

Université de Montréal

**Expression et localisation du système
endocannabinoïde dans la rétine du singe**

Par

Joseph Bouskila

École d'optométrie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en sciences de la
vision, option recherche fondamentale

Septembre, 2010

© Joseph Bouskila, 2010

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Expression et localisation du système
endocannabinoïde dans la rétine du singe**

Présenté par:

Joseph Bouskila

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

président-rapporteur

Vasil Diaconu

directeurs de recherche

Jean-François Bouchard, Maurice Ptito

membre du jury

Elvire Vaucher

Résumé

Les effets de la marijuana, un médicament utilisé par l'homme depuis des millénaires, sur le système visuel sont peu connus. Une meilleure connaissance de la distribution du système endocannabinoïde (eCB) de la rétine pourrait expliquer comment cette drogue affecte la vision. Cette étude vise à caractériser la distribution du récepteur cannabinoïde CB1 (CB1R) et de l'enzyme de dégradation FAAH ("fatty acid amide hydrolase") des ligands du CB1R dans la rétine du singe Vert (*Chlorocebus sabaeus*). De plus, elle vise à déterminer quelles sous-populations cellulaires de la rétine expriment ces composantes. La plupart des études à ce jour ont été conduites surtout sur les rongeurs et peu de travaux ont été réalisés chez le singe. Notre étude vient donc combler cette carence. Par le biais de méthodes immunohistochimiques, nous avons investigué la localisation du CB1R et de l'enzyme FAAH à différentes excentricités rétiniennes, de la fovéa *centralis* vers la périphérie. Nos résultats, en accord avec notre hypothèse de travail, démontrent que CB1R et FAAH sont exprimés à travers toute la rétine mais avec, cependant, des différences notoires. Au niveau de la couche des photorécepteurs, CB1R est exprimé préférentiellement dans les cônes et ce patron d'expression suit la distribution des photorécepteurs centre-périphérie. De plus, CB1R se retrouve surtout dans les pédicules des cônes de la couche plexiforme externe. CB1R et FAAH sont abondants dans les cellules bipolaires tant au centre qu'en périphérie. Le soma et l'axone des cellules ganglionnaires expriment aussi CB1R et FAAH. Ces données suggèrent que le système eCB est présent à travers toute la rétine du primate et pourrait expliquer les perturbations visuelles entraînées par la marijuana, telles la photosensibilité et la vision des couleurs.

Mots clés : Cannabinoïdes, rétine, primate, immunofluorescence, microscopie

Abstract

The effects of marijuana, a drug that has been used by men for millennia, on the visual system are poorly understood. A better understanding of the distribution of the endocannabinoid system in the retina will help us explain how this drug affects vision. This study aims at characterizing the distribution of the endocannabinoid receptor CB1 (CB1R) and the enzyme degrading CB1R ligands, fatty acid amide hydrolase (FAAH) throughout the Green monkey retina (*Chlorocebus sabaeus*). In addition, it seeks to determine which sub-population of neurons expresses CB1R and the degrading enzyme FAAH. Most data on the endocannabinoid system have been acquired in rodents and studies on monkeys are rather scarce. We attempted to fill this void by using immunohistochemical methods to locate CB1R and FAAH at various eccentricities of the monkey retina, from the center to the far periphery. Our results, in agreement with our hypothesis, demonstrate that CB1R and FAAH are expressed throughout the retina. At the level of the photoreceptors, CB1R is expressed preferentially in cones rather than in rods, and this expression pattern follows the photoreceptors distribution. In the outer plexiform layer, CB1R immunoreactivity is predominantly concentrated in the cone pedicles. Although foveal cones are the main expressers of both CB1R and FAAH, these are also found in rod bipolar cells. The ganglion cell axons strongly express the CB1 receptor and the enzyme FAAH. These data suggest that the presence of CB1R throughout the retina may be responsible for the visual effects commonly reported by cannabis users, such as the increase in photosensitivity and alterations in color discrimination.

Keywords: Cannabinoids, retina, primate, immunofluorescence microscopy

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements.....	x
Introduction.....	1
Avant-propos	2
1.1. <i>LE SYSTÈME VISUEL DU PRIMATE</i>	3
1.1.1. <i>La rétine</i>	5
1.1.1.1 Anatomie	7
1.1.1.2 Physiologie.....	11
Voies des cônes et des bâtonnets	13
A) Voies des cônes (P, M et K).....	14
B) Voie des bâtonnets.....	15
1.1.2 <i>Le corps genouillé latéral (CGL)</i>	16
1.1.3 <i>Les aires visuelles primaire et secondaires</i>	18
1.1.4 <i>Les aires supérieures associatives</i>	20
1.2. <i>LE SYSTÈME DES ENDOCANNABINOÏDES</i>	22
1.2.1 <i>Structure</i>	24
1.2.2 <i>Distribution des récepteurs CB1 et CB2</i>	26
1.2.3 <i>Voies de signalisation</i>	28
1.2.4 <i>Relation du système des endocannabinoïdes avec d'autres systèmes</i>	30
1.3. <i>LE SYSTÈME DES ENDOCANNABINOÏDES ET LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL</i>	32
1.3.1 <i>Fonctions générales</i>	34
1.4. <i>LE SYSTÈME DES CANNABINOÏDES ET LA VISION</i>	36

1.4.1 Localisation des composants du système endocannabinoïde dans le système visuel.....	37
1.4.2 Implications cliniques	38
1.4.3 Effets sur la relâche synaptique	38
Hypothèses et objectifs de l'étude	40
Manuscript	41
Discussion	76
CHOIX DU MODÈLE ANIMAL	76
DISTRIBUTION DU CB1R ET FAAH	77
IMPORTANCE POUR LE DÉVELOPPEMENT.....	78
PERSPECTIVE	79
MIGRATION NEURONALE ET GUIDAGE AXONAL	80
NEUROGENÈSE DANS LA RÉTINE ADULTE	81
IMPLICATION PHYSIOLOGIQUE DE LA DISTRIBUTION RÉTINIENNE DU SYSTÈME ENDOCANNABINOÏDE	81
CONCLUSION	82
Bibliographie.....	83

Liste des figures

Figure 1. Schéma de l'œil du primate.....	4
Figure 2. Représentation schématique de l'anatomie de la rétine.	6
Figure 3. Représentation générale des principaux types de cellules de la rétine de mammifères.....	8
Figure 4. Le spectre électromagnétique.....	9
Figure 5. Sections radiales de la rétine du singe à différentes excentricités.	10
Figure 6. Représentation schématique de la fovéa.....	11
Figure 7. Représentation schématique des 4 voies parallèles principales de la rétine du primate.	13
Figure 8. Représentation de l'organisation du corps genouillé latéral (CGL).....	17
Figure 9. Les 4 voies visuelles principales provenant des cellules ganglionnaires de la rétine.	19
Figure 10. Le trajet des voies magnocellulaire (M) et parvocellulaire (P).	21
Figure 11. Structures chimiques des molécules se liant aux récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2.....	23
Figure 12. Voies de synthèse des eCBs.	26
Figure 13. Internalisation du ligand par un système de transporteurs..	29
Figure 14. Illustration schématique des voies métaboliques de la dégradation de l'AEA et du 2-AG.	30
Figure 15. Bases moléculaires de l'action neuromodulatrice des endocannabinoïdes.....	31
Figure 16. Les eCBs agissent comme messagers synaptiques rétrogrades.....	34

Liste des abréviations

Δ^9 -THC : Δ^9 -tétrahydrocannabinol

2-AG : 2-arachidonylglycérol

AEA : arachidonyléthanolamide

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

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

CB1R : récepteur cannabinoïde 1

CB2R : récepteur cannabinoïde 2

CGR : cellule ganglionnaire de la rétine

CGL : corps genouillé latéral

COX-2 : cyclooxygénase-2

eCB : endocannabinoïde

EPR : épithélium pigmentaire rétinien

FAAH : *fatty acid amide hydrolase*

GABA : acide gamma-aminobutyrique (*gamma-aminobutyric acid*)

LOX : lipoxygénase

MGL : monoacylglycérol lipase

MAPK : protéine kinase activée par des agents mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*)

NAPE-PLD : N-acylphosphatidyléthanolamine phospholipase D

PKA : protéine kinase A

PR : photorécepteur

SNC : système nerveux central

« La vision de l'œil ne sert pas lorsque le cœur est aveugle »
- Shlomo Ben Gabirol

Remerciements

Je souhaite remercier profondément les Drs. Jean-François Bouchard et Maurice Ptito qui, par leur appui, ont su m'encourager pour mettre à terme ma formation de maîtrise. Je les remercie aussi pour leur incroyable et inestimable disponibilité, leur patience et toute la latitude dont ils m'ont permis de jouir au cours de ce projet. Ils ont su me motiver, m'encourager et me perfectionner dans tous mes projets.

Merci également à Mark Burke pour sa patience et son soutien. Mark m'a, jour après jour, d'une multitude de manières aidé, encadré et permis d'acquérir des aptitudes solides en recherche.

Je voudrais également remercier Nawal Zabouri, qui m'a généreusement accordé de son temps pour effectuer, m'aider à comprendre et à interpréter les résultats histologiques liés à mon projet.

Merci aux étudiants et au personnel des laboratoires du Dr. Jean-François Bouchard et du Dr. Maurice Ptito, qui m'ont supporté tout au long de ma formation.

Chapitre 1
Introduction

Avant-propos

C'est au niveau de la rétine que commence le premier traitement de l'information visuelle. La lumière de notre environnement pénètre dans nos yeux, passe à travers la cornée et se projette au fond de l'œil. C'est justement à cet endroit que se trouve la rétine, l'organe sensoriel responsable de la conversion de la lumière en signaux neuronaux. Ces derniers sont envoyés par le nerf optique vers les centres supérieurs du cerveau pour le traitement nécessaire à la perception.

La rétine est incroyablement complexe. Elle peut répondre aux changements d'éclairements, aux formes, aux couleurs et aux contrastes. Cependant, le fonctionnement de la rétine est peu connu et en démontrant que le système endocannabinoïde y est abondamment présent, nous ajoutons un élément supplémentaire à la compréhension de la physiologie de la vision. En effet, ce système est en position de moduler plusieurs fonctions rétinienne comme la photosensibilité et la vision des couleurs.

Le présent projet est une tentative de relier deux systèmes bien distincts, le système visuel et le système endocannabinoïde, qui ont été abondamment étudiés séparément. L'implication du système endocannabinoïde dans la vision commence à peine à être étudié et la plupart des recherches, à ce jour, ont porté sur les rongeurs, le poisson rouge et la salamandre (Yazulla, 2008). Étudier le primate nous donnera sans aucun doute des intuitions plus probantes sur le fonctionnement du système visuel de l'Homme vu l'étonnante similarité de son organisation anatomo-fonctionnelle. De toutes les informations sensorielles que nous pouvons retirer de notre entourage, une bonne vision est généralement indispensable pour une vie normale

quotidienne et le primate constitue un excellent modèle animal pour l'étude du système visuel normal et pathologique.

Une revue de la littérature décrivant le système visuel, en mettant l'emphase sur la rétine et ses annexes, ainsi que sur le système endocannabinoïde est présentée de façon à réunir les éléments nécessaires à la compréhension des données. Le manuscrit décrit les expériences effectuées et le lien établi entre la rétine et les cannabinoïdes. Finalement, une discussion générale des résultats obtenus conclue le mémoire.

1.1. Le système visuel du primate

L'organe de la vision qui capte les informations visuelles est le globe oculaire, ou tout simplement l'œil. Il est suspendu dans l'orbite, cavité du crâne dans laquelle l'œil et ses appendices se trouvent, par 6 muscles oculaires. L'œil est bien protégé par 3 éléments : les paupières, la conjonctive et le film lacrymal. Ceux-ci protègent le globe oculaire contre des agressions externes comme la poussière, mais assurent aussi un nettoyage de la cornée pour optimiser l'entrée de lumière lorsque nécessaire. L'œil est composé de 3 tuniques. La tunique la plus externe est la sclérotique avec la cornée sur le pôle antérieur. Ensuite, il y a la choroïde se spécialisant en corps ciliaire au niveau de l'ora serrata. Enfin, la tunique la plus interne est la rétine (Krebs et Krebs, 1991) dont les fibres nerveuses forment le nerf optique (Figure 1). L'œil possède également un système optique comprenant : une lentille convergente de distance focale variable (le cristallin), une surface sensible sur laquelle se forment les images et qui a un plan parallèle au cristallin (la rétine) et un

diaphragme (l'iris) qui limite la quantité de lumière qui pénètre dans l'œil. Justement, l'œil fonctionne comme un appareil photographique.

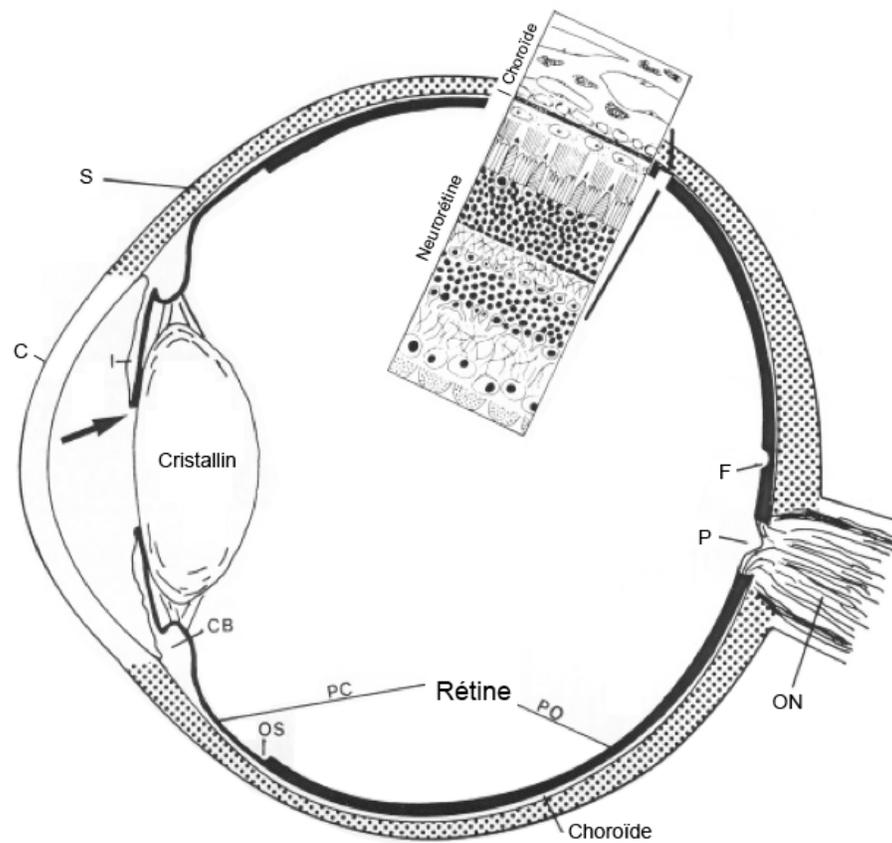


Figure 1. Schéma de l'œil du primate.

C, cornée; S, sclère; I, iris ; CB, corps ciliaire; OS, ora serrata; PC, pars caeca retinae; PO, pars optica retinae; P, papille optique; F, fovéa centralis; ON, nerf optique; flèche, ouverture de la pupille. (Image modifiée de Krebs et Krebs, 1991)

1.1.1. La rétine

La rétine est une mince membrane d'environ 0,5 mm qui tapisse la face interne de l'œil. Elle constitue la partie sensible à la lumière qui transforme l'image de lumière projetée par le système optique de l'œil. Elle contient les cellules permettant de capter les rayons lumineux et les transformer en influx nerveux. L'image lumineuse focalisée par l'œil est ainsi convertie en une série de potentiels d'action. Elle est facilement observable par rétinoscopie. La rétine est une partie très particulière du système nerveux central (SNC) qui s'isole très tôt de la masse cérébrale durant le développement de l'embryon (Sernagor et al., 2006). Elle est formée à partir d'une boursoufflure du tube nerveux que l'on appelle vésicule optique. Cette dernière s'invagine ensuite pour donner naissance à la cupule optique. Enfin, la paroi interne de la cupule optique forme la partie nerveuse de la rétine tandis que la paroi externe devient l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). L'EPR assure l'entretien des photorécepteurs (PRs) en se comportant comme phagocytes qui ingèrent leurs disques membranaires pour assurer ainsi leur renouvellement constant. De plus, ils procurent aux neurones rétiniens tous les nutriments nécessaires à leur survie cellulaire (Purves et al., 2004). Les cellules de l'EPR contiennent aussi de la mélanine, un pigment qui absorbe les rayons lumineux traversant les PRs évitant ainsi le phénomène de diffusion qui nuit à une bonne vision (Helga Kolb, 2003). Une section transversale de la rétine apparaît stratifiée au microscope. Les cellules de la rétine sont ordonnées en couches bien distinctes. La lumière passe à travers toutes les couches pour se rendre au niveau des photorécepteurs, cônes et bâtonnets. Les corps cellulaires des cellules horizontales, bipolaires, amacrines et de Müller forment la couche nucléaire interne. Les cellules amacrines déplacées se retrouvent près des cellules ganglionnaires, à la surface de la rétine.

Les connexions axonales et dendritiques forment les couches plexiformes qui séparent les couches nucléaires (Figure 2).

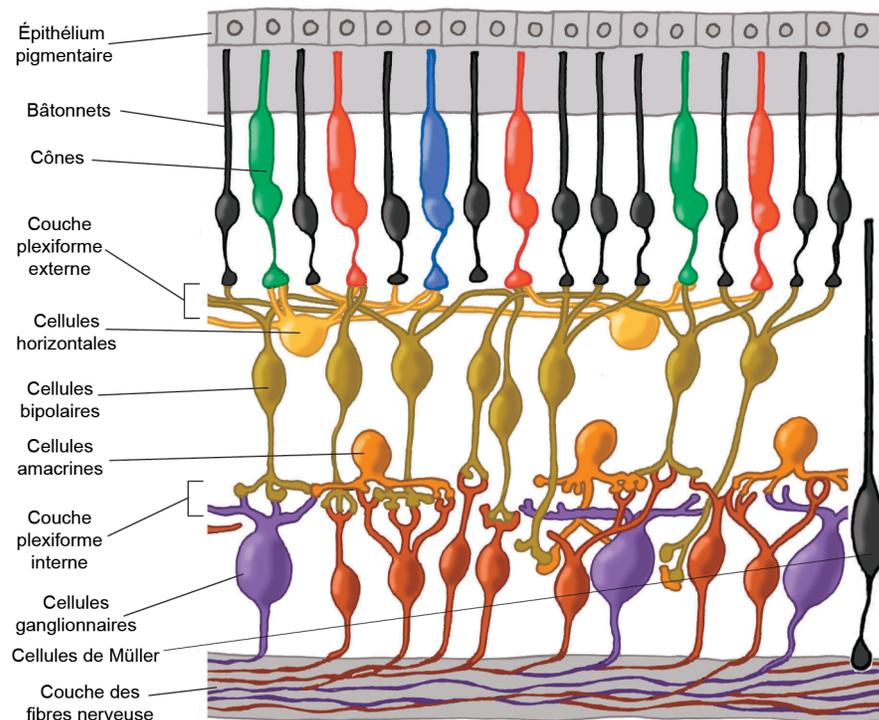


Figure 2. Représentation schématique de l'anatomie de la rétine.

La lumière doit passer à travers toutes les couches de la rétine pour se rendre au niveau des cônes et bâtonnets. La couche nucléaire interne comprend les corps cellulaires des cellules horizontales, bipolaires, amacriennes et de Müller. À la surface de la rétine, les cellules amacriennes déplacées se retrouvent dans la couche des cellules ganglionnaires (non indiqué). Les couches plexiformes sont formées des connexions axonales et dendritiques séparant les couches nucléaires. (Image modifiée de Helga Kolb, 2003)

1.1.1.1 Anatomie

Connaitre l'anatomie de la rétine est primordial pour comprendre sa fonction. La rétine de mammifères est composée de 5 types cellulaires disposés en couches: les photorécepteurs, les cellules bipolaires, les cellules horizontales et amacrines, et les cellules ganglionnaires (Figure 3). Il existe 2 types de photorécepteurs: les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets, extrêmement sensibles à la lumière, sont présents à travers la rétine, tant au centre qu'en périphérie. Ils sont 20x plus nombreux que les cônes. Les cônes, responsables principalement de la vision des couleurs, sont concentrés au niveau de la fovéa. Trois types de cônes sont sensibles à différentes longueurs d'ondes de la gamme de couleurs du spectre lumineux (Figure 4). Les photorécepteurs s'adaptent lentement aux changements d'intensité de lumière. Le maximum de réponse de l'œil en vision de jour (photopique) se situe à 550 nm et en vision de nuit (scotopique) à 490 nm. À des niveaux de basse luminance, ce sont seulement les bâtonnets qui sont activés. Les cônes commencent à contribuer à la perception visuelle à la lumière des étoiles et sont les seuls qui sont activés à des niveaux de haute luminance. La raison pour laquelle les photorécepteurs répondent à des intervalles d'intensité lumineuse bien spécifiques est que les mécanismes de transduction sont différents. Par exemple, un bâtonnet peut répondre à un seul photon de lumière tandis que plus de 100 photons sont nécessaire pour activer un cône. De plus, les bâtonnets ne contiennent qu'un seul photopigment tandis qu'il existe 3 types de cônes qui diffèrent par le photopigment qu'ils contiennent. Ces photopigments sont sensibles à une longueur d'onde bien précise, coute (bleu), moyenne (vert) ou longue (rouge). Ainsi, la perception des couleurs permet aux primates de discriminer des objets sur la base de la distribution des longueurs d'onde lumineuses qu'ils reflètent.

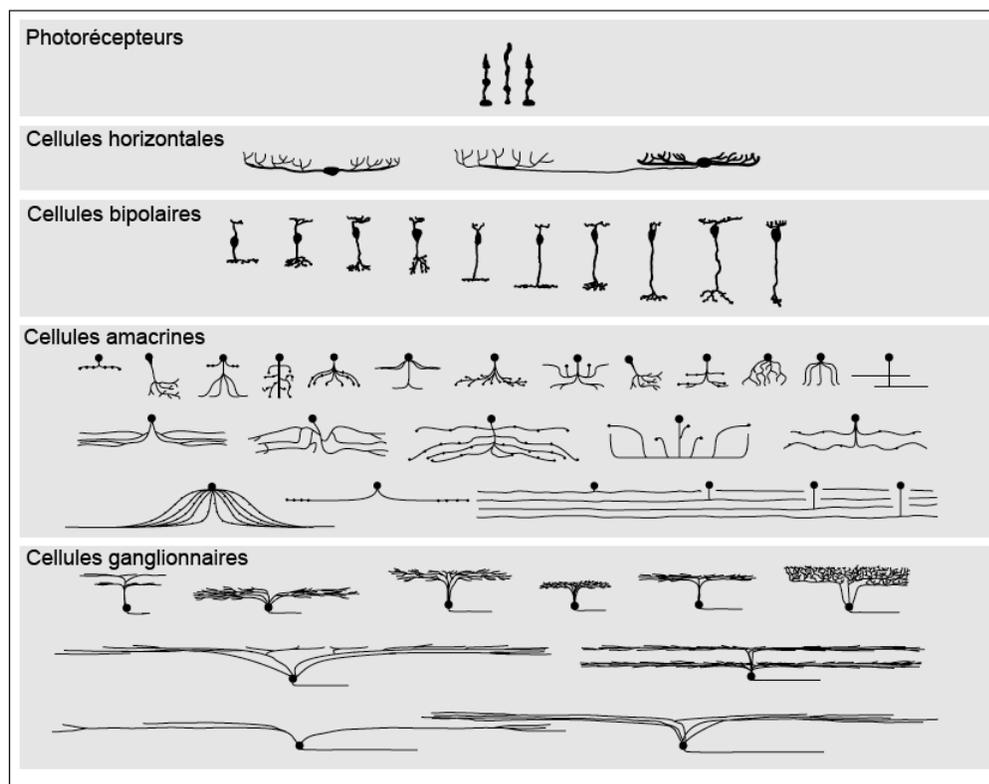


Figure 3. Représentation générale des principaux types de cellules de la rétine de mammifères.

De la rangée du haut vers le bas sont reproduits les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires. Les cellules amacrines, la classe de cellules la plus diversifiée, ont été les plus étudiées chez le lapin. Cette illustration est basée principalement sur des travaux effectués chez le lapin. La plupart des cellules sont également observés dans une variété d'espèces de mammifères. Pour des raisons stériques, seul un sous-ensemble des amacrines à grand champ et des cellules ganglionnaires sont présentés. Le nombre total de cellules dans l'illustration est de 49. (Illustration modifiée de Masland, 2001)

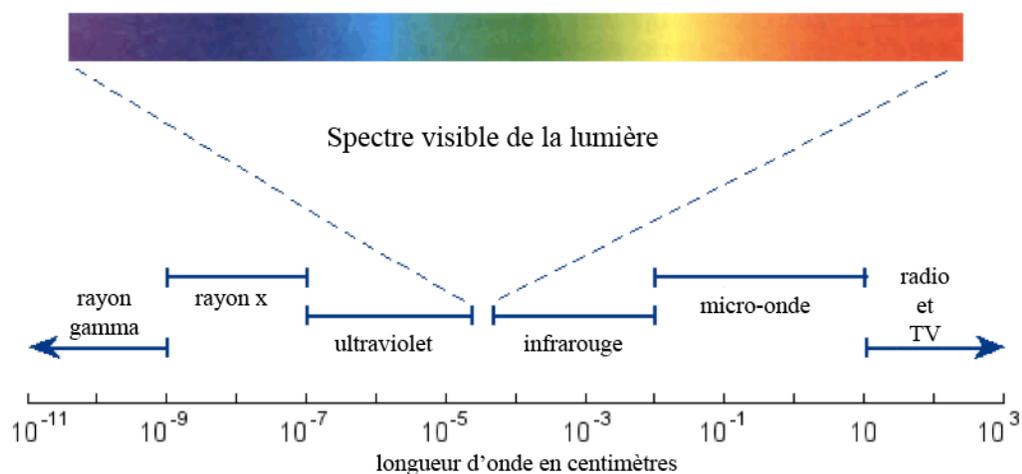


Figure 4. Le spectre électromagnétique.

Le spectre visible s'étend environ de 400 nm (violet) à 700 nm (rouge). L'œil normal possède une sensibilité maximale à une longueur d'onde de 550 nm qui correspond au jaune-vert. L'ultraviolet et l'infrarouge font parties des ondes électromagnétiques qui ne sont pas visible à l'œil humain car les photorécepteurs de la rétine ne contiennent pas de pigments sensibles à ces longueurs d'onde contrairement à d'autres espèces animales, notamment la souris et le rat. (Purves et al., 2004; Image tirée du site <http://www.pegasuslaser.com/physics-safety/properties.php>)

Le spectre visible de la lumière est appelé ainsi parce que c'est ce que l'humain trichromate normal peut voir. Les cônes sont surtout présent dans le centre rétinien (fovéa) et contribuent à assurer la meilleure résolution spatiale. C'est à ce niveau qu'il y a une communication directe 1 à 1 cellule, il n'y a pas de distorsion de la lumière et ils sont plus petits et entassés (Osterberg, 1935). En effet, parmi les mammifères, ce ne sont que les primates qui possèdent une fovéa *centralis* de la rétine (Krebs et Krebs, 1991).

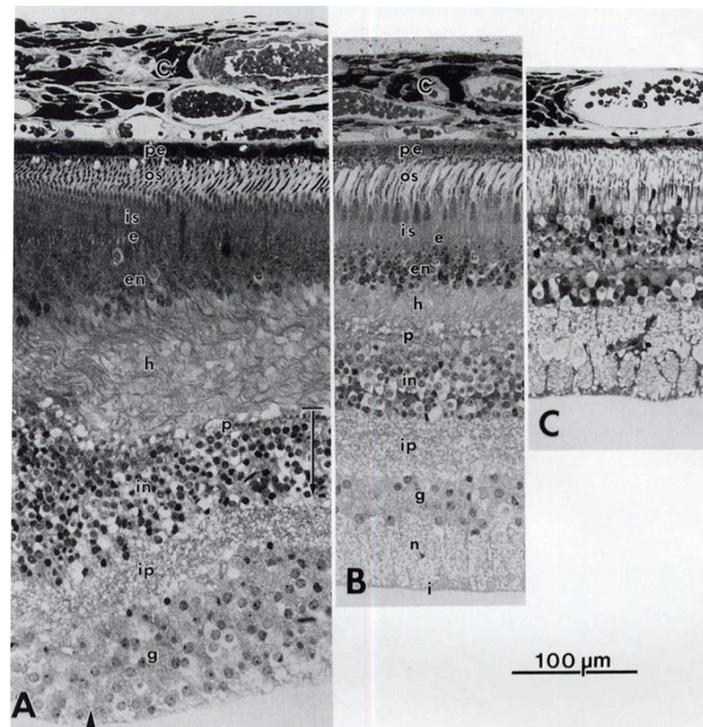


Figure 5. Sections radiales de la rétine du singe à différentes excentricités.

En (A), nous retrouvons la partie parafovéale; en (B) la mi-périphérie; en (C), la partie périphérique de la rétine. Images prises au même grossissement. La barre d'échelle équivaut à 100 µm. (Inspirée de Krebs et Krebs, 1991, p. 15)

Ce qui diffère entre la rétine de mammifères (Figure 3) et la rétine de primates est que la rétine de primates possède un troisième type de cônes, des cellules bipolaires naines (« midget ») et des cellules ganglionnaires naines (« midget »). De plus, au niveau de la fovéa des primates, ces cellules sont numériquement dominantes. Toutefois, la fovéa, ce point de la rétine au niveau de l'axe de vision du globe oculaire, représente une petite fraction de la rétine total des primates. C'est la région qui est responsable de la plus haute acuité visuelle. À ce niveau, l'épaisseur de la rétine est diminuée, devient plus

épaisse en para-central et se réduit de nouveau en périphérie (Figures 5 et 6). Un point qui mérite d'être soulevé est que les cellules sont réparties uniformément parmi les différentes classes, sauf au niveau de la fovéa. Les cellules à grand champ sont moins nombreuses que les cellules à champ étroit, mais il n'y a pas de types prédominants. Autrement dit, la rétine n'est pas composée de quelques grands joueurs, mais plutôt d'une distribution imposante de cellules équipotentes.

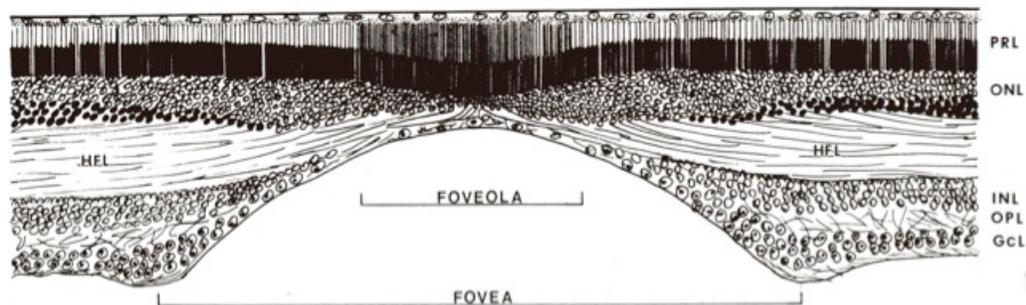


Figure 6. Représentation schématique de la fovéa.

GCL, couche des cellules ganglionnaires; HFL, couche des fibres de Henle; INL, couche nucléaire interne; ONL, couche nucléaire externe; OPL, couche plexiforme externe; PRL, couche des photorécepteurs. (Inspirée de Krebs et Krebs, 1991, p. 9)

1.1.1.2 Physiologie

C'est au niveau des segments externes des photorécepteurs que se trouvent les pigments sensibles à la lumière. Les bâtonnets contiennent plus de photopigments que les cônes, ce qui leur permet de capter plus de lumière. De plus, les bâtonnets amplifient les signaux visuels beaucoup plus que les cônes. C'est la raison pour laquelle les bâtonnets sont beaucoup plus sensibles à la lumière que les cônes. Le

système des bâtonnets est convergent. Plusieurs bâtonnets établissent des connexions avec la même cellule bipolaire, ce qui renforce les signaux perçus par la lumière et augmentent la capacité du cerveau à détecter une très faible luminosité. Comme mentionné précédemment, au niveau de la fovéa, les cônes ont un petit diamètre, sont densément disposés et ne converge pas du tout; un cône se lie avec une cellule bipolaire qui se lie avec une cellule ganglionnaire (Purves et al., 2004).

La voie verticale est appelée aussi la voie glutamatergique puisque c'est le glutamate qui est le neurotransmetteur principal tandis que la voie horizontale est appelée GABAergique parce que le GABA est le neurotransmetteur principal. Dans le noir (obscurité), les photorécepteurs sont dépolarisés. La libération glutamate est importante.

Durant le jour (lumière), les photorécepteurs sont hyperpolarisés. Il y a donc une baisse de la relâche de glutamate au niveau de la synapse avec la cellule bipolaire. La raison pour laquelle les cellules peuvent répondre différemment au glutamate (ON ou OFF) est qu'elles possèdent différents récepteurs au glutamate. Les cellules bipolaires à centre-ON ont un récepteur métabotrope (mGLUR6) qui, lorsqu'activé au glutamate, active une cascade de signalisation intracellulaire qui ferme les canaux sodiques (Na^+) cGMP-dépendants, réduit le courant membranaire et hyperpolarise ainsi la cellule. En revanche, les cellules bipolaires à centre OFF ont des récepteurs ionotropiques (kainate et AMPA) qui mènent à la dépolarisation des cellules en réponse au glutamate libéré aux niveaux des terminaisons des photorécepteurs.

Voies des cônes et des bâtonnets

La voie verticale de la rétine est composée des photorécepteurs (1^{ère} étage rétinien), des cellules bipolaires (2^e étage rétinien) puis des cellules ganglionnaires (3^e étage rétinien). Ainsi, 4 grandes voies parallèles existent. Trois voies impliquent les cônes (voies des cônes) tandis qu'une voie implique les bâtonnets (voie des bâtonnets) (Figure 7).

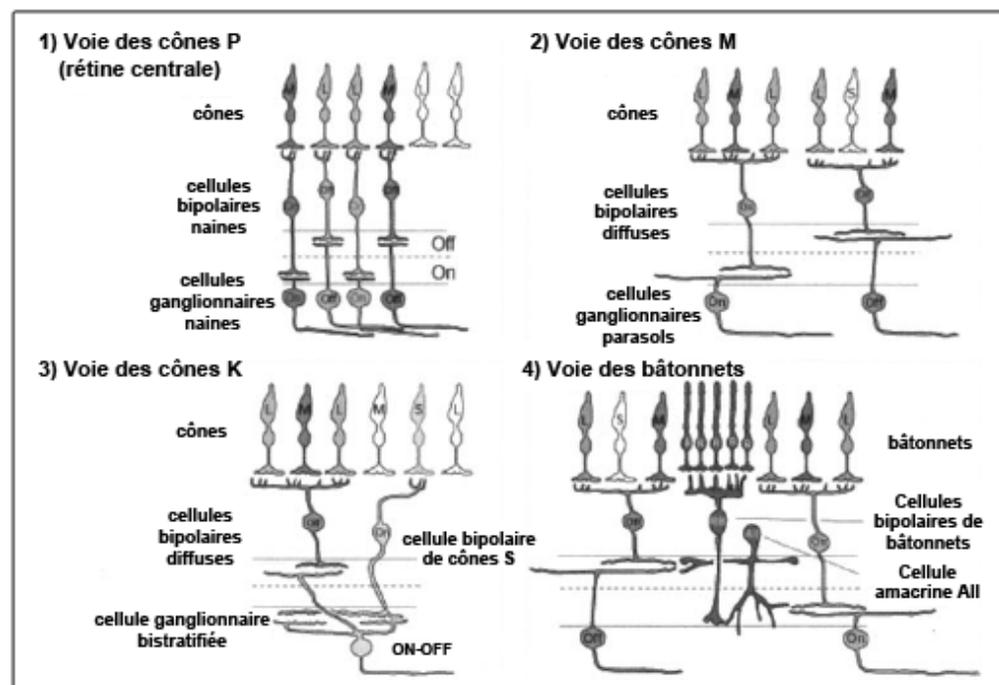


Figure 7. Représentation schématique des 4 voies parallèles principales de la rétine du primate.

À noter est qu'en rétine centrale, chaque cône se lie à une cellule bipolaire de type ON ou OFF. A des fins de simplicité, 2 cellules bipolaires seulement ont été représentées dans ce schéma (Image modifiée de Silveira et al., 2006).

A) Voies des cônes (P, M et K)

Il est possible de distinguer 3 voies des cônes qui ne fonctionnent qu'aux niveaux de luminance photopiques :

1) La voie P (parvocellulaire) se termine aux couches parvocellulaires du corps genouillé latéral et implique les cônes de type L (« long » pour les longues longueurs d'ondes) et M (« medium » pour les longueurs d'ondes moyennes). Chaque cônes L ou M est lié à 2 cellules bipolaires de type naines ON et OFF, elles même reliées aux cellules ganglionnaires naines ON et OFF. Après une stimulation, les cellules bipolaires naines ON vont se dépolariser et les OFF s'hyperpolariser.

2) La voie M (magnocellulaire) se termine aux couches magnocellulaires du corps genouillé latéral et implique aussi les cônes L et M. Chaque cônes L ou M est lié à 2 cellules bipolaires de type diffuses ON et OFF, elles même reliées aux cellules ganglionnaires parasols ON et OFF. La différence est que les cellules bipolaires entre en contact indifféremment avec les cônes L ou M alors que les bipolaires naines séparent bien les cônes L des M. De plus, plusieurs cellules bipolaires sont connectées à la même cellule ganglionnaire.

3) La voie K (koniocellulaire) se termine aux couches interlaminaires du corps genouillé latéral. Elle implique les cônes S (« Short » pour courtes longueurs d'onde). Chaque cône S est lié à 1 cellule bipolaire de cône S de type ON, elle même reliée à 1 cellule ganglionnaire bistratifiée qui reçoit les informations de S, mais aussi de L et de M. En fait 5 cônes sont liés à 1 cellule bipolaire, il y a donc convergence. Les cônes S ont un rôle fondamental pour la vision des

couleurs mais sont peu nombreux et fragiles (ce sont les premiers touchés lors de pathologies).

Ainsi, au centre de la rétine, la voie P lie un cône à 2 cellules bipolaires. Il y a une divergence et amplification de l'information. Ceci explique pourquoi une bonne acuité visuelle réside dans cette zone. Pour la voie M, plusieurs cônes sont liés à une seule bipolaire, il y a donc une convergence de l'information. En périphérie, les voies P et M sont toutes les deux convergentes. L'information reçue est donc compressée. La performance visuelle est moins bonne et il y a une absence d'amplification. En somme, les voies P (80%), M (19%) et K (1%) forment 100% du nerf optique. Que reste-t-il pour les bâtonnets?

B) Voie des bâtonnets

La voie des bâtonnets est une voie qui arrive en dernier durant l'embryogénèse; les bâtonnets se connectent directement sur la voie P déjà formée. Cette voie est activée lorsque les cônes sont non fonctionnels, comme en vision scotopique. En effet, cette voie joue un rôle important dans la vision de nuit. Elle a aussi un rôle dans le trophisme (nutrition et croissance) des cônes. Ainsi, un dysfonctionnement des bâtonnets affecte le fonctionnement normal des cônes. Justement, plusieurs thérapies visent à rétablir le fonctionnement des bâtonnets pour la survie des cônes. Plusieurs bâtonnets se lient à 1 cellule bipolaire des bâtonnets qui se branchent aux cellules amacrines AII qui transmettent l'information aux cellules ganglionnaires naines On et Off. Si la voie des bâtonnets ne se lie pas à la voie P, elle assure son rôle trophique sur les cônes.

1.1.2 Le corps genouillé latéral (CGL)

Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine sont acheminés vers le nerf optique, chiasma optique, tractus optique pour ensuite se rendre au corps genouillé latéral. Le CGL est situé dans la partie dorsale du thalamus. Ces efférences sont ensuite projetées vers le cortex visuel primaire pour traiter l'information visuelle de la rétine. Une coupe transversale du CGL du primate montre 6 couches cellulaires bien distinctes. Le fait que les neurones du CGL soient organisés en différentes couches illustre que des éléments spécifiques de l'information visuelle sont traités à part à ce niveau. Les 2 premières couches les plus ventrales sont les couches magnocellulaires. Les 4 autres couches les plus dorsales sont les couches parvocellulaires. De plus, ce sont les cellules ganglionnaires de type M qui projettent aux 2 premières couches du CGL et les cellules ganglionnaires de type P aux 4 autres couches (Wassle, 2004). Ceci témoigne bien le fait qu'il existe un traitement parallèle des canaux de l'information provenant de la rétine (Figure 8).

D'une part, les couches cellulaires magnocellulaires comportent des neurones ayant un grand volume cellulaire, un grand champ récepteur et des axones à conduction élevée. Ces neurones contribuent à la perception du contraste et représentent 10% de la population neuronale du CGL (Purves et al., 2004).

D'autre part, les couches cellulaires parvocellulaires contiennent des neurones ayant un petit volume cellulaire, un petit champ récepteur et des axones à faible conduction. Ces neurones, hautement sélectifs, contribuent à la vision des couleurs et à la vision de haute résolution; ils représentent 80% de la population neuronale du CGL. Le 10% restant

est constitué de neurones faisant parties des couches koniocellulaires. Ces derniers sont situés en majeure partie dans les intercouches du CGL. Il a été démontré que c'est un type bien spécifique de cellules ganglionnaires de la rétine qui se connecte aux neurones de la couche koniocellulaire, ce sont les cellules ganglionnaires bi-stratifiées (Purves et al., 2004).

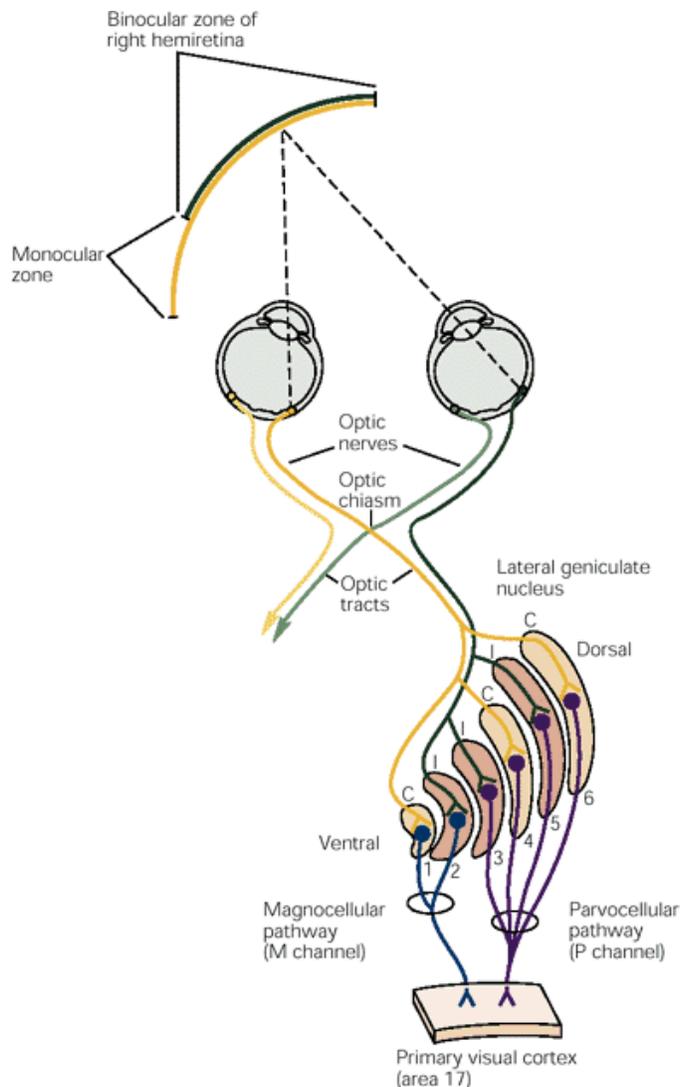


Figure 8. Représentation de l'organisation du corps genouillé latéral (CGL).

Le CGL est la cible sous corticale principale pour le traitement de l'information visuelle. (Image tirée de Kandel, 1991, p. 530)

1.1.3 Les aires visuelles primaire et secondaires

Les informations venant de la rétine atteignent plusieurs parties du cerveau qui, globalement, mènent à la perception consciente de la scène visuelle. En parallèle, certains réflexes classiques peuvent survenir de façon non consciente comme l'ajustement de la taille pupillaire, le mouvement des yeux vers une cible d'intérêt et la régulation des comportements liés au cycle jour/nuit. Les structures et voies qui sont impliquées dans ce large éventail de fonctions sont diverses. Il y a 4 voies principales qui assurent la projection des informations venant de la rétine vers les centres supérieurs : le corps genouillé latéral, le collicule supérieur, le préteectum et l'hypothalamus (Figure 9). La voie visuelle principale qui atteint le cortex visuel primaire en passant par le corps genouillé latéral du thalamus est la plus étudiée (Nassi et al., 2009). Différentes classes neuronales au sein de cette voie codent les variétés de l'information visuelle (la luminance, la couleur, la texture et le mouvement) qui contribuent à la vision. Le traitement en parallèle des différentes catégories d'information visuelle fournit une variété d'aires visuelles dans le lobe occipital, pariétal et temporal. Par exemple, les aires visuelles dans le lobe temporal sont essentiellement attachées à la reconnaissance d'objets, tandis que celles du lobe pariétal sont liées au mouvement (Purves et al., 2004). La vision normale dépend de l'intégration de l'information visuelle dans toutes ces régions corticales.

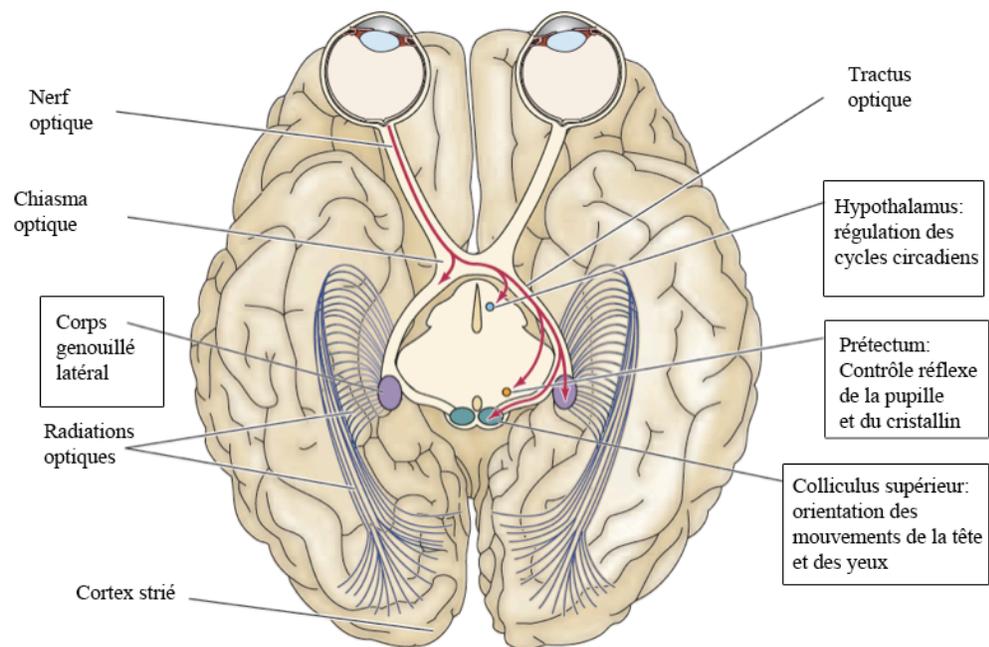


Figure 9. Les 4 voies visuelles principales provenant des cellules ganglionnaires de la rétine.

Environ 90% des axones des cellules ganglionnaires se projettent sur le corps genouillé latéral, c'est la voie visuelle principale. Le 10% restant se projettent sur le collicule supérieur, important l'orientation des mouvements de la tête et des yeux, le prétectum, pour le contrôle réflexe de la pupille et du cristallin, et l'hypothalamus, pour la régulation des cycles circadiens. Pour plus de clarté, ces 4 régions sont encadrées. (Image modifiée de Purves et al., 2004)

1.1.4 Les aires supérieures associatives

Le cortex secondaire V2 converge par la suite vers les aires associatives. C'est à ce niveau que l'information est globalement traitée. Les informations d'autres modalités sont souvent intégrées aux informations visuelles pour avoir une représentation multisensorielle de l'environnement. En fait, plusieurs aires corticales contribuent à la perception visuelle, l'aire primaire V1 et secondaire V2 étant les premiers relais, l'aire V3, V4, V5... Il est possible de dissocier 2 grandes voies du traitement de l'information visuelle, une qui passe par le lobe temporal, la voie ventrale, et une autre qui passe par le lobe pariétal, la voie dorsale (Purves et al., 2004).

D'une part, la voie ventrale est le trajet qui est suivi par les informations provenant des caractéristiques propres à l'objet. Elle permet de reconnaître l'objet (« quoi ? »), sa forme, sa couleur, sa matière... Ce sont les propriétés intrinsèques de l'objet.

D'autre part, la voie dorsale est le trajet suivi, à l'intérieur du cortex, par les informations provenant de la localisation dans l'espace de l'objet. Elle a comme fonction de positionner l'objet (« où ? »). Elle assure le contrôle visuo-moteur sur les objets qui portent des propriétés comme la position spatiale, la taille et l'orientation. Ce sont les propriétés extrinsèques de l'objet (Silveira et al., 2006).

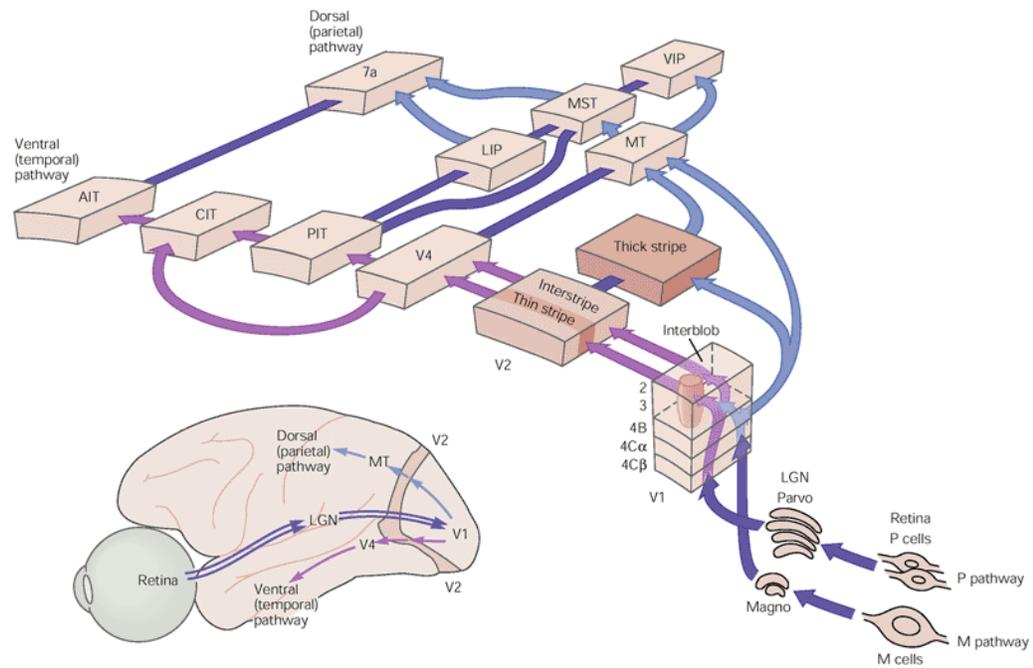


Figure 10. Le trajet des voies magnocellulaire (M) et parvocellulaire (P).

Les voies M et P qui débutent au niveau de la rétine se projettent dans le corps genouillé latéral pour se rendre dans l'aire V1. (Image tirée de Kandel, 1991, p. 551)

1.2. Le système des endocannabinoïdes

Les cannabinoïdes font partie du groupe de molécules chimiques qui activent les récepteurs aux cannabinoïdes. Il existe 3 classes de cannabinoïdes: les cannabinoïdes végétaux, notamment le THC, les cannabinoïdes endogènes, principalement le AEA et 2-AG et les cannabinoïdes de synthèse comme le CP-55,940 (Figure 11). Déjà depuis plus de 5000 ans, le cannabis était connu pour avoir de nombreux effets psychotropes. Cette espèce de plante annuelle, aussi connu sous le nom de chanvre (*Cannabis sativa L.*), fait partie de la famille des Cannabacées. Elle peut être subdivisée en 4 sous espèces dépendant la région qu'elle provient, Sativa, Indica, Spontanea ou Kafiristanica (Clarke and Watson, 2006). Le chanvre a été longtemps utilisé pour la fabrication des tissus, des cordes, pour la construction, l'isolation thermique et bien plus. De nos jours, le cannabis est cultivé généralement pour un usage récréatif. Certains considèrent que cette plante fait partie des drogues douces contrairement aux drogues dures comme l'héroïne qui possèdent une grande dépendance physique. Aujourd'hui, cette considération ne tient plus puisque certaines personnes font un usage dur de cette drogue, ce qui les rend fortement dépendants. De plus, il reste possible d'avoir une dépendance psychologique vis à vis le cannabis, ce qui signifie d'être dépendant de l'effet procuré par la consommation. Le chanvre peut se présenter sous plusieurs formes, notamment, de fleurs séchées femelles (marijuana), de résine de cannabis (haschich), d'huile de cannabis ou de pollen. Généralement, il est consommé avec du tabac, mais aussi mangé, inhalé ou infusé directement dans le corps (Clarke and Watson, 2006). C'est en 1964 que Raphael Mechoulam et Yechiel Gaoni de l'Institut Weizmann de Rehovot en Israël, isolent le principe actif du cannabis, le

Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), responsable de la vaste majorité des effets psychotropes (Mechoulam and Gaoni, 1965) (Figure 11). Par la suite, des récepteurs possédant une affinité pour le THC ont été découverts; puis, des ligands endogènes de ces récepteurs, les endocannabinoïdes (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993).

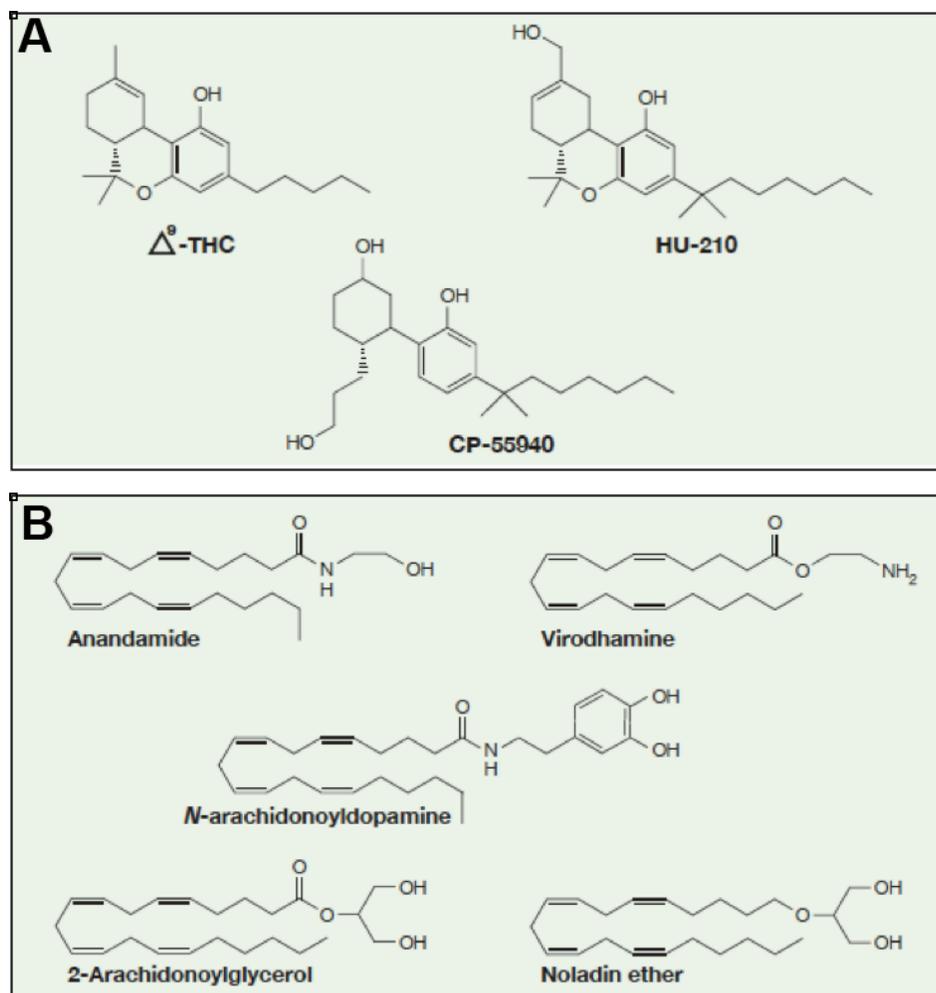


Figure 11. Structures chimiques des molécules se liant aux récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2.

(A) Composés dérivés de la plante du cannabis (THC) et synthétique (HU-210 et CP-55940). (B) Composés endogènes principaux qui peuvent activer le CB1R et CB2R. (Image modifiée de Piomelli, 2003)

Environ 160 millions de personnes ont consommé du cannabis au cours de l'année 2005 (*United Nations Office on Drugs and Crime*, 2007), La consommation de cannabis chez les adolescents est très répandue et est souvent associée à une consommation à long terme. Justement, de ceux qui ont consommé plus de 5 fois, la moitié a continué d'utiliser la drogue 10 ans plus tard (Perkonig et al., 2008).

Le développement de traitements pharmacologiques est souvent ralenti par l'opinion, même de la communauté scientifique, qui admet que le cannabis ne produit pas de dépendance. Au contraire, certaines études ont affirmé que le cannabis produit une dépendance en démontrant, d'une part, que le THC possède des propriétés comme le renforcement chez les primates non humains et, d'autre part, que l'abstinence de la drogue cause le syndrome de retrait au cannabis chez les humains (Budney et al., 2002, 2003; Fattore et al., 2008; Tanda and Goldberg, 2003). Ce syndrome est caractérisé par l'envie, l'irritabilité, l'anxiété, l'état dépressif, le manque d'appétit et des difficultés de sommeil (Budney et al., 2002, 2003).

1.2.1 Structure

Le système des endocannabinoïdes (eCBs) est constitué des récepteurs cannabinoïdes CB1 (CB1R) et CB2 (CB2R), leurs ligands endogènes (principalement AEA et 2-AG) et les enzymes responsables de la synthèse (notamment NAPE-PLD, DAGL α et DAGL β) et de la dégradation (surtout FAAH et MGL) de ces ligands (Marijuana and the Cannabinoids, 2008; Hoover et al., 2008). Les récepteurs cannabinoïdes font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui sont caractérisées par 7 passages transmembranaires. CB1R et CB2R possèdent tous deux des protéines Gi/Go qui inhibent

l'adénylate cyclase, et régulent les canaux ioniques de type sodiques et potassiques, mais diffèrent considérablement dans leur couplage aux mécanismes de transduction (Piomelli, 2003). En 1990, le CB1R est identifié et cloné (Matsuda et al., 1990). Trois ans plus tard, le CB2R est découvert et cloné (Munro et al., 1993; Facci et al., 1995). Aujourd'hui, des études ont démontré qu'il existerait possiblement d'autres récepteurs aux cannabinoïdes, comme le GPR55 (Brown, 2007 pour un article de revue).

Les eCBs sont des dérivés d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne (amides, esters et éthers), en particulier l'acide arachidonique, retrouvés dans plusieurs tissus centraux et périphériques (De Petrocellis et al., 2004; Bari et al., 2006). Les endocannabinoïdes les mieux étudiés sont : l'anandamide (N-arachidonyléthanolamine ou AEA) et le 2 arachidonylglycérol (2-AG) (Figure 12). Comme le THC se lie aux mêmes récepteurs CB1 et CB2 que les eCBs, ces derniers reproduisent tous les effets centraux et périphériques du cannabis (Howlett et al., 2004; Mechoulam et al., 2002).

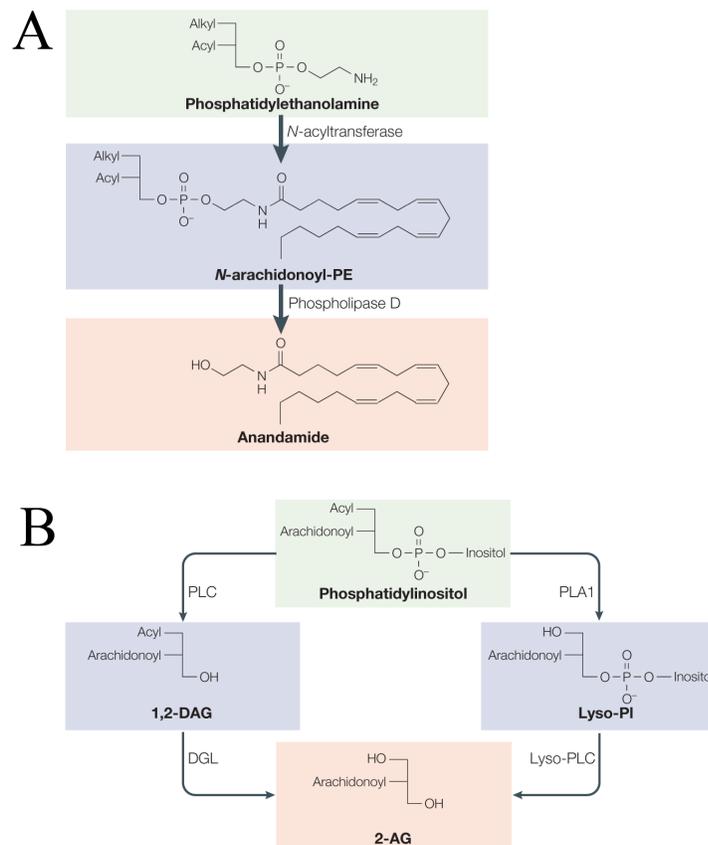


Figure 12. Voies de synthèse des eCBs.

En (A) est illustré la séquence de réactions par laquelle l'anandamide est formé dans les neurones. En (B) figure les voies de formation du 2-AG à l'intérieur de la cellule nerveuse. (Image modifiée de Piomelli, 2003)

1.2.2 Distribution des récepteurs CB1 et CB2

Actuellement, il existe 2 récepteurs aux cannabinoïdes qui ont été découverts au début des années 1990, le récepteur cannabinoïde 1 (CB1R) (Matsuda et al., 1990) et le récepteur cannabinoïde 2 (CB2R) (Munro et al., 1993).

D'une part, le CB1R se retrouve principalement dans l'hippocampe, le cortex associatif, le cervelet et les ganglions de la base (Tsou et al, 1998a). Il semble être responsable des effets euphoriques et anticonvulsifs du cannabis (Mackie, 2008a). Le récepteur CB1 inhibe les canaux calciques voltages dépendants et stimule les canaux potassiques. Dans le SNC, la stimulation du CB1R par ses agonistes conduit à l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs par les neurones centraux et périphériques (Piomelli, 2003). Il est localisé principalement au niveau des terminaisons axonales. La stimulation du CB1R par les eCBs conduit à l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs. Exprimé dans la circuiterie cérébrale, le récepteur CB1 module la libération de dopamine induite par le THC, les opioïdes ou la nicotine (Le Foll and Goldberg, 2005). Il joue donc un rôle important dans la dépendance à ces drogues. L'implication des eCBs dans la régulation des fonctions cognitives et émotionnelles, particulièrement à travers les circuits neuronaux du cortex, de l'hippocampe, de l'amygdale et du système mésolimbique est très importante (Marsicano et al., 2003). Le CB1R et les eCBs présents dans les ganglions de la base et dans le cervelet participent à la coordination motrice et au contrôle de la posture (Chevaleyre and Castillo, 2003). Par ailleurs, le récepteur CB1 régule aussi la perception de la douleur et l'intégration cérébrale des fonctions cardiovasculaires, gastro-intestinales et respiratoires (Fuentes et al., 1999). De plus, son effet sur la libération des peptides et des hormones hypothalamiques peut intervenir dans la modulation de la prise de nourriture et dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Valenzuela et al., 2010; Ducobu, 2005, pour un article de revue).

D'autre part, le CB2R semble se situer principalement dans

certaines composantes du système immunitaire, comme la rate. Il serait responsable de la plupart des effets anti-inflammatoires du cannabis (Mackie, 2008a). Cependant, les recherches menées à ce jour confirment que ces récepteurs agissent aussi sur plusieurs processus neurophysiologiques au niveau du cerveau (Mackie, 2008b). En effet, tout récemment, le CB2R a été localisé dans la rétine du rat adulte (Lopez et al., 2010).

De récentes recherches suggèrent qu'il pourrait exister un autre type de récepteur qui se lie aux cannabinoïdes. Il serait aussi couplé à une protéine G et serait responsable de l'inhibition de la transmission glutaminergique, mais ce récepteur n'a pas encore été ni cloné ni identifié (Brown, 2007 pour un article de revue).

1.2.3 Voies de signalisation

Après que le récepteur CB1 soit activé par l'anandamide, ce ligand endogène est rapidement pompé à l'intérieur du neurone ou dans la glie grâce à un transporteur, pour être ensuite hydrolysé par la FAAH dans la cellule (Figure 12). Les bases moléculaires de ce transporteur ne sont toujours pas identifiées. Ce qui est sûr, l'internalisation de l'anandamide dans les cellules nerveuses est rapide, sensible à la température, saturé indépendamment de l'hydrolyse de l'anandamide et susceptible à l'inhibition pharmacologique (Beltramo et al., 1997; Kathuria et al., 2003; Fegley et al., 2004; Piomelli et al., 1999).

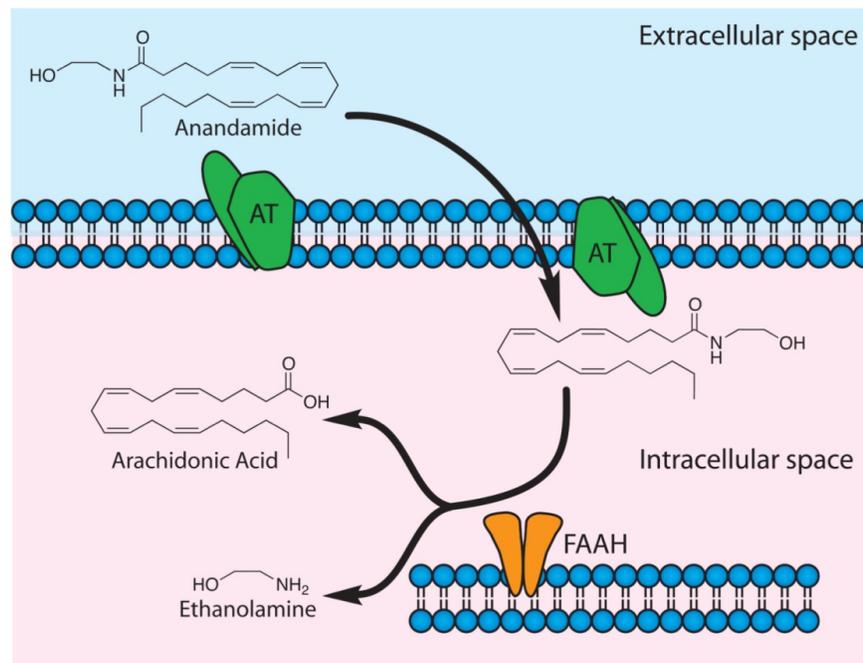


Figure 13. Internalisation du ligand par un système de transporteurs.

Dans le SNC, l'anandamide est éliminé par un processus de désactivation à 2 étapes. D'abord, le ligand endogène traverse la membrane pour entrer dans la cellule par un système de transporteur qui n'est pas encore défini au niveau moléculaire. Ensuite, une fois que l'anandamide est internalisé, il est hydrolysé en acide arachidonique et éthanolamine par l'enzyme *fatty acid amide hydrolase* (FAAH), une sérine hydrolase qui est localisée dans les membranes intracellulaires. (Figure inspirée de Clapper et al., 2008)

En fait, il peut y avoir plusieurs voies métaboliques de dégradation pour le même ligand (Figure 13). En effet, l'AEA et le 2-AG sont inactivés après une accumulation intracellulaire, comme mentionné plus haut, par plusieurs enzymes, notamment la *fatty acid amide hydrolase* (FAAH), monoacylglycérol lipase (MGL), cyclooxygénase-2 (COX-2) et lipoxygénase (LOX).

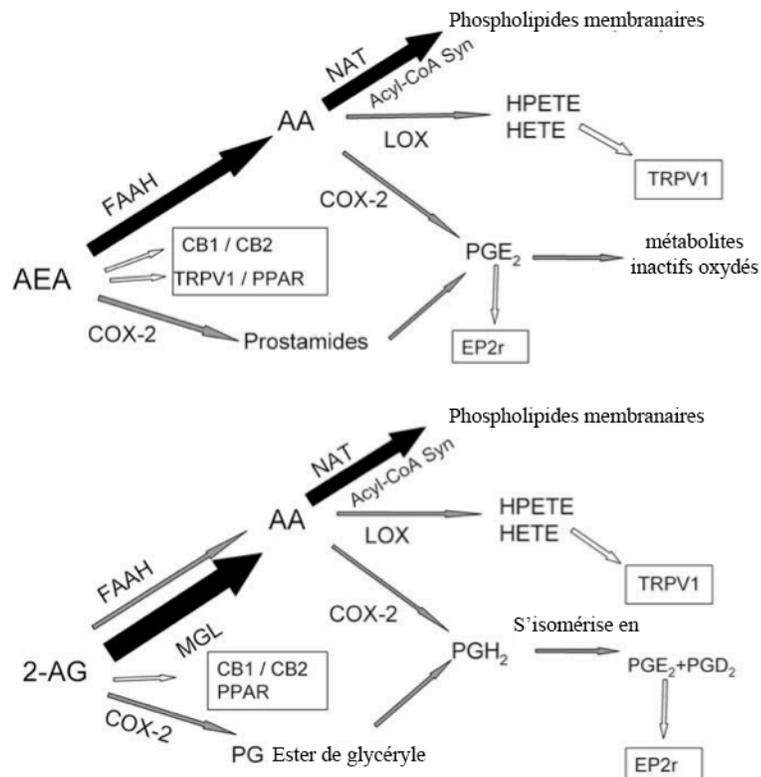


Figure 14. Illustration schématique des voies métaboliques de la dégradation de l'AEA et du 2-AG.

Cette figure illustre quelques unes des voies métaboliques de la dégradation de l'AEA et du 2-AG. Les flèches en gras montrent les voies dominantes. (Tirée de Yazulla, 2008)

1.2.4 Relation du système des endocannabinoïdes avec d'autres systèmes

Récemment, certaines études ont démontré que le récepteur CB1 peut former des hétéromères dans le système de cellules artificielles avec des récepteurs tels que le récepteur D₂, A_{2A} et μ (Kearn et al., 2005; Rios et al., 2006; Carriba et al., 2007; Marcellino et al., 2008).

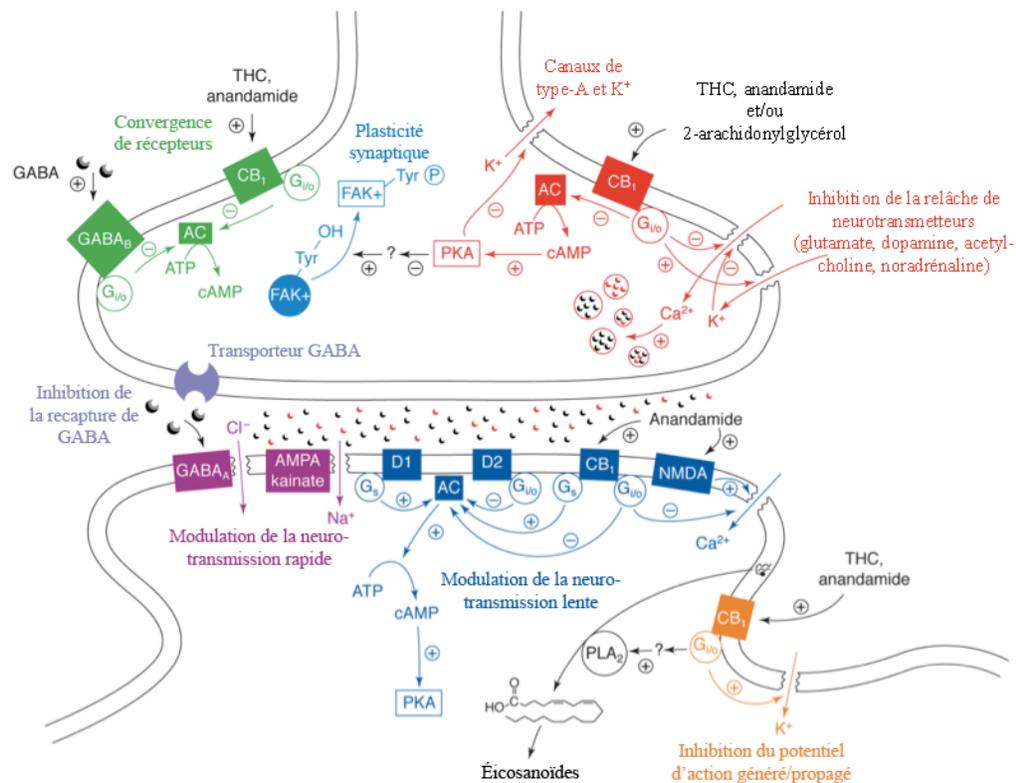


Figure 15. Bases moléculaires de l'action neuromodulatrice des endocannabinoïdes.

Au niveau de la terminaison présynaptique, l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) activent le récepteur CB1, modulent la perméabilité de la membrane aux ions calciques (Ca²⁺) et potassiques (K⁺), l'activité de l'adénylate cyclase, par conséquent, la relâche et l'action des neurotransmetteurs. L'anandamide peut activer aussi le récepteur vanilloïde de type 1 (TRPV1) qui est la cible de la capsaïcine, composé actif du piment produit comme force de dissuasion contre les herbivores (Image prise de De Petrocellis et al., 2004)

1.3. *Le système des endocannabinoïdes et le système nerveux central*

Le système endocannabinoïde est impliqué dans de nombreuses fonctions accomplies par le cerveau comme la mémoire, la perception de la douleur, l'activité motrice et le métabolisme (Rodriguez de Fonseca et al., 2005). Il est nécessaire de comprendre le fonctionnement du système des endocannabinoïdes et montrer son implication dans ces fonctions accomplies par le cerveau.

Les endocannabinoïdes sont synthétisés sur demande à la suite d'une dépolarisation cellulaire ou la stimulation de récepteurs d'une manière dépendante du calcium (Gomez-Ruiz et al, 2007). Une fois produits, ils agissent sur les récepteurs cannabinoïdes autour du site de production. Ils sont ainsi considérés comme des médiateurs locaux semblables aux autacoïdes, des agents autopharmacologiques (Bisogno, 2008). Dans le SNC, la localisation des éléments du système des endocannabinoïdes dans les synapses glutamatergiques et GABAergiques suggèrent un rôle important dans la transmission synaptique. L'inhibition de l'adénylate cyclase engendre l'activation des canaux potassiques et l'inhibition des canaux calciques dans les cellules, et, conséquemment, l'effet net de l'activation du CB1R est une hyperpolarisation locale qui mène à une baisse de la relâche de neurotransmetteurs (De Petrocellis et al., 2001). Si les endocannabinoïdes agissent de façon postsynaptique, ils vont contrer les entrées activatrices des cellules postsynaptiques (Figure 15). Ce mécanisme a été proposé pour les interactions avec la transmission postsynaptique dopaminergique (Felder et al., 1998; Rodríguez de Fonseca et al., 1998; Giuffrida et al., 1999). Cependant, c'est un effet qui est secondaire à l'importante action présynaptique puisque (i) la

concentration des récepteurs CB1 est plus grande dans les terminaisons présynaptiques et (ii) les agonistes du récepteur CB1 ont des effets inhibiteurs sur la libération du GABA, du glutamate, de l'acétylcholine et de la noradrénaline (Schlicker et Kathmann, 2001; Piomelli, 2003). Cet effet inhibiteur a aussi été démontré pour des neuropeptides tels que la corticolibérine et la cholécystokinine (Rodríguez de Fonseca et al., 1997; Beinfeld et Connolly, 2001). L'inhibition de la libération de neurotransmetteurs présynaptiques est donc associée à l'action inhibitrice des endocannabinoïdes sur les canaux calciques via l'activation des récepteurs CB1 (Bisogno, 2008). L'inhibition présynaptique de la libération de neurotransmetteur par les endocannabinoïdes peut adopter deux formes de plasticité synaptique à court terme, soit une dépolarisation induite par la suppression de l'inhibition (depolarization induced suppression of inhibition - DSI), soit une dépolarisation induite par la suppression de l'excitation (depolarization induced suppression of excitation - DSE), dépendamment de l'implication de la transmission du GABA ou glutamate, respectivement (Wilson et Nicoll, 2002; Diana et Marty, 2004). Les deux formes de plasticité synaptique supposent que l'activation initiale d'un neurone postsynaptique de grand calibre (cellules pyramidales ou Purkinje, par exemple) envoie un message rétrograde à une terminaison présynaptique GABAergique (DSI) ou à une terminaison présynaptique glutamatergique (DSE), induisant ainsi une suppression transitoire de l'entrée présynaptique inhibitrice ou excitatrice. La contribution des endocannabinoïdes à ces formes de plasticité synaptique à court terme a été bien décrite dans plusieurs structures, dont l'hippocampe (Wilson et Nicoll, 2001; Wilson et al., 2001) et le cervelet (Diana et al., 2002). Pourtant, la raison pour laquelle le système endocannabinoïde agit de façon rétrograde, est encore inconnue (Figure 16).

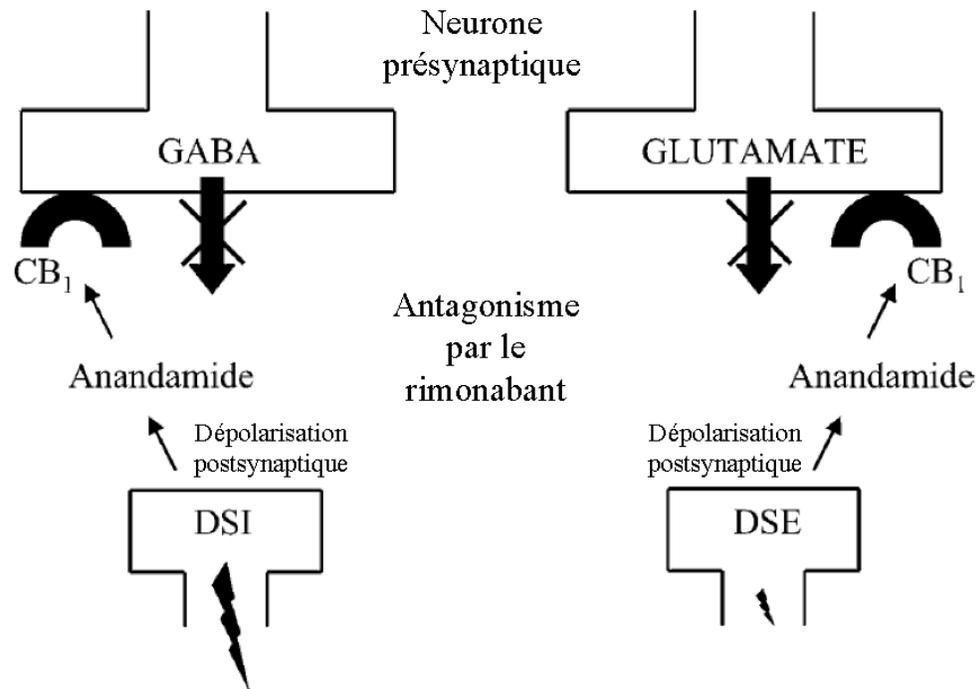


Figure 16. Les eCBs agissent comme messagers synaptiques rétrogrades.

La synapse cannabinoïde : les eCBs se comportent comme des messagers synaptiques rétrogrades à travers le CB₁R. GABA, acide gamma-aminobutyrique; DSI, dépolarisation induite par la suppression de l'inhibition; DSE, dépolarisation induite par la suppression de l'excitation. (modifiée de Raymon et Chip Walls, 2006, p.99)

1.3.1 Fonctions générales

Le rôle de la DSI ou DSE induite par les endocannabinoïdes semble être d'assurer la coordination des réseaux neuronaux, notamment dans l'hippocampe et le cervelet, tous deux impliqués dans des processus physiologiques, la mémoire et la coordination motrice, respectivement. Les endocannabinoïdes peuvent aussi agir sur la transmission synaptique en induisant une plasticité synaptique à long

terme, une potentialisation à long terme (long-term potentiation - LTP) ou une dépression à long terme (long-term depression - LTD). Ces deux formes de plasticité synaptique à long terme résultent en des changements à long terme dans l'efficacité de la transmission synaptique dans les neurones glutamatergiques ayant un impact majeur sur la formation et le remodelage synaptique. Par exemple, l'activation des récepteurs cannabinoïdes empêche l'induction de la LTP dans les synapses hippocampiques (Stella et al., 1997) et facilite la LTD dans le striatum (Gerdeman et al., 2002) ainsi que dans le noyau accumbens (Robbe et al., 2002). Dans l'hippocampe, les endocannabinoïdes régulent une forme de LTD qui affecte neurones GABAergiques (Chevaleyre et Castillo, 2003).

En général, les endocannabinoïdes agissent comme des médiateurs locaux qui ajustent la charge synaptique et éliminent la transmission d'informations par certaines synapses spécifiques. Le fait que la stimulation des récepteurs cannabinoïdes a un impact majeur sur ces ligands impliqués dans le remodelage synaptique (Derkinderen et al., 2004; Piomelli, 2003), la différenciation neuronale (Rueda et al., 2002) et la survie neuronale (Panikashvili et al., 2001; Marsicano et al., 2003) indique que ce système de signalisation est un mécanisme homéostatique qui assure un fin réglage du traitement de l'information dans le cerveau. Il prévoit aussi des mécanismes de contre-régulation visant à préserver la structure et la fonction des principaux circuits du cerveau.

De cette façon, ce système gère des comportements pourvus de fonctions homéostatiques tel que l'alimentation, la reproduction et le sommeil, et dépourvus de fonctions homéostatiques comme les émotions et l'apprentissage puisqu'ils nécessitent des modifications

fonctionnelles et morphologiques dans les circuits du cerveau. Une confirmation expérimentale de ce rôle a été démontré le contrôle de l'extinction de la mémoire aversive (Marsicano et al., 2002; Terranova et al., 1996).

1.4. *Le système des cannabinoïdes et la vision*

Il est bien connu que la consommation de cannabis affecte plusieurs fonctions biologiques comme l'appétit, la mémoire, la coordination motrice, et bien plus (Tsou et al, 1998). Évidemment, les structures cérébrales qui régulent ces fonctions expriment fortement le système des endocannabinoïdes, en particulier le récepteur cannabinoïde CB1. Cependant, les effets psychophysiques que procure la consommation de marijuana sur la fonction visuelle sont très peu connus pour plusieurs raisons. D'abord, la standardisation de la dose dépend de la voie d'administration. De plus, les effets placébos sont difficilement produits à cause du goût et de l'odeur caractéristique de la marijuana. L'intoxication peut être affectée par l'environnement et les attentes du sujet. Il y a aussi la polytoxicologie qui peut intervenir. Les gens peuvent prendre de l'alcool et d'autres drogues en plus de la marijuana au moment de l'étude. Enfin, les effets sur l'attention compliquent l'identification des seuils de détection (voir Yazulla, 2008 pour un article de revue).

Malgré les récents progrès dans le domaine des endocannabinoïdes et la vision, le rôle spécifique de ce système en vision n'est pas totalement clair. Quelques études datant des années 1970 ont mentionné qu'une consommation de cannabis pouvait affecter plusieurs fonctions visuelles, comme la photosensibilité (Adams et al.,

1978), l'acuité visuelle (Kiplinger et al., 1971; Moskowitz et al., 1972, Noyes *et al.*, 1975) et la vision des couleurs (Dawson et al., 1977). De plus, certaines études ont démontré que le cannabis peut aussi agir sur des fonctions visuelles centrales, comme la vision du relief (Semple et al., 2003; Skosnik et al., 2006).

1.4.1 Localisation des composants du système endocannabinoïde dans le système visuel

C'est en 1998 que Buckley et collaborateurs ont détecté l'ARNm du récepteur CB1 par hybridation *in situ* chez le rat embryon. CB1R a été retrouvé dans les cellules ganglionnaires au 15^e jour embryonnaire (E15) et dans une autre couche cellulaire qui semblait être l'INL à E20 (Buckley et al., 1998). Cependant, l'ARNm du CB2R n'a pas été détecté à E20. Plus tard, une étude a démontré que le récepteur CB1 est exprimé chez l'embryon de poulet à E18 dans les cellules ganglionