANOVA, Bonferroni post hoc-test,  $p < 0.05$ ). In contrast, the amounts of MAGL protein were very low from P1 to P13, and then increased from P15 until P45 (P15, 21, 30 and 45 were all significantly different from P1 to P7, one-way ANOVA, Bonferroni post hoc-test,  $p < 0.05$ ).

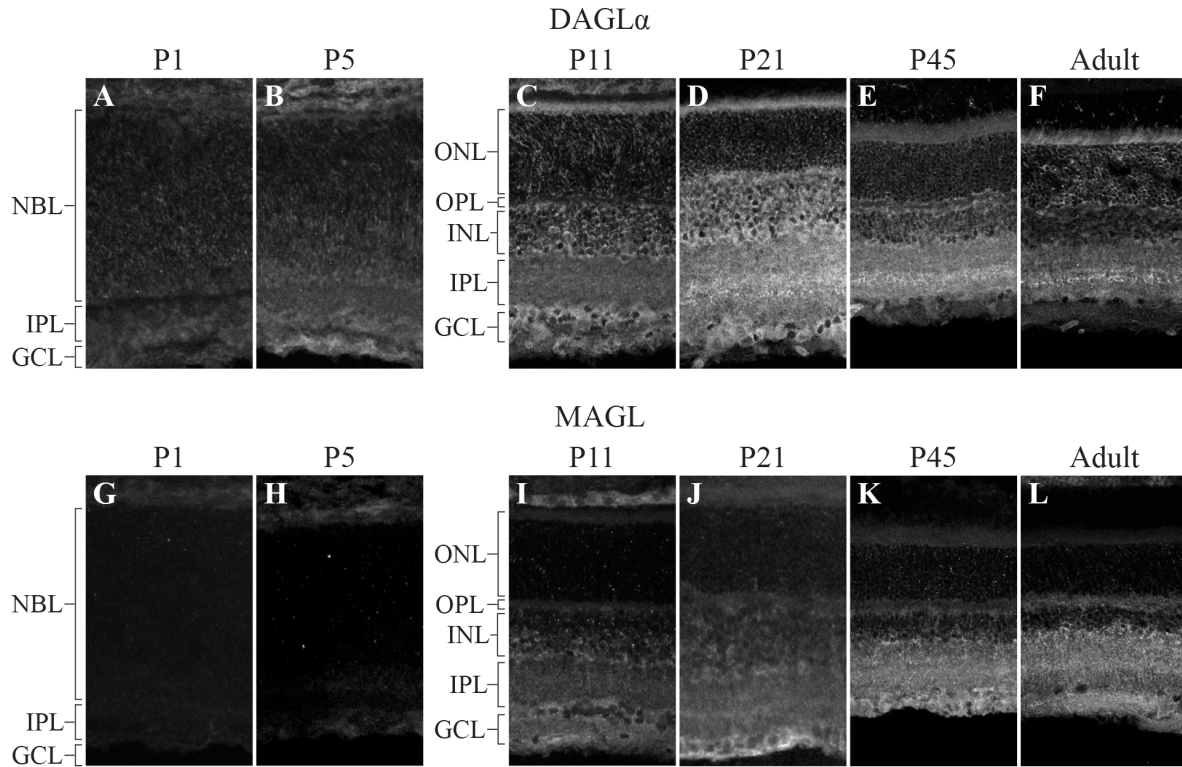


**Figure 3.1** Temporal patterns of protein contents of DAGL $\alpha$  and MAGL during retinal development.

A) Characterization of the antibodies used against DAGL $\alpha$  and MAGL in the adult rat retina. Specific bands were seen at approximately 120 and 33-kDa for DAGL $\alpha$  and MAGL respectively. B) DAGL $\alpha$  and MAGL expression in the adult rat retina in the presence or not of their respective blocking peptide (BP). Scale bar = 50  $\mu$ m. C) Representative examples of DAGL $\alpha$  and MAGL protein content during retinal development. D-E) Average variations of DAGL $\alpha$  and MAGL during retinal postnatal development and maturation as measured by western blot analysis. Retinas were collected from rats between P1 and adulthood. The quantifications were performed on seven different sets of samples and mean optical density ratios  $\pm$  SEM are presented for each age group. The statistical differences were assessed using a one-way ANOVA, Bonferroni post hoc-test. \*, Significant change compared to P1 ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry

DAGL $\alpha$  was present in the neuroblast, inner plexiform and ganglion cell layers (NBL, IPL and GCL, respectively; Fig 3.2A) at P1. By P5, DAGL $\alpha$  immunoreactivity was largely upregulated, as indicated by the increased fluorescence exhibited by immunopositive cells compared to P1 (Fig 3.2B), which was present primarily in the GCL and in the inner nuclear layer (INL). At P11, DAGL $\alpha$  immunoreactivity was visible in the outer nuclear layer (ONL), the outer plexiform layer (OPL), INL, IPL and GCL (Fig 3.2C). At P21, DAGL $\alpha$  localization remained similar (Fig 3.2D). This spatial profile was maintained over the following weeks (Fig 3.2E) until adulthood (Fig 3.2F) with increased fluorescence in the IPL. MAGL was not detectable in any neural layers of the retina at P1, but was weakly expressed exclusively in the retinal pigment epithelium (RPE) (Fig 3.2G). At P5, MAGL immunoreactivity was barely visible in the RPE, the IPL and the GCL (Fig 3.2H). At P11, MAGL was present in the RPE, OPL, INL, IPL and GCL (Fig 3.2I). This expression pattern remained unchanged at P21, with the exception that MAGL was no longer present in the RPE (Fig 3.2J) over the following weeks (Fig 3.2K) until adulthood (Fig 3.2L).





**Figure 3.2** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in the developing rat retina.

A-L: DAGL $\alpha$  (A-F) and MAGL (G-L) protein expressions were obtained with vertical sections from P1, P5, P11, P21, P45 and adult retinas. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; NBL, neuroblast layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bar = 50  $\mu$ m.

## Cellular distribution of DAGL $\alpha$ and MAGL

### Cone photoreceptors

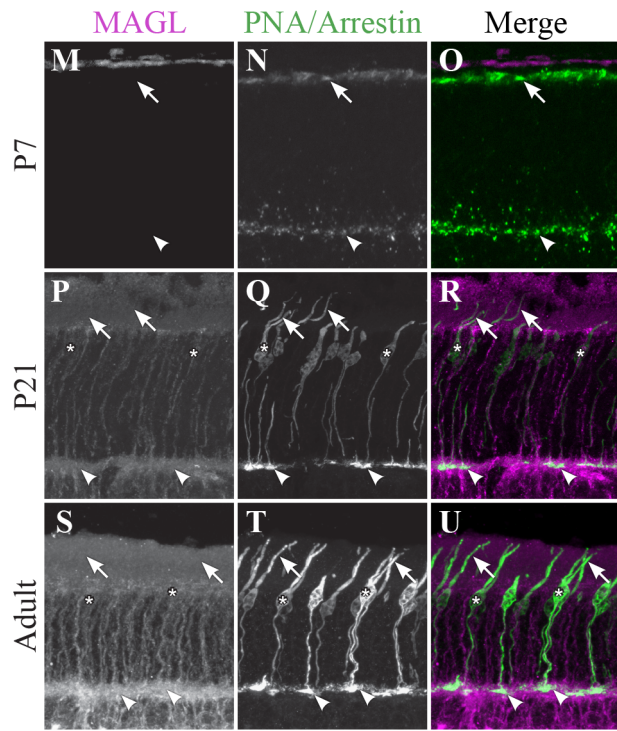
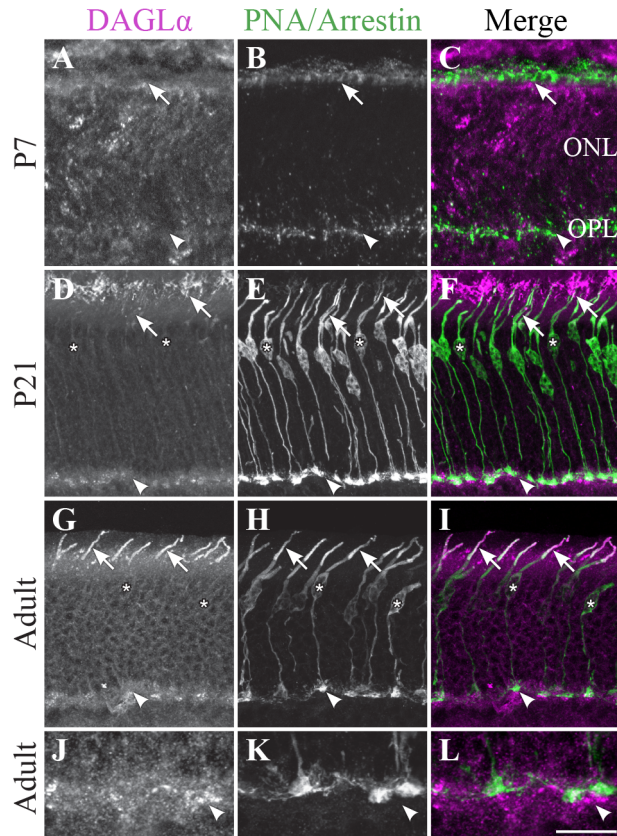
#### DAGL $\alpha$

Cones constitute the last class of early-born neurons to be generated (216). From P1 until P7, DAGL $\alpha$  was present in the outer segments but not in the pedicles of the cones (Fig 3.3A-C). By P21, the majority of cones reach their final position in the ONL, and they intensely expressed DAGL $\alpha$  in all of their cellular compartments except the cone pedicles (Fig 3.3D-F). Over the following weeks, DAGL $\alpha$  expression

remained elevated in the outer and inner segments until the animal reached adulthood (Fig 3.3G-I). However, DAGL $\alpha$  was not expressed in the pedicles of the cones, but did seem to be present postsynaptically to these pedicles (Fig 3.3J-L).

### **MAGL**

MAGL was not detectable in cone photoreceptors during retinal development in any of the cone cellular compartments (Fig 3.3M-U). MAGL expression in the ONL was exclusively localized to Müller cells (a detailed localization is presented in Figure 3.10).



**Figure 3.3** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in cone photoreceptors.

A-U: confocal micrographs of P7, P21 and adult rat retinas co-labeled for DAGL $\alpha$  (A-L) or MAGL (M-U) and the cell-type specific marker for cone photoreceptors, PNA (for P7) or cone-arrestin (for P21 and adult). Each protein is presented alone in gray scale: DAGL $\alpha$  or MAGL in the first column and PNA/cone-arrestin in the second; then the two are presented merged in the third column (DAGL $\alpha$  or MAGL in magenta and PNA/cone-arrestin in green). DAGL $\alpha$  is localized in the outer (arrows) and inner segments of cones, as well as the cell body (stars) but not the synaptic pedicle (arrowheads). MAGL is not detectable in any parts of the cone photoreceptors. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

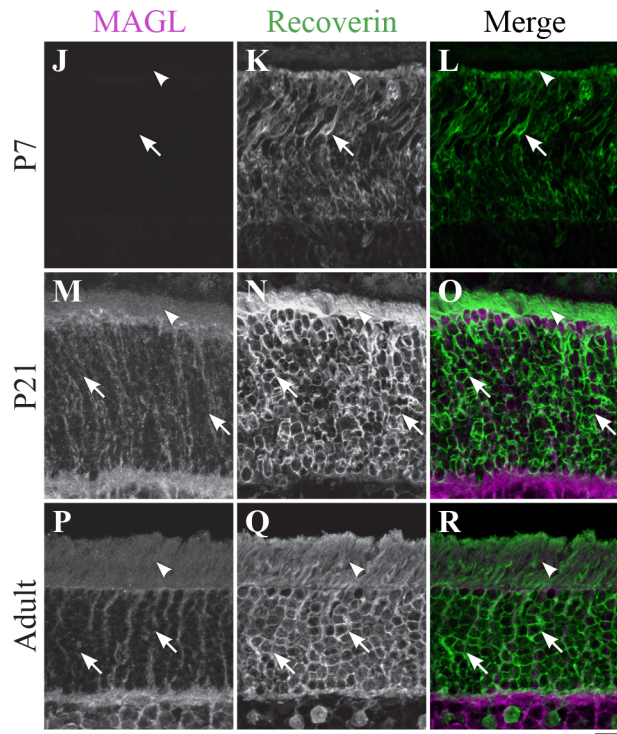
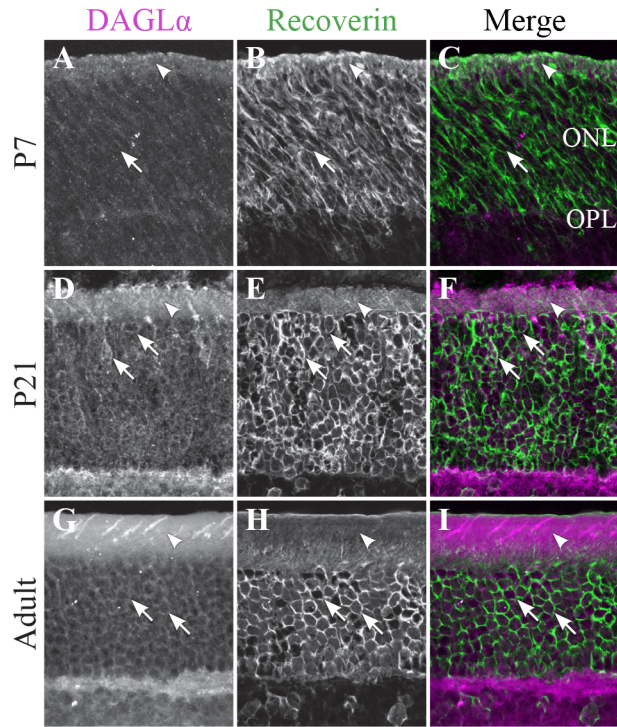
**Rod photoreceptors**

**DAGL $\alpha$**

Rods compose the vast majority of photoreceptors in the rat retina. In this study, the rods were discriminated from cones on the basis of their morphology. Starting from P1, DAGL $\alpha$  was expressed in somas of rods and in their inner and outer segments (Fig 3.4A-C). This expression remained constant through the second to the end of the third week of life (Fig 3.4D-F) and into adulthood (Fig 3.4G-I).

**MAGL**

MAGL was not detectable in any of the rod cellular compartments (Fig 3.4J-R). The immunoreactivity visible in the ONL was localized to Müller cells (Figure 3.10).



**Figure 3.4** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in rod photoreceptors.

A-R: confocal micrographs of P7, P21 and adult rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-I) or MAGL (J-R) and the cell-type marker for photoreceptors, recoverin. DAGL $\alpha$  is localized in the outer (arrowheads) and inner segments of the rods (arrows). MAGL is not detectable in any part of the rod photoreceptors. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

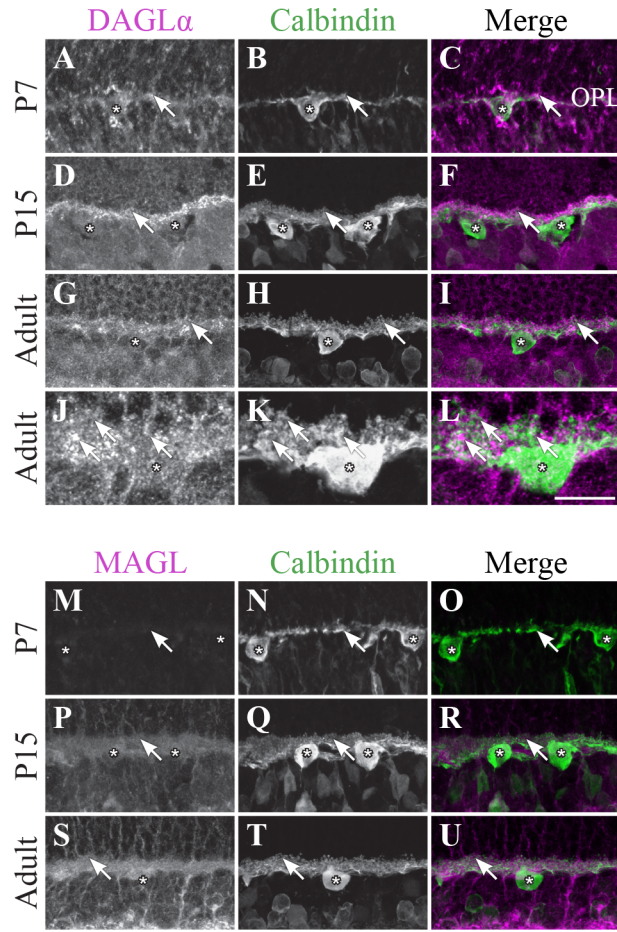
## **Horizontal cells**

### **DAGL $\alpha$**

Starting from P1 and until P7, DAGL $\alpha$  expression was observed in the dendritic terminals of the horizontal cells (Fig 3.5A-C). This expression remained constant during the second and third weeks of life (Fig 3.5D-F), and until adulthood (Fig 3.5G-L).

### **MAGL**

MAGL was not detectable in the OPL from P1 to P7 (Fig 3.5M-O). Starting from P11 and through to P45, light expression of MAGL was visible in the OPL but not in the horizontal cells (Fig 3.5P-R). This expression pattern was conserved in adulthood (Fig 3.5S-U).



**Figure 3.5** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in horizontal cells.

A-U: confocal micrographs of P7, P15 and adult rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-L) or MAGL (M-U) and the cell-type specific marker for horizontal cells, calbindin. DAGL $\alpha$  is present in the dendritic terminals (arrows) but not in the cell bodies of the horizontal cells (stars). MAGL is not detectable in any part of the horizontal cells. OPL, outer plexiform layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

### Cone bipolar cells

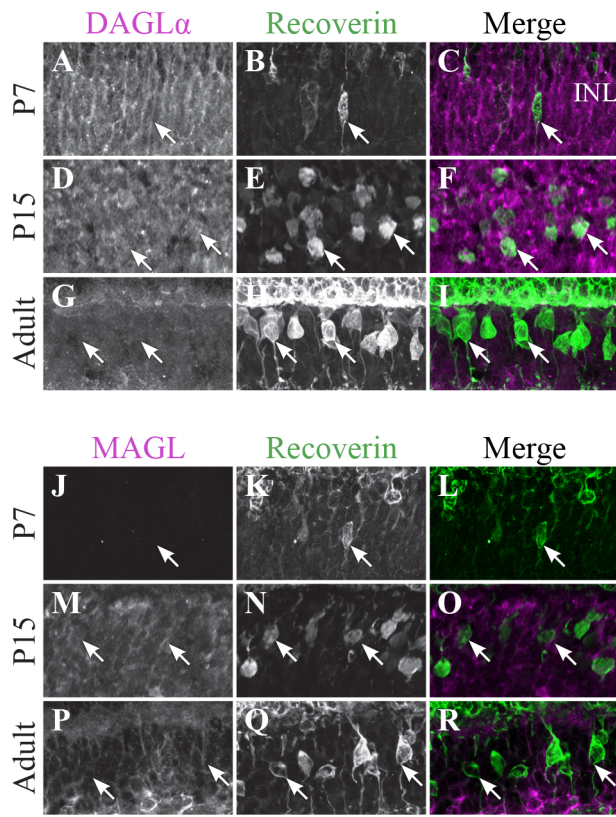
#### DAGL $\alpha$

Recoverin was also used as a marker to investigate DAGL $\alpha$  and MAGL expression in type 2 and 8 cone bipolar cells. This marker is present in type 2 OFF and type 8 ON cone bipolar cells. At P7, no recoverin-positive neurons expressed

DAGL $\alpha$  (Fig 3.6A-C). The labeling of the somas remained the same from P15 (Fig 3.6D-F) to adulthood (Fig 3.6G-I), and neither type 2 nor 8 cone bipolar cells expressed DAGL $\alpha$ .

### MAGL

MAGL was not detectable in recoverin neurons at P7 (Fig 3.6J-L). By P15, MAGL was still absent from cone bipolar cells (Fig 3.6M-O). MAGL remained undetectable in recoverin neurons by adulthood (Fig 3.6P-R).



**Figure 3.6** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in type 2 and 8 cone bipolar cells. A-R: confocal micrographs of P7, P15 and adult rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-I) or MAGL (J-R) and the cell-type marker for type 2 and 8 cone bipolar cells, recoverin. DAGL $\alpha$  is not expressed in the cell bodies (arrows) of type 2 or 8



cone bipolar cells. MAGL is not detectable in type 2 or 8 cone bipolar cells. INL, inner nuclear layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

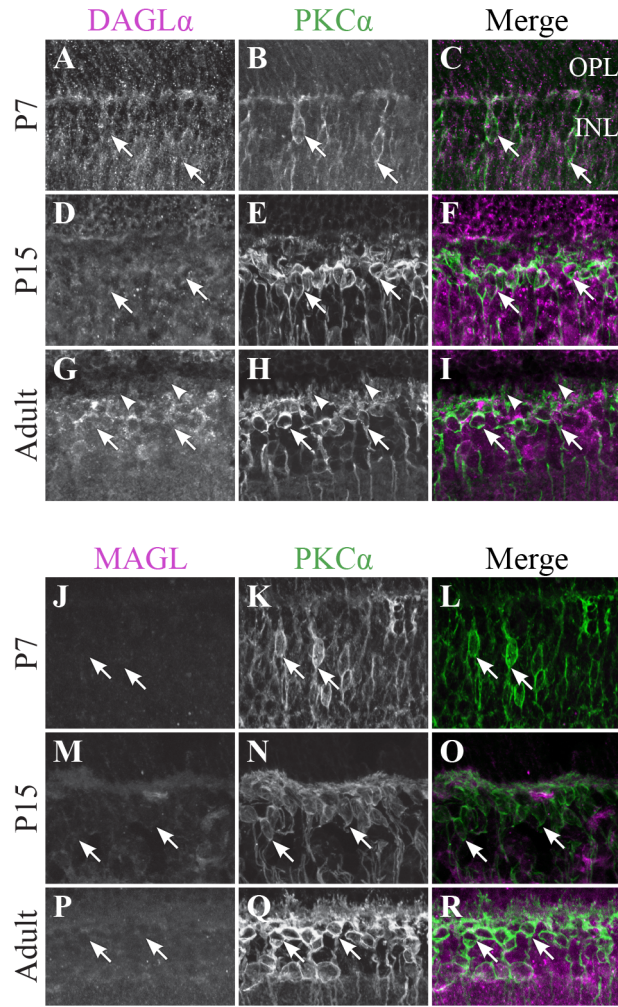
## **Rod bipolar cells**

### **DAGL $\alpha$**

Before P7, the majority of PKC-positive cells were either rod bipolar cells or amacrine cells. These cells could not be differentiated because most rod bipolar cells have not yet reached their final location at this stage. At P7, when the differentiation of the cells became clearer, DAGL $\alpha$  was absent from the somas of the rod bipolar cells (Fig 3.7A-C). The DAGL $\alpha$  signal remained similar at P15 (Fig 3.7D-F) and through adulthood (Fig 3.7G-I). Moreover, DAGL $\alpha$  was not expressed in the dendritic connections of rod bipolar cells.

### **MAGL**

MAGL was not detectable in PKC neurons at P7 (Fig 3.7J-L). By P15, MAGL was still absent from rod bipolar cells (Fig 3.7M-O). This protein expression pattern continued into adulthood (Fig 3.7P-R).



**Figure 3.7** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in rod bipolar cells.

A-R: confocal micrographs of P7, P15 and adult rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-I) or MAGL (J-R) and the cell-type specific marker for the rod bipolar cells, PKC $\alpha$ . DAGL $\alpha$  and MAGL are not detectable in the cell bodies (arrows) or dendritic connections of the rod bipolar cells. OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

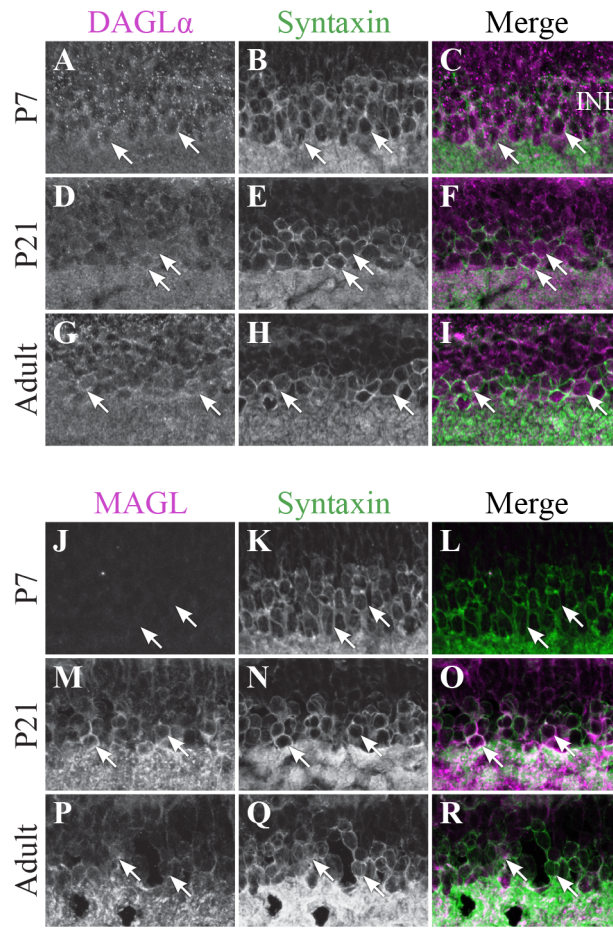
## Amacrine cells

### DAGL $\alpha$

DAGL $\alpha$  was expressed in amacrine cells during the first week of life (Fig 3.8A-C). All amacrine cells expressed DAGL $\alpha$  at P21 (Fig 3.8D-F) and through adulthood (Fig 3.8G-I).

### MAGL

MAGL was not detectable in amacrine cells at P7 (Fig 3.8J-L), but an upregulation occurred from P11 (data not shown) and was also present at P21 (Fig 3.8M-O). MAGL was still expressed in amacrine cells in the adult animals (Fig 3.8P-R).



**Figure 3.8** Expression of DAGL $\alpha$  and MAGL in amacrine cells.

A-R: confocal micrographs of P7, P21 and adult rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-I) or MAGL (J-R) and the cell-type specific marker for the amacrine cells, syntaxin. DAGL $\alpha$  is localized in the cell bodies (arrows) of the amacrine cells from P1 to the adult age while MAGL is not detectable in these cells until P11. It is then expressed in the amacrine cells into adulthood. INL, inner nuclear layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

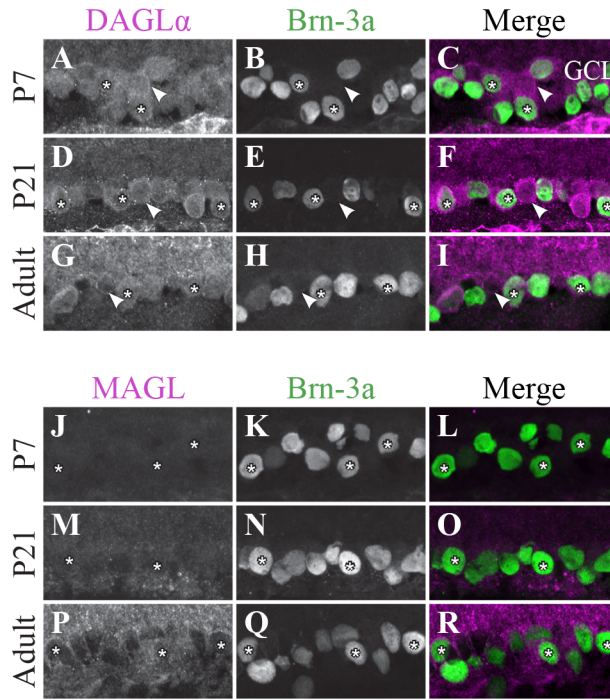
**Ganglion cells**

**DAGL $\alpha$**

The spatial organization of DAGL $\alpha$  localization in ganglion cells did not vary with time. Examples of this expression are shown in Figure 3.9A-I. As expected, a decrease in the number of ganglion cells with age was observed. Moreover, GCL cells other than RGCs were also immunopositive; these cells might have been displaced amacrine cells or ipRGCs.

**MAGL**

At around P7, there was light expression of MAGL in the GCL but not in the ganglion cells (Fig 3.9J-L). From P21 to adulthood, the MAGL immunoreactivity intensity was elevated in the GCL but remained unobservable in the ganglion cells (Fig 3.9M-R).



**Figure 3.9** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in ganglion cells.

A-R: confocal micrographs of P7, P21 and adult rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-I) or MAGL (J-R) and the cell-type specific marker for the ganglion cells, Brn-3a. DAGL $\alpha$  is localized in the cell bodies (stars) of the ganglion cells as well as in displaced amacrine cells or intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) (arrowheads) from P1 to the adult age. MAGL is not detectable in the ganglion cells. GCL, ganglion cell layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

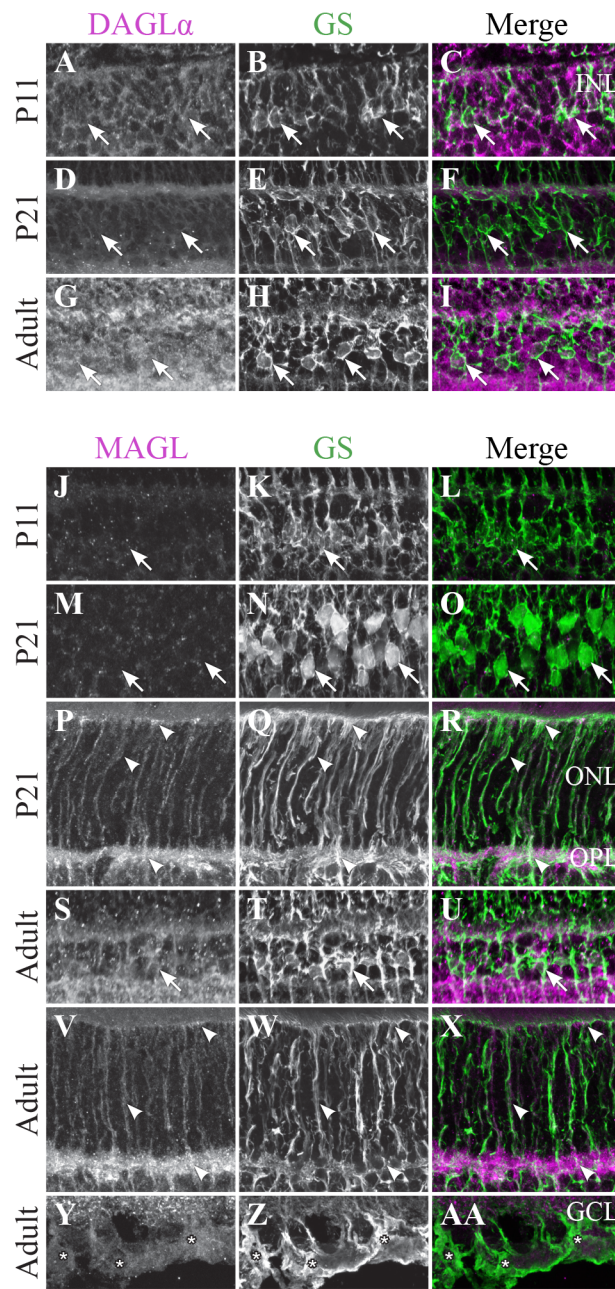
## Müller cells

### DAGL $\alpha$

Müller cells are generated late in development and begin to express GS at around P5. However, they are not clearly distinguishable until P11 and did not express DAGL $\alpha$  in their cell bodies or processes (Fig 3.10A-C). DAGL $\alpha$  was still undetectable in Müller cells from P21 (Fig 3.10D-F) to adulthood (Fig 3.10G-I).

## MAGL

MAGL was expressed in the processes but not in the cell bodies of the Müller cells at P11 (Fig 3.10J-L). From P21, MAGL was present in the outer processes of Müller cells but remained absent from their cell bodies (Fig 3.10M-R). In adulthood, MAGL was expressed in the outer and inner processes of Müller cells but not in their cell bodies (Fig 3.10S-AA).



**Figure 3.10** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in Müller cells.

A-AA: confocal micrographs of P11, P21 and adult rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-I) or MAGL (J-AA) and the cell-type specific marker for the Müller cells, glutamine synthetase (GS). DAGL $\alpha$  is not expressed in the cell bodies (arrows), or any part of the Müller cells. MAGL is not detectable in the cell bodies of the Müller cells (J-O, S-U). MAGL is localized in the outer (P-R, V-X) and inner (Y-AA) processes of the Müller cells from P11 to the adult age. INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

**Outer plexiform layer**

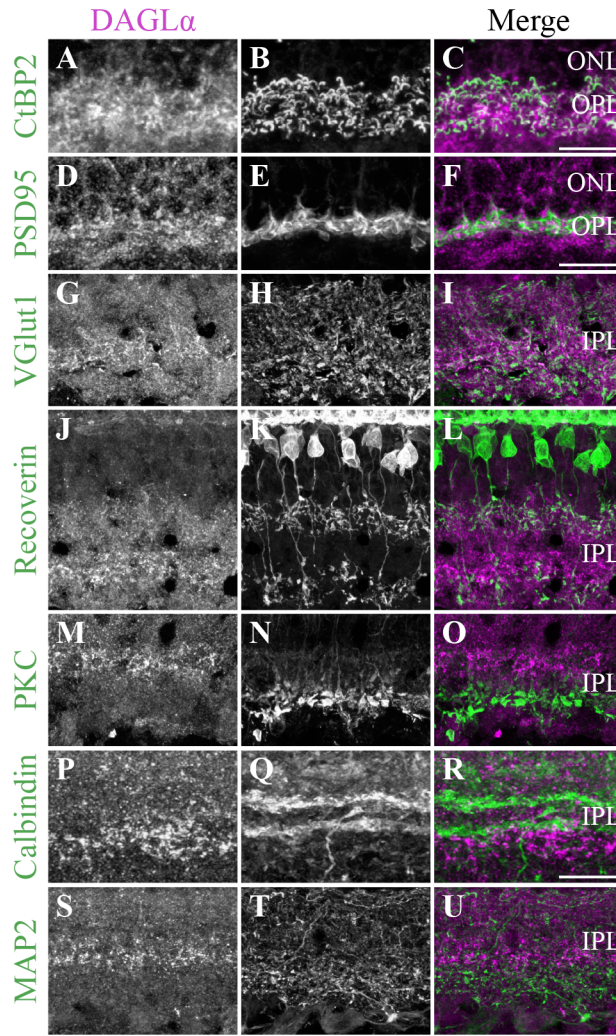
**DAGL $\alpha$**

In the previous paragraphs, DAGL $\alpha$  was shown to be located in the OPL, specifically in the dendritic terminals of the horizontal cells (Fig 3.5A-L) and not in the pedicles of the cones (Fig 3.3J-L) or the dendritic connections of the rod bipolar cells (Fig 3.7G-I). We carefully examined whether this OPL labeling was exclusive to the horizontal cells. From P7 to adulthood, DAGL $\alpha$  was also expressed in the cytoplasm of the photoreceptor terminals (Fig 3.11A-F).

**Inner plexiform layer**

**DAGL $\alpha$**

During development, strong DAGL $\alpha$  labeling was visible in the IPL. The antibody VGlut1 revealed the presence of DAGL $\alpha$  in the axon terminals of the bipolar cells (Fig 3.11G-I). Using the antibody recoverin, we determined that DAGL $\alpha$  was not expressed in the axon terminals of the type 2 or 8 cone bipolar cells (Fig 3.11J-L). The antibody PKC $\alpha$  revealed that DAGL $\alpha$  was not present in the axon terminals of the rod bipolar cells (Fig 3.11M-O). Finally, the antibodies calbindin and MAP2 confirmed that DAGL $\alpha$  was absent from the dendrites of the amacrine (Fig 3.11P-R) and ganglion cells (Fig 3.11S-U), respectively.



**Figure 3.11** DAGL $\alpha$  immunoreactivity in the outer and inner plexiform layers.

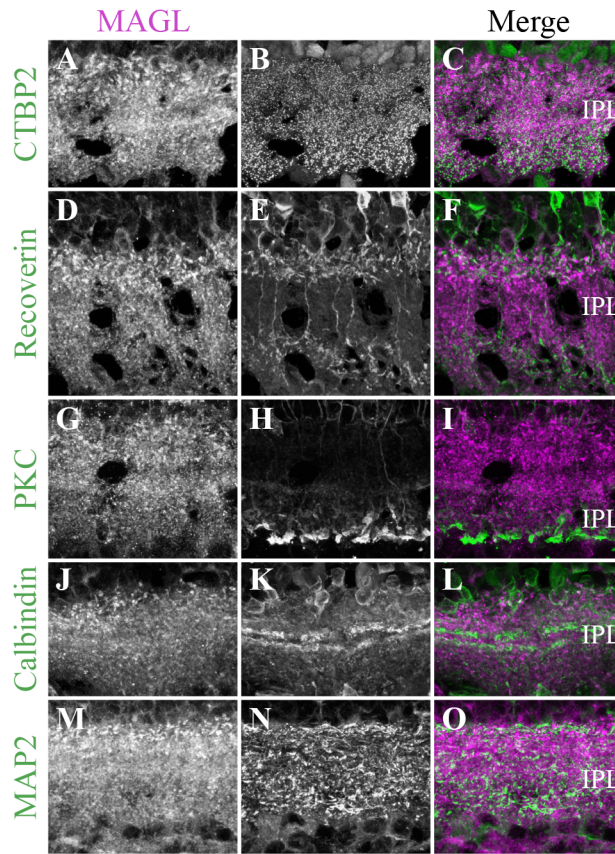
A-U: confocal micrographs of adult retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  and several markers for photoreceptor synaptic ribbons (CtBP2), photoreceptor terminals (PSD95), axon terminals of the bipolar cells (VGlut1), axon terminals of type 2 and 8 cone bipolar cells (recoverin), axon terminals of rod bipolar cells (PKC $\alpha$ ), dendrites of amacrine cells (calbindin) or dendrites of ganglion cells (MAP2). DAGL $\alpha$  is localized in the synaptic terminals of the photoreceptors (A-F), and in the axon terminals of the bipolar cells (G-I). However, DAGL $\alpha$  is not expressed in the axon terminals of type 2 and 8 cone bipolar cells (J-L) or rod bipolar cells (M-O). DAGL $\alpha$  is not expressed in



the dendrites of amacrine (P-R) or ganglion cells (S-U). ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; IPL, inner plexiform layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

### MAGL

From P21 to adulthood, a MAGL labeling was visible in the IPL. The antibody CtBP2 revealed the presence of MAGL in the axon terminals of bipolar cells (Fig 3.12A-C). We then determined that MAGL appeared to be present in the axon terminals of the type 2 OFF but not in the type 8 ON cone bipolar cells (Fig 3.12D-F). The antibody PKC $\alpha$  revealed that MAGL was not present in the axon terminals of the rod bipolar cells (Fig 3.12G-I). Finally, the antibodies calbindin and MAP2 confirmed that MAGL was not expressed in the dendrites of the amacrine (Fig 3.12J-L) or ganglion cells (Fig 3.12M-O).



**Figure 3.12** MAGL immunoreactivity in the inner plexiform layer.

A-L: confocal micrographs of adult retinas co-immunolabeled for MAGL and several markers for axon terminals of bipolar cells (CtBP2), axon terminals of type 2 and 8 cone bipolar cells (recoverin), axon terminals of rod bipolar cells (PKC $\alpha$ ) or dendrites of ganglion cells (MAP2). MAGL is localized in the axon terminals of bipolar cells (A-C), but not in the axon terminals of type 2 and 8 cone bipolar cells (D-F) or rod bipolar cells (G-I). MAGL is not expressed in the dendrites of amacrine (J-L) or ganglion cells (M-O). IPL, inner plexiform layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

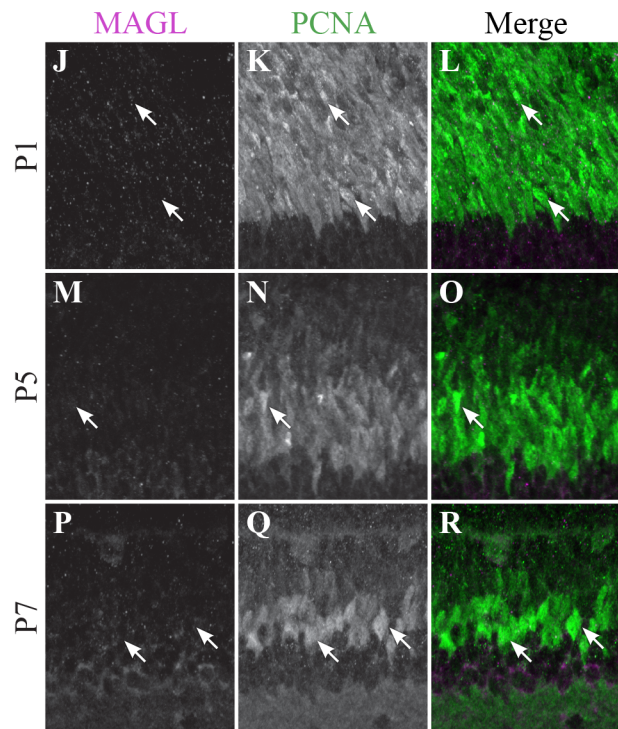
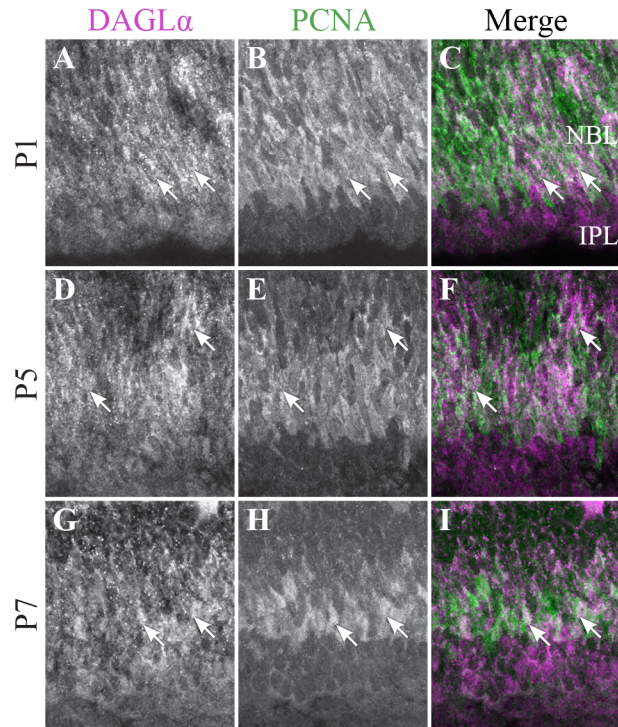
### **Progenitor cells**

#### **DAGL $\alpha$**

At P1, the progenitor cells were DAGL $\alpha$ -positive (Fig 3.13A-C), and the same pattern of expression was visible at P5 (Fig 3.13D-F) and P7 (Fig 3.13G-I).

#### **MAGL**

MAGL was not detectable in the progenitor cells at P1 (Fig 3.13J-L), and this pattern remained unchanged at P5 and P7 (Fig 3.13M-R).



**Figure 3.13** DAGL $\alpha$  and MAGL immunoreactivity in progenitor cells.

A-R: confocal micrographs of P1, P5 and P7 rat retinas co-immunolabeled for DAGL $\alpha$  (A-I) or MAGL (J-R) and the cell-type specific marker for the progenitor cells, PCNA. DAGL $\alpha$  is localized in the cell bodies (arrows) of progenitor cells from P1 to P7, while MAGL is not detectable in them. NBL, neuroblast layer; IPL, inner plexiform layer. Scale bar = 10  $\mu$ m.

### **Comparison of the temporal and spatial profiles of DAGL $\alpha$ and MAGL protein localization**

The timelines of DAGL $\alpha$  and MAGL localization in all of the retinal cells studied are shown in Figure 3.14A. These timelines were constructed based on detailed analyses of the expressions of both proteins in each cell type. From this figure, it can be seen that, during the first week of life, DAGL $\alpha$  was highly expressed in every cell type, while MAGL was not present in any of these cells. From P11, the two proteins were only co-expressed in amacrine cells. MAGL was present in the Müller cells from P11, while DAGL $\alpha$  was never expressed in these cells. In the adult retina, DAGL $\alpha$  and MAGL were only co-expressed in the amacrine cells. Hypothetical mechanisms of 2-AG action during postnatal development (P1) and on the retinal synapses of adult animals are presented in Figure 3.14B and C, respectively.



**Figure 3.14** Comparison of DAGL $\alpha$  and MAGL retinal localization.

A: summary of the retinal localization of DAGL $\alpha$  (black bars) and MAGL (grey bars) over the postnatal development. B: schematic illustration representing the localization and the hypothetical mechanism of action on synapses in the adult rat retina. The hydrolysis of membrane phospholipids into diacylglycerol (DAG) by phospholipase C (PLC) is promoted by the activation of G $_{q/11}$  –coupled metabotropic receptors (mGluR) and/or by intracellular Ca $^{2+}$  elevation. DAG is then converted into 2-AG by DAGL $\alpha$ . 2-AG can bind to CB1R and/or CB2R present on retinal cells. 2-AG is later catabolized to arachidonic acid (AA) and glycerol by the enzyme MAGL present in the Müller cells. The panel B is partly based on results from Zabouri et al. (2011a) and Cécyre et al. (2013).

### 3.5- Discussion

This study is the first to investigate the protein localization of DAGL $\alpha$  and MAGL, which are two key enzymes of the eCB system, during the postnatal development of the retina. Using immunohistological labeling and immunoblots, we showed that the protein content of DAGL $\alpha$  remains constant after birth, while that of MAGL varies during postnatal development and the maturation of the rat retina. Our data provide evidence of the early and widespread presence of DAGL $\alpha$ .

#### Temporal expression of DAGL $\alpha$ and MAGL

We observed that the amount of DAGL $\alpha$  protein was constant during retinal development. These results are in agreement with previous reports that have suggested that DAGL $\alpha$  protein levels remain stable during brain development (for review, see Anavi-Goffer et Mulder (98)). Conversely, the MAGL protein content was low from P1 to P13 and subsequently gradually increased from P15 to P45. Based on these results, we hypothesize that 2-AG levels are elevated from birth to P13 and are then regularized from P15 to adulthood. Hence, these results are in accordance with

those of previous reports that have shown rapid increases in 2-AG levels immediately after the birth that are followed by stabilization during postnatal development (96, 97).

## **Cellular localization of DAGL $\alpha$ and MAGL**

### **Cellular localization of DAGL $\alpha$**

DAGL $\alpha$  was present in the majority of early-born neurons as early as P1. This finding is in accordance with previous reports that have shown that DAGL $\alpha$  is expressed in the rostral migratory stream of young mice (279). Hence, in the adult, we showed that DAGL $\alpha$  was present in cone and rod photoreceptors, horizontal cell processes, some cone bipolar cell axon terminals, amacrine cells, and ganglion cells. This expression pattern contrasts with that previously described for the mouse retina (183) in which DAGL $\alpha$  is present in postsynaptic terminals of type 1 OFF cone bipolar cells and is widely and diffusely distributed in the IPL. However, these findings are not in complete opposition with ours because we noted strong labeling in the OPL, which might correspond to the dendritic connections of cone bipolar cells, and in the IPL. This difference might be attributable to species differences in DAGL $\alpha$  expression between rats and mice.

### **DAGL $\alpha$ localization in the OPL**

DAGL $\alpha$  was intensely expressed in the OPL; it was expressed in photoreceptor terminals but not in cone pedicles. Logically, these findings indicate that DAGL $\alpha$  is expressed in rod photoreceptors terminals. Moreover, we also demonstrated that DAGL $\alpha$  is expressed in the processes of horizontal cells but not in the dendritic connections of rod bipolar cells. We were unable to verify the presence of DAGL $\alpha$  in the dendritic connections of cone bipolar cells. Therefore, in the OPL, DAGL $\alpha$  is present in rod photoreceptors terminals, horizontal cell processes and possibly in the dendritic connections of cone bipolar cells.

### **DAGL $\alpha$ localization in the IPL**

DAGL $\alpha$  is also intensely expressed in the IPL. We showed that DAGL $\alpha$  was not expressed in the dendrites of amacrine or ganglion cells. We also determined that DAGL $\alpha$  was present in the axon terminals of bipolar cells, but these connections were not from type 2 or 8 cone bipolar cells or rod bipolar cells. Comparisons of the shapes and positions of DAGL $\alpha$  labeling to those of the axon terminals of type 2 and 8 cone bipolar cells, as shown in Figure 3.11J-L, allowed for a hypothesis about the cell types in which DAGL $\alpha$  was present. Based on Figure 8 of Ghosh, Bujan (131), which shows the stratification of each type of bipolar cell in the rat retina, we propose that DAGL $\alpha$  is expressed in the axon terminals of type 6 and/or 7 ON cone bipolar cells.

### **Cellular localization of MAGL**

MAGL was minimally expressed in the retina until P11. At adulthood, MAGL was expressed in amacrine and Müller cells and in the axon terminals of type 2 cone bipolar cells. These results are, to some extent, in agreement with those of previous studies that have reported the presence of MAGL in the OPL (rod spherules and cone pedicles), IPL and GCL (183). We believe that the expression reported by Hu, Arnold (183) might reflect the presence of MAGL in Müller cells. Müller cell bodies sit in the INL and project processes in either direction to the outer and inner limiting membranes. Therefore, somata or processes of these cells are present in every retinal cell layer and might be responsible for the localization of MAGL reported by Hu, Arnold (183) in adult animals.

### **MAGL localization in the IPL**

MAGL was also intensely expressed in the IPL. MAGL was present in the axon terminals of type 2 OFF cone bipolar cells, but not in type 8 ON cone bipolar cells or in rod bipolar cells. However, MAGL was not restricted to type 2 cone bipolar cells. On the basis of the position of the MAGL expression in the IPL, we hypothesize that MAGL might be present in the axon terminals of type 3 or 4 OFF cone bipolar cells.



Additionally, we showed that MAGL was not detectable in the dendrites of amacrine or ganglion cells.

### **Functional considerations**

Because eCBs are lipophilic ligands that are released and degraded near their sites of action, one would predict that DAGL $\alpha$  and MAGL would have similar distributions. Obviously, DAGL $\alpha$  and MAGL do not share a similar distribution; DAGL $\alpha$  was expressed in nearly every retinal cell type, and MAGL was only expressed in amacrine and Müller cells. However, because Müller cells stretch radially across the thickness of the retina and insinuate themselves between the cell bodies of neurons in the nuclear layers and envelop groups of neural processes in the plexiform layers, DAGL $\alpha$  and MAGL are nearly co-expressed in every retinal cell layer.

DAGL $\alpha$  and MAGL are often near or in the same cell types as CB1R and CB2R. CB1R is present in cones, horizontal, bipolar, amacrine and ganglion cells in the developing rat retina (189). CB2R is present in cone and rod photoreceptors and horizontal, bipolar, amacrine and ganglion cells in the adult mouse retina (191). Taken together, these results suggest that, in the retina, eCBs, such as 2-AG, are expressed closely to cannabinoid receptors and might be implicated in the regulation of the maturation of the retina. Because eCBs are known to participate in developmental processes, such as neurogenesis, axon guidance and synaptogenesis, they might play an essential role in the structural and functional development of the retina.

The very low levels of protein content of MAGL in the retina from birth to P11 were surprising given the importance of MAGL in 2-AG hydrolysis. Because MAGL is responsible for approximately 85% of the hydrolysis of 2-AG, it is possible that the enzymes ABHD6 and ABHD12 mediate 2-AG hydrolysis in the first days of development when MAGL is absent.

In conclusion, this study revealed the presence of DAGL $\alpha$  and MAGL in the retinal cells of developing and adult rats. We propose that retinal 2-AG levels increase

from birth to P11 and are then regularized in adulthood. DAGL $\alpha$ , MAGL, CB1R and CB2R proteins are present in young and adult animals, which suggests that the eCB system might play an important role in the development and function of the retina.

### **Author contributions**

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: BC, CC, JFB. Acquisition of data: BC, MM, LB. Analysis and interpretation of data: BC, MM, LB, CC, JFB. Drafting of the manuscript: BC, CC, JFB. Statistical analysis: BC. Obtained funding: CC, JFB.

### **Acknowledgements**

We would like to thank the Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, Doheny Eye Institute and Dr. Cheryl M. Craft for generously supplying the antibody against cone arrestin. We also would like to thank Sébastien Thomas, Geneviève Cyr and Florence Dotigny for their excellent assistance. This work was supported in part by a CIHR (MOP 301710) to J.-F.B. and C.C. and by a NSERC grant (RGPIN-2014-06503) to C.C., a CIHR grant (MOP 177796) and a NSERC grant (311892-2010) to J.-F.B. B.C. is supported by a studentship from Réseau Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S), a studentship from École d'optométrie et Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal, a FRQ-S de recherche en santé de la vision studentship. J.-F.B. salary is supported in part by a Chercheur-Boursier Senior from the FRQ-S.

Antibody	Immunogen	Provenance	Dilution*	Host
DAGL $\alpha$	C-terminus 42 amino acids of mouse DAGL $\alpha$ (1003-1044 amino acid residues); affinity purified with antigen polypeptide	DGL $\alpha$ -Rb-Af380, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan	I: 1/200 W: 1/200	Rabbit
MAGL	N-terminus 35 amino acids of mouse MAGL (1-35 amino acid residues); affinity purified with antigen polypeptide	MGL-Rb-Af200, Frontier Institute	I: 1/200 W: 1/200	Rabbit
$\beta$ -actin	Modified $\beta$ -cytoplasmic actin N-terminal peptide (DDDIAALVIDNGSGK, conjugated to KLH)	A5316, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	W: 1/2,000	Mouse
Mouse cone-arrestin (LUMIj)	C-terminus of the mCAR protein, residues 369-381; affinity purified with the immunogen	Dr. Cheryl M. Craft, Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, Doheny Eye Institute, USC, Los Angeles, CA	I: 1/1000	Rabbit
Recoverin	Full-length recombinant human recoverin	AB5585, Millipore, Billerica, MA	I: 1/2,000	Rabbit
Calbindin	Recombinant rat calbindin D-28k full length	CB-38a, Swant, Bellinzona, Switzerland	I: 1/1,000	Rabbit
PKC $\alpha$	Synthetic peptide with the sequence DFEGFSYVNPQFVHPILQSSV from the human protein	Sc-8393, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	I: 1/500	Mouse
Syntaxin	Synaptosomal plasma fraction of rat hippocampus Sequence:	S0664, Sigma-Aldrich	I: 1/500	Mouse
Brn-3a	GGSAHPPHMHGLGHLSPAAAAAMNMPGSLPHPLVAA fused to the T7 gene 10 protein	MAB1585, Millipore	I: 1/100	Mouse
Glutamine synthetase (GS)	Full protein purified from sheep brain	MAB302, Millipore	I: 1/3,000	Mouse
CtBP2	Amino acids 431-445 of rat CtBP2 coupled to keyhole limpet hemocyanin via added N-terminal Cys-residue; affinity purified with the immunogen	193003, Synaptic Systems, Göttingen, Germany	I: 1/10,000	Rabbit
PSD95	Recombinant rat PSD-95	MAB1596, Millipore	I: 1/200	Mouse

VGlut1			Synthetic peptide representing amino acids 456-560 of rat vesicular glutamate transporters (VGlut1); affinity purified with the immunogen	135303, Synaptic Systems	I:	Rabbit
MAP2			Bovine microtubule-associated protein 2	M1406, Sigma-Aldrich	I: 1/500	Mouse
PCNA			Synthetic peptide with the sequence LVFEAPNQEK	M0879, Dako, Burlington, ON, Canada	I: 1/500	Mouse
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse			Mouse (used against PKC $\alpha$ , syntaxin, Brn-3a, GS, PSD95, MAP2 and PCNA)	A-21202, Molecular Probes, Eugene, OR	I: 1/500	Donkey
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit			Rabbit (used against mouse cone-arrestin, recoverin, calbindin, CtBP2 and VGlut1)	A-21206, Molecular Probes	I: 1/500	Donkey
Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit			Rabbit (used against DAGL $\alpha$ and MAGL)	A-31573, Molecular Probes	I: 1/500	Donkey
Alexa Fluor 647 donkey anti-goat			Goat (used against DAGL $\alpha$ and MAGL, for same hosts labeling)	A-21447, Molecular Probes	I: 1/500	Donkey
Peanut agglutinin (PNA)			No immunogen; binds to galactosyl (b-1,3) N-acetylgalactosamine, rhodamine labeled	RL-1072, Vector Laboratories, Burlingame, CA	I: 1/5,000	-

**Table 3.1** Antibodies Used in This Study

\*I, immunohistochemistry; W, Western blot

## 4- Article 2

---

### **Cannabinoids affect the mouse visual acuity via the cannabinoid receptor type**

**2**

Cécyre, Bruno<sup>1, 2</sup>, Papineau, Francois<sup>1</sup>, Casanova, Christian<sup>2</sup>, Bouchard, Jean-Francois<sup>1, \*</sup>

Running Title: Role of cannabinoids in the mouse visual acuity

Cet article est prêt à être soumis dans un journal du calibre de Investigative Ophthalmology & Visual Science. J'ai participé à l'élaboration de l'étude, la cueillette et à l'analyse des résultats de même qu'à l'écriture du manuscrit.

## 4.1- Summary

Multiple research teams studied the cannabinoid receptor type 2 expression and function in the mouse retina. Here, we examined the consequence of deleting *cnr2*, the gene coding for CB2R on the visual acuity by taking advantage of the optomotor response. Similarly, we studied the impact of the administration of synthetic cannabinoids and the blockade of endocannabinoid enzymes. We found that *cnr2* knockout mice have a better visual acuity during their postnatal development and through adulthood. Consistently, exogenous CB2R agonist HU308 decreased the visual acuity while the inverse agonist AM630 increased it. The blockade of 2-arachidonylglycerol (2-AG) synthesis and degradation, also greatly increased and decreased the visual acuity, respectively. Interestingly, no differences were seen when CB1R was deleted, blocked or activated. We also investigated the role of cannabinoids in retinal function with electroretinography (ERG). We found that exogenous cannabinoids specific for CB1R or CB2R do not affect the retinal function, contrarily to recent reports. Only the modulation of 2-AG levels affected the ERG components. Taken together, these results provide another proof that CB2R is present in visual areas and regulates vision-related functions.

Keywords: Endocannabinoids, CB1R, CB2R, Optomotor response, Vision, Rodent, Eye, Electroretinography, ERG

## 4.2- Introduction

In the last years, there have been increasing indications that the endocannabinoid (eCB) system is involved in vision. The cannabinoid receptor type 1 (CB1R) is found in the majority of retinal neurons, including photoreceptors, horizontal cells, bipolar cells, amacrine cells and ganglion cells (for review see (280)). There is mounting evidence that CB2R is expressed in neuronal tissues, such as cerebellum, brainstem, hippocampus, cortex, and retina (280). Indeed, the retinal expression of CB2R was reported in many animals including monkeys (194), though it remains controversial because of the lack of specificity of antibodies directed against CB2R

(190). However, many studies confirmed the presence of a functional CB2R in the retina with pharmacological and genetic tools. For instance, CB2R was found to be involved in retinal ganglion cell (RGC) axon guidance during development (211); *in vivo* recording of electroretinogram (ERG) responses demonstrated that mice lacking CB2R (*cnr2*<sup>-/-</sup>) exhibited increased a-wave amplitude under scotopic conditions, reflecting an enhanced sensitivity of photoreceptors (191). Furthermore, a recent report studying the retinal function of *cnr2*<sup>-/-</sup> mice confirmed that ERG responses are altered in these mice, and found that a prolonged treatment with CB2R inverse agonist AM630 mimics the effects seen in *cnr2*<sup>-/-</sup> mice (193). These accumulating evidences demonstrate the modulator effect of CB2R, thus suggesting its functional presence in the retina.

Until now, almost all studies regarding CB2R expression and function in visual structures were realized on the retina. Since vision does not rely strictly on the retina, other tests need to be conducted to evaluate the visual function impact of CB2R. One of these assays is the optomotor response (OMR), consisting of a stereotyped head movement in response to movement in the surrounding environment. This reflex is highly conserved among many species and does not require a training process. Hence, it does not require constrains to animals, which are allowed to move freely on a platform. Compared to ERGs, the OMR can assess deficits in RGCs, optic nerve transmission or brain visual integration.

We investigated the visual acuity and retinal function of mice after genetic manipulation or pharmacological modulation. The results reported here show that CB2R absence in transgenic mice increased the visual acuity. Similarly, the administration of CB2R agonist and antagonist respectively decreased and increased the visual acuity. These results are consistent with the hypothesis that CB2R is expressed in the retina, and strengthen the current knowledge of cannabinoids in visual function.

## 4.3- Methods

### Animals

All procedures were performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. They were approved by the Ethics Committee on animal research of the Université de Montréal. The *cnr1*<sup>-/-</sup> and *cnr2*<sup>-/-</sup> transgenic mice were obtained from Beat Lutz (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Mainz, Germany) and Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), respectively. The colonies were maintained in-house, under a 12 hours dark/light cycle. For experiences using adult animals, male and female adult mice aged between 3 and 4 months old were used. For experiments during postnatal development, littermates had one of their toes tattooed at 10 days with a tattoo paste (Ketchum, Brockville, ON, Canada) for identification. Their visual acuity was tested at different times, namely at postnatal (P) days 15, 17, 19, 21, 24, 27, 30 and 45.

### Optomotor Response Measurements

The visual acuity was determined by using the OptoMotry optokinetic system (CerebralMechanics, Lethbridge, AB, Canada). Briefly, an animal was placed on a platform where stimuli with patterns of varying spatial frequencies were projected. A 1-up-1-down staircase testing protocol was used until head tracking was no longer detected, thereby establishing the visual acuity. Hence, the visual acuity consists of the highest spatial frequency perceivable with 100% contrast. By changing the direction of the stimulus pattern, both eyes can be tested individually. Therefore, thresholds determined from individual eyes were considered individually for statistical analyses. All experiments were carried out by an experienced observer, in blind conditions. Since many mice would get agitated when they came to the testing platform for the first time, they were acclimatized by being placed on the OMR platform for about 10 minutes the day before the OMR test.



## **Electroretinography**

After an overnight dark adaptation (at least 12 hours of complete darkness), mice were anaesthetized using isoflurane inhalation. Corneas were anesthetized with a drop of 0.5% proparacaine hydrochloride and pupils were dilated with a drop of 1% tropicamide. The mice were then positioned on a probed heating pad and located in a Ganzfeld dome that housed a photostimulator. The ERGs were recorded with a gold electrode inserted in a corneal lens adapted for mice (LKC Technologies, Gaithersburg, MD). Reference and ground electrodes (E2 subdermal electrode; Grass Instruments) were inserted subcutaneously in the forehead and in the tail. Broadband ERGs and oscillatory potentials were recorded simultaneously (bandwidth, 1–1,000 Hz; 10,000x; P511, Grass, West Warwick, RI). Signals were fed to an analog-digital interface (1401, CED, Cambridge, UK) and were acquired using the software Signal (v.3.01x, CED, Cambridge UK). Scotopic luminance-response functions were obtained in response to progressively brighter stimuli spanning a 5.29 log-unit range (interstimulus interval: 30s; averaged over 5 flashes; luminance interval -3.89 to 1.40 log scot.cd.s.m<sup>-2</sup>). The photopic (cone-mediated) signal was recorded thereafter: the animal was adapted to light background of 30 cd.m<sup>-2</sup> for 20 minutes, then ERGs were recorded using a photopic luminance-response function (flash luminance interval: -0.59 to 1.40 log photo.cd.s.m<sup>-2</sup>; interstimulus interval: 3s, averaged over 15 flashes).

## **Electroretinography Analysis**

Analysis of the ERG waveforms was performed according to standard practice, but using a 60 Hz low pass digital filter to eliminate the contaminating noise from OPs when analyzing the a- and b-waves (281). The amplitude of the a-wave was measured from baseline to the most negative trough, whereas the b-wave amplitude was measured from the trough of the a-wave to the highest positive peak of the retinal response. Implicit times were measured from flash onset to the peak of the waves. Oscillatory potentials were also analyzed similarly using a 60 Hz high pass digital filter to eliminate the a- and b-waves. The amplitude of OPs was measured and

reported individually and as the sum of all OPs. Both eyes were recorded independently, but were averaged for each animal.

## **Drug Injections**

HU308, JJKK048, URB597, RHC80267 and ACEA were purchased from Bio-Techne Canada (Oakville, ON, Canada). AM630 and AM251 were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). HU308, AM630, and AM251 were first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), while JJKK048 and URB597 were first dissolved in polyethylene glycol 400 (PEG 400; Fisher Scientific). All compounds were then diluted with saline containing Tween 80 (Fisher Scientific), so that the final dilution was composed of 5% DMSO (or 5% PEG 400) and 5% Tween 80. In some cases, sonication and gentle heating were required to obtain a soluble dilution. All compounds were freshly diluted and sterile filtered before injection.

The dose administered for each compound was based on previous work in the literature. The doses are the following: HU308, 10 mg/kg; AM630, 2.5 mg/kg; JJKK048, 4 mg/kg; AM251, 3 mg/kg; ACEA, 2.5 mg/kg; URB597, 7.5 mg/kg; RHC80267, 10 mg/kg. All compounds were injected intra-peritoneally (i.p.) and the injection volume was of 6 ml/kg.

The baseline visual acuity was tested the day before injecting the compounds. Since cannabinoids are poorly soluble and their body distribution is not reliable, animals received one injection daily for 4 days, had their visual acuity tested on the fourth day and were tested for electroretinography on the fifth day.

Since the compounds JJKK048, URB597 and RHC80267 act rapidly and affect drastically 2-AG and AEA levels (282, 283), they were injected once, 30 minutes before testing the visual acuity. In electroretinography experiments, a booster dose was administered 60 minutes after the first dose and consisted of half the initial dose.

## Statistics

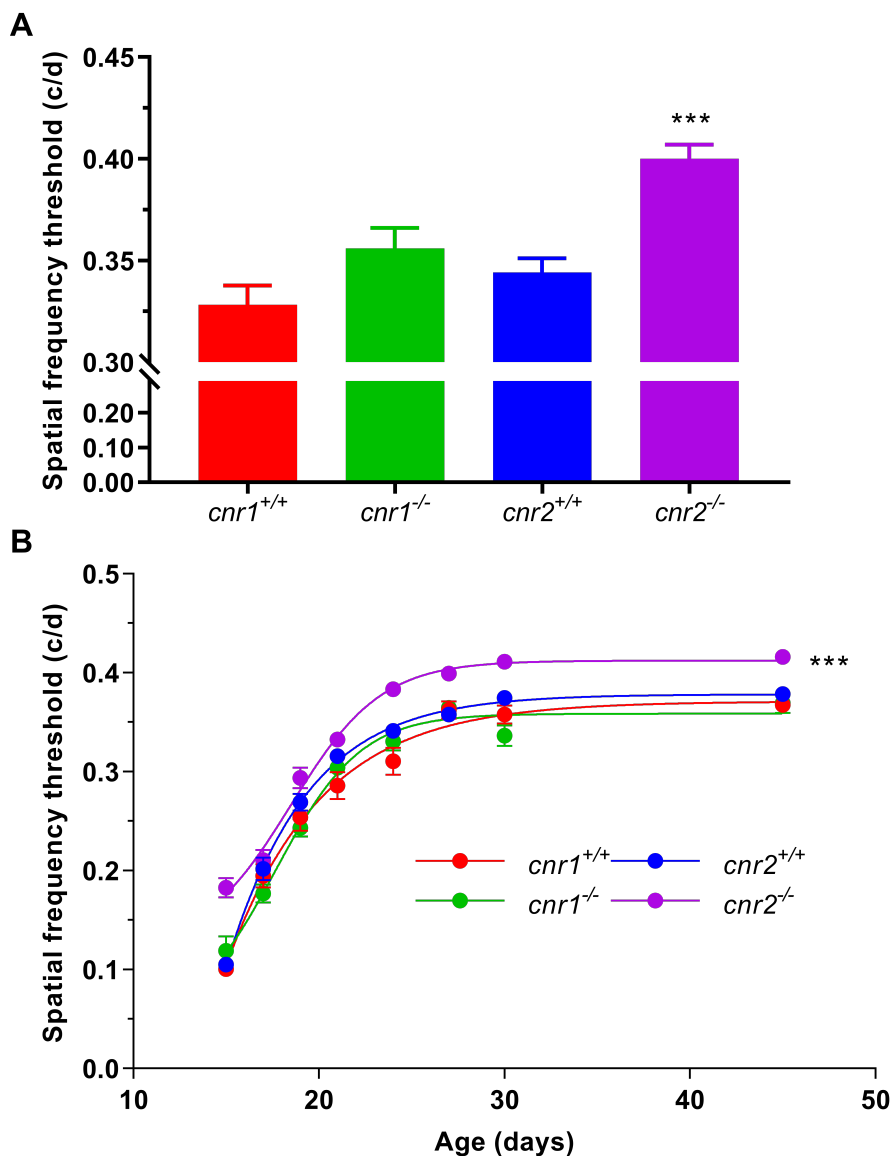
Statistical analyses were performed using one-way ANOVAs or repeated measures two-way ANOVAs with Dunnett post-hoc test (SPSS 20, IBM, Somers, NY).

## 4.4- Results

### ***The Deletion of *cnr2* Enhances the Visual Acuity During the Development Through Adulthood***

Our data indicate that the absence of CB2R enhanced the visual acuity in adults. Indeed, the spatial frequency threshold of *cnr2*<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than the one of *cnr2*<sup>+/+</sup> mice (Fig 4.1A). No differences were observed between *cnr1*<sup>-/-</sup> and *cnr1*<sup>+/+</sup> mice.

The important role of cannabinoids during visual system development has been extensively studied in the literature (210, 211). In order to better evaluate the impact of *cnr2* deletion on visual acuity, we measured the spatial frequency threshold of the same wildtype and mutant mice during their postnatal development, with regular tests between eye opening and adulthood. Similarly with adult animals, the visual acuity of *cnr2*<sup>-/-</sup> pups was globally enhanced compared to *cnr2*<sup>+/+</sup> mice (Fig 4.1B; two-way ANOVA). More specifically, the time points P15, P19, P24, P27, P30 and P45 were statistically different when compared individually between *cnr2*<sup>-/-</sup> and *cnr2*<sup>+/+</sup> mice. These results suggest that *cnr2*<sup>-/-</sup> mice have a better visual acuity since their early development, and they keep this enhanced acuity through adulthood.



**Figure 4.1** CB2R deletion enhances visual acuity in adults and through postnatal development.

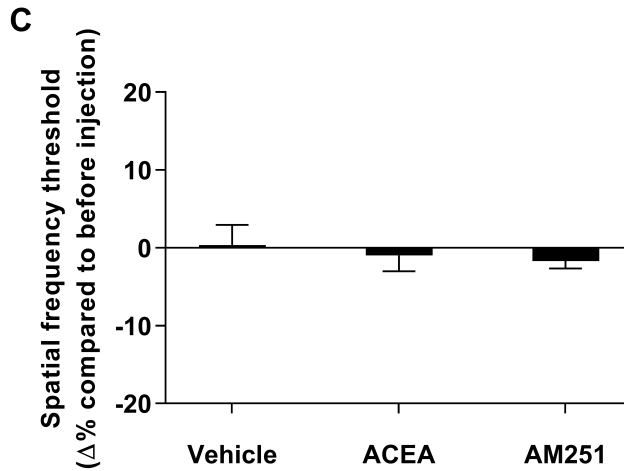
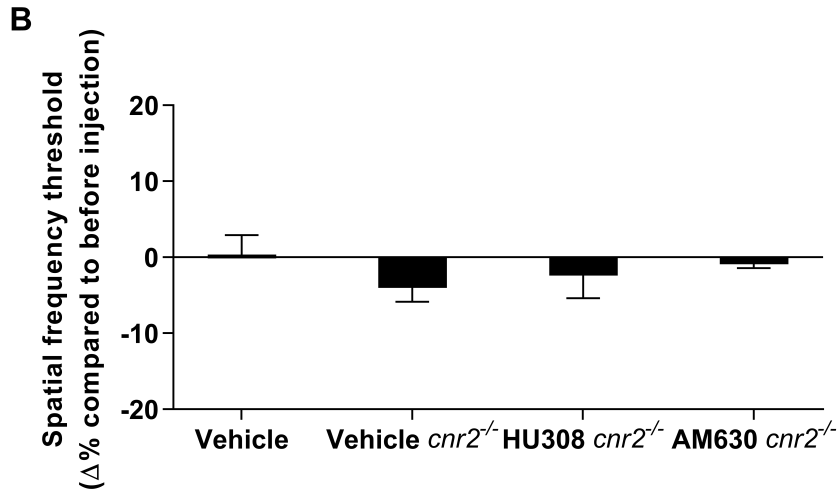
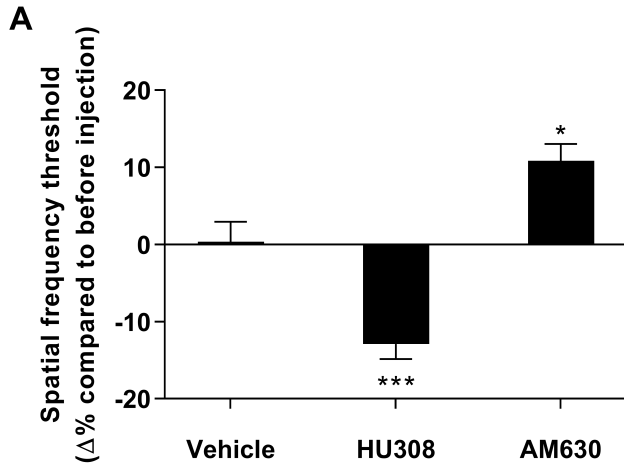
**A-B)** The *cnr2*<sup>-/-</sup> mice showed a better spatial frequency threshold compared to *cnr2*<sup>+/+</sup> animals. No differences were observed between *cnr1*<sup>-/-</sup> and *cnr1*<sup>+/+</sup> mice. (For A and B respectively, *cnr1*<sup>+/+</sup>: n=14 and 38 eyes; *cnr1*<sup>-/-</sup>: n=30 and 38 eyes; *cnr2*<sup>+/+</sup>: n=32 and 37 eyes; *cnr2*<sup>-/-</sup>: n=18 and 32 eyes; ANOVA with Dunnett posthoc test, \*\*\* p<0.001 compared to *cnr2*<sup>+/+</sup>).

### ***The Pharmacological Manipulation of CB2R Modulates Visual Acuity***

In order to validate the findings obtained with *cnr2<sup>-/-</sup>* animals, and since compensation could occur in these transgenic animals thus affecting the visual acuity, specific compounds targeting CB2R were injected in adult mice. The CB2R agonist HU308, injected daily for 3 days, significantly decreased the visual acuity while the inverse agonist AM630 increased it (Fig 4.2A). The vehicle was tested to make sure that it did not affect the visual acuity. Indeed, no differences were seen after 3 days of injection. The same drugs were tested on *cnr2<sup>-/-</sup>* mice in order to validate their specificity (Fig 4.2B). All compounds, including the vehicle, did not affect the visual acuity in *cnr2<sup>-/-</sup>* animals, confirming their specificity to CB2R, and also that the dose used for each pharmacological agent did not activate another receptor.

### ***The CB1R Does Not Modulate Visual Acuity***

Similarly to the CB2R ligands, specific drugs acting on CB1R were injected in adult mice daily for 3 days. Both the CB1R agonist ACEA and the inverse agonist AM251 did not yield to statistically significant changes on visual acuity (Fig 4.2C). These results suggest that CB1R is not implicated in the cannabinoid modulation of visual acuity.

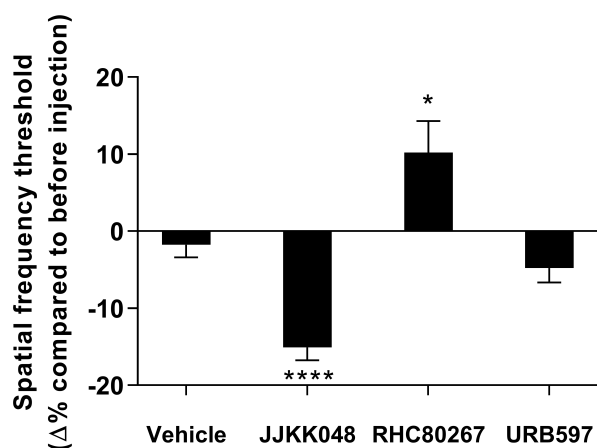


**Figure 4.2** Only CB2R modulates visual acuity.

**A)** The visual acuity of adult mice was tested, and they received daily injections of the CB2R agonist HU308, inverse agonist AM630, or vehicle for 3 days, after which their visual acuity was tested. The group treated with HU308 showed a decrease in its spatial frequency threshold compared to before injection while the group treated with AM630 had a better visual acuity. **B)** Mice lacking CB2R (*cnr2*<sup>-/-</sup>) received the same treatment and displayed a normal visual acuity, demonstrating the specificity of the pharmacological drugs. All groups displayed an unchanged visual acuity compared to vehicle on *cnr2*<sup>+/+</sup> mice. **C)** Adult mice received daily injections of the CB1R agonist ACEA, inverse agonist AM251, or vehicle. No changes were seen in their visual acuity. (A) vehicle, n=12 eyes; HU308, n=12 eyes; AM630, n=12 eyes; ANOVA with Dunnett posthoc test \*\*\* p<0.001, \* p<0.05 compared to the vehicle, B) vehicle, n=12 eyes; vehicle *cnr2*<sup>-/-</sup>, n=10 eyes; HU308 *cnr2*<sup>-/-</sup>, n=8 eyes; AM630 *cnr2*<sup>-/-</sup>, n=10 eyes, C) vehicle, n=12 eyes; ACEA, n=12 eyes, AM251, n=12 eyes).

### ***Endocannabinoids Also Modulate Visual Acuity***

So far, we showed that CB2R modulation increased or decreased the visual acuity depending on whether CB2R is blocked or activated, respectively. Since the drugs used are extremely specific, we sought to determine if eCBs could also affect visual acuity. One simple way to increase the levels of eCBs is to block their degradation by specifically targeting the enzyme responsible for it. In this set of experiments, the inhibitors JJKK048, RHC80267 and URB597, respectively targeting the enzymes MAGL, DAGL and FAAH, were injected 30 minutes before assessing the visual acuity. By blocking the enzymes MAGL and FAAH, a rapid rise in 2-AG and AEA levels occurs (282, 283), while the blocking of DAGL causes a decrease in 2-AG levels (284). The inhibitor JJKK048 strongly decreased the visual acuity (Fig 4.3) while the RHC80267 enhanced the visual acuity and the URB597 did not significantly affect it.



**Figure 4.3** The inhibition of 2-AG degradation decreases visual acuity.

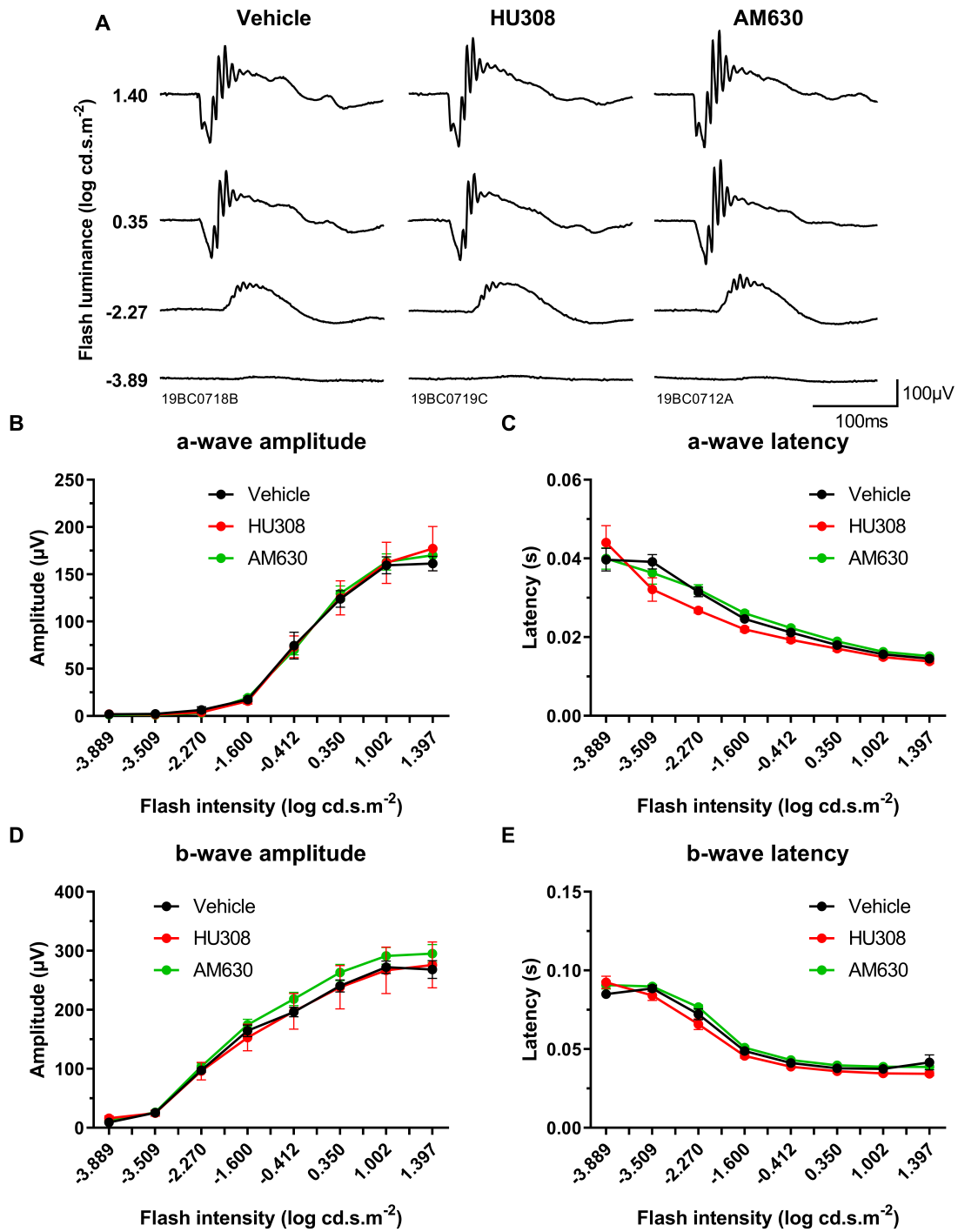
The visual acuity of adult mice was tested, and they received an injection of MAGL inhibitor JJKK048, DAGL inhibitor RHC80267, FAAH inhibitor URB597, or vehicle after which their visual acuity was tested 30 minutes later. The group treated with JJKK048 showed a decrease in its spatial frequency threshold compared to before injection while the group treated with URB597 did not reach any statistical significance. (vehicle, n=12 eyes; JJKK048, n=12 eyes; RHC80267, n=14 eyes; URB597, n=14 eyes; ANOVA with Dunnett posthoc test, \*\*\*\* p<0.0001 compared to vehicle).

### ***The Systemic Pharmacological Manipulation of CB1R and CB2R Does Not Modulate Retinal Function***

In order to determine whether the enhanced visual acuity found after the administration of cannabinoids came from an increase in retinal sensitivity, ERGs were recorded following OMR testing. Representative examples of scotopic ERGs of CB2R modulation are shown in Fig 4.4A. Both CB2R agonist and inverse agonist, HU308 and AM630 respectively, did not significantly alter the a- and b-wave amplitude and time to peak in scotopic conditions (Fig 4.4B-E). They also did not affect the amplitude of OPs (data not shown). Representative photopic traces of CB2R modulation are presented in Fig 4.5A. Both HU308 and AM630 did not affect

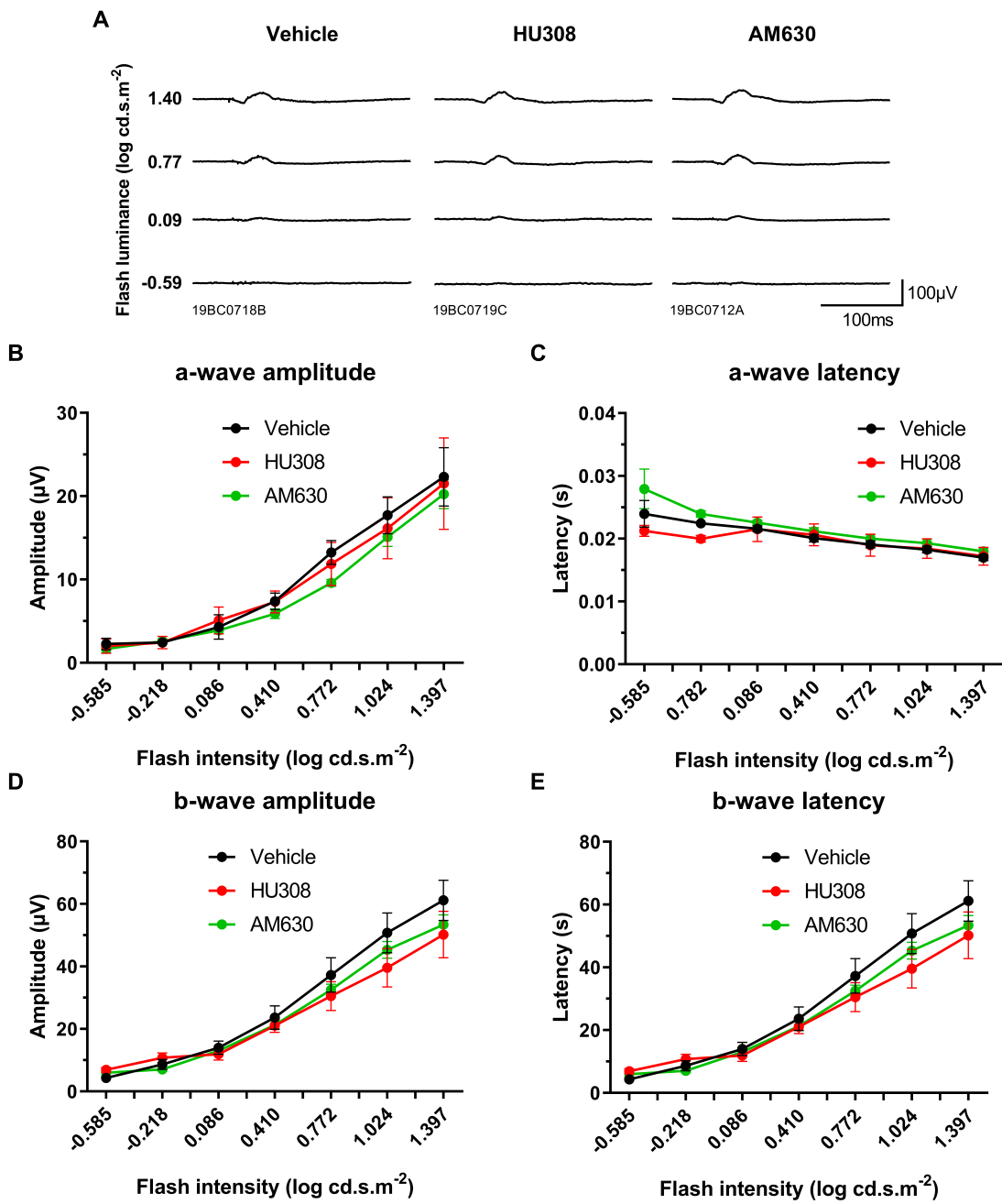


the a- and b-wave amplitude and time to peak in photopic conditions (Fig 4.5B-E). CB1R modulation did not modify the retinal function either (Fig 4.6A). Both CB1R agonist ACEA, and inverse agonist AM251 did not induce any change in a- and b-wave amplitude and time to peak in scotopic conditions (Fig 4.6B-E). They also did not affect the amplitude of OPs (data not shown). The same outcome is observed in photopic conditions, as ACEA and AM251 did not affect the a- and b-wave amplitude and time to peak (Fig 4.7A-E).



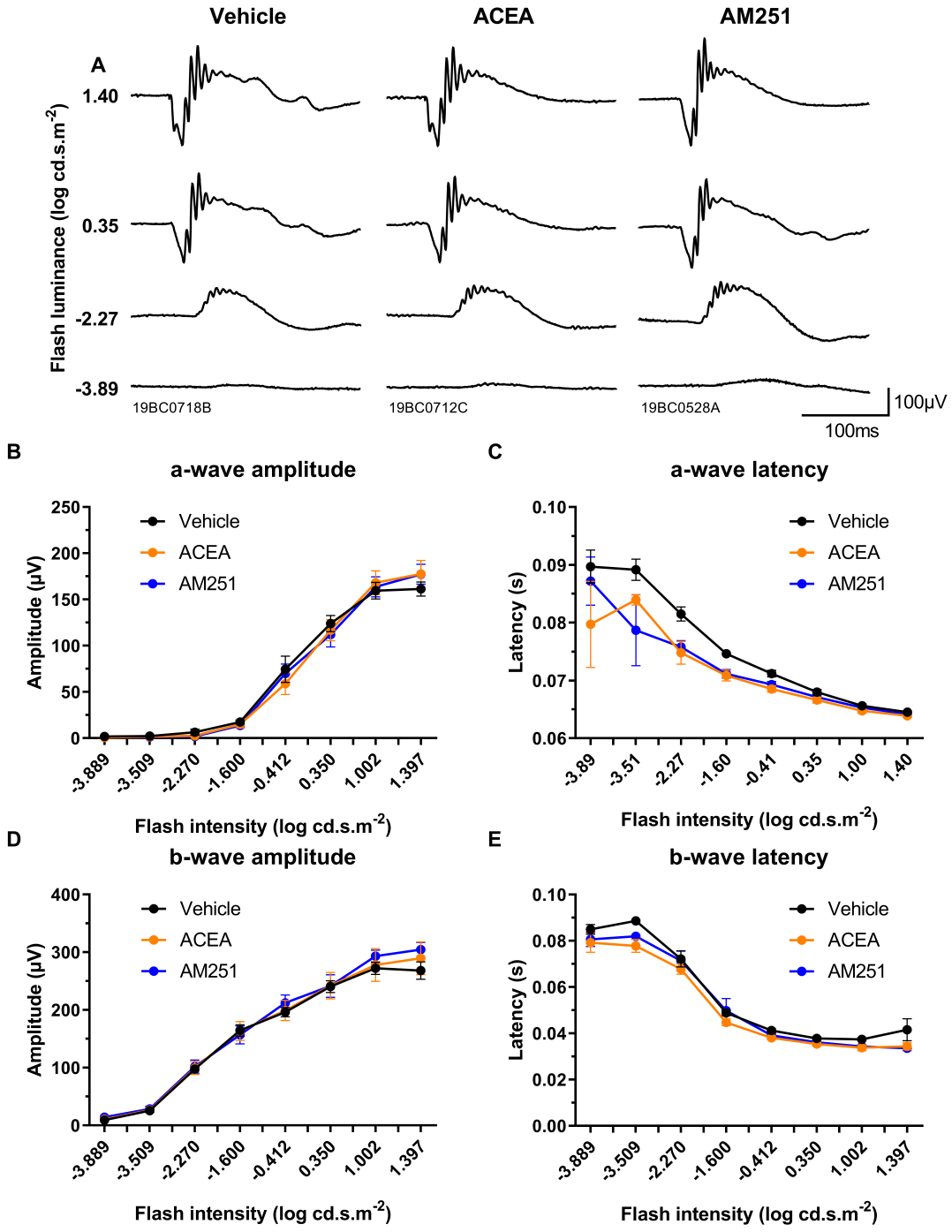
**Figure 4.4** Systemic CB2R modulation does not affect retinal function in scotopic conditions.

Adult mice received daily injections of the CB2R agonist HU308, inverse agonist AM630, or vehicle for 4 days, after which their retinal function was tested. **A)** Representative examples of scotopic ERGs in the different treatments. The luminance-response function of each animal was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). Amplitude, time to peak of scotopic ERG a- (**B-C**) and b-waves (**D-E**) respectively, plotted as a function of flash luminance. The values are mean  $\pm$  SEM from all animals in each group (vehicle, n=5; HU308, n=6; AM630, n=6; repeated measures ANOVA).



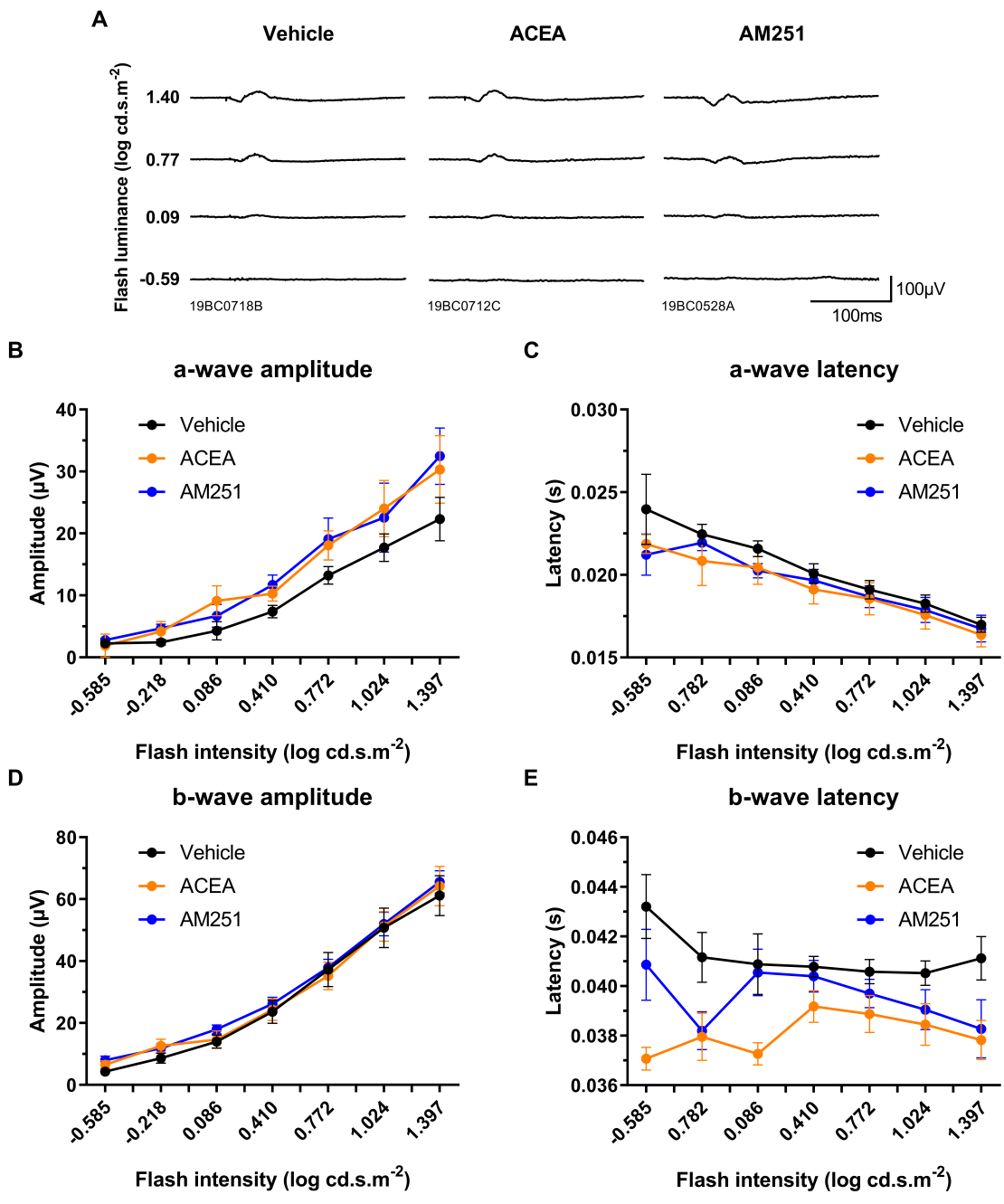
**Figure 4.5** Systemic CB2R modulation does not affect retinal function in photopic conditions.

**A)** Representative examples of photopic ERGs in the different treatments. The animals were adapted to light for 20 min, and then the luminance-response function of each animal was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). Amplitude, time to peak of photopic ERG a- (**B-C**) and b-waves (**D-E**) respectively, plotted as a function of flash luminance. The values are mean  $\pm$  SEM from all animals in each group (vehicle, n=5; HU308, n=6; AM630, n=6; repeated measures ANOVA).



**Figure 4.6** Systemic CB1R modulation does not affect retinal function under scotopic conditions.

Adult mice received daily injections of the CB1R agonist ACEA, inverse agonist AM251, or vehicle for 4 days, after which their retinal function was tested. **A)** Representative examples of scotopic ERGs in the different treatments. The luminance-response function of each animal was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). Amplitude, time to peak of scotopic ERG a- (**B-C**) and b-waves (**D-E**) respectively, plotted as a function of flash luminance. The values are mean  $\pm$  SEM from all animals in each group (vehicle, n=5; ACEA, n=4; AM251, n=4; repeated measures ANOVA).



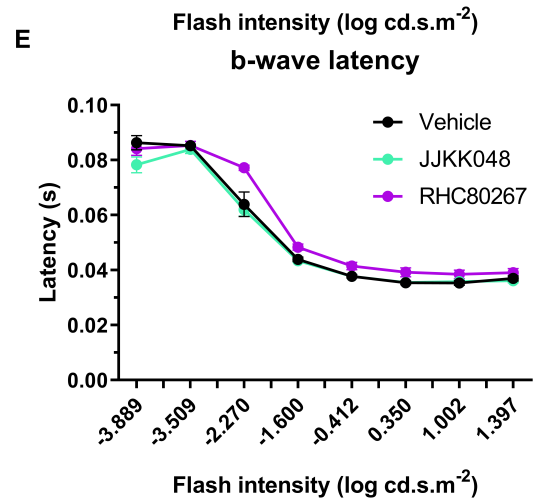
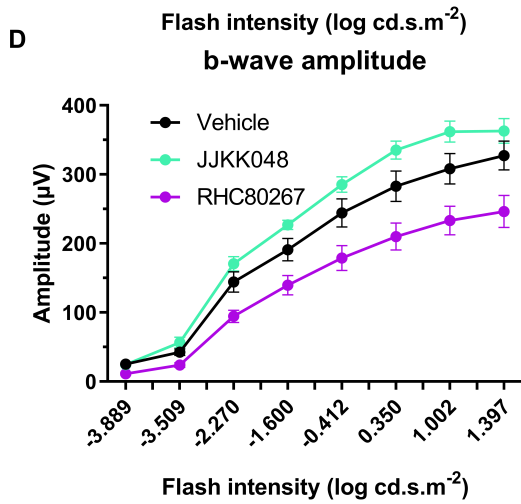
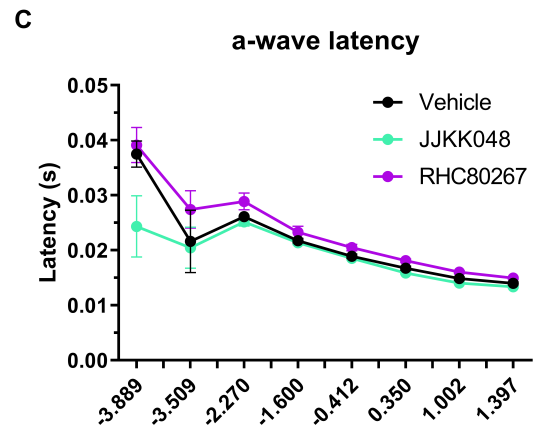
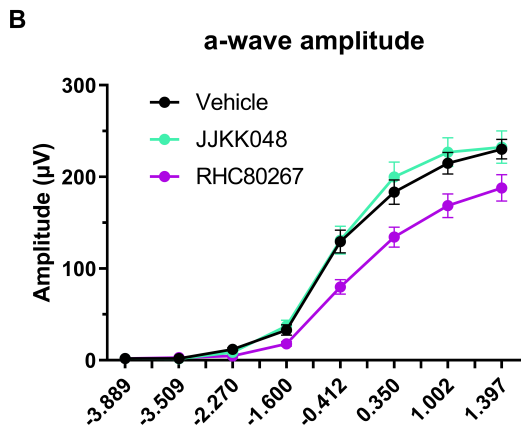
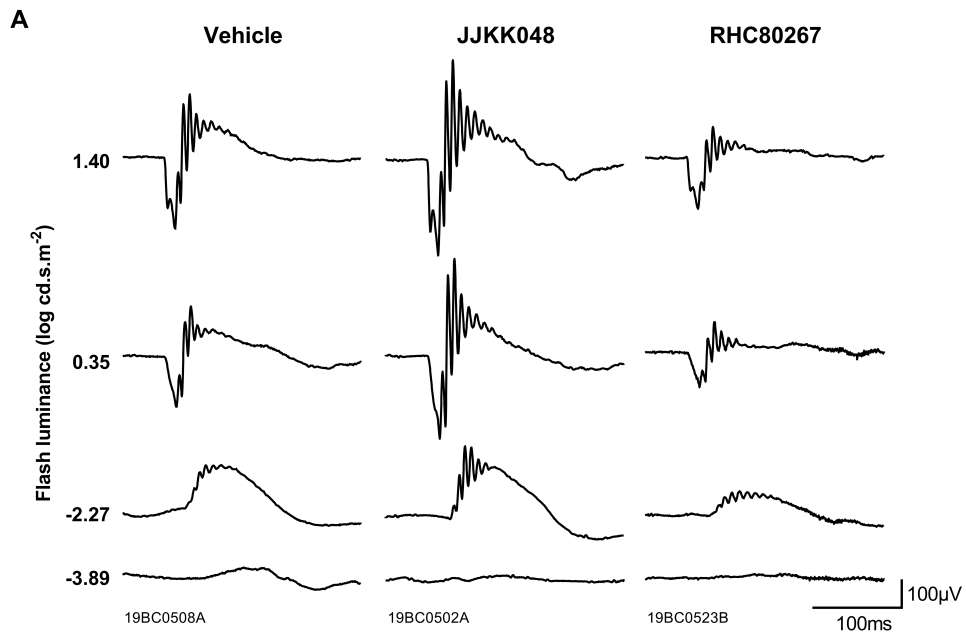


**Figure 4.7** Systemic CB1R modulation does not affect retinal function in photopic conditions.

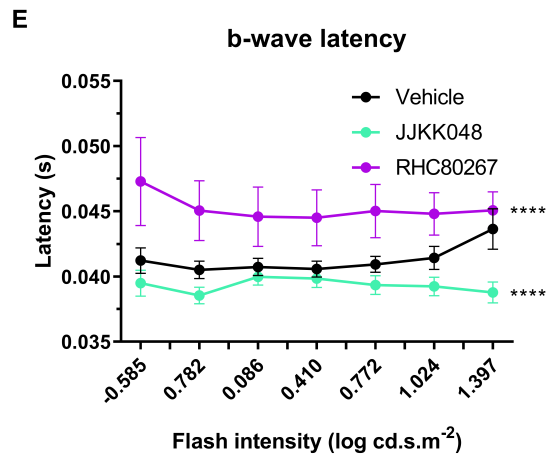
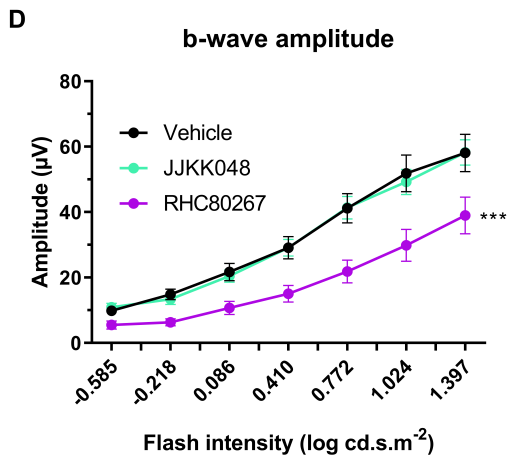
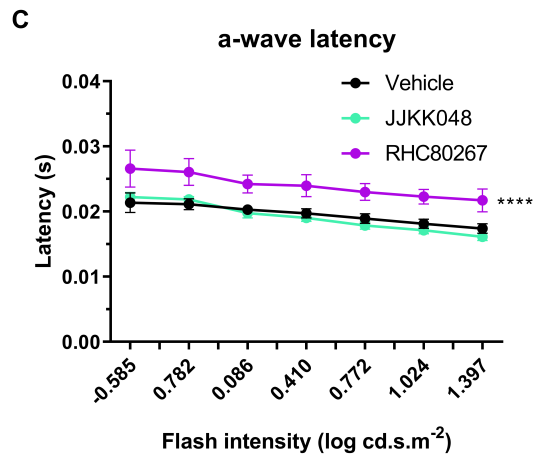
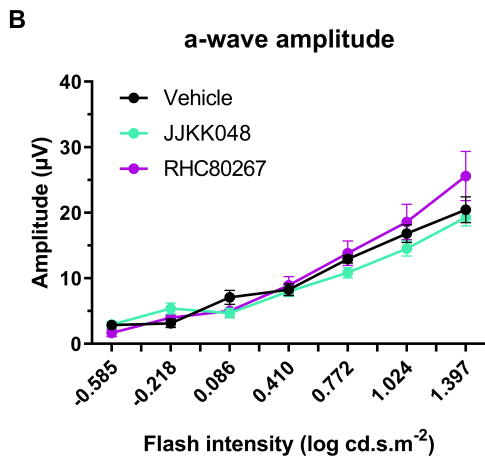
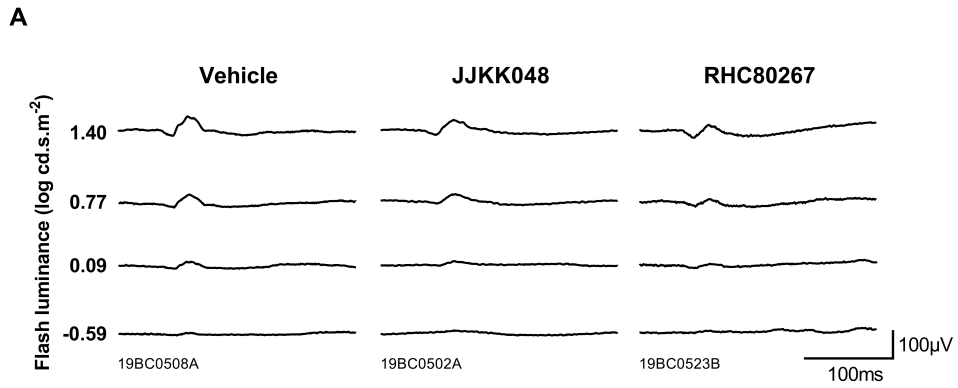
**A)** Representative examples of photopic ERGs in the different treatments. The animals were adapted to light for 20 min, and then the luminance-response function of each animal was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). Amplitude, time to peak of photopic ERG a- (**B-C**) and b-waves (**D-E**) respectively, plotted as a function of flash luminance. The values are mean  $\pm$  SEM from all animals in each group (vehicle, n=5; ACEA, n=4; AM251, n=4; repeated measures ANOVA).

### ***Endocannabinoid Modulation Affects Retinal Function***

The impact of 2-AG on the retinal function was evaluated as the inhibitor JJKK048, specific for MAGL and thus inducing an increase in 2-AG levels, significantly elevated the b-wave amplitude in scotopic conditions (Fig 4.8A-E). The inhibitor RHC80267, specific for DAGL and thus decreasing 2-AG levels, decreased the b-wave amplitude in scotopic conditions (Fig 4.8A-E). Both treatments did not affect the a- and b-wave latency (Fig 4.8A-E) in scotopic conditions. In photopic conditions, the JJKK048 increased the b-wave latency while the RHC80267 decreased both a- and b-wave latency and b-wave amplitude (Fig 4.9A-E). The inhibition of 2-AG' degradation by the inhibitor JJKK048 also increased the amplitude of most individual OPs and the sum of all OPs in scotopic conditions (Fig 4.10A-E). Similarly, the inhibitor RHC80267 decreased the amplitude of most individual OPs and the sum of all OPs in scotopic conditions (Fig 4.10A-E).

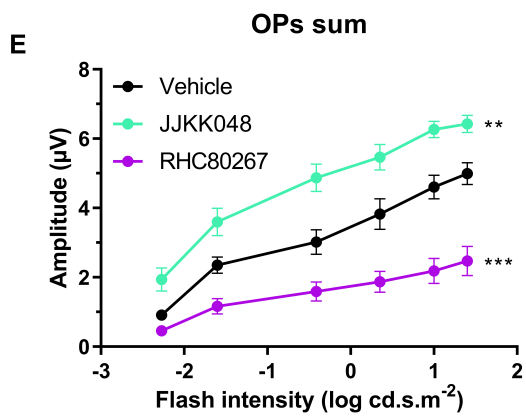
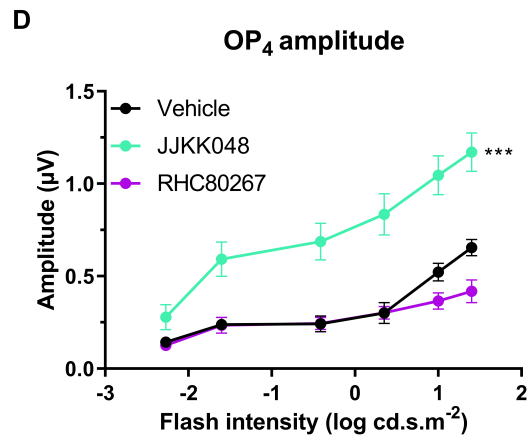
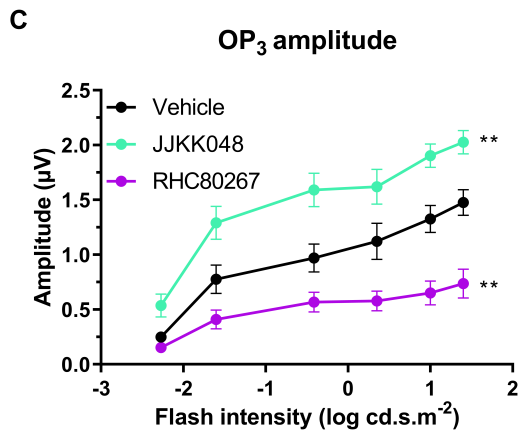
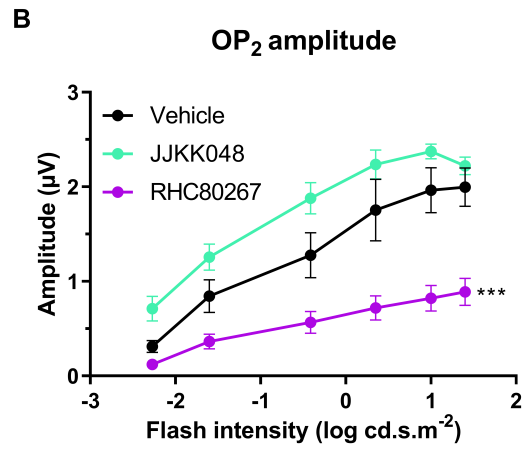
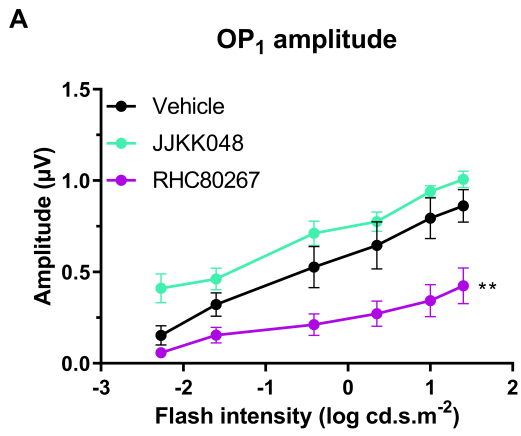


**Figure 4.8** Endocannabinoid modulation affects retinal function in scotopic conditions. Adult mice received an injection of the MAGL inhibitor JJKK048, DAGL inhibitor RHC80267, or vehicle. Thirty minutes after the injection, their retinal function was tested. A second dose was administered 60 minutes after the first to act as a booster. **A)** Representative examples of scotopic ERGs in the different treatments. The luminance-response function of each animal was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). Amplitude, time to peak of scotopic ERG a- **(B-C)** and b-waves **(D-E)** respectively, plotted as a function of flash luminance. The values are mean  $\pm$  SEM from all animals in each group (vehicle, n=7; JJKK048, n=10; RHC80267, n=7; repeated measures ANOVA, Dunnett post-hoc test \* p<0.05 compared to the vehicle).



**Figure 4.9** Endocannabinoid modulation affects retinal function in photopic conditions.

**(A)** Representative examples of photopic ERGs in the different treatments. The animals were adapted to light for 20 min, and then the luminance-response function of each animal was established by presenting progressively brighter flashes (bottom to top). Amplitude, time to peak of photopic ERG a- **(B-C)** and b-waves **(D-E)** respectively, plotted as a function of flash luminance. The values are mean  $\pm$  SEM from all animals in each group (vehicle, n=7; JJKK048, n=10; RHC80267, n=7; repeated measures ANOVA, Dunnett post-hoc test \*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001 compared to the vehicle).



**Figure 4.10** Endocannabinoid modulation affects the oscillatory potentials in scotopic conditions.

Amplitude of individual oscillatory potentials (**A-D**) and the sum of all oscillatory potentials (**E**), plotted as a function of flash luminance. The values are mean  $\pm$  SEM from all animals in each group (vehicle, n=7 eyes; JJKK048, n=10 eyes; RHC80267, n=7 eyes; repeated measures ANOVA, Dunnett post-hoc test \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  compared to the vehicle).

## 4.5- Discussion

We have tested the impact of genetic and pharmacological modulation of CB2R on the visual acuity and the retinal function of mice. We have chosen to study the impact of CB2R on visual acuity, and on mice since it represents a more complete evaluation of the impact of cannabinoids on vision, compared to other studies using chronic cannabis smokers. We report that deletion or the blockade of CB2R both increased the visual acuity, while its activation decreased it. On the other hand, only the modulation of eCB levels affect ERG responses while CB1R or CB2R pharmacological modulation did not.

### ***The CB2R Is Implicated in Visual Acuity***

Earlier reports showed that CB2R deletion and blockade increase the a-wave amplitude in ERG experiments, reflecting an increased photosensitivity (191, 193). In this study, we found that deletion or blockade of CB2R both increased the visual acuity, while the activation of CB2R decreased it. Since the OMR is a test examining vision as a whole, our results represent a great step forward in our understanding of the impact of cannabinoids on vision.

It should be noted that the impact on visual acuity of injected cannabinoids was observed with a daily injection for 3 consecutive days, whereas a similar study tested the CB2R inverse agonist AM630 injected twice daily for 7 days on ERG (193). The authors report that since a single treatment with the same drug did not modify the ERG responses, they had to block for a prolonged time in order to obtain an effect on

ERG claiming that it mimicked adaptive or developmental effect of *cnr2* deletion. In fact, it seems much more plausible that the acute injection of AM630 did not yield an effect because of a fast rate of body distribution. Indeed, plasmatic levels of cannabinoids rise very quickly after administration, usually in 3 to 10 minutes (285). It is thus plausible that the effect of an acute injection of cannabinoids cannot be observed if the ERG recordings are not accomplished just after the injection.

If acute injections did not affect ERG responses, why chronic injections did? With chronic use, cannabinoids could potentially accumulate in adipose tissues. The subsequent release of cannabinoids may result in the persistence of cannabinoid activity for several days post administration (286). A longer elimination half-life is observed in heavy cannabis users, attributable to a slow redistribution from deep compartments such as fatty tissues (287). Thus, when cannabinoids are administered chronically, the body fat acts a reservoir and redistributes them over a longer period of time. This would explain why only chronic injections of cannabinoids affect ERG responses.

Furthermore, the claimed effect by a prolonged treatment with CB2R inverse agonist is doubtful and inconsistent with the other results from the same report (193). For instance, in their study, the authors found that the a-wave amplitude of AM630 was nearly identical between acute and chronic treatments (about 155 $\mu$ V). However, the a-wave amplitude of the vehicle group was dramatically lower in the chronic treatment (acute: 155 $\mu$ V; chronic: 95 $\mu$ V). Thereby, the AM630 yielded the same a-wave amplitude between acute and prolonged treatments while the a-wave amplitude of the vehicle changed drastically. The same phenomenon is observed with the b-wave amplitude as well, indicating that the findings from this report should not be considered as accurate.

The vehicle can also dramatically change the bioavailability of drugs, especially lipophilic compounds such as cannabinoids. Unfortunately, the vehicle composition was not specified in that same study (193). It is plausible that the vehicle was composed of a certain amount of dimethyl sulfoxide (DMSO). However, this solvent is known to cause toxicity, visible on ERG recordings (288). In our experiments, care was taken to dilute the compounds with the less amount possible of DMSO, reaching



a 5% level. It is plausible that the amount of DMSO was higher and induced retinal toxicity in Borowska-Fielding et al. since the ERG responses were altered in the vehicle group of the prolonged treatment. However, since the AM630 treatment yielded normal ERG responses, it may be possible that CB2R blockade protected from DMSO-induced retinal toxicity. This interesting hypothesis needs to be deepened.

It is surprising to observe no effect of CB2R modulation on the retinal function since the deletion of *cnr2* gene strongly affects ERG responses and since the visual acuity was altered by specific CB2R ligands (191, 193). Many hypotheses could explain this situation. First, this discrepancy could originate from compensation in *cnr2*<sup>-/-</sup> animals that does not reflect the true role of CB2R in the retina. It would be normal that exogenous cannabinoids affect ERG responses. Second, a pharmacokinetic problem such as a poor retinal distribution of the compounds or a fast metabolism of the administered drugs could explain this discrepancy. It is possible that exogenous cannabinoids were not able to cross the blood-retinal barrier. Also, we may not have been able to observe the effects of CB2R modulation since they could occur very fast. However, this hypothesis is not consistent with the results in visual acuity. Further research is necessary to elucidate this question.

While the expression of CB2R in the retina and in visual areas is still subject to debate, mostly because of antibody specificity concerns (190), the results reported in this study strongly suggest that the CB2R is functionally present in some visual areas. Unfortunately, since the tools available to detect CB2R are not reliable at this moment, we were not able to study the expression of CB2R in the visual cortex or superior colliculus. We agree with the finding of Borowska-Fielding et al. that the recent batches of the CB2R antibody #101550 produced by Cayman Chemical are not specific to CB2R, thereby this antibody cannot be used to study CB2R expression at the moment. In their report, Borowska-Fielding et al. used a CB2R-eGFP reporter mouse and found that a “minimal” amount of CB2R labeling is seen in the mouse retina under physiological conditions. However, no further details were available concerning the imaging parameters, as these could affect the staining intensity. Furthermore, after inflammatory insult, the authors found that CB2R-eGFP expression

was upregulated with enhanced eGFP signal particularly in the GLC but also in the proximal INL. In fact, this experiment just proved that CB2R is indeed expressed in the retina, as if an upregulation of CB2R occurs after inflammatory induction, it is because, at first, CB2R is expressed. Also, since the inflammatory agents were injected intraocularly, it is logical that only the retinal parts close to the vitreous body show CB2R labeling.

### ***The CB1R Does Not Modulate Visual Acuity***

A few years ago, we demonstrated that *cnr1* deletion does not affect retinal responses (191). Here, we found the same conclusion since *cnr1* deletion, blockade or activation did not induce a change in visual acuity. This suggests that only CB2R is responsible for the visual effects of cannabinoids.

### **Endocannabinoids Can Act on Visual Acuity**

In many reports studying the impact of cannabinoids *in vivo*, the doses used did not necessarily represent physiological conditions. Under physiological conditions, eCBs are produced and released on demand. In a set of experiments, we showed that inhibition of MAGL, which degrades 2-AG, decreased the visual acuity, indicating 2-AG's implication in visual acuity. Similarly, we observed that the inhibition of DAGL, responsible for the synthesis of 2-AG, increased the visual acuity. We also found that URB597, which inhibits the enzyme FAAH, responsible for the degradation of AEA, did not affect the visual acuity. This suggests that 2-AG is responsible for at least some of the physiological effects of cannabinoids on visual acuity.

In ERG experiments, both the inhibition of MAGL and DAGL by JJKK048 and RHC80267 respectively had a major impact. For instance, both treatments had a huge impact on the amplitude of OPs, suggesting that eCBs affect amacrine cells. The impact of RHC80267 on the photopic b-wave amplitude and latency suggest that eCBs affect cones rather than rods. Thus, the inhibition of 2-AG' synthesis decreased the sensitivity of cones and caused a delay in their response.

It could be surprising to observe that exogenous cannabinoids do not affect ERG responses while the inhibition of 2-AG synthesis or degradation did. The explanation could be that since the chemical structure of synthetic cannabinoids and 2-AG inhibitors is different, their body distribution could also be very different. It is thus plausible that these compounds were able to reach the retina and affect ERG responses. These results are promising since they highlight a role for eCBs in retinal function. They are coherent with a report showing the impact of DAGL deletion on contrast and spatial frequency sensitivity (104). Hence, it would be interesting to test transgenic animals for DAGL $\alpha$  and MAGL proteins in ERG to confirm the results obtained with specific inhibitors of 2-AG synthesis and degradation.

However, DAGL does not strictly catalyze the hydrolysis of diacylglycerol in 2-arachidonoyl glycerol since it is required for a wide range of responses, including vasopressin-induced release of noradrenaline and adrenaline from the adrenal medulla (289) and other arachidonic acid-dependent responses such as vasodilatation (290, 291). Moreover, in *Drosophila*, DAGL activity is required for the generation of photoreceptor responses since it is part of the pathway that couples photoexcitation of rhodopsin to the opening of TRP channels in photoreceptors (292). This could explain the effect of DAGL inhibition on retinal function, and it is possible that this effect is not mediated by cannabinoid receptors.

In conclusion, this study confirmed the impact of cannabinoids on visual acuity. These effects are modulated by CB2R, but not CB1R, and strengthen the importance of CB2R in vision. Further research is necessary to assess the impact of CB2R on higher visual areas, such as the primary visual cortex.

### **Acknowledgements.**

We thank Christophe Cloutier-Tremblay and Antoine Létourneau for the creation of the flash module and the ganzfeld used in electroretinography.

B.C. was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada and the Fonds de Recherche Santé Québec.

J.F.B. was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC, RGPAS 478115-2015/RGPIN 2015-06582) and the Canadian Institutes of Health Research (PJT-156029).

### **Author contributions**

Conceptualization, B.C., C.C. and J.F.B.; Methodology, B.C., C.C. and J.F.B.; Investigation, B.C., F.P. and C.B.; Writing – Original Draft, B.C.; Writing – Review & Editing, B.C., F.P., C.B. C.C. and J.F.B.; Funding Acquisition, C.C. and J.F.B.; Supervision, C.C. and J.F.B.

### **Declaration of interests**

The authors declare no competing interests.

## 5- Discussion

---

### 5.1- Résumé des résultats

#### 5.1.1- Aspects de la localisation des enzymes DAGL $\alpha$ et MAGL dans la rétine de rat

Le but du premier volet de cette thèse était d'étudier la distribution anatomique des enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL dans la rétine de rat, pendant le développement postnatal. Nos résultats ont montré que l'enzyme DAGL $\alpha$  est exprimée de manière constante au cours du développement postnatal alors que l'enzyme MAGL est faiblement exprimée au cours des premiers jours de vie et devient graduellement plus présente. Mis ensemble, ces deux patrons d'expression temporelle suggèrent que la production de 2-AG est forte au cours des premiers jours du développement postnatal et se régularise par la suite. En outre, ces résultats suggèrent que le 2-AG pourrait jouer un rôle prépondérant au cours du développement normal de la rétine.

Nos résultats ont également montré que l'enzyme DAGL $\alpha$  est présente dans la majorité des neurones rétiniens, à l'exception des cellules bipolaires des bâtonnets, pendant l'étendue du développement postnatal. L'enzyme MAGL est quant à elle exprimée exclusivement dans les cellules amacrines et dans les cellules de Müller à partir du onzième jour postnatal jusqu'à l'âge adulte.

#### 5.1.2- Aspects de la modulation de l'acuité visuelle et de la fonction rétinienne par les cannabinoïdes

Le but du deuxième volet de cette thèse était d'étudier l'impact fonctionnel des cannabinoïdes sur la vision. Nos résultats ont montré que l'absence du récepteur CB2 a causé une amélioration de l'acuité visuelle pendant tout le développement postnatal et à l'âge adulte. De plus, l'administration d'agonistes inverses du récepteur CB2 a également amélioré l'acuité visuelle tandis que les agonistes du récepteur CB2 ont fait l'inverse, soit une diminution de l'acuité visuelle. Nous avons aussi montré que l'inhibition des enzymes responsables de la synthèse ou de la dégradation du 2-

AG a affecté l'acuité visuelle, respectivement à la hausse et à la baisse. Enfin, nous avons montré en électrorétinographie que l'administration d'inhibiteurs des enzymes DAGL et MAGL a affecté la réponse rétinienne.

## **5.2- Aspects méthodologiques**

### **5.2.1- Justification du modèle**

Le choix de la rétine comme modèle d'étude est basé sur plusieurs raisons. Premièrement, cette structure représente un modèle d'étude du SNC puisqu'elle en fait partie intégrante. Elle est la porte d'entrée du traitement de l'information visuelle et présente l'avantage d'être bien caractérisée d'un point de vue anatomique et fonctionnel. L'existence de marqueurs permettant l'identification aisée des différents types cellulaires de la rétine rend possible une bonne caractérisation de la distribution des enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL. De plus, l'organisation de la rétine est assez similaire chez tous les mammifères, de sorte qu'il est possible de faire des comparaisons et des extrapolations. Enfin, la rétine est facilement accessible d'un point de vue technique.

Également, le choix du rat et de la souris comme modèle animal nous confère quelques avantages. D'abord, la rétine de ces animaux est très similaire à celle des autres mammifères. Les observations effectuées chez ces rongeurs sont donc potentiellement transposables à d'autres espèces de mammifères. Nous avons décidé d'opter pour le rat pour étudier l'expression développementale des enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL parce que l'œil de rat en jeune âge est significativement plus gros qu'un œil de souris du même âge. Cette différence de taille permet de mieux manipuler les yeux afin d'en extraire la rétine pour étudier l'expression des enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL. Enfin, la souris nous donne l'avantage des manipulations génétiques nous permettant de vérifier la spécificité des ligands dirigés contre les récepteurs CB1 et CB2, dans le cas des études d'acuité visuelle.

### 5.3- Localisation des enzymes DAGL $\alpha$ et MAGL

Nous avons démontré que les enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL sont exprimées dans la rétine de rat au cours du développement postnatal et que leur patron d'expression temporelle suggère que le 2-AG est fortement produit à un jeune âge. Ce résultat concorde avec d'autres rapports montrant une augmentation rapide des niveaux de 2-AG immédiatement après la naissance, suivie d'une stabilisation pendant le développement postnatal (96, 97). Ce changement dans l'expression du 2-AG – forte en début de développement postnatal et modérée à l'âge adulte – pourrait correspondre à certaines des fonctions physiologiques du système eCB. En effet, les eCBs participent aux processus de guidage axonal et cette forte expression en début de vie pourrait être attribuée par ce processus. De plus, une fois à l'âge adulte, la relâche d'eCBs semblerait être moins importante puisque les eCBs ne sont alors utilisés qu'en tant que neuromodulateurs agissant sur la vision. Cette hypothèse reste à être vérifiée mais elle pourrait expliquer le patron d'expression temporelle des eCBs.

Étant donné que les eCBs sont des ligands lipophiles et qu'ils sont synthétisés et dégradés près de leur site d'action, il aurait été attendu que les enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL aient des distributions similaires. Cependant, l'enzyme DAGL $\alpha$  est exprimée dans pratiquement tous les types cellulaires alors que MAGL est seulement présente au sein des cellules amacriques et de Müller. Étant donné que les cellules de Müller s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine et que celles-ci entrecroisent les corps cellulaires des autres neurones rétiniens, les enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL sont à proximité dans toute la rétine.

De plus, les enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL sont exprimées dans ou à proximité des mêmes types cellulaires que les récepteurs CB1 et CB2. Le récepteur CB1 est présent dans les cônes, les cellules horizontales, amacriques et ganglionnaires (189). Le récepteur CB2 est quant à lui exprimé dans les cônes, les bâtonnets, les cellules horizontales, bipolaires, amacriques et ganglionnaires (191). Ces résultats suggèrent que, dans la rétine, les eCBs tels que le 2-AG sont sécrétés à proximité des

récepteurs cannabinoïdes et pourraient être impliqués dans le développement et la fonction rétinienne.

## **5.4- Rôles du système eCB dans la rétine adulte**

Nous avons démontré que les cannabinoïdes affectent l'acuité visuelle chez des animaux jeunes et adultes. Ces résultats concordent avec des études antérieures montrant un impact du récepteur CB2 sur la fonction rétinienne (191, 193). Nos résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils ont été obtenus en utilisant comme modèle une souris éveillée, libre de tous mouvements. C'est en effet grâce à la technique du réflexe optomoteur que nous avons obtenu ces résultats. De plus, ces résultats démontrent, au moyen d'une étude standardisée, que les cannabinoïdes affectent l'acuité visuelle. Quelques études s'étaient intéressées à ce sujet, mais leurs conclusions étaient difficilement applicables étant donné que les sujets utilisés et les composés cannabinoïdes testés n'étaient pas reproductibles. Par exemple, il existe une grande variété de cannabis et ceux-ci ont une grande différence dans leurs concentrations de  $\Delta^9$ -THC, CBD et autres composés cannabinoïdes. Ainsi, il est primordial de tester les sujets avec des doses contrôlées et surtout du même agent pharmacologique, ce qui a été le cas dans cette thèse.

De plus, ces résultats démontrent encore une fois le rôle prépondérant du récepteur CB2 dans la vision. En effet, autant l'absence du récepteur CB1 chez des souris transgéniques et l'administration de ligands spécifiques du récepteur CB1 n'ont pas causé de changements dans l'acuité visuelle. Ces résultats prouvent une fois de plus que le récepteur CB1 ne module peu ou pas les réponses au niveau du système visuel, contrairement au reste du SNC où le récepteur CB1 est plus important.

Nos résultats démontrent également que les eCBs peuvent affecter l'acuité visuelle. En effet, l'administration d'un inhibiteur de MAGL, l'enzyme responsable de la dégradation du 2-AG, a causé une diminution de l'acuité visuelle similaire à celle obtenue avec le HU308, agoniste du récepteur CB2. Inversement, l'administration d'un inhibiteur de DAGL, l'enzyme responsable de la synthèse du 2-AG, a provoqué une augmentation de l'acuité visuelle. Bien qu'il soit vrai que l'inhibition des enzymes



MAGL et DAGL ne représentent pas nécessairement des conditions physiologiques, nos résultats ont néanmoins prouvé que l'interaction entre les eCBs et l'acuité visuelle était possible. De futures études pourraient se concentrer à démontrer le lien entre les eCBs et l'acuité visuelle que ce soit en administrant des eCBs de manière exogène, en utilisant des inhibiteurs ciblant d'autres enzymes critiques du système eCB ou en se servant de souris transgéniques pour ces mêmes enzymes.

Nos résultats d'électrorétinographie ont montré que les ligands ciblant autant CB1 que CB2 n'affectent pas les ondes a et b. Ces résultats vont à l'encontre de plusieurs études montrant que les souris pour qui le récepteur CB2 est absent ont une meilleure sensibilité rétinienne et que nos résultats d'acuité visuelle démontrent l'impact des ligands spécifiques au récepteur CB2 (191, 193). Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces résultats peu cohérents. D'abord, il est possible qu'une compensation se soit produite chez les animaux *cnr2<sup>-/-</sup>* et que la sensibilité rétinienne augmentée chez ces animaux en soit une manifestation. La modulation de l'acuité visuelle par le récepteur CB2 serait alors explicable par un impact du récepteur CB2 ailleurs que sur la rétine, dans le système visuel. Une autre possibilité serait que l'administration de cannabinoïdes n'a pas fonctionné en raison d'un problème de pharmacocinétique. Il est en effet possible que ces drogues aient un métabolisme rapide et qu'il n'a pas été possible d'enregistrer leur effet à temps. Une seule étude s'est intéressée au temps de demi-vie plasmatique des cannabinoïdes synthétiques. Elle a montré que le volume de distribution et ainsi, le temps de demi-vie, varient selon le ligand utilisé et peuvent être aussi courte que 60 minutes pour l'agoniste JWH133, lorsqu'administré de manière intraveineuse (293). Cela semble peu probable étant donné que le même régime d'administration a permis d'observer des effets au niveau de l'acuité visuelle. Il est aussi possible que ces drogues hautement lipophiles aient une mauvaise distribution rétinienne et qu'elles n'aient pas réussi à traverser la barrière hématorétinienne. Une manière de contourner ce problème serait d'injecter ces drogues directement au niveau du corps vitré. Par contre, l'injection de composés dans le corps vitré cause une augmentation temporaire de la pression oculaire affectant la réponse à l'électrorétinographie. Cette solution ne serait donc pas utilisable pour cette technique d'enregistrement.

Enfin, la modulation de la sensibilité rétinienne par les inhibiteurs des enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation du 2-AG est très intéressante. Elle démontre indirectement, puisqu'il n'a pas été possible de le faire avec les ligands spécifiques aux récepteurs CB1 et CB2, que les cannabinoïdes peuvent affecter la sensibilité rétinienne. Qui plus est, ces résultats démontrent que les eCBs peuvent moduler la sensibilité rétinienne.

## **5.5- Synthèse globale**

À notre connaissance, cette thèse est la première à montrer avec une grande précision l'expression des enzymes DAGL $\alpha$  et MAGL dans la rétine lors du développement postnatal. Elle suggère que le 2-AG, qui est considéré comme le principal eCB, peut être produit dans les principaux types cellulaires de la rétine. De plus, cette thèse confirme que le 2-AG serait plus abondant au cours des premiers jours de vie. De plus, cette thèse montre pour la première fois que les cannabinoïdes peuvent affecter l'acuité visuelle principalement par le biais du récepteur CB2. Par ailleurs, ces résultats sont intéressants pour des professionnels de la santé tels que les optométristes. En effet, étant donné qu'il est désormais démontré que les cannabinoïdes peuvent affecter autant à la hausse qu'à la baisse l'acuité visuelle, selon la substance utilisée, il serait judicieux pour ces professionnels de s'enquérir auprès de leurs patients s'ils ont consommé des cannabinoïdes peu de temps avant leur examen de la vue. Ainsi, leurs résultats d'examen visuel ne risqueraient pas d'être affectés par l'usage de cannabis. Cette problématique est d'autant plus réaliste dans le contexte actuel de légalisation grandissante de l'usage récréatif du cannabis.

## **5.6- Futures directions**

Après que nous avons démontré l'impact des cannabinoïdes dans l'acuité visuelle, il serait très intéressant de poursuivre de nouvelles expériences. Dans un premier temps, il serait utile d'étudier l'impact des cannabinoïdes sur les aires visuelles cérébrales (CS, CGL, cortex visuel primaire). Pour ce faire, il serait nécessaire de mettre un point un traceur précis pour localiser le récepteur CB2,

puisque les outils disponibles présentement sont imprécis. De plus, il serait possible d'utiliser les techniques d'électrophysiologie et d'imagerie optique, voire d'optogénétique pour observer l'effet de l'administration de cannabinoïdes sur ces régions.

Il serait également intéressant de poursuivre les études en ERG afin de déterminer si des cannabinoïdes exogènes peuvent affecter la sensibilité rétinienne. Pour ce faire, il faudrait d'abord déterminer avec précision la raison pour laquelle nous n'avons pas observé d'effets en ERG, puis effectuer ces expériences. Il n'est toujours pas déterminé si l'absence de résultats significatifs en ERG est due à une mauvaise distribution des composés ayant été injectés ou à un rapide métabolisme de ces composés, compromettant ainsi l'enregistrement de réponses précises.

Il serait aussi utile d'étudier la vision d'animaux transgéniques pour des enzymes essentielles du système eCB. Il serait notamment à propos de tester autant l'acuité visuelle que la sensibilité rétinienne d'animaux *dag1<sup>-/-</sup>* et *mag1<sup>-/-</sup>*. Ces expériences permettraient en outre de mieux caractériser l'impact du système eCB sur la vision.

Enfin, étant donné qu'il est montré que le système eCB est impliqué au niveau du développement, notamment au niveau du guidage axonal et de la synaptogenèse, il serait particulièrement intéressant de vérifier si ce système module également ces mêmes fonctions chez l'animal adulte. Par exemple, il serait utile de tester s'il est possible de recréer les mêmes conditions gagnantes qui subsistent pendant le développement postnatal chez l'adulte dans le but de traiter des maladies neurodégénératives, entre autres. Ainsi, l'étude de l'impact des cannabinoïdes sur la régénération du nerf optique serait un sujet intéressant à étudier. Étant donné leur impact au niveau du développement, il est probable que les cannabinoïdes puissent affecter favorablement la régénération du nerf optique.

## 6- Conclusion

---

Les recherches composant cette thèse ont permis de mieux comprendre le rôle du système eCB dans la vision. Nous avons d'abord montré que les deux enzymes clés du principal ligand endogène des eCBs, le 2-AG, sont exprimées dans la rétine pendant le développement postnatal. Qui plus est, leur patron d'expression temporelle laisse croire que le 2-AG serait fortement exprimé pendant les premiers jours de vie, suggérant ainsi un rôle probable pendant le développement rétinien. De plus, nous avons montré ces deux enzymes, DAGL $\alpha$  et MAGL, sont distribuées dans la rétine de telle sorte que le 2-AG puisse être synthétisé et dégradé dans tous les types cellulaires de la rétine.

Ensuite, nous avons montré que l'absence des récepteurs CB2 engendre une augmentation de l'acuité visuelle, durant tous les stades du développement postnatal ainsi qu'à l'âge adulte. En outre, l'administration d'un agoniste des récepteurs CB2 diminue l'acuité visuelle tandis qu'un antagoniste de ces récepteurs l'augmente. Nous avons aussi montré que l'accumulation de 2-AG, causée par l'administration d'un inhibiteur de sa dégradation, réduit également l'acuité visuelle.

Enfin, nous avons découvert que l'inhibition de la synthèse du 2-AG cause une diminution de l'amplitude des ondes a et b en électrorétinographie. Nous n'avons pas réussi à montrer l'impact d'une administration de cannabinoïdes sur la fonction rétinienne, probablement en raison d'une mauvaise distribution des composés en raison de leur composition.

Étant donné que la consommation de cannabis est de plus en plus démocratisée à travers le monde, notamment en raison d'un assouplissement des lois encadrant son utilisation, les conclusions de cette thèse mettent en évidence l'importance de la recherche portant sur l'étude des impacts des cannabinoïdes. En effet, la portée des effets visuels du cannabis n'a toujours pas été étudiée profondément. De plus, c'est sans parler de l'utilisation thérapeutique des

cannabinoïdes, qui restent encore aujourd'hui largement sous-utilisés malgré les importants rôles physiologiques du système eCB.

L'avènement de nouvelles découvertes induit généralement plus de questions qu'elles n'apportent de réponses. Les chercheurs s'intéressant au système eCB seront certainement très occupés au cours des prochaines années.

## 7- Annexe

---

### **Collaboration sur des articles scientifiques au cours de la thèse:**

1. Cherif H, Argaw A, Cécycy B, Bouchard A, Gagnon J, Javadi P, Desgent D, Mackie K, Bouchard J-F. *Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation*. eNeuro, 2015.
2. Cherif H, Duhamel F, Cécycy B, Bouchard A, Quintal A, Chemtob S, Bouchard J-F. *Receptors of intermediates of carbohydrate metabolism, GPR91 and GPR99, mediate axon growth*. PLoS Biology, 2018.
3. Hawken ER, Normandeau CP, Gardner Gregory J, Cécycy B, Bouchard J-F, Mackie K, Dumont ÉC. *A novel GPR55-mediated satiety signal in the oval Bed Nucleus of the Stria Terminalis*. Neuropharmacology, 2019.
4. Argyriou C, Polosa A, Cécycy B, Hsieh M, Di Pietro E, Cui W, Bouchard J-F, Lachapelle P, Braverman N. *A longitudinal study of retinopathy in the PEX1-Gly844Asp mouse model for mild Zellweger Spectrum Disorder*. Experimental Eye Research, 2019.
5. Adibnia V, Mirbagheri M, Latreille P-L, Faivre J, Cécycy B, Bouchard J-F, Martinez VA, Delair T, David L, Hwang DK, Banquy X. *Chitosen Hydrogel Micro-bio-devices with Complex Capillary Patterns via Reactive-Diffusive Self-Assembly*. Acta Biomaterialia, 2019.
6. Projet en cours avec le groupe de Nancy Braverman: « Developing retinal gene augmentation therapy for Zellweger Spectrum Disorder ».
7. Projet en cours avec le groupe de Gilbert Bernier: « Cell transplantation therapy for the treatment of retinal degeneration diseases ».

## **Prix remportés au cours de la thèse:**

1. Prix Réseau Vision pour la qualité d'un article scientifique, 2014
2. Nomination pour le Prix Hans-Selye du Congrès du Club de Recherches Cliniques du Québec, 2016
3. *Muchison Callender Young Investigator Award – Honourable Mention* lors de la conférence *Canadian Optometry Schools Research Conference*, 2017
4. Nomination pour le Prix Hans-Selye du Congrès du Club de Recherches Cliniques du Québec, 2018
5. Prix du public lors de la Journée scientifique organisée par le Groupe de Recherche en Sciences de la Vision, 2019

## **Bourses reçues au cours de la thèse:**

1. Bourse d'excellence Banque TD, Études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal, 2014
2. Bourse d'excellence, Études supérieures et postdoctorales – École d'optométrie de l'Université de Montréal, 2014
3. Bourse de recrutement, Groupe de recherche universitaire sur le médicament, 2014 (déclinée, cause cumul)
4. Bourse de formation au doctorat, Fonds de recherche en santé – Québec, 2014-2016 (3e année déclinée, cause cumul)
5. Bourse d'études supérieures du Canada Alexander-Graham Bell-Doctorat, Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, 2016-2018
6. Bourse *Alma Mater*, Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal, 2018

## **Responsabilités occupées au cours de la thèse:**

1. Responsable de la plateforme d'imagerie du Groupe de recherche en sciences de la vision (depuis janvier 2011)
2. Responsable de laboratoire (depuis juillet 2013)
3. Chargé de cours (depuis 2016)
4. Supervision de 16 étudiants stagiaires
5. Révision de plus de 10 articles scientifiques en tant qu'arbitre



## Articles de revue

### 7.1- Retinal Cannabinoids

Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, 2017

Bruno Cécylre, Christian Casanova, and Jean-François Bouchard (modified from Stephen Yazulla)

School of Optometry, University of Montreal, Montreal, Canada

Cet article a été publié dans un module de référence produit par la maison d'éditions Elsevier. Ce module de référence regroupe une large banque d'articles comme le mien afin qu'ils servent de sources d'informations de confiance couvrant une foule de sujets. Ce module de référence fait partie de la division « Neuroscience and Biobehavioral Psychology » et été publié en décembre 2014. J'ai participé à l'élaboration de l'étude, la recherche de la littérature scientifique et à l'écriture du manuscrit.

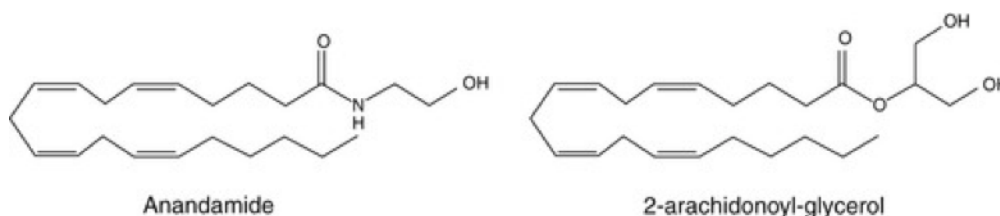
#### Abstract

Endocannabinoids are one the most recently described neuromodulators to be studied extensively in neural and non-neural tissues for their roles in neuroplasticity and neuroprotection. The endocannabinoid system is highly expressed throughout the visual system, especially in the retina. Functional studies have shown that cannabinoids modify the activity of photoreceptors, bipolar cells and ganglion cells, among others. The existence of multiple endocannabinoids, degradative enzymes, and receptors paints a picture of great complexity. How this relates to light and dark adaptation, receptive field formation, temporal properties of cell responses, and ultimately visual behavior still needs to be addressed.

Anandamide; Bipolar cells; Cones; Endocannabinoids; Expression; Ganglion cells; Marijuana; Photoreceptors; Retina; Rods; Synaptic transmission

## Marijuana and the Endocannabinoids

The active component of the marijuana plant *Cannabis sativa*,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), mimics endogenous chemicals, named endocannabinoids (eCBs), that activate membrane receptors. eCBs include a variety of amide, ester, and ether derivatives of arachidonic acid. The most widely studied of these are arachidonoyl ethanolamide (anandamide, AEA) and *sn*-2 arachidonoyl glycerol (2-AG) (Figure 1). Other eCBs have been identified with varying degrees of affinity for cannabinoid receptors, and also compete with AEA and 2-AG for metabolizing enzymes. In this way, they modulate activity by competition at the receptors or by affecting substrate availability for metabolism.



**Figure 7.1.1** Chemical structures of endocannabinoids: arachidonoyl-ethanolamide (anandamide, AEA) and 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG)

## Synthesis and Release

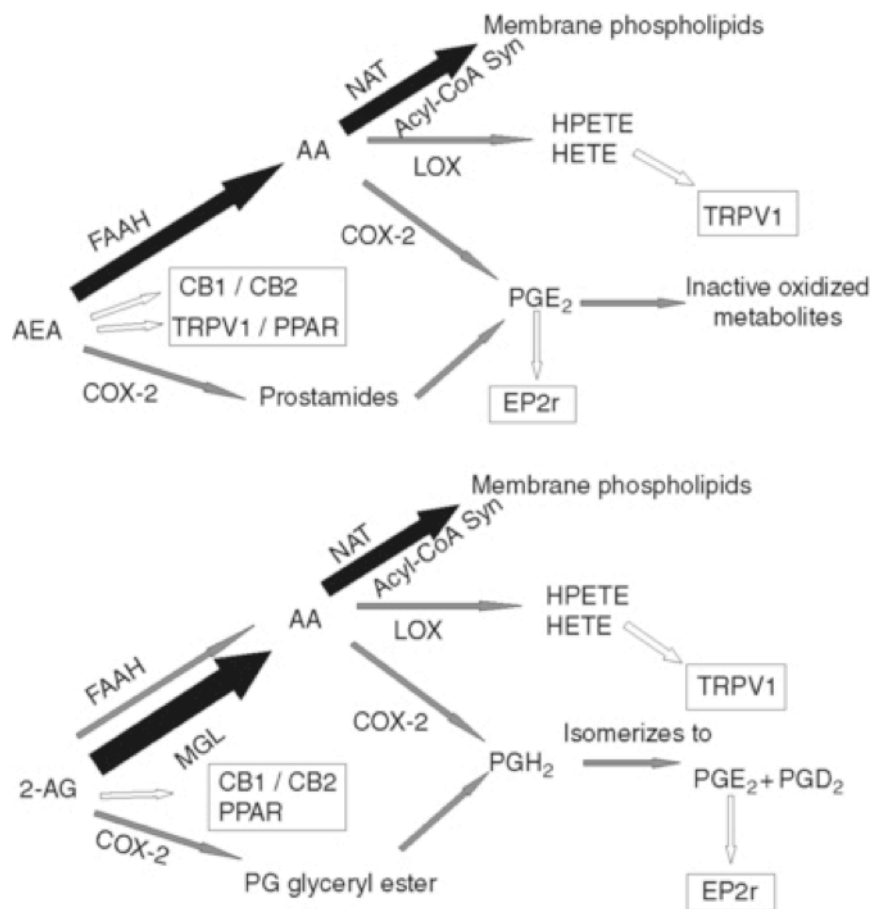
Unlike water-soluble neurotransmitters, AEA and 2-AG are lipophilic and not stored in synaptic vesicles. Rather, membrane phospholipids are metabolized on demand to liberate AEA and 2-AG by calcium-dependent phospholipases. The precursor of AEA is *N*-arachidonylphosphatidyl ethanolamine (NAPE), formed by calcium-dependent transfer of arachidonic acid from arachidonoylphosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine (PE). There are multiple pathways for AEA liberation from the membrane. First, NAPE is hydrolyzed by phospholipase D (PLD) to release AEA and phosphatidic acid. Second, NAPE is hydrolyzed to *N*-acyl-lyso-PE by phospholipase A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>; then, AEA is released by lysophospholipase D. Third, phospholipase C (PLC) cleaves NAPE to generate phosphoanandamide, which is

dephosphorylated to liberate AEA. The PLC pathway may be involved in the on-demand synthesis of AEA rather than in maintaining basal tissue levels of AEA.

The primary pathway for 2-AG synthesis involves hydrolysis of diacylglycerol (DAG) by DAG lipase isoforms, DAGL $\alpha$  and DAGL $\beta$ . DAG may be produced by the PLC  $\beta$ -catalyzed hydrolysis of phosphatidylinositol or hydrolysis of phosphatidic acid by a phosphohydrolase. AEA and 2-AG freely diffuse within the membrane where they interact with the active sites of degradative enzymes and receptors. AEA binds reversibly to serum albumin, and it is likely that such binding is critical for the movement of AEA and 2-AG in blood, the extracellular matrix, and the cytoplasm. The presence and localization of AEA and 2-AG are inferred from the distribution of receptors, synthesizing and inactivating enzymes as well as physiological effects on identified cells.

### **Inactivation**

AEA and 2-AG are inactivated following intracellular accumulation by fatty acid amide hydrolase (FAAH), monoacylglycerol lipase (MAGL), cyclooxygenase-2 (COX-2), and lipoxygenase (LOX). AEA and 2-AG are hydrolyzed by FAAH into AA and ethanolamine or glycerol, respectively. 2-AG, but not AEA, is hydrolyzed by MAGL. Following hydrolysis of AEA or 2-AG, AA is incorporated into membrane phospholipids. COX-2 oxidizes arachidonic acid, AEA, and 2-AG to prostamides or prostaglandin glyceryl esters, leading to prostaglandins. In addition, oxidation of AA by LOX produces 12-(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-(S)-HPETE), 5-(S)-HETE, and leukotriene B<sub>4</sub>, all of which are agonists of TRPV1 receptors (Figure 2). The effects of AEA and 2-AG are modulated by the balance of metabolic enzymes that is specific to each cell type.



**Figure 7.1.2** Metabolic pathways for AEA and 2-AG degradation

This schematic illustrates some of the metabolic pathways for the degradation of AEA and 2-AG. In the dominant pathways (bold arrows), AEA and 2-AG are hydrolyzed to arachidonic acid (AA), and then rapidly incorporated into membrane phospholipids via N-acyltransferase (NAT) and acyl-Coenzyme A synthetase. Lesser pathways (shaded arrows) involve oxidation by cyclooxygenase-2 (COX-2) of AEA, 2-AG, and AA to prostaglandins (PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub>). Additionally, AA may be oxidized by lipoxygenase (LOX) to 12-(S)- and 15-(S)-HPETE and 5-(S)-HETE. Hollow arrows show that AEA and 2-AG are endoligands for CB1, CB2, and PPAR receptors, while AEA also activates TRPV1 receptors. Metabolites of COX-2 oxidation activate EP2 receptors, and metabolites of LOX oxidation activate TRPV1 receptors.

## Receptors

Effects of cannabinoids are mediated by metabotropic (G-protein-coupled receptors (GPCRs)) and ionotropic (ion channel) receptors. In general, activation of cannabinoid 1 receptors (CB1Rs), via heterotrimeric guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding proteins  $G_{i/o}$  ( $G_{i/o}$ ), modulates voltage-gated  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  conductances, resulting in a reduction of neurotransmitter release, particularly  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate. CB2 receptors, which also signal through  $G_{i/o}$ , are expressed in cells of the immune system and the central nervous system (CNS), particularly in astrocytes and microglia. There is evidence for additional cannabinoid receptors, such as GPR55 and GPR18. AEA, but not 2-AG, activates the ionotropic transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) that increases intracellular calcium either by entry through the plasma membrane or from intracellular stores. Prostaglandins and prostaglandin glycerol esters, produced by eCB oxidation by COX-2, bind to a variety of prostaglandin receptors. eCBs are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), members of the nuclear receptor superfamily that are involved in lipid metabolism, insulin sensitivity, regulation of inflammation, and cell proliferation.

## Distribution and Function

Cannabinoid receptors are considered to be the most numerous GPCRs in the brain. eCBs, their receptors, and metabolizing enzymes are expressed in several brain regions. AEA and 2-AG have short and long-term effects on synaptic plasticity and neuroprotection. The effects depend largely on retrograde transmission in which postsynaptic dendrites release an eCB that binds to presynaptic CB1Rs to reduce transmitter release. Retrograde release of eCBs is evoked by two mechanisms. In a voltage-dependent mechanism, depolarization of postsynaptic dendrites by L-glutamate opens voltage-gated calcium channels. The increase in intracellular  $Ca^{2+}$  activates Ca-dependent PLD to release an eCB. A second mechanism involves activation of heterotrimeric GTP-binding protein  $G_{q/11}$  ( $G_{q/11}$ ) coupled metabotropic receptors, usually group I metabotropic glutamate receptors (mGluRs), mGluR1 and

mGluR5, and muscarinic receptors (M1 and M3). eCBs are released from the plasma membrane by enzymatic cascades that may or may not release calcium from intracellular stores. The eCB-induced reduction of presynaptic glutamate and GABA release contributes to synaptic plasticity, while the reduction of glutamate release inhibits excitotoxicity following ischemia.

### **Cannabinoids and Ocular Tissues**

Marijuana induces conjunctival vasodilation and reduces intraocular pressure (IOP). These effects are mediated locally by eCBs as demonstrated in the ciliary body, iris, choroid, and trabecular meshwork in mammalian tissues. THC, as low as  $10^{-12}$  M, increases monoamine oxidase activity in the bovine trabecular meshwork, choroid, and ciliary processes but not in the iris. Hydrolysis of AEA has been measured in the porcine iris, choroid, lacrimal gland, and optic nerve. CB1 receptor has been detected in the ciliary body, trabecular meshwork, and conjunctival epithelium of rat, mouse, bovine, and human. The bovine corneal epithelial cells express CB1R, MAGL,  $\alpha/\beta$  hydrolase domain 6 (ABHD6),  $\alpha/\beta$  hydrolase domain 12 (ABHD12) and NAPE-PLD mRNA. AEA and 2-AG have been measured by gas chromatography in human ocular tissues.

The content of eCBs varies in certain disease states, suggesting the importance of eCBs in maintaining ocular homeostasis. For example, 2-AG levels are lower in the ciliary body of patients with glaucoma. However, in diabetic retinopathy, there are higher levels of 2-AG only in the iris, and increased levels of AEA in the retina, ciliary body, and cornea. Eyes of patients with age-related macular degeneration (AMD) also show increases of AEA in the retina, choroid, ciliary body, and cornea. Topically applied AEA reduces IOP by activation of CB1R and activation of the prostaglandin E 2 receptor after conversion of AEA to prostamides. Administration of either AEA or THC to human nonpigmented epithelium (NPE) cells induces COX-2 expression, indicating a relationship among prostaglandins, COX-2,

and eCBs in lowering IOP. In addition, EP2 receptors have been localized in the NPE of mouse, porcine, and human ciliary body.

### **Cannabinoids – Retinal Anatomy**

Early studies of the effects of cannabis on vision were performed in concert with the effects of alcohol in order to examine the influence on visual motor behaviors as they related to driving. Anecdotal reports showed that Jamaican and Moroccan fishermen smoke marijuana to improve dim light vision when fishing at night. Indeed, an increased night vision was measured and it was suggested that these effects occurred at the retinal level. Acute effects on vision are subtle and include blurred and double vision, a reduction in Vernier and Snellen acuity, alterations in color discrimination, an increase in photosensitivity and an increase in recovery from foveal glare. It is unlikely that all of these effects of marijuana are due to cortical or preretinal sites because processes of light–dark adaptation take place in the retina. Knockout mice that lack CB2R exhibit increased a-wave amplitudes under scotopic conditions of electroretinogram recordings. Since the a-wave originates from the activity of photoreceptors, the stimulation of CB2R could affect these cells. The absence of CB2R also produced a different light adaptation pattern in photopic conditions. The lack of CB1R did not affect the retinal response.

Furthermore, vervet monkeys had their retinal function affected by the intravitreal injection of specific inverse agonists of CB1R and CB2R. For instance, the injection of AM251 increased the photopic a-wave amplitude at high flash intensities, whereas AM630 increased the amplitude of both photopic a- and b-waves. In scotopic conditions, both drugs increased the amplitude of the b-wave while not altering the a-wave amplitude.

On the other hand, the injection of selective GPR55 agonist and antagonist caused opposite effects compared to those of CB1R and CB2R. The intravitreal administration of the GPR55 agonist lysophosphatidylglucoside (LPG) increased the

amplitude of the scotopic b-wave while the injection of the antagonist CID16020046 decreased it.

### **Localization – Cannabinoid Receptors**

CB1R was extensively studied in the retina of various species using techniques such as *in situ* hybridization, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), western blot or immunohistochemistry. CB1R was first localized in the ganglion cell layer (GCL) and inner nuclear layer (INL) of the rat retina. Since then, CB1R expression was detected in the retinas of human, monkey, mouse, rat, chick, salamander and goldfish with a similar labeling in the outer plexiform layer (OPL), inner plexiform layer (IPL) and GCL. Briefly, CB1R is expressed in the inner and outer segments of photoreceptors with a strong labeling in the cone pedicles; in the membrane but not in dendrites of horizontal cells; in the dendrites, cell body axons of rod bipolar cells; in GABAergic and other amacrine cells; in the synapses of rod and cone bipolar cells; in the cell body and fibers of ganglion cells. CB1R is also expressed in Müller cells but only for the goldfish.

The localization of CB2R in the retina has been less extensively studied than CB1R. It was first believed that CB2R was not expressed in the embryonic and adult retina. Then, CB2R mRNA localization was shown in photoreceptors, INL and GCL of the rat retina. Subsequent studies confirmed the presence of CB2R in the retina, but with a differential expression between species. CB2R is expressed in the inner and outer segments of photoreceptors, with an absence of labeling in the cone pedicles; in the membrane of the soma and in the dendrites of horizontal cells; in the membrane of the soma of cone and rod bipolar cells, and in axons of rod bipolar cells; in unspecified subtypes of amacrine cells; in the soma of ganglion cells. CB2R is absent from Müller cells for most species, while in the vervet monkey it is exclusively present in these cells.



## **Localization – Synthesizing and catabolic enzymes**

The synthesizing enzyme DAGL $\alpha$  is present in the synaptic layers of the mouse retina. Indeed, DAGL $\alpha$  is localized in postsynaptic terminals of type 1 OFF cone bipolar cells as well as in the dendrites of unidentified bipolar cells. DAGL $\alpha$  expression was recently found in the rat retina, as its presence was detected in cone and rod photoreceptors, horizontal cells' processes, some cone bipolar cells' axonal connections, amacrine cells, and ganglion cells. DAGL $\beta$  is exclusively expressed in retinal blood vessels.

The hydrolyzing enzyme FAAH is localized in the retina of mice, rats and primates. It was expressed in cone photoreceptors, axon terminals of rods, horizontal cells, rod and cone bipolar cells, dopamine amacrine cells, dendrites of starburst amacrine cells and some ganglion cells of the rat retina.

The metabolizing enzyme MAGL is expressed in the mouse and rat retina. In the OPL, MAGL is found in rod spherules and cone pedicles. MAGL is mainly expressed in rod spherules, cone pedicles, amacrine cells, Müller cells and in the axonal connections of type 2 cone bipolar cells.

The expression of the metabolizing ABHD6, a serine hydrolase, was reported in the mouse retina. It is localized in GABAergic amacrine cells, ganglion cells, and in the dendrites of ganglion cells or displaced amacrine cells.

As for the synthesizing enzyme NAPE-PLD, a major synthesizing enzyme of AEA and OEA from lipids, its retinal expression was shown but not its distribution.

## **Cannabinoids – Retinal Physiology**

### **Effects on Transmitter Release**

In the retina, cannabinoids inhibit the release of various neurotransmitters. Stimulation of CB1Rs via G<sub>i/o</sub> reduces voltage- and Ca<sup>2+</sup>-evoked release of

noradrenaline and dopamine in guinea pig retina. A first proof of concept for the importance of CB1R-mediated modulation of glutamate release came from the inhibition by agonists of CB1R, but not CB2R of [<sup>3</sup>H] D-aspartate (a substitute of L-glutamate for high-affinity uptake sites) release following ischemia or K<sup>+</sup> channel activation in isolated bovine retina. Uptake of [<sup>3</sup>H] D-aspartate identifies high-affinity uptake sites for L-glutamate and L-aspartate in photoreceptors, a small percentage of ganglion cells and Müller's cells. Some evidence also suggests a regulatory effect on GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inward currents from WIN55,212-2, a synthetic cannabinoid with similar affinity to both CB1R and CB2R, on low spontaneous transmission in embryonic chick amacrine cells. The effect of WIN55,212-2 is not mediated by CB1R.

### **Effects on Ganglion cells**

An *in vitro* study showed that CB1R/CB2R activation with WIN55,212-2 causes a partial inhibition of high-voltage activated Ca<sup>2+</sup> channels and thus decreasing the excitability of cultured rat RGCs. Another report revealed that activation of cannabinoid receptors with the same agonist caused a significant reversible reduction in the frequency of spontaneous postsynaptic currents (SPSCs) in RGCs of adult and young mice. WIN55,212-2, AEA, the selective CB1R agonist arachidonoyl-2-chloroethylamide (ACEA), and the CB2R agonist CB65 inhibit *I<sub>K</sub>* via the tetraethylammonium (TEA)-sensitive K(+) current component in rat RGCs. These effects could not be reversed by the CB1R inverse agonists AM251/SR141716A nor by the CB2R inverse agonist AM630 although both CB1Rs and CB2Rs are present on ganglion cells. The authors suggest that eCBs modulate potassium channels in rat RGCs in a receptor-independent manner, as demonstrated in other cells.

### **Effects on Amacrine cells**

The neuroprotective effects of endogenous and synthetic cannabinoids on the viability of amacrine cells were studied using an *in vivo* AMPA excitotoxicity model of retinal neurodegeneration. AEA, HU-210 and methanandamide (a stable synthetic

chiral analogue of AEA) afforded partial recovery following the AMPA-induced excitotoxicity of both bNOS-positive and cholinergic amacrine cells. This neuroprotection is mediated by a mechanism involving CB1R but not CB2R, and PI3K/Akt and/or MEK/ERK<sub>1/2</sub> signaling pathways.

### **Effects on Bipolar Cells**

CB1R-mediated inhibition of L-type calcium ( $I_{Ca}$ ) and delayed rectifier ( $I_K$ ) currents has been reported for ON-bipolar cells of salamander and goldfish. As yet there are no data on OFF-bipolar cells. The agonist WIN55,212-2 reversely inhibited  $I_{Ca}$  in salamander bipolar cells. On the goldfish large ON-type bipolar cells, the activation of CB1R and CB2R inhibited  $I_K$ , and this inhibition could be reversed by using an inverse agonist for CB1R. As this inverse agonist did not cause by itself much increase in the  $I_K$  of some ON bipolar cells and no increase on others, an eCB modulating tone present in this area remains unclear. This lack of direct modulation of bipolar cells by cannabinoids does not necessarily translate into no cannabinoid-mediated mechanism for these cells. Retrograde signaling from ganglion cells is still a plausible mechanism and was first demonstrated for 2-AG.

WIN55212-2 also inhibits the enhancement in  $I_K$  seen following the activation of D1 receptors. It has thus been proposed that the cannabinoid and dopaminergic systems have opposite properties on bipolar cells. A CB1R inverse agonist and a pre-treatment with *pertussis toxin* could both block this mechanism, although WIN55,212-2 by itself did not cause an increase in conductivity on  $I_K$ . Cannabinoids effects on ON bipolar cells have thus been associated with a tonic effect whereas D1-mediated effects have been described as phasic.

### **Effects on Photoreceptors**

Different effects on rod and cone photoreceptors have been reported for the salamander and goldfish following WIN55,212-2 addition, with a potential biphasic response based on concentration for the goldfish. Delayed rectifier currents ( $I_K$ ) were

suppressed by WIN55,212-2 in cones and rods, whereas  $Ca^{2+}$  currents ( $I_{Ca}$ ) were enhanced in rods and suppressed in cones, which could potentially be translated to an increased transmitter release, thus reducing light sensitivity. A cannabinoid-mediated retrograde suppression of membrane currents via 2-AG release on goldfish cones in retinal slices was also tested by Fan and Yazulla. These authors found the existence of a retrograde transmission in cones, with bipolar cell dendrites as the likely source of 2-AG. Furthermore, the retrograde suppression of  $I_K$  is mediated by  $Ca^{2+}$  dependent release of 2-AG from bipolar cell dendrites.

Cannabinoids also preserved cone and rod structure, as well as function and synaptic connectivity with postsynaptic neurons in a transgenic model for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Indeed, HU-210, a more potent and long lasting synthetic analogue of THC, increased the scotopic a- and b-wave amplitudes in treated animals, and preserved photoreceptor degeneration and synaptic contacts between photoreceptors and bipolar or horizontal cells.

## **Cannabinoids – Development and Neuroprotection**

### **Development**

As shown in other systems, eCBs are well known modulators of synaptic transmission and neuronal plasticity, mostly via pre-synaptic inhibitory mechanisms. The impact of the eCB system during CNS development has been documented in the last decade. The eCB system regulates the proliferation, migration, specification and survival of neural progenitors, dictates the differentiation of neurons, and controls the establishment of synaptic connections. The importance of eCBs during neuronal development is confirmed by the demonstration that maternal marijuana smoking or cannabinoid consumption during pregnancy causes cognitive, motor and social deficit. In addition, 2-AG levels in the CNS progressively increase during embryonic development, and then peak just after birth. However, eCB-mediated changes in developmental processes are not only limited to the higher brain structures, they can also affect the development of the retina.

CB1R mRNA is expressed in the rat retina as early as embryonic age 13 (E13), which is a good indicator of its possible developmental implication. By E15 to E17, the GCL expresses CB1R mRNA and, from E20-E21, it is present in the GCL as well as in an unspecified cell layer that appears to be the INL. The CB1R is also expressed in the chick retinotectal system as soon as E4, with labeling in ganglion cells and the IPL and INL. The CB1R, FAAH, DAGL $\alpha$  and MAGL were also detected during postnatal development of the rat retina. The CB1R is present in ganglion cells, amacrine, horizontal and mitotic cells at P1. During retinal development, a transient expression of CB1R was reported in cones and bipolar cells. Moreover, FAAH was found at P1 in ganglion and cholinergic amacrine cells, and in the course of development, it appeared in cones, horizontal and bipolar cells. FAAH is transiently expressed in horizontal, cholinergic amacrine cells and cone bipolar cells, showing an important redistribution of the enzyme during postnatal retinal development. Additionally, at P1, DAGL $\alpha$  is expressed early in retinal development where it is present in cone and rod photoreceptors, horizontal, amacrine, and ganglion cells. MAGL expression is detected at low levels from P1 to P9, and then gradually increases onto adulthood. MAGL is constantly found in amacrine and Müller cells from P11 onto the adult age. Overall, the expression of DAGL $\alpha$  combined with the absence of MAGL expression in early postnatal development of the retina suggests that 2-AG levels could be elevated and thus play an active role in retinal development. Despite an important body of literature currently available on the involvement of eCBs in developmental functions, only few studies focused on the impact of cannabinoids in retinal development. It is to be noted that retinas from *cnr1*-KO and *cnr2*-KO animals do not show obvious changes in retinal structures, as their thickness and morphology were similar to wild-type animals. For these reasons, it is too early to hypothesize on the role of eCBs in retinal development.

The TRPV1 is also present in the rat retina from E19 onto adulthood. From E19 to P5, the TRPV1 is detected in the neuroblastic layer, in the pigment epithelium and in a few small cell bodies in the GCL. From P15 onto adulthood, TRPV1 is also

present in all cell layers with prominent labeling in the IPL and GCL. The precise cellular expression of TRPV1 in the retina is still incomplete. So far, TRPV1 has been located in RGC and microglial cells.

No studies have yet reported the expression of GPR18 in the developing retina. Recent studies from our group have so far shown that GPR55 mRNA and protein are expressed in the retina of newly born mice, more specifically in RGCs.

### **Regeneration**

The end point of several retinal degenerative diseases is the ganglion cell death by apoptosis that may be caused by a multitude of mechanisms. In addition to their effect at the level of ionic channels, eCBs show neuroprotective properties. For example, in a model of glaucoma, CB1R agonists as well as inhibition of FAAH protect ganglion cells from glutamate excitotoxicity and ischemia caused by increased IOP. In addition, blockade of FAAH produces neuroprotective effects on RGCs in a rat model of optic nerve axotomy through a CB1R-mediated mechanism.

### **Conclusion**

eCBs are the one of the most recently described neuromodulators to be studied in neural and non-neural tissues. Their extensive expression in the nervous system and peripheral organ systems highlights the range of their actions, and their potential in therapeutic applications. Strong evidence now suggests a wide distribution of eCBs, receptors and enzymatic machinery in key structures of the visual system, including a strong presence in the retina. Although a clear picture can ascertain of the specific effects cannabinoids can have in the retina itself, or the visual system as a whole, various mechanisms in specific cellular structures of the retina have now been reported. The cannabinoid system also appears to have several roles in neuronal survival and apoptosis in the retina, and could be linked with many other ocular disorders. However, their specific mechanisms in retinal development, neuroplasticity, and neuroprotection need to be more thoroughly investigated.

**See also**

Glutamate Receptors in Retina; Information Processing: Amacrine Cells; Information Processing: Bipolar Cells; Information Processing: Ganglion Cells; Information Processing: Horizontal Cells; Neurotransmitters and Receptors: Dopamine; Phototransduction: Adaptation in Cones

**Glossary**

Age-related macular degeneration (AMD)

It comprises a variety of diseases, mainly of the elderly, that involves loss of vision in the central region of the retina.

Endocannabinoids

Endogenous ligands of cannabinoid receptors.

Monoamine oxidase

An enzyme that degrades monoamines such as dopamine, noradrenaline, adrenaline, and serotonin.

Snellen acuity

A test of visual acuity that uses eleven lines of block letters with the first line consisting of one very large letter and subsequent rows having increasing numbers of letters that decrease in size.

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)

An ionotropic receptor that increases intracellular calcium either by entry through the plasma membrane or from intracellular stores. It is activated by noxious heat, capsaicin, and the endocannabinoid, anandamide.

Vernier acuity

A test of visual acuity that measures the ability to detect a misalignment among two line segments or gratings.

### **Further Reading**

Bouchard, J. F., C. Casanova, B. Cecyre and W. J. Redmond (2016). Expression and Function of the Endocannabinoid System in the Retina and the Visual Brain. *Neural Plast* **2016**: 9247057.

Hu, S. S., A. Arnold, J. M. Hutchens, J. Radicke, B. F. Cravatt, J. Wager-Miller, K. Mackie and A. Straiker (2010). Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J Comp Neurol* **518**(18): 3848-3866.

Yazulla, S., Endocannabinoids in the retina: From marijuana to neuroprotection, *Progress in Retinal and Eye Research* **27** (5) (2008) 501–526.

### **Relevant Websites**

cannabinoidsociety.org <http://cannabinoidsociety.org/>; – This is the official website of the International Cannabinoid Research Society. It provides updates and background information on all aspect of the endocannabinoid field.

webvision.med.utah.edu <http://webvision.med.utah.edu/>; – This website from the University of Utah provides extensive coverage of retinal anatomy and physiology, particularly in mammals.

### **Change history**

The sections Cannabinoids – Retinal anatomy, Cannabinoids – Retinal physiology, Cannabinoids – Development and Neuroprotection, Conclusion, and Further reading were majorly updated. Some parts of the sections Marijuana and the Endocannabinoids, and Cannabinoids and Ocular tissues were also revised.



## 7.2- Expression and function of the endocannabinoid system in the retina and the visual brain

Jean-François Bouchard, Christian Casanova, Bruno Cécyre, William John Redmond

Cet article a été publié dans le journal *Neural Plasticity* en décembre 2015. Bien que je sois le troisième auteur dans l'ordre indiqué, j'ai néanmoins participé à l'élaboration de l'étude, la recherche de la littérature scientifique et à l'écriture du manuscrit de façon majoritaire.

### **Abstract**

Endocannabinoids are important retrograde modulators of synaptic transmission throughout the nervous system. Cannabinoid receptors are seven transmembrane G-protein coupled receptors favoring  $G_{i/o}$  protein. They are known to play an important role in various processes, including metabolic regulation, craving, pain, anxiety and immune function. In the last decade, there has been a growing interest for endocannabinoids in the retina and their role in visual processing. The purpose of this review is to characterize the expression and physiological functions of the endocannabinoid system in the visual system, from the retina to the primary visual cortex, with a main interest regarding the retina, which is the best-described area in this system so far. It will show that the endocannabinoid system is widely present in the retina, mostly in the through pathway where it can modulate neurotransmitter release and ion channel activity, although some evidence also indicate possible mechanisms via amacrine, horizontal, as well as Müller cells. The presence of multiple endocannabinoid ligands, synthesizing and catabolizing enzymes, and receptors highlights various pharmacological targets for novel therapeutic application to retinal diseases.

**Key Words:** Anatomy, CB1R, CB2R, GPR55, Development, Dorsal lateral geniculate nucleus, Cannabinoid, Function, Visual cortex

The endocannabinoid (eCB) system is a complex neuromodulatory system consisting of two classical receptors, cannabinoid receptor type 1 (CB1R) and 2 (CB2R), their endogenous ligands named endocannabinoids, and enzymes responsible for their synthesis and degradation. This system can modulate both inhibitory and excitatory synapses in a short or long-lasting manner. They mostly act through a retrograde mechanism in which the postsynaptic on demand release of eCBs will lead to a presynaptic CB1R activation in order to reduce transmitter release (42, 294, 295). These eCBs, the two best defined of which are *N*-arachidonoyl ethanolamide, also known as anandamide (AEA), and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), are then quickly degraded, mostly via fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity for AEA and monoacylglycerol lipase (MAGL) for 2-AG. This retrograde release can also act on CB2R, in large part situated on glial cells in the adult nervous system (294, 296). CB1R and CB2R are both 7-transmembrane G-protein coupled receptors with a strong preference toward Gi/o coupling (297, 298) although Gq (299) and Gs (300) coupling has as well been reported for CB1R in the past. This can lead, among others, to a reduction of presynaptic glutamate and GABA release and have neuroprotective and plasticity-mediating properties. For general reviews on the eCB signaling system, see (22, 294, 301, 302).

In recent years, the role of eCBs in visual function has been intensely studied. Recent reports suggest that the eCB system could play an instrumental role at all levels of the visual system. The vast majority of these studies focused on the effects of eCBs on adult retinal functions and only a few investigated the effects of cannabinoids on visual perception.

Reports showed that  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC) increased the recovery time from bright foveal glare by several seconds (164). Acute effects on vision from smoking marijuana include a reduction in Vernier and Snellen acuity, alterations in color discrimination and an increase in photosensitivity (169, 170). Some anecdotal reports also showed that Jamaican fishermen smoke marijuana to improve dim light vision when fishing at night (171). These results have been corroborated by another

study that measured more precisely the night vision of Moroccan fishermen using cannabis to improve visual perception (172). The authors noted increased night vision following THC or cannabis ingestion and suggested that these effects were produced locally in the retina. These intriguing findings have certainly fascinated various researchers, who then began to study the expression of the eCB system in the visual system, with a focus on the adult retina. While still scarce, there are now increasing evidence of transient receptor and enzymatic machinery expression during development. Sections one and two of this review will describe the expression (section 1) and function (section 2) of eCBs in the adult retina, whilst section three will focus on these during development (section 3).

## **Cannabinoid expression in the visual system**

### **Ocular tissues**

It is well established that marijuana consumption induces vasodilatation in conjunctiva noticeable by a reddish color change in the eyes, and a reduction in intraocular pressure (164). It was first believed that marijuana exerted its effects systemically through the central nervous system (CNS). However, it became evident that cannabinoids can act locally on cannabinoid receptors present in various cell types in the eye (182). Physiological and biochemical studies demonstrated the presence of the eCB system in various regions of ocular tissues. The CB1R mRNA is found in the ciliary body of rat, bovine and human, as well as in the trabecular meshwork in bovine and human (167, 303-305). CB1R is also detected in the non-pigmented ciliary epithelium in human and bovine tissues and conjunctival epithelium in mouse and human (165, 304). The bovine corneal epithelial cells express, among others, CB1R, MAGL,  $\alpha/\beta$  hydrolase domain 6 (ABHD6),  $\alpha/\beta$  hydrolase domain 12 (ABHD12), and N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) mRNA (306). Furthermore, AEA and 2-AG, as well as other *N*-acyl ethanolamides such as palmitoylethanolamide (PEA) are present in human ocular tissues, except for the lens (167, 168).

## Adult retina

### Endocannabinoids

The two major eCBs (AEA and 2-AG) are present in the retina of adult rodents (182), bovines (181) and humans (167). Most of the studies comparing AEA to 2-AG expression in the retina concluded that 2-AG levels are significantly higher than AEA, thus human and bovine retinas contain 25 times more 2-AG compared to AEA (167, 181, 307). PEA was detected in the rat and human and oleylethanolamide (OEA), another endocannabinoid-like *N*-acyl ethanolamide, was also measured in the rat retina (182). In human, 2-AG is mostly produced in the retina, while AEA and PEA are mainly expressed in the iris (167). The levels of endocannabinoids from various species are listed in Table 8.1.

Endocannabinoids	Concentration (pmol/g)	Species
2-arachidonoyl glycerol (2-AG)	2,970	Rat (182)
	1,393	Human (167)
	1,600	Bovine (181)
Anandamide (AEA)	Under detection level	Rat (182)
	20,000	Rat (307)
	36	Human (167)
	64	Bovine (181)
Palmitoylethanolamide (PEA)	130	Rat (182)
	200	Human (167)
Oleylethanolamide (OEA)	55	Rat (182)

**Table 8.1** Endocannabinoid levels in the adult retina of various species.

The content of eCBs varies in certain disease states, suggesting the importance of eCBs in maintaining ocular homeostasis. For instance, 2-AG levels decrease in the ciliary body of patients with glaucoma (167), but increase in the iris of patients with diabetic retinopathy (168). Similarly, PEA levels are lower in the ciliary body and the choroid of glaucomatous human retinas (167), but higher in the ciliary body of diabetic retinopathy human retinas (168). Patients with age-related macular degeneration (AMD) and diabetic retinopathy also showed widespread increases of AEA levels in the retina, choroid, ciliary body and cornea (168). It is believed that the up-regulation of eCBs in these disorders may contribute to cell protection in part by the anti-inflammatory and neuroprotective properties of eCBs (168).

#### Cannabinoid receptors

CB1R was extensively studied in the retina of various species using techniques such as *in situ* hybridization, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), western blot or immunohistochemistry. CB1R was first localized in the ganglion cell layer (GCL) and inner nuclear layer (INL) of the rat retina (99). Since then, CB1R expression was detected in the retinas of human, monkey, mouse, rat, chick, salamander and goldfish with a similar labeling in the outer plexiform layer (OPL), inner plexiform layer (IPL) and GCL (165, 182). Retinal protein distribution of CB1R is presented in Table 8.2 and its expression for different species is illustrated in Figure 8.2.

Retinal cells	
Photoreceptors	Expression in the inner (182, 189) and outer segments (165) Strong labeling in the cone pedicles (182, 184, 186, 188, 189)
Horizontal cells	Expression in the membrane but not in dendrites (182, 184, 189)
Bipolar cells	Expression in the dendrites, cell body and axons of rod bipolar cells (182, 184)
Amacrine cells	Expression in amacrine cells, including GABAergic amacrine cells (182, 184, 189, 197)
Inner plexiform layer	Unspecified expression in the IPL (165, 182, 186) Expression in the synapses of rod bipolar cells (184) Higher expression in the synapses of ON than OFF cone bipolar cells (188)
Ganglion cells	Expression in the cell body and fibers (165, 182, 186, 189, 198)
Müller cells	Absence of expression (182, 186, 189) Expression in the goldfish retina only (188)

**Table 8.2** Cannabinoid receptor type 1 protein distribution in the adult retina of various species.

The cannabinoid receptor type 2 (CB2R) distribution in the retina has been less extensively studied than CB1R. This could be explained in part by the lack of specific markers for CB2R (72, 190, 308) and by initial reports revealing an expression pattern restricted to immune cells. It was first believed that CB2R was not expressed in the embryonic and adult rat retina (99, 303). Then, CB2R mRNA localization was shown in photoreceptors, INL and GCL of the rat retina (71). More recently, protein expression of CB2R was detected in retinal pigmentary epithelium (RPE), inner segments of the photoreceptors, horizontal and amacrine cells of the rat retina (70). Furthermore, a recent report localized CB2R in cone and rod photoreceptors, horizontal cells, some amacrine cells, and bipolar and ganglion cells of the mouse retina (191). CB2R is also expressed in the vervet monkey retina, but exclusively in Müller cells (194). Finally, CB2R mRNA expression was also recently found in the

goldfish retina; however its precise distribution is still unknown (309). Retinal protein distribution of CB2R is presented in Table 8.3 and its expression for different species is illustrated in Figure 8.3.

## Retinal cells

Photoreceptors	Expression in the outer and inner segments of cones (191) Absence of expression in cone pedicles (191) Expression in the inner and outer segments and cell body of rods (191)
Horizontal cells	Expression at the membrane of the soma and in their dendrites (70, 191)
Bipolar cells	Expression in the membrane of the soma and axons of rod bipolar cells (191) Expression in the membrane of the soma of cone bipolar cells (191)
Amacrine cells	Expression in some subtypes (70, 191)
Ganglion cells	Expression in the soma (70, 191)
Müller cells	Absence of expression at the membrane of the soma, in their inner and outer processes (191) Expression in Müller cells' processes in the vervet monkey only (194)

**Table 8.3** Cannabinoid receptor type 2 protein distribution in the adult retina.

## Cannabinoid-like receptors

In recent years, the G-protein coupled receptor 55 (GPR55) was suggested to act as a cannabinoid receptor since it interacts with AEA and THC (74). Due to the lack of specificity of GPR55 markers, only one report studied its expression in the retina. In the vervet monkey retina, GPR55 is present exclusively in rods, with most prominent staining in their inner segments (310).

Another cannabinoid-like receptor present in the retina is the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), which binds eCBs such as AEA and N-arachidonoyl dopamine (311). It was first localized in photoreceptor synaptic ribbons and in amacrine cells of goldfish and zebrafish retinas (312, 313). In the rat retina, TRPV1 was found in microglial cells, blood vessels, astrocytes and in neuronal structures such as synaptic boutons of both plexiform layers, as well as in cell bodies of the INL and GCL (314). TRPV1 mRNA was also detected in ganglion and Müller cells in the



rat retina (315). In the rabbit and human retina, TRPV1 is intensely expressed in the RPE (316). TRPV1 is also present in the outer nuclear layer (ONL), INL and at the end of the nerve fiber layer as well as in Müller cells of the rabbit retina (316).

The G-protein coupled receptor 18 (GPR18) is activated by N-arachidonoyl glycine (NAGly), the endogenous metabolite of AEA, and is suggested to be the “abnormal-CBD” (Abn-CBD) receptor (317). Only one study examined the expression of GPR18 in the retina. It is mostly expressed in the IPL and OPL, and in the endothelium of retinal vessels in the rat (318).

Furthermore, there is growing evidence that the intracellular peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are the targets of cannabinoid ligands. PPARs belong to a family of nuclear receptors comprising three isoforms:  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  (see (319) for review). PPAR  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  are diffusely expressed in the retina and the RPE of humans and mice (320). PPARs are expressed in cultures of primary RPE cells and ARPE-19 cells (a human RPE cell line) (321). PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\delta$  are moderately expressed in both cell types, while PPAR $\alpha$  is only expressed in ARPE-19 cells. PPAR $\alpha$  and  $\delta$  are also expressed in freshly isolated RPE, but PPAR $\gamma$  is absent (321).

### Synthesizing and catabolic enzymes

The first retinal localization of the enzymes responsible for 2-AG synthesis was recently reported. Diacylglycerol lipase alpha (DAGL $\alpha$ ) is present in the two synaptic layers of the mouse retina, namely the OPL and the IPL (183). Indeed, DAGL $\alpha$  is localized in postsynaptic terminals of type 1 OFF cone bipolar cells as well as in the dendrites of unidentified bipolar cells. DAGL $\alpha$  expression was recently found in the rat retina, as its presence was detected in cone and rod photoreceptors, horizontal cells' processes, some cone bipolar cells axonal connections, amacrine cells, and ganglion cells (322). DAGL $\beta$  is exclusively expressed in retinal blood vessels (183).

The hydrolyzing enzyme FAAH, which is responsible for the degradation of AEA, is localized in the retina of mice (183), rats (184, 185) and primates (186). It was first detected in horizontal cells, dopamine amacrine cells, dendrites of starburst amacrine

cells and large ganglion cells of the rat retina (184). Further studies revealed the expression of FAAH in cone photoreceptors, rod bipolar cells and some ganglion cells in the rat retina as well as in the inner segments of photoreceptors, ONL, GCL, in a subpopulation of amacrine and cone bipolar cells, and in the axon terminals of rod photoreceptors (183, 185). In the vervet monkey retina, FAAH is localized in cones, cone pedicles, rod spherules, cone and rod bipolar cells, and ganglion cells (186).

The metabolizing enzyme MAGL is expressed in the mouse and rat retina. It was first detected in the OPL, IPL and GCL (183). In the IPL, MAGL is particularly present in two laminae: one in the central IPL and the other in the distal IPL. In the OPL, MAGL is found in rod spherules and cone pedicles. A recent study revealed that, in the rat retina, MAGL is expressed in amacrine and Müller cells, as well as in the axonal connections of type 2 cone bipolar cells (322).

The expression of the metabolizing ABHD6, a serine hydrolase (51, 323), was reported in the mouse retina. It is localized in GABAergic amacrine cells, ganglion cells, and in the dendrites of ganglion cells or displaced amacrine cells (183). As for the synthesizing enzyme NAPE-PLD, a major synthesizing enzyme of AEA and OEA from lipids, it is expressed in the rat retina (189).

For now, no studies have revealed the presence of ABHD12 in the retina (51), as the study of ABHD12 requires the development of a specific antibody against this protein.

### **Cannabinoid system expression in the primary visual cortex**

As CB1R is the most abundant GPCR in the CNS, it is not surprising that the eCB system is also present in several visual brain regions beyond the retina. For instance, CB1R is expressed throughout the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) of vervet monkeys, with a prominent labeling in the magnocellular layers (180). The catabolic enzyme FAAH shows the same pattern of expression, while the synthesizing enzyme NAPE-PLD is expressed homogeneously throughout the dLGN (180). All CB1R, FAAH and NAPE-PLD are weakly expressed in the koniocellular layers. Furthermore, CB1R is expressed in the primary visual cortex (V1) of macaque

monkeys, with the highest density observed in layers V-VI and the absence of labeling in layer IV (324). CB1R is intensely expressed in layers II/III and VI of the striate cortex of the adult mouse (179), where it is mainly localized at vesicular GABA transporter-positive inhibitory nerve terminals. The eCB system also appears to be of importance in development as CB1R protein expression increased throughout the development of V1, with a specific laminar pattern of CB1R appearing at postnatal day 20 (P20) and remaining until adulthood (179).

## **Cannabinoid function in the visual system**

### **Retina**

In the retina, cannabinoids inhibit the release of various neurotransmitters. Indeed, CB1R agonists decrease the release of [<sup>3</sup>H]-noradrenaline and [<sup>3</sup>H]-dopamine in the guinea pig (325) via a  $G_{i/o}$ -dependent mechanism (326, 327). In general though, the cannabinoid-mediated system in the vertebrate retina appears to act mainly via the “through” pathway, as cannabinoid receptors are concentrated in photoreceptors, bipolar and ganglion cells, i.e. cells using glutamate as a principal neurotransmitter (166). A first proof of concept for the importance of CB1R-mediated modulation of glutamate release came from the inhibition by cannabinoids of [<sup>3</sup>H]-D-aspartate (a substitute of  $L$ -glutamate for high-affinity uptake sites) release following ischemia or  $K^+$  channel activation in isolated bovine retina (328). Some evidence also suggest a regulatory effect on  $GABA_A$  receptor-mediated inward currents from WIN55,212-2, a synthetic cannabinoid with similar affinity to both CB1R and CB2R, on low spontaneous transmission in embryonic chick amacrine cells (197). It is important to note that, in this study, Warrier et al used a high concentration of WIN55,212-2 which could produce off-target effects. At this concentration, the effect of WIN55,212-2 was not blocked by SR141716A, a selective CB1R inverse agonist. Due to the nature of WIN55,212-2, this effect could be mediated by CB2R, via the activation of a TRP-family type of receptor, or via other off-target mechanisms. Taken together, these various effects may suggest a possible cannabinoid-mediated tone in transmitter release. Yet, in *in vivo* electrophysiological studies, only CB2R, not CB1R, appears to

cause changes to light responses in the mouse retina: *in vivo* recording of electroretinogram responses indicates that *cnr2*-KO animals exhibit an increased a-wave amplitude under scotopic conditions and to a different light adaptation pattern in photopic conditions (191). As this review aims at describing the anatomical distribution of cannabinoids in the retina, modulatory effects of cannabinoids will be reported by cell-type.

### Epithelial cells

In recent years, epithelial cells have been shown to be of importance in several models of pathology induced in cultured RPE cells. In one study, high glucose-mediated apoptosis in ARPE-19 RPE cells was reduced by the overexpression of FAAH, via CB1R blockade and via CB1R siRNA transfection, demonstrating a therapeutic potential for FAAH modulation in diabetic retinopathy (329). An overexpression of CB1R and CB2R and down-regulation of FAAH were also observed in response to oxidative stress in a model of AMD (330). In a first study, cannabinoid agonists were shown to cause neuroprotection in these cells, although the specificity of these effects via a CB1R nor CB2R mechanism could be made due to a lack of proper use of inhibitors or specific blockade of the receptors. However, in a follow up study by the same authors, blockade of the overexpressed CB1R in this model via specific siRNA conveyed a neuroprotective effect by causing a downregulation of oxidative stress signaling and facilitating phosphatidylinositol 3'-kinase (PI<sub>3</sub>K/AKT) activation, a fundamental signaling pathway for cellular apoptosis (331). As the list of eCBs keeps expanding, so does the list of their potential targets. For example, the atypical endothelial cannabinoid receptor, CB<sub>e</sub> (for review, see (332)), has recently shown promises as a possible inhibitor of vasoconstriction in the retinal microvasculature, an autoregulated CNS bed. Abn-CBD, an agonist of the atypical endothelial cannabinoid receptor, causes an inhibition of the retinal arteriole vasoconstriction induced by endothelin-1. This mechanism was independent of CB1R/CB2R, as well as of GPR55, a receptor for which Abn-CBD is an agonist. N-arachidonoyl glycine, a putative GPR18 agonist, showed nearly identical effects as

those of Abn-CBD. Both mechanisms took place via calcium-sensitive potassium channels (SKCa). The presence of the endothelium is important for both mechanisms, as these effects were highly reduced in its absence (318). Abn-CBD via GPR18 also caused vasodilation of isolated perfused retinal arterioles, but only on pre-contracted vessels, hinting at a mechanism dependent on vascular tone. Intra- and extra-luminal administration gave very different responses, and again the presence of epithelial cells showed to be primordial in this mechanism (333, 334). Various cannabinoids could activate PPAR $\alpha$  (335), although no studies have so far shown an effect of cannabinoids via PPAR $\alpha$  on the visual system. Interestingly, a recent study by Ma *et al.* has demonstrated that fenofibrate, a direct agonist of PPAR $\alpha$ , has a therapeutic potential for the treatment of diabetic retinopathy in models of type 1 diabetes (336). It would be interesting to investigate if some of the effects of cannabinoids in this pathology could come from a similar mechanism.

#### Photoreceptors

Different effects on rod and cone photoreceptors have been reported for the salamander and goldfish following WIN55,212-2 addition, with a potential biphasic response based on concentration for the goldfish. Delayed rectifier currents ( $I_K$ ) were suppressed by WIN55,212-2 in cones and rods, whereas Ca<sup>2+</sup> currents ( $I_{Ca}$ ) were enhanced in rods and suppressed in cones (187, 195), which could potentially be translated to an increased transmitter release, thus reducing light sensitivity. A cannabinoid-mediated retrograde suppression of membrane currents via 2-AG release on goldfish cones in retinal slices was also tested by Fan and Yazulla (196). These authors found the existence of a retrograde transmission in cones, with bipolar cell dendrites as the likely source of 2-AG. Furthermore, the retrograde suppression of  $I_K$  is mediated by Ca<sup>2+</sup> dependent release of 2-AG from bipolar cell dendrites. Cannabinoids also preserved cone and rod structure, as well as function and synaptic connectivity with postsynaptic neurons in a transgenic model for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Indeed, HU-210, a more potent and longer lasting synthetic analogue of THC, increased the scotopic a- and b-wave amplitudes in treated

animals, and preserved photoreceptor degeneration and synaptic contacts between photoreceptors and bipolar or horizontal cells (337).

### Bipolar cells

As for photoreceptors, Straiker and Yazulla's groups were the first to describe a cannabinoid-mediated effect in the salamander and the goldfish, respectively (182). WIN55,212-2 reversely inhibited  $I_{Ca}$  in the salamander [6]. On the goldfish large ON-type bipolar cells, cannabinoids agonists such as CP54490 (a full agonist at both CB1R and CB2R) and WIN55,212-2 inhibited  $I_K$ , and this inhibition could be reversed by using SR141716A, an inverse agonist for CB1R (188). As SR141716A did not cause by itself much increase in the  $I_K$  of some ON bipolar cells and no increase on others, an eCB modulating tone present in this area remains unclear. This lack of direct modulation of bipolar cells by cannabinoids do not necessarily translate into no cannabinoid-mediated mechanism for these cells. Retrograde signaling from ganglion cells is still a plausible mechanism and was first demonstrated for 2-AG (196).

WIN55212-2 also inhibits the enhancement in  $I_K$  seen following the activation of D1 receptors. It has thus been proposed that the cannabinoid and dopaminergic system have opposite properties on bipolar cells. SR141716A and a pre-treatment with *pertussis toxin* could both block this mechanism, although WIN55,212-2 by itself did not cause an increase in conductivity on  $I_K$  (188). Cannabinoids effects on ON bipolar cells have thus been associated with a tonic effect whereas D1-mediated effects have been described as phasic (166).

### Amacrine cells

The neuroprotective effects of endogenous and synthetic cannabinoids on the viability of amacrine cells were studied using an *in vivo* AMPA excitotoxicity model of retinal neurodegeneration. AEA, HU-210 and methanandamide (a stable synthetic chiral analogue of AEA) afforded partial recovery following the AMPA-induced excitotoxicity of both bNOS-positive and cholinergic amacrine cells (338). This

neuroprotection is mediated by a mechanism involving CB1R but not CB2R, and PI3K/Akt and/or MEK/ERK<sub>1/2</sub> signaling pathways.

#### Retinal ganglion cells

It has been reported that WIN55,212-2, AEA, the selective CB1R agonist arachidonoyl-2-chloroethylamide (ACEA) and the CB2R agonist CB65 inhibit  $I_K$  via the tetraethylammonium (TEA)-sensitive K(+) current component in rat RGCs. These effects could not be reversed by the CB1R inverse agonists AM251/SR141716A nor by the CB2R inverse agonist AM630 (339) although both CB1Rs and CB2Rs are present on ganglion cells. The authors suggest that eCBs modulate potassium channels in rat RGCs in a receptor-independent manner, as demonstrated in other cells (340, 341). An earlier *in vitro* study showed a partial inhibition of high-voltage activated  $Ca^{2+}$  channels with WIN55,212-2 that could be reversed by both SR141716A and AM281 in cultured rat RGCs (198). A recent study showed that the agonist WIN55,212-2 caused a significant reversible reduction in the frequency of spontaneous postsynaptic currents (SPSCs) in RGCs of adult and young mice (199). This effect was caused by presynaptic binding to cannabinoid receptors, as it did not alter the kinetics of SPSCs. The authors also found that the release probability of GABA and glutamate was significantly reduced by the agonist. As the largest reduction of the frequency of both GABAergic and glutamatergic SPSCs was observed in young mice, this suggests that the eCB system might play a role in the developmental maturation of synaptic circuits.

In addition to their effect at the level of ionic channels, eCBs, via CB1R, have neuroprotective properties. In fact, blockade of FAAH produces neuroprotective effects on RGCs in a rat model of optic nerve axotomy through a CB1R-mediated mechanism, which was gradually lost in aging animals (342). Neuroprotective properties on RGCs were also reported with the administration of WIN55,212-2 in a rat model of acute rise of intraocular pressure induced ischemia (343). Pinar-Sueiro *et al* proposed that the neuroprotective effect of WIN55,212-2 was mediated by an inhibition of glutamatergic excitotoxicity, TNF- $\alpha$  release and iNOS expression. But it is

not confirmed experimentally. Thus, cannabinoid agonists, such as WIN55,212-2 could be relevant targets to prevent degeneration of RGC cells for intraocular pressure induced ischemia (342). Overall, these neuroprotective effects by cannabinoid-mediated mechanisms are in accordance with a previous study reporting an increase in FAAH activity and a down-regulation of AEA, CB1R and TRPV1 following high intraocular pressure induced ischemia. This effect could be prevented by the administration of the FAAH inhibitor URB597 (307). Furthermore, systemic administration of URB597 or intravitreal injection of methanandamide, a stable analogue of AEA, reduced cell loss in the GCL (307). Furthermore, the neuroprotective effects mediated by cannabinoid ligands in the retina might be mediated by CB2R as well. Indeed, CB2R activation results in immunomodulation and neuroprotection in models of brain injury and by altering infiltrating macrophages and activated resident microglia (344-346). Additional studies are needed to assess the role of CB2R in retinal neuroprotection. Very little is known about the effects of other alternative cannabinoid receptors on RGC function. Future studies would need to point out if GPR55 or GPR18 activation affects RGCs.

Various TRP channels can be activated by tactile and pressure stimuli, including TRPV channels (347-350) In RGC, TRPV1 is activated by hydrostatic pressures in isolated rat cells *in vitro*. This activation causes an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  and leads to cell apoptosis and could be partially prevented by using a non-specific antagonist, iodo-resiniferatoxin (315). Ligands acting on the orthosteric site of the receptor, such as capsaicin, could also cause cell death. Interestingly, TRPV1 activity on microglia cells in the retina can have an inverse effect and prevent cell apoptosis when hydrostatic pressure is applied (351). It would thus be appealing to verify if 2-AG, AEA and N-arachidonoyl dopamine, all agonists of TRPV1, could act on RGCs via TRPV1 and mediate effects previously attributed to classical CBRs. Moreover, it would be interesting to validate if both receptors, could act in synergy and lead to an increase in intracellular calcium inside these cells.



## **Cannabinoid Function in the primary visual cortex**

So far, few studies have looked at the effects of eCBs on central visual areas processing. CB1R activation alters spontaneous and visual activity in the rat dLGN, increasing the spontaneous bursting and oscillatory activity (178, 352). For 28% of the geniculate cells, the injection of various agonists, such as AEA, 2-AG and O2545, a potent water-soluble synthetic cannabinoid, increased the visual responses, while for the remaining 72%, a decrease visual discharges was observed. These effects could be blocked by AM251. These studies suggest that CB1R acts as a dynamic modulator of visual information being sent to V1. In layer 2/3 of V1, eCBs play a crucial role in the maturation of GABAergic release. The developmental maturation of GABAergic release between eye opening and puberty can be affected in dark-reared mice and this effect can be mimicked by CB1R agonists, blocked by antagonists and was similar in *cnr1*-KO mice (176, 177). GABAergic synapses themselves in layers 2/3 and 5 have also been shown to not mature normally in *cnr1*-KO animals. These results suggest that visually stimulated endocannabinoid-mediated long-term depression of GABAergic neurotransmission (iLTD) happens in the extragranular layer of the mouse visual cortex (353). In another report, pharmacological blockade of cannabinoid receptors prevents the ocular dominance shift in layers II/III of V1, leaving plasticity intact in layer IV of juvenile mouse (354). Moreover, the application of cannabinoid agonists leads to an increase in the amplitude and frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents and miniature inhibitory postsynaptic currents in mouse V1 (355). The systemic administration of a cannabinoid agonist can also modify the encoding of visual stimuli, primarily by delaying and broadening the temporal response functions of V1 and V2 neurons in macaque monkeys (356). Finally, more studies are needed to assess the impact of CB2R function in the primary visual cortex. However, based on the impact of CB2R on retinal function, it is conceivable that CB2R could mediate a large variety of effects in the primary visual cortex.

## **Endocannabinoid expression and Function during Retinal development**

As shown in other systems, eCBs are well known modulators of synaptic transmission and neuronal plasticity, mostly via pre-synaptic inhibitory mechanisms. The impact of the eCB system during CNS development has been documented in the last decade. The eCB system regulates the proliferation, migration, specification and survival of neural progenitors (213), dictates the differentiation of neurons and controls the establishment of synaptic connections (209) (for review, see (214)). The importance of eCBs during neuronal development is confirmed by the demonstration that maternal marijuana smoking or cannabinoid consumption during pregnancy causes cognitive, motor and social deficits (357-359) (see (360) for review). In addition, 2-AG levels in the CNS progressively increase during embryonic development, then peak just after birth (96, 97). However, eCB-mediated changes in developmental processes are not only limited to the higher brain structures, they can also affect the development of the retina.

### **Retinal endocannabinoid expression**

CB1R mRNA is expressed in the rat retina as early as embryonic age 13 (E13), which is a good indicator of its possible developmental implication (99). By E15 to E17, the GCL expresses CB1R mRNA and, from E20-E21, it is present in the GCL as well as in an unspecified cell layer that appears to be the INL (99). The CB1R is also expressed in the chick retinotectal system as soon as E4, with labeling in ganglion cells and the IPL and INL (361). The CB1R, FAAH, DAGL $\alpha$  and MAGL were also detected during postnatal development of the rat retina (185, 189, 322). The CB1R is present in ganglion cells, amacrine, horizontal and mitotic cells at P1 (189). During retinal development, a transient expression of CB1R was reported in cones and bipolar cells. Moreover, FAAH was found at P1 in ganglion and cholinergic amacrine cells, and in the course of development, it appeared in cones, horizontal and bipolar cells (185). FAAH is transiently expressed in horizontal, cholinergic amacrine cells and cone bipolar cells, suggesting an important redistribution of the enzyme during postnatal retinal development. Additionally, DAGL $\alpha$  is expressed early

in retinal development as its presence at P1 is observed in cone and rod photoreceptors, horizontal, amacrine and ganglion cells (322). MAGL expression is detected at low levels from P1 to P9, and then gradually elevated onto adulthood (322). MAGL is constantly found in amacrine and Müller cells from P11 onto the adult age. Overall, the expression of DAGL $\alpha$  combined with the absence of MAGL expression in early postnatal development of the retina suggests that 2-AG levels could be elevated and thus play an active role in retinal development. Despite an important body of literature currently available on the involvement of eCBs in developmental functions, only few studies focused on the impact of cannabinoids in retinal development (see section 2.2). It is to be noted that retinas from *cnr1*-KO and *cnr2*-KO animals do not show obvious changes in retinal structures, as their thickness, distribution and morphology were similar to wild-type animals (191). For these reasons, it is too early to hypothesize on the role of eCBs in retinal development.

The TRPV1 receptor is also present in the rat retina from E19 onto adulthood (314). From E19 to P5, the TRPV1 receptor is detected in the neuroblastic layer, in the pigment epithelium and in a few small cell bodies in the GCL. From P15 onto adulthood, TRPV1 is also present in all cell layers with prominent labeling in the IPL and GCL. The precise cellular expression of TRPV1 in the retina is still incomplete. So far, TRPV1 has been located in RGC (315) and microglial cells (351).

No studies have yet reported the expression of GPR18 in the developing retina. Ongoing projects from our group have so far shown that GPR55 mRNA and protein are expressed in the retina of newly born mice, more specifically in RGCs (76).

### **Endocannabinoid system Function**

Only two studies reported the functional impact of cannabinoids on retinal development. CB1R and CB2R specific agonists induce a collapse of the growth cone of RGC axon and decrease axon growth (210, 211). Conversely, the application of CB1R and CB2R specific inverse agonists increases the growth cone surface area,

the number of filopodia present on the growth cone, and increases axon growth. The intraocular injection of CB1R and CB2R specific inverse agonists promotes retinal projection growth in the dorsal terminal nucleus. Moreover, the importance of GPR55 in neuronal development has recently been pointed out by the lipid-signaling of GPR55 and one of its ligand, lyso-phosphatidyl- $\beta$ -D-glucoside, in glial-neuron communication in the developing spinal chord (362). GPR55 also modulates the growth rate and the targets innervation of retinal projections during development. For instance, the application of GPR55 agonists increases the growth cone surface area, the number of filopodia on the growth cone and also increases the axon growth (76). Furthermore, *gpr55*<sup>-/-</sup> mice revealed a decreased branching in the dorsal terminal nucleus and a lower level of eye-specific segregation of retinal projections in the superior colliculus and in the dLGN. Altogether, these studies identify a mechanism by which the eCB system modulates retinothalamic development and offer a potential model to explain why cannabinoid agonists affect CNS development.

### **Future directions and implications**

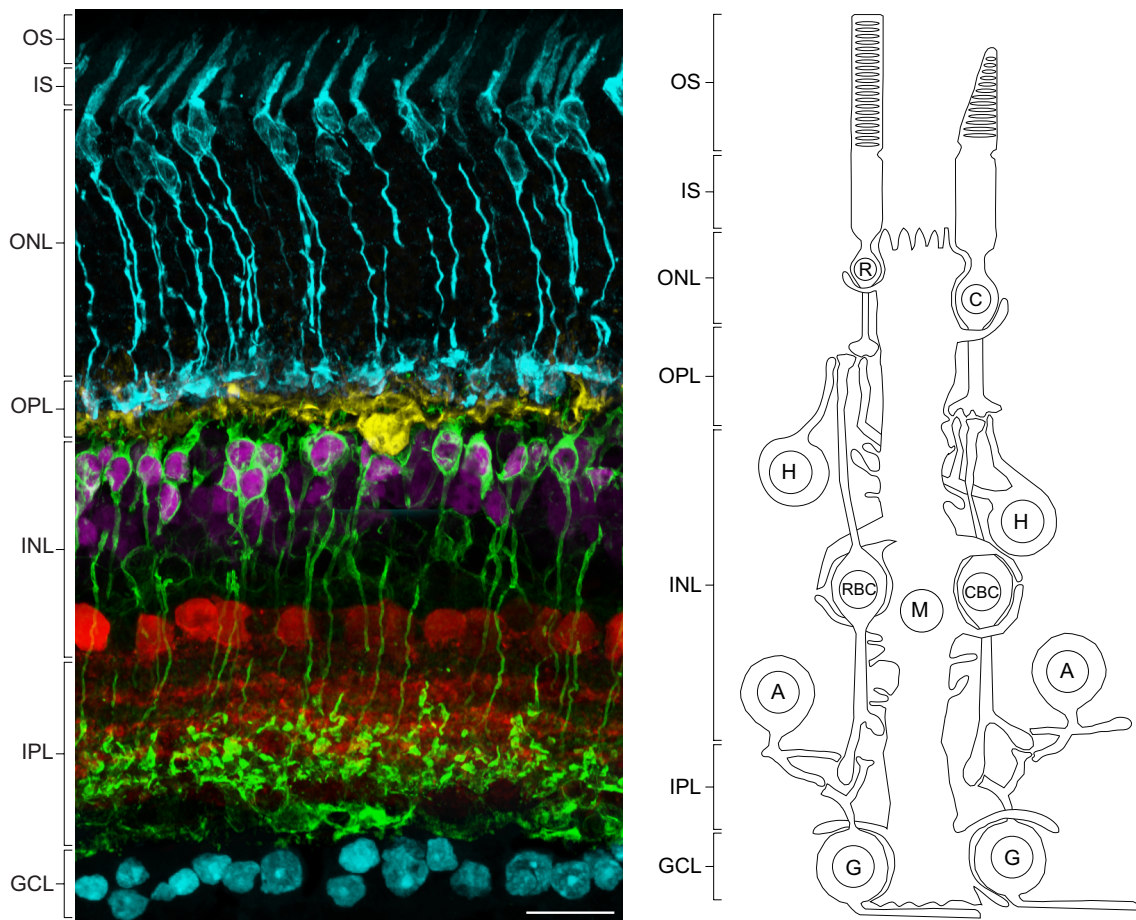
As we have reported in this review, CB1R and CB2R are both present in various retinal tissues where they modulate, in the most part via retrograde signaling, neurotransmitter release and where they inhibit potassium and calcium currents. These effects can thus modulate visual activity as early as the retina level. More studies are obviously needed to assess to what extent a cannabinoid-mediated modulation in the retina could impact visual perception. This is especially true given that cannabinoid receptors are present in most retinal cell types. As cannabinoids are also present in the visual cortex (including areas beyond V1 and V2), as well as subcortical regions such as the LGN, it may well be that cannabinoids modulate visual perception at each levels of visual system hierarchy.

The ability of the eCB system to induce various changes in plasticity in central visual areas is now well described, for review, see (294), and some of these plastic changes could potentially be present in the retina. Furthermore, in the CNS, and as our group and others have previously demonstrated in the visual system,

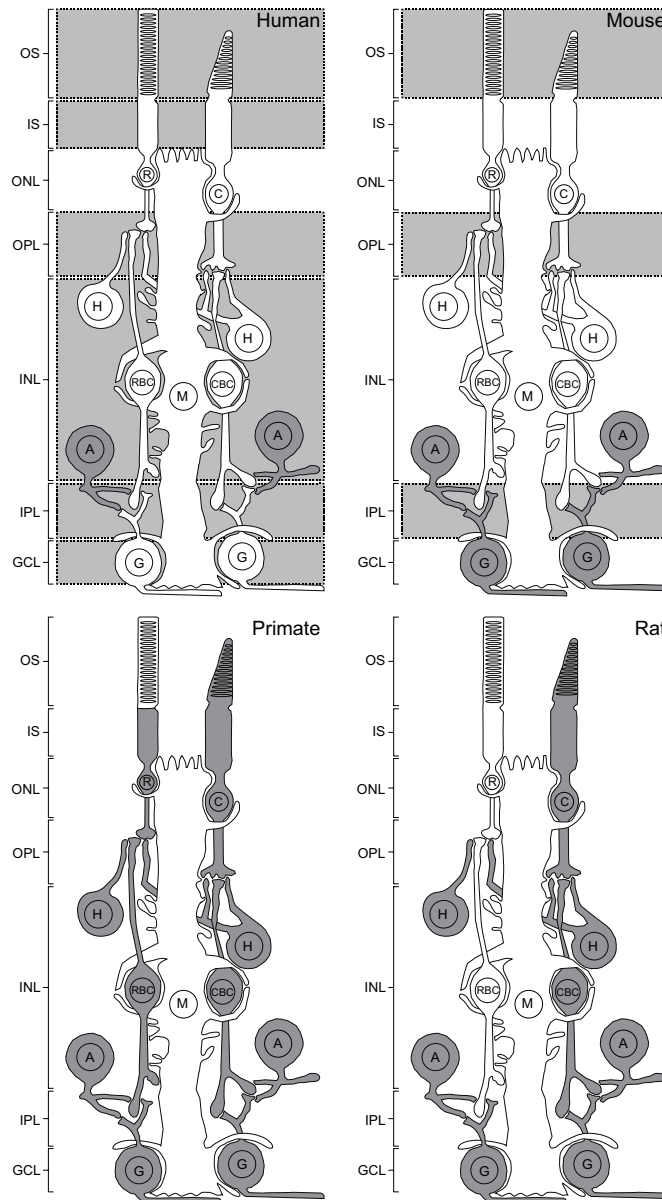
cannabinoids play an important role in neuronal development and axon guidance. It would now be of interest to see if a similar variation in the concentration of receptors, enzymatic machinery and endogenous ligands occur during retinal development. Moreover, a better anatomical identification of the various cannabinoids synthesizing and degrading enzymes, novel eCBs as well as other potential cannabinoid-like receptors such as TRPV1, GPR55 and GPR18 are also needed in order to draw a clearer picture of all the possible targets for various cannabinoid ligands in the retina and the CNS. New methods are also needed to better localize and find the rapid occurrence of the activation of CBRs. Finally, some mechanisms associated with the modulation of the eCB system in specific areas of the retina have neuroprotective potential and regulate apoptosis and could even potentially help preventing pathologies of the retina, such as glaucoma and AMD.

## **Conclusion**

Endocannabinoids constitute one of the newest neuromodulators found in neural and non-neural tissues throughout the body. Their wide expression in the nervous system and peripheral organ systems highlights the range of their actions, and their potential in therapeutic applications. Strong evidence now suggests a wide distribution of eCBs, receptors and enzymatic machinery in key structures of the visual system, including a strong presence in the retina. Although a clear picture can ascertain of the specific effects cannabinoids can have in the retina itself, or the visual system as a whole, various mechanisms in specific cellular structures of the retina have now been reported. The cannabinoid system also appears to have several roles in neuronal survival and apoptosis in the retina, and could be linked with many other ocular disorders. However, their specific mechanisms in retinal development, neuroplasticity, and neuroprotection need to be more thoroughly investigated.

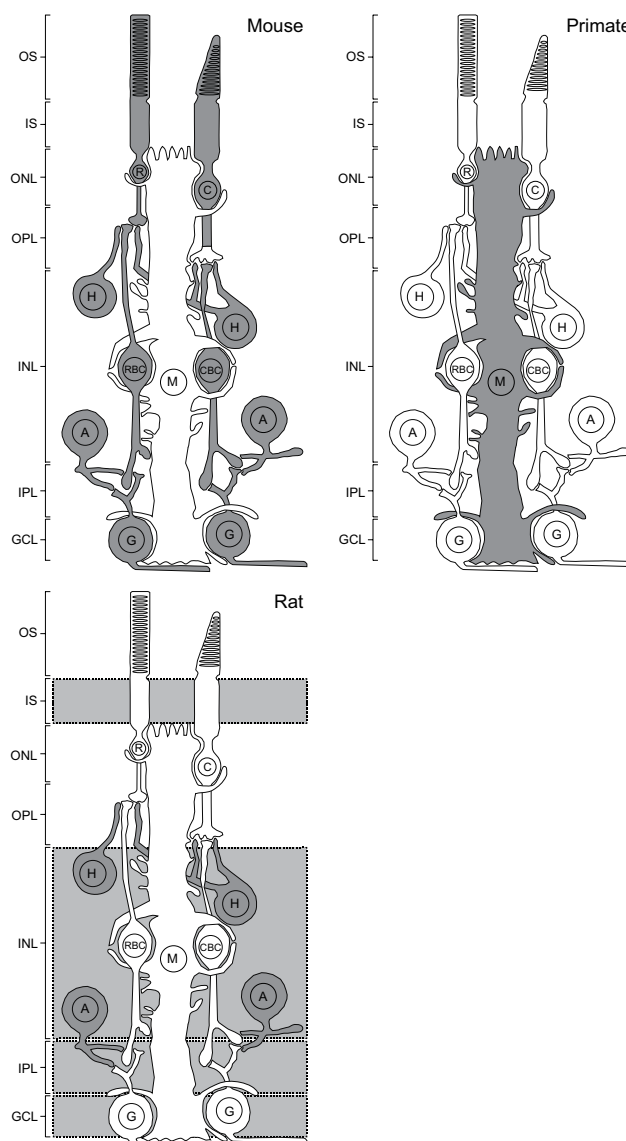


**Figure 8.1** Schematic illustration representing the organization of the mouse retina. Rod (R) and cone (blue/C) photoreceptors have their cell bodies in the outer nuclear layer (ONL) and extend inner (IS) and outer (OS) segments. Photoreceptors axons synapse in the outer plexiform layer (OPL) with horizontal (yellow/H) and bipolar (magenta/RBC-CBC) cells. The inner nuclear layer (INL) also contains amacrine (red/A) and Müller cells (M). Bipolar cells synapse to amacrine and ganglion (blue/G) cells in the inner plexiform layer (IPL). Ganglion cell axons form the optic nerve in the ganglion cell layer (GCL) and carry signals to the brain.



**Figure 8.2** Schematic illustration representing the distribution of CB1R in the adult retina of several species.

CB1R expression was demonstrated in dark gray retinal cells, while CB1R presence was noted in light gray retinal layers without precise localization. OS, outer segments of photoreceptors ; IS, inner segments of photoreceptors ; ONL, outer nuclear layer ; OPL, outer plexiform layer ; INL, inner nuclear layer ; IPL, inner plexiform layer ; GCL, ganglion cell layer ; C, cones ; R, rods ; H, horizontal cells ; CBC, cone bipolar cells ; RBC, rod bipolar cells ; A, amacrine cells ; G, ganglion cells ; M, Müller cells.



**Figure 8.3** Schematic illustration showing the expression of CB2R in the adult retina of several species.

CB1R expression was demonstrated in dark gray retinal cells, while CB2R presence was noted in light gray retinal layers without precise localization. OS, outer segments of photoreceptors ; IS, inner segments of photoreceptors ; ONL, outer nuclear layer ; OPL, outer plexiform layer ; INL, inner nuclear layer ; IPL, inner plexiform layer ; GCL, ganglion cell layer ; C, cones ; R, rods ; H, horizontal cells ; CBC, cone bipolar cells ; RBC, rod bipolar cells ; A, amacrine cells ; G, ganglion cells ; M, Müller cells. Scale bar: 20µm.



# Bibliographie

---

## Uncategorized References

1. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006;28(2):153-7.
2. French L, Manzanárez M. NAFTA & neocolonialism : comparative criminal, human & social justice. Lanham, MD: University Press of America; 2004. iv, 269 p. p.
3. Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids.* 2000;108(1-2):1-13.
4. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society.* 1964;86:1646-7.
5. Mechoulam R, Braun P, Gaoni Y. A stereospecific synthesis of (-)-delta 1- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *J Am Chem Soc.* 1967;89(17):4552-4.
6. Mechoulam R, Shani A, Ederly H, Grunfeld Y. Chemical basis of hashish activity. *Science.* 1970;169(3945):611-2.
7. Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol.* 1986;29(3):307-13.
8. Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988;34(5):605-13.
9. Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, et al. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(5):1932-6.

10. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-4.
11. Munro S, Thomas K, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
12. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
13. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology*. 1995;50(1):83-90.
14. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(1):89-97.
15. Di Marzo V, Fontana A. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995;53(1):1-11.
16. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliabatella-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural product reports*. 2016;33(12):1357-92.
17. Berman P, Futoran K, Lewitus GM, Mukha D, Benami M, Shlomi T, et al. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis. *Scientific reports*. 2018;8(1):14280.
18. Pertwee R, Howlett A, Abood M, Alexander S, Di Marzo V, Elphick M, et al. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*. LXXIX. Cannabinoid

receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacological reviews*. 2010;62(4):588-631.

19. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(11):873-84.

20. Rouzer CA, Ghebreselasie K, Marnett LJ. Chemical stability of 2-arachidonoylglycerol under biological conditions. *Chem Phys Lipids*. 2002;119(1-2):69-82.

21. Willoughby KA, Moore SF, Martin BR, Ellis EF. The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;282(1):243-7.

22. Di Marzo V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2009;60(2):77-84.

23. Luchicchi A, Pistis M. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Molecular neurobiology*. 2012;46(2):374-92.

24. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(6):218-24.

25. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(5):438-55.

26. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*. 2003;83(3):1017-66.

27. Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6375-80.
28. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 1997;277(5329):1094-7.
29. Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, et al. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci*. 2012;15(1):64-9.
30. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10819-24.
31. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996;384(6604):83-7.
32. Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(16):7656-60.
33. Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*. 2007;14(3):237-46.
34. Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, et al. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS letters*. 1996;393(2-3):231-5.

35. Pertwee R. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *The AAPS journal*. 2005.
36. Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF. Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry*. 2006;45(15):4720-6.
37. Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, et al. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*. 2008;54(1):1-7.
38. Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, et al. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *The Biochemical journal*. 2004;380(Pt 3):749-56.
39. Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2009;89(3-4):112-9.
40. Simon GM, Cravatt BF. Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol Biosyst*. 2010;6(8):1411-8.
41. Yu M, Ives D, Ramesha CS. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21181-6.
42. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*. 2009;89(1):309-80.
43. Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, et al. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their

biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256(2):377-80.

44. Sugiura T, Waku K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *Journal of biochemistry.* 2002;132(1):7-12.

45. Járai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Wang L, Razdan RK, Sugiura T, et al. Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension.* 2000;35(2):679-84.

46. Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, et al. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nature chemical biology.* 2009;5(1):37-44.

47. Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio M, Ligresti A, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *The Journal of cell biology.* 2003;163(3):463-8.

48. Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, et al. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci.* 2010;30(6):2017-24.

49. Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, et al. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron.* 2010;65(3):320-7.

50. Schlosburg J, Blankman J, Long J, Nomura D, Pan B, Kinsey S, et al. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nature neuroscience.* 2010;13(9):1113-9.

51. Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & biology*. 2007;14(12):1347-56.
52. Kozak KR, Crews BC, Morrow JD, Wang LH, Ma YH, Weinander R, et al. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonoylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *J Biol Chem*. 2002;277(47):44877-85.
53. Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27218-23.
54. Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, et al. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*. 2004;20(2):441-58.
55. Straiker A, Mackie K. Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol*. 2005;569(Pt 2):501-17.
56. Svízenská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2008;90(4):501-11.
57. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161-202.
58. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of

the central cannabinoid receptor CB1. *The Biochemical journal*. 1995;312 ( Pt 2):637-41.

59. Howlett AC. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. *Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes*. *Mol Pharmacol*. 1985;27(4):429-36.

60. Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(9):3825-9.

61. Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*. 1995;15(10):6552-61.

62. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(9):771-84.

63. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991;11(2):563-83.

64. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, et al. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1993;214(1):173-80.

65. Marsicano G, Lutz B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*. 1999;11(12):4213-25.

66. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1995;232(1):54-61.



67. Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, et al. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):3984-9.
68. Van Sickle M, Duncan M, Kingsley P, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, NY)*. 2005;310(5746):329-32.
69. Gong J-P, Onaivi E, Ishiguro H, Liu Q-R, Tagliaferro P, Brusco A, et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research*. 2006;1071(1):10-23.
70. Lopez EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, Lopez-Costa JJ. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse*. 2011;65(5):388-92.
71. Lu Q, Straiker A, Lu Q, Maguire G. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci*. 2000;17(1):91-5.
72. Atwood BK, Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):467-79.
73. Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20 Suppl 1:10-4.
74. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007;152(7):1092-101.
75. Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, et al. GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One*. 2013;8(4):e60314.

76. Cherif H, Argaw A, Cecyre B, Desgent S, Gagnon J, Mackie K, et al., rédacteurs. GPR55 participates to the development of the nervous system. Society for Neuroscience Annual Meeting; 2013; San Diego, CA.
77. Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, et al. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem.* 2000;75(6):2434-44.
78. Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, et al. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):825-31.
79. Lowin T, Straub RH. Cannabinoid-based drugs targeting CB1 and TRPV1, the sympathetic nervous system, and arthritis. *Arthritis research & therapy.* 2015;17:226.
80. Ross RA, Gibson TM, Brockie HC, Leslie M, Pashmi G, Craib SJ, et al. Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol.* 2001;132(3):631-40.
81. Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, et al. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci.* 2011;31(13):5067-77.
82. Edwards JG. TRPV1 in the Central Nervous System: Synaptic Plasticity, Function, and Pharmacological Implications. Dans: Abdel-Salam OME, rédacteur. *Capsaicin as a Therapeutic Molecule.* Basel: Springer Basel; 2014. p. 77-104.
83. Pacher P, Bátkai S. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews.* 2006.

84. Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):585-9.
85. Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol.* 2002;136(4):550-7.
86. Moreira FA, Crippa JA. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Revista brasileira de psiquiatria.* 2009;31(2):145-53.
87. Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science.* 2003;302(5642):84-8.
88. Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 2006;78(6):549-63.
89. Alsasua del Valle A. Implication of cannabinoids in neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology.* 2006;26(4-6):579-91.
90. Kreitzer AC, Regehr WG. Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci.* 2001;21(20):RC174.
91. Kim J, Alger BE. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci.* 2004;7(7):697-8.
92. Chevaleyre V, Takahashi... K. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 2006.
93. Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci.* 2002;5(5):446-51.
94. Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci.* 1999;2(4):358-63.

95. Fernandez-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.* 2000;23(1):14-20.
96. Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse.* 1999;33(3):181-91.
97. Fride E. Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J Neuroendocrinol.* 2008;20 Suppl 1:75-81.
98. Anavi-Goffer S, Mulder J. The polarised life of the endocannabinoid system in CNS development. *Chembiochem : a European journal of chemical biology.* 2009;10(10):1591-8.
99. Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience.* 1998;82(4):1131-49.
100. Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett.* 1992;148(1-2):173-6.
101. Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, et al. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science.* 2007;316(5828):1212-6.
102. Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, et al. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(25):8760-5.

103. Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, Wang S, O'Leary D, Monory K, et al. Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci.* 2010;32(5):693-706.
104. Martella A, Sepe RM, Silvestri C, Zang J, Fasano G, Carnevali O, et al. Important role of endocannabinoid signaling in the development of functional vision and locomotion in zebrafish. *FASEB J.* 2016;30(12):4275-88.
105. Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, et al. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS One.* 2007;2(7):e641.
106. Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, et al. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 2006;26(21):5628-37.
107. Perez-Reyes M, Wall ME. Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk. *The New England journal of medicine.* 1982;307(13):819-20.
108. Rodriguez de Fonseca F, Hernandez ML, de Miguel R, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA. Early changes in the development of dopaminergic neurotransmission after maternal exposure to cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992;41(3):469-74.
109. Garcia L, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. Perinatal delta 9-tetrahydrocannabinol exposure in rats modifies the responsiveness of midbrain dopaminergic neurons in adulthood to a variety of challenges with dopaminergic drugs. *Drug and alcohol dependence.* 1996;42(3):155-66.
110. Navarro M, de Miguel R, Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. Perinatal cannabinoid exposure modifies the sociosexual approach behavior and

the mesolimbic dopaminergic activity of adult male rats. *Behavioural brain research*. 1996;75(1-2):91-8.

111. Trezza V, Cuomo V, Vanderschuren LJM. Cannabis and the developing brain: insights from behavior. *European journal of pharmacology*. 2008;585(2-3):441-52.

112. Hernandez M, Berrendero F, Suarez I, Garcia-Gil L, Cebeira M, Mackie K, et al. Cannabinoid CB(1) receptors colocalize with tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons and their activation increases the levels of this enzyme. *Brain Res*. 2000;857(1-2):56-65.

113. Molina-Holgado F, Alvarez FJ, Gonzalez I, Antonio MT, Leret ML. Maternal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) alters indolamine levels and turnover in adult male and female rat brain regions. *Brain research bulletin*. 1997;43(2):173-8.

114. Molina-Holgado F, Amaro A, Gonzalez MI, Alvarez FJ, Leret ML. Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *Eur J Pharmacol*. 1996;316(1):39-42.

115. Suarez I, Bodega G, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA, Rubio M, Fernandez B. Down-regulation of the AMPA glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 in the rat cerebellum following pre- and perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure. *Cerebellum*. 2004;3(2):66-74.

116. Ellgren M, Spano SM, Hurd YL. Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(3):607-15.

117. Hubel D. *L'oeil, le cerveau et la vision. Les étapes cérébrales du traitement visuel*. Paris: Pour la Science; 1994. 240 p.

118. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, et al. Neuroscience. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2008.
119. Remington LA. Chapter 4 - Retina. Dans: Remington LA, rédacteur. Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition). Saint Louis: Butterworth-Heinemann; 2012. p. 61-92.
120. Fu Y, Yau KW. Phototransduction in mouse rods and cones. Pflugers Archiv : European journal of physiology. 2007;454(5):805-19.
121. Kefalov V, Fu Y, Marsh-Armstrong N, Yau KW. Role of visual pigment properties in rod and cone phototransduction. Nature. 2003;425(6957):526-31.
122. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience. Exploring the Brain. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
123. Yau KW. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35(1):9-32.
124. Sterling P, Demb JB. Retina. Dans: Shepherd GM, rédacteur. The Synaptic Organization of the Brain. Oxford: Oxford University Press; 2003. p. 217-69.
125. Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina. Nature reviews Neuroscience. 2004;5(10):747-57.
126. Famiglietti EV, Jr., Kolb H. Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. Science. 1976;194(4261):193-5.
127. Koyasu T, Kondo M, Miyata K, Ueno S, Miyata T, Nishizawa Y, et al. Photopic electroretinograms of mGluR6-deficient mice. Curr Eye Res. 2008;33(1):91-9.
128. Slaughter MM, Miller RF. Characterization of an extended glutamate receptor of the on bipolar neuron in the vertebrate retina. J Neurosci. 1985;5(1):224-33.

129. DeVries SH. Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron*. 2000;28(3):847-56.
130. Masland R. Neuronal diversity in the retina. *Current opinion in neurobiology*. 2001.
131. Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2004;469(1):70-82.
132. Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(1):106-17.
133. Volgyi B, Chheda S, Bloomfield SA. Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2009;512(5):664-87.
134. Grillo SL, Koulen P. Psychophysical testing in rodent models of glaucomatous optic neuropathy. *Exp Eye Res*. 2015;141:154-63.
135. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*. 2002;295(5557):1065-70.
136. He S, Weiler R, Vaney DI. Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *J Comp Neurol*. 2000;418(1):33-40.
137. Xin D, Bloomfield SA. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol*. 1999;405(1):75-87.
138. MacNeil MA, Masland RH. Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron*. 1998;20(5):971-82.
139. Huxlin KR, Sefton AJ, Furby JH. The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *J Neurocytol*. 1992;21(7):530-44.



140. Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Kodak H, Faude F, et al. Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Muller cells. *Glia*. 2000;29(1):35-44.
141. Drager UC. Autoradiography of tritiated proline and fucose transported transneuronally from the eye to the visual cortex in pigmented and albino mice. *Brain Res*. 1974;82(2):284-92.
142. Leinonen H, Tanila H. Vision in laboratory rodents-Tools to measure it and implications for behavioral research. *Behavioural brain research*. 2018;352:172-82.
143. Reese BE. 'Hidden lamination' in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional organization of this thalamic region in the rat. *Brain Res*. 1988;472(2):119-37.
144. Glickfeld LL, Olsen SR. Higher-Order Areas of the Mouse Visual Cortex. *Annual review of vision science*. 2017;3:251-73.
145. Binns KE. The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Progress in neurobiology*. 1999;59(2):129-59.
146. Sprague JM. The role of the superior colliculus in facilitating visual attention and form perception. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(4):1286-90.
147. Friedrich S, Cheng YL, Saville B. Drug distribution in the vitreous humor of the human eye: the effects of intravitreal injection position and volume. *Curr Eye Res*. 1997;16(7):663-9.
148. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina. Dans: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, rédacteurs. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT)1995.

149. Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS. A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125631.
150. Priebe NJ, McGee AW. Mouse vision as a gateway for understanding how experience shapes neural circuits. *Frontiers in neural circuits*. 2014;8:123.
151. Hébert M, Lachapelle P. Evaluation of Retinal Function: Electroretinography. Dans: DiPolo LALaA, rédacteur. *Ocular Neuroprotection*. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 249-72.
152. McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, Hamilton R, Holder GE, Tzekov R, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 2015;130(1):1-12.
153. Rigaudière F, Le Gargasson J-F. Électrorétinogramme, électro-oculogramme, potentiels évoqués visuels. Dans: SAS EM, rédacteur. *Explorations électrophysiologiques sensorielles*. Paris2007.
154. Barraco R, Bellomonte L, Brai M, Anastasi M. Analysis of the human a-wave ERG component. *Physiological measurement*. 2006;27(9):881-99.
155. Stockton RA, Slaughter MM. B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol*. 1989;93(1):101-22.
156. Newman EA, Frishman LJ. The b-wave. Dans: Arden JRHaGB, rédacteur. *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*. St-Louis: Mo: Mosby Year Book; 1991. p. 101-11.
157. Watchmeister LL. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res*. 1998;17:485-521.

158. Kretschmer F, Kretschmer V, Kunze VP, Kretzberg J. OMR-arena: automated measurement and stimulation system to determine mouse visual thresholds based on optomotor responses. *PLoS One*. 2013;8(11):e78058.
159. Douglas RM, Alam NM, Silver BD, McGill TJ, Tschetter WW, Prusky GT. Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Vis Neurosci*. 2005;22(5):677-84.
160. Guzik-Kornacka A, van der Bourg A, Vajda F, Joly S, Christ F, Schwab ME, et al. Nogo-A deletion increases the plasticity of the optokinetic response and changes retinal projection organization in the adult mouse visual system. *Brain structure & function*. 2016;221(1):317-29.
161. Liu BH, Huberman AD, Scanziani M. Cortico-fugal output from visual cortex promotes plasticity of innate motor behaviour. *Nature*. 2016;538(7625):383-7.
162. Cahill H, Nathans J. The optokinetic reflex as a tool for quantitative analyses of nervous system function in mice: application to genetic and drug-induced variation. *PLoS One*. 2008;3(4):e2055.
163. Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4611-6.
164. Adams AJ, Brown B, Haegerstrom-Portnoy G, Flom MC, Jones RT. Marijuana, alcohol, and combined drug effects on the time course of glare recovery. *Psychopharmacology (Berl)*. 1978;56(1):81-6.
165. Straiker A, Maguire G, Mackie K, Lindsey J. Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(10):2442-8. Epub 1999/09/07.

166. Yazulla S. Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(5):501-26.
167. Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, et al. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005;330(4):1062-7.
168. Matias I, Wang JW, Moriello AS, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo V. Changes in endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in eye tissues of patients with diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006;75(6):413-8.
169. Kiplinger GF, Manno JE, Rodda BE, Forney RB. Dose-response analysis of the effects of tetrahydrocannabinol in man. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 1971;12(4):650-7.
170. Dawson WW, Jimenez-Antillon CF, Perez JM, Zeskind JA. Marijuana and vision--after ten years' use in Costa Rica. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16(8):689-99.
171. West ME. Cannabis and night vision. *Nature.* 1991;351(6329):703-4. Epub 1991/06/27.
172. Russo E, Merzouki A, Mesa J, Frey K, Bach P. Cannabis improves night vision: a case study of dark adaptometry and scotopic sensitivity in kif smokers of the Rif mountains of northern Morocco. *Journal of ethnopharmacology.* 2004;93(1):99-104.
173. Schwitzer T, Henrion ML, Sarre D, Albuissou E, Angioi-Duprez K, Giersch A, et al. Spatial localization of retinal anomalies in regular cannabis users: The relevance of the multifocal electroretinogram. *Schizophrenia research.* 2019.

174. Schwitzer T, Schwan R, Angioi-Duprez K, Giersch A, Lalanne L, Albuisson E, et al. Delayed bipolar and ganglion cells neuroretinal processing in regular cannabis users: The retina as a relevant site to investigate brain synaptic transmission dysfunctions. *Journal of psychiatric research*. 2018;103:75-82.
175. Lalanne L, Ferrand-Devouge E, Kirchherr S, Rauch L, Koning E, Speeg C, et al. Impaired contrast sensitivity at low spatial frequency in cannabis users with early onset. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2017;27(12):1289-97.
176. Jiang B, Huang S, de Pasquale R, Millman D, Song L, Lee HK, et al. The maturation of GABAergic transmission in visual cortex requires endocannabinoid-mediated LTD of inhibitory inputs during a critical period. *Neuron*. 2010;66(2):248-59.
177. Jiang B, Sohya K, Sarihi A, Yanagawa Y, Tsumoto T. Laminar-specific maturation of GABAergic transmission and susceptibility to visual deprivation are related to endocannabinoid sensitivity in mouse visual cortex. *J Neurosci*. 2010;30(42):14261-72.
178. Dasilva M, Grieve K, Cudeiro J, Rivadulla C. Endocannabinoid CB1 receptors modulate visual output from the thalamus. *Psychopharmacology*. 2012;219(3):835-45.
179. Yoneda T, Kameyama K, Esumi K, Daimyo Y, Watanabe M, Hata Y. Developmental and visual input-dependent regulation of the CB1 cannabinoid receptor in the mouse visual cortex. *PLoS One*. 2013;8(1):e53082.
180. Javadi P, Bouskila J, Bouchard JF, Ptito M. The endocannabinoid system within the dorsal lateral geniculate nucleus of the vervet monkey. *Neuroscience*. 2015;288:135-44.
181. Bisogno T, Delton-Vandenbroucke I, Milone A, Lagarde M, Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-

docosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Arch Biochem Biophys.* 1999;370(2):300-7.

182. Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14565-70.

183. Hu SS, Arnold A, Hutchens JM, Radicke J, Cravatt BF, Wager-Miller J, et al. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J Comp Neurol.* 2010;518(18):3848-66.

184. Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol.* 1999;415(1):80-90.

185. Zabouri N, Ptito M, Casanova C, Bouchard JF. Fatty acid amide hydrolase expression during retinal postnatal development in rats. *Neuroscience.* 2011;195:145-65.

186. Bouskila J, Burke MW, Zabouri N, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF. Expression and localization of the cannabinoid receptor type 1 and the enzyme fatty acid amide hydrolase in the retina of vervet monkeys. *Neuroscience.* 2012;202:117-30. Epub 2011/12/07.

187. Straiker A, Sullivan JM. Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander. *J Neurophysiol.* 2003;89(5):2647-54. Epub 2003/05/13.

188. Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Fan SF. Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings. *Vis Neurosci.* 2000;17(3):391-401. Epub 2000/07/26.

189. Zabouri N, Bouchard JF, Casanova C. Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina. *J Comp Neurol.* 2011;519(7):1258-80.
190. Cecyre B, Thomas S, Ptito M, Casanova C, Bouchard JF. Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387(2):175-84.
191. Cécyre B, Zabouri N, Huppé-Gourgues F, Bouchard JF, Casanova C. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(13):8079-90.
192. Ashton JC, Zheng Y, Darlington C, Baek JH, Smith PF. Cannabinoid CB2 receptor immunolabelling in the healthy brain-still a live possibility. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2013.
193. Borowska-Fielding J, Murataeva N, Smith B, Szczesniak AM, Leishman E, Daily L, et al. Revisiting cannabinoid receptor 2 expression and function in murine retina. *Neuropharmacology.* 2018;141:21-31.
194. Bouskila J, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF. Muller cells express the cannabinoid CB2 receptor in the vervet monkey retina. *J Comp Neurol.* 2013;521(11):2399-415.
195. Fan SF, Yazulla S. Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci.* 2003;20(2):177-88. Epub 2003/08/15.
196. Fan SF, Yazulla S. Retrograde endocannabinoid inhibition of goldfish retinal cones is mediated by 2-arachidonoyl glycerol. *Vis Neurosci.* 2007;24(3):257-67. Epub 2007/06/27.

197. Warriar A, Wilson M. Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Vis Neurosci.* 2007;24(1):25-35.
198. Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 2006;12:1160-6.
199. Middleton T, Protti D. Cannabinoids modulate spontaneous synaptic activity in retinal ganglion cells. *Visual neuroscience.* 2011;28(5):393-402.
200. Middleton TP, Huang JY, Protti DA. Cannabinoids Modulate Light Signaling in ON-Sustained Retinal Ganglion Cells of the Mouse. *Frontiers in neural circuits.* 2019;13:37.
201. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* 1997;388(6644):773-8.
202. Sjöström PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron.* 2003;39(4):641-54.
203. Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature.* 2001;410(6828):588-92.
204. Mackie K, Devane WA, Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol.* 1993;44(3):498-503.
205. Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol.* 2000;57(5):1045-50.



206. Savinainen JR, Järvinen T, Laine K, Laitinen JT. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br J Pharmacol*. 2001;134(3):664-72.
207. Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med*. 2008;14(9):923-30.
208. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*. 2006;45(5):405-46.
209. Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, et al. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):19115-20.
210. Argaw A, Duff G, Zabouri N, Cécyre B, Chainé N, Cherif H, et al. Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance. *J Neurosci*. 2011;31(4):1489-99.
211. Duff G, Argaw A, Cécyre B, Cherif H, Tea N, Zabouri N, et al. Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance. *PLoS One*. 2013;8(8):e70849.
212. Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I. Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *Journal of molecular medicine*. 2001;78(11):613-25.
213. Galve-Roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzman M. Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr Pharm Des*. 2006;12(18):2319-25.
214. Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(2):83-92.

215. Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernández ML, Romero J, Cebeira M, de Miguel R, et al. Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*. 1998;125(16):3179-88.
216. Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol*. 2004;474(2):304-24.
217. Rasband WS. ImageJ. 1.47be éd. Bethesda, Maryland, USA: National Institutes of Health; 1997-2012.
218. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*. 2009;30(11):1845-55.
219. Tan HY, Ng TW. Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels. *Optics Communications*. 2008;281(10):3013-7.
220. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative western blots. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 2011;60(2):193-6.
221. Sherry DM, Wang MM, Bates J, Frishman LJ. Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol*. 2003;465(4):480-98.
222. Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, et al. Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 2011;31(21):7700-14.
223. Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, et al. Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close

proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci*. 2006;26(18):4740-51.

224. Suárez J, Bermudez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, et al. Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol*. 2008;509(4):400-21.

225. Rivera P, Arrabal S, Vargas A, Blanco E, Serrano A, Pavon FJ, et al. Localization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) in cells expressing the Ca(2+)-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:12.

226. Arellano JI, Guadiana SM, Breunig JJ, Rakic P, Sarkisian MR. Development and distribution of neuronal cilia in mouse neocortex. *J Comp Neurol*. 2012;520(4):848-73.

227. Gribaudo S, Bovetti S, Garzotto D, Fasolo A, De Marchis S. Expression and localization of the calmodulin-binding protein neurogranin in the adult mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2009;517(5):683-94.

228. Zhu X, Brown B, Li A, Mears AJ, Swaroop A, Craft CM. GRK1-dependent phosphorylation of S and M opsins and their binding to cone arrestin during cone phototransduction in the mouse retina. *J Neurosci*. 2003;23(14):6152-60.

229. Zhu X, Li A, Brown B, Weiss ER, Osawa S, Craft CM. Mouse cone arrestin expression pattern: light induced translocation in cone photoreceptors. *Mol Vis*. 2002;8:462-71.

230. Nikonov SS, Brown BM, Davis JA, Zuniga FI, Bragin A, Pugh EN, Jr., et al. Mouse cones require an arrestin for normal inactivation of phototransduction. *Neuron*. 2008;59(3):462-74. Epub 2008/08/15.

231. Bobu C, Hicks D. Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(7):3495-502.
232. Bobu C, Lahmam M, Vuillez P, Ouarour A, Hicks D. Photoreceptor organisation and phenotypic characterization in retinas of two diurnal rodent species: potential use as experimental animal models for human vision research. *Vision Res.* 2008;48(3):424-32.
233. Hendrickson A, Troilo D, Djajadi H, Possin D, Springer A. Expression of synaptic and phototransduction markers during photoreceptor development in the marmoset monkey *Callithrix jacchus*. *J Comp Neurol.* 2009;512(2):218-31.
234. Haverkamp S, Wässle H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol.* 2000;424(1):1-23.
235. Chun MH, Kim IB, Oh SJ, Chung JW. Synaptic connectivity of two types of recoverin-labeled cone bipolar cells and glutamic acid decarboxylase immunoreactive amacrine cells in the inner plexiform layer of the rat retina. *Vis Neurosci.* 1999;16(4):791-800.
236. Günhan E, van der List D, Chalupa LM. Ectopic photoreceptors and cone bipolar cells in the developing and mature retina. *J Neurosci.* 2003;23(4):1383-9.
237. Milam AH, Dacey DM, Dizhoor AM. Recoverin immunoreactivity in mammalian cone bipolar cells. *Vis Neurosci.* 1993;10(1):1-12.
238. Hirano AA, Brandstätter JH, Morgans CW, Brecha NC. SNAP25 expression in mammalian retinal horizontal cells. *J Comp Neurol.* 2011;519(5):972-88.
239. Massey SC, Mills SL. A calbindin-immunoreactive cone bipolar cell type in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 1996;366(1):15-33.

240. Mitchell CK, Rowe-Rendleman CL, Ashraf S, Redburn DA. Calbindin immunoreactivity of horizontal cells in the developing rabbit retina. *Exp Eye Res.* 1995;61(6):691-8.
241. Matsuoka RL, Nguyen-Ba-Charvet KT, Parray A, Badea TC, Chédotal A, Kolodkin AL. Transmembrane semaphorin signalling controls laminar stratification in the mammalian retina. *Nature.* 2011;470(7333):259-63.
242. Morgan JL, Dhingra A, Vardi N, Wong RO. Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells. *Nat Neurosci.* 2006;9(1):85-92.
243. Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R. Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci.* 1990;5(1):1-16.
244. Peichl L, González-Soriano J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci.* 1994;11(3):501-17.
245. Mojumder DK, Wensel TG, Frishman LJ. Subcellular compartmentalization of two calcium binding proteins, calretinin and calbindin-28 kDa, in ganglion and amacrine cells of the rat retina. *Mol Vis.* 2008;14:1600-13.
246. Negishi K, Kato S, Teranishi T. Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas. *Neurosci Lett.* 1988;94(3):247-52.
247. Johansson K, Bruun A, deVente J, Ehinger B. Immunohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(1):305-13.
248. Euler T, Wässle H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol.* 1995;361(3):461-78.

249. Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, Jain V, Dhingra NK. Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration. *Neuroscience*. 2009;160(2):517-29.
250. Gaillard F, Bonfield S, Gilmour GS, Kuny S, Mema SC, Martin BT, et al. Retinal anatomy and visual performance in a diurnal cone-rich laboratory rodent, the Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Comp Neurol*. 2008;510(5):525-38.
251. Hirano AA, Brandstätter JH, Brecha NC. Cellular distribution and subcellular localization of molecular components of vesicular transmitter release in horizontal cells of rabbit retina. *J Comp Neurol*. 2005;488(1):70-81.
252. Li Y, Zheng H, Liu PP, Chen YY, She ZJ, Xiao HL, et al. The new targets of ouabain in retinal interneurons of Sprague-Dawley rats. *Brain research bulletin*. 2010;81(6):617-24.
253. Kunzevitzky NJ, Willeford KT, Feuer WJ, Almeida MV, Goldberg JL. Amacrine cell subtypes differ in their intrinsic neurite growth capacity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(12):7603-13.
254. Li S, Mo Z, Yang X, Price SM, Shen MM, Xiang M. *Foxn4* controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron*. 2004;43(6):795-807.
255. Voinescu PE, Kay JN, Sanes JR. Birthdays of retinal amacrine cell subtypes are systematically related to their molecular identity and soma position. *J Comp Neurol*. 2009;517(5):737-50.
256. Gerrero MR, McEvilly RJ, Turner E, Lin CR, O'Connell S, Jenne KJ, et al. Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10841-5.

257. Xiang M, Zhou L, Macke JP, Yoshioka T, Hendry SH, Eddy RL, et al. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci.* 1995;15(7 Pt 1):4762-85.
258. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Cánovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3860-8.
259. Jain V, Ravindran E, Dhingra NK. Differential expression of Brn3 transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J Comp Neurol.* 2012;520(4):742-55.
260. Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY. Reactive changes of retinal astrocytes and Müller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *Journal of anatomy.* 2007;210(1):54-65.
261. Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol.* 2007;500(2):222-38.
262. Kim DS, Ross SE, Trimarchi JM, Aach J, Greenberg ME, Cepko CL. Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine retina. *J Comp Neurol.* 2008;507(5):1795-810.
263. tom Dieck S, Altmann WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, et al. Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol.* 2005;168(5):825-36.

264. Ostergaard J, Hannibal J, Fahrenkrug J. Synaptic contact between melanopsin-containing retinal ganglion cells and rod bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(8):3812-20.
265. Koulen P, Fletcher EL, Craven SE, Brecht DS, Wässle H. Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J Neurosci.* 1998;18(23):10136-49.
266. Li C, Zhou Y, Liu Z, Tuo J, Hu N, Guan H. Spatiotemporal expression of postsynaptic density 95 in rat retina after optic nerve injury. *Journal of molecular neuroscience : MN.* 2012;46(3):595-605.
267. Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature.* 2000;407(6801):189-94.
268. Johnson J, Fremeau RT, Jr., Duncan JL, Renteria RC, Yang H, Hua Z, et al. Vesicular glutamate transporter 1 is required for photoreceptor synaptic signaling but not for intrinsic visual functions. *J Neurosci.* 2007;27(27):7245-55.
269. Stella SL, Jr., Li S, Sabatini A, Vila A, Brecha NC. Comparison of the ontogeny of the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) with VGLUT1 and VGLUT2 in the rat retina. *Brain Res.* 2008;1215:20-9.
270. Seki M, Nawa H, Fukuchi T, Abe H, Takei N. BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(7):3211-8.
271. Okabe S, Shiomura Y, Hirokawa N. Immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins 1A and 2 in the rat retina. *Brain Res.* 1989;483(2):335-46.



272. Barton KM, Levine EM. Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2008;237(3):672-82.
273. Nakajima M, Cooney MJ, Tu AH, Chang KY, Cao J, Ando A, et al. Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(9):2110-4.
274. Ino H, Chiba T. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;78(1-2):163-74.
275. Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci*. 1990;96 ( Pt 1):121-9.
276. Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, et al. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J Comp Neurol*. 2007;501(1):150-67.
277. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-82.
278. Luisier F, Blu T. SURE-LET multichannel image denoising: interscale orthonormal wavelet thresholding. *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society*. 2008;17(4):482-92. Epub 2008/04/09.
279. Oudin MJ, Gajendra S, Williams G, Hobbs C, Lalli G, Doherty P. Endocannabinoids regulate the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *J Neurosci*. 2011;31(11):4000-11.

280. Bouchard JF, Casanova C, Cecyre B, Redmond WJ. Expression and Function of the Endocannabinoid System in the Retina and the Visual Brain. *Neural Plast.* 2016;2016:9247057.
281. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology.* 2009;118(1):69-77.
282. Aaltonen N, Kedzierska E, Orzelska-Gorka J, Lehtonen M, Navia-Paldanius D, Jakupovic H, et al. In Vivo Characterization of the Ultrapotent Monoacylglycerol Lipase Inhibitor {4-[bis-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl]-piperidin-1-yl}(1H-1,2,4-triazol-1-yl)m ethanone (JJKK-048). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2016;359(1):62-72.
283. Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Mor M, Compton TR, et al. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS drug reviews.* 2006;12(1):21-38.
284. Hoover HS, Blankman JL, Niessen S, Cravatt BF. Selectivity of inhibitors of endocannabinoid biosynthesis evaluated by activity-based protein profiling. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(22):5838-41.
285. Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *Journal of analytical toxicology.* 1992;16(5):276-82.
286. Lucas CJ, Galettis P, Schneider J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *British journal of clinical pharmacology.* 2018;84(11):2477-82.
287. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics.* 2003;42(4):327-60.

288. Tsai TI, Bui BV, Vingrys AJ. Dimethyl sulphoxide dose-response on rat retinal function. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 2009;119(3):199-207.
289. Shimizu T, Okada S, Yamaguchi-Shima N, Yokotani K. Brain phospholipase C-diacylglycerol lipase pathway is involved in vasopressin-induced release of noradrenaline and adrenaline from adrenal medulla in rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;499(1-2):99-105.
290. Gauthier KM, Baewer DV, Hittner S, Hillard CJ, Nithipatikom K, Reddy DS, et al. Endothelium-derived 2-arachidonylglycerol: an intermediate in vasodilatory eicosanoid release in bovine coronary arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;288(3):H1344-51.
291. Tang X, Edwards EM, Holmes BB, Falck JR, Campbell WB. Role of phospholipase C and diacylglyceride lipase pathway in arachidonic acid release and acetylcholine-induced vascular relaxation in rabbit aorta. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(1):H37-45.
292. Leung HT, Tseng-Crank J, Kim E, Mahapatra C, Shino S, Zhou Y, et al. DAG lipase activity is necessary for TRP channel regulation in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*. 2008;58(6):884-96.
293. Soethoudt M, Grether U, Fingerle J, Grim TW, Fezza F, de Petrocellis L, et al. Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nature communications*. 2017;8:13958.
294. Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 2012;76(1):70-81.
295. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(11):873-84.

296. Stella N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1:244-53.
297. Howlett AC. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life sciences*. 1984;35(17):1803-10.
298. Howlett AC, Fleming RM. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular pharmacology*. 1984;26(3):532-8.
299. Lauckner JE, Hille B, Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(52):19144-9.
300. Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(14):5327-33.
301. Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chemical reviews*. 2008;108(5):1687-707.
302. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacological reviews*. 2010;62(4):588-631.
303. Porcella A, Maxia C, Gessa GL, Pani L. The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur J Neurosci*. 2000;12(3):1123-7.

304. Stamer WD, Golightly SF, Hosohata Y, Ryan EP, Porter AC, Varga E, et al. Cannabinoid CB(1) receptor expression, activation and detection of endogenous ligand in trabecular meshwork and ciliary process tissues. *Eur J Pharmacol.* 2001;431(3):277-86.
305. Lograno MD, Romano MR. Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *Eur J Pharmacol.* 2004;494(1):55-62.
306. Murataeva N, Li S, Oehler O, Miller S, Dhopeswarkar A, Hu SS, et al. Cannabinoid-induced chemotaxis in bovine corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(5):3304-13.
307. Nucci C, Gasperi V, Tartaglione R, Cerulli A, Terrinoni A, Bari M, et al. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(7):2997-3004.
308. Ashton JC. The use of knockout mice to test the specificity of antibodies for cannabinoid receptors. *Hippocampus.* 2012;22(3):643-4.
309. Cottone E, Pomatto V, Cerri F, Campantico E, Mackie K, Delpero M, et al. Cannabinoid receptors are widely expressed in goldfish: molecular cloning of a CB2-like receptor and evaluation of CB1 and CB2 mRNA expression profiles in different organs. *Fish physiology and biochemistry.* 2013;39(5):1287-96.
310. Bouskila J, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF. Rod photoreceptors express GPR55 in the adult vervet monkey retina. *PLoS One.* 2013;8(11):e81080.
311. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 1999;400(6743):452-7.

312. Zimov S, Yazulla S. Localization of vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1)-like immunoreactivity in goldfish and zebrafish retinas: restriction to photoreceptor synaptic ribbons. *J Neurocytol.* 2004;33(4):441-52.
313. Zimov S, Yazulla S. Vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1) co-localizes with fatty acid amide hydrolase (FAAH) in retinal amacrine cells. *Vis Neurosci.* 2007;24(4):581-91.
314. Leonelli M, Martins DO, Kihara AH, Britto LR. Ontogenetic expression of the vanilloid receptors TRPV1 and TRPV2 in the rat retina. *Int J Dev Neurosci.* 2009;27(7):709-18.
315. Sappington RM, Sidorova T, Long DJ, Calkins DJ. TRPV1: contribution to retinal ganglion cell apoptosis and increased intracellular Ca<sup>2+</sup> with exposure to hydrostatic pressure. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2009;50(2):717-28.
316. Martinez-Garcia MC, Martinez T, Paneda C, Gallego P, Jimenez AI, Merayo J. Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid 1 in rabbit and human eyes. *Histology and histopathology.* 2013;28(11):1507-16.
317. McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, et al. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC neuroscience.* 2010;11:44.
318. MacIntyre J, Dong A, Straiker A, Zhu J, Howlett SE, Bagher A, et al. Cannabinoid and lipid-mediated vasorelaxation in retinal microvasculature. *Eur J Pharmacol.* 2014;735:105-14.
319. O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):576-82.

320. Herzlich AA, Ding X, Shen D, Ross RJ, Tuo J, Chan CC. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression in Murine Models and Humans with Age-related Macular Degeneration. *The open biology journal*. 2009;2:141-8.
321. Dwyer MA, Kazmin D, Hu P, McDonnell DP, Malek G. Research resource: nuclear receptor atlas of human retinal pigment epithelial cells: potential relevance to age-related macular degeneration. *Molecular endocrinology*. 2011;25(2):360-72.
322. Cecyre B, Monette M, Beudjekian L, Casanova C, Bouchard JF. Localization of diacylglycerol lipase alpha and monoacylglycerol lipase during postnatal development of the rat retina. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:150.
323. Marris W, Blankman J, Horne E, Thomazeau A, Lin Y, Coy J, et al. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nature neuroscience*. 2010;13(8):951-7.
324. Eggan SM, Lewis DA. Immunocytochemical distribution of the cannabinoid CB1 receptor in the primate neocortex: a regional and laminar analysis. *Cerebral cortex*. 2007;17(1):175-91.
325. Schlicker E, Timm J, Gothert M. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996;354(6):791-5.
326. Weber B, Schlicker E. Modulation of dopamine release in the guinea-pig retina by G(i)- but not by G(s)- or G(q)-protein-coupled receptors. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2001;15(6):393-400.
327. Savinainen JR, Laitinen JT. Detection of cannabinoid CB1, adenosine A1, muscarinic acetylcholine, and GABA(B) receptor-dependent G protein activity in transducin-deactivated membranes and autoradiography sections of rat retina. *Cellular and molecular neurobiology*. 2004;24(2):243-56.

328. Opere CA, Zheng WD, Zhao M, Lee JS, Kulkarni KH, Ohia SE. Inhibition of potassium- and ischemia-evoked [3H] D-aspartate release from isolated bovine retina by cannabinoids. *Current eye research*. 2006;31(7-8):645-53.
329. Lim SK, Park MJ, Lim JC, Kim JC, Han HJ, Kim GY, et al. Hyperglycemia induces apoptosis via CB1 activation through the decrease of FAAH 1 in retinal pigment epithelial cells. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(2):569-77.
330. Wei Y, Wang X, Wang L. Presence and regulation of cannabinoid receptors in human retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*. 2009;15:1243-51.
331. Wei Y, Wang X, Zhao F, Zhao PQ, Kang XL. Cannabinoid receptor 1 blockade protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative injury. *Molecular vision*. 2013;19:357-66.
332. Bondarenko AI. Endothelial atypical cannabinoid receptor: do we have enough evidence? *Br J Pharmacol*. 2014;171(24):5573-88.
333. Su EN, Kelly ME, Cringle SJ, Yu DY. Role of Endothelium in Abnormal Cannabidiol-Induced Vasoactivity in Retinal Arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(6):4029-37.
334. Caldwell MD, Hu SS, Viswanathan S, Bradshaw H, Kelly ME, Straker A. A GPR18-based signalling system regulates IOP in murine eye. *Br J Pharmacol*. 2013;169(4):834-43.
335. Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR research*. 2007;2007:23513.
336. Chen Y, Hu Y, Lin M, Jenkins AJ, Keech AC, Mott R, et al. Therapeutic effects of PPARalpha agonists on diabetic retinopathy in type 1 diabetes models. *Diabetes*. 2013;62(1):261-72.



337. Lax P, Esquivá G, Altavilla C, Cuenca N. Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 2014;120:175-85.
338. Kokona D, Thermos K. Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity in vivo, via activation of CB1 receptors: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Exp Eye Res.* 2015;136:45-58.
339. Zhang CQ, Wu HJ, Wang SY, Yin S, Lu XJ, Miao Y, et al. Suppression of outward K(+) currents by WIN55212-2 in rat retinal ganglion cells is independent of CB1/CB2 receptors. *Neuroscience.* 2013;253:183-93.
340. Amoros I, Barana A, Caballero R, Gomez R, Osuna L, Lillo MP, et al. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2010;48(1):201-10.
341. Barana A, Amoros I, Caballero R, Gomez R, Osuna L, Lillo MP, et al. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res.* 2010;85(1):56-67.
342. Slusar JE, Cairns EA, Szczesniak AM, Bradshaw HB, Di Polo A, Kelly ME. The fatty acid amide hydrolase inhibitor, URB597, promotes retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of optic nerve axotomy. *Neuropharmacology.* 2013;72:116-25.
343. Pinar-Sueiro S, Zorrilla Hurtado JA, Veiga-Crespo P, Sharma SC, Vecino E. Neuroprotective effects of topical CB1 agonist WIN 55212-2 on retinal ganglion cells after acute rise in intraocular pressure induced ischemia in rat. *Experimental eye research.* 2013;110:55-8.

344. Amenta PS, Jallo JI, Tuma RF, Hooper DC, Elliott MB. Cannabinoid receptor type-2 stimulation, blockade, and deletion alter the vascular inflammatory responses to traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11:191.
345. Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, et al. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 11):3152-64.
346. Zarruk JG, Fernandez-Lopez D, Garcia-Yebenes I, Garcia-Gutierrez MS, Vivancos J, Nombela F, et al. Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012;43(1):211-9.
347. Minke B, Cook B. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological reviews*. 2002;82(2):429-72.
348. Corey DP. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron*. 2003;39(4):585-8.
349. Moran MM, Xu H, Clapham DE. TRP ion channels in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 2004;14(3):362-9.
350. O'Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2005;451(1):193-203.
351. Sappington RM, Calkins DJ. Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(7):3004-17.
352. Dasilva M, Grieve KL, Cudeiro J, Rivadulla C. Anandamide activation of CB1 receptors increases spontaneous bursting and oscillatory activity in the thalamus. *Neuroscience*. 2014;265:72-82.

353. Sun W, Wang L, Li S, Tie X, Jiang B. Layer-specific endocannabinoid-mediated long-term depression of GABAergic neurotransmission onto principal neurons in mouse visual cortex. *Eur J Neurosci*. 2015.
354. Liu CH, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Cannabinoid receptor blockade reveals parallel plasticity mechanisms in different layers of mouse visual cortex. *Neuron*. 2008;58(3):340-5.
355. Garkun Y, Maffei A. Cannabinoid-dependent potentiation of inhibition at eye opening in mouse V1. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:46.
356. Ohiorhenuan IE, Mechler F, Purpura KP, Schmid AM, Hu Q, Victor JD. Cannabinoid neuromodulation in the adult early visual cortex. *PLoS One*. 2014;9(2):e87362.
357. Fried PA, Watkinson B, Gray R. Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol*. 2003;25(4):427-36.
358. Huizink AC, Mulder EJ. Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2006;30(1):24-41.
359. Richardson GA, Day NL, Goldschmidt L. Prenatal alcohol, marijuana, and tobacco use: infant mental and motor development. *Neurotoxicol Teratol*. 1995;17(4):479-87.
360. Calvigioni D, Hurd YL, Harkany T, Keimpema E. Neuronal substrates and functional consequences of prenatal cannabis exposure. *European child & adolescent psychiatry*. 2014.

361. Leonelli M, Britto LR, Chaves GP, Torrao AS. Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Brain research Developmental brain research*. 2005;156(2):176-82.

362. Guy AT, Nagatsuka Y, Ooashi N, Inoue M, Nakata A, Greimel P, et al. NEURONAL DEVELOPMENT. Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science*. 2015;349(6251):974-7.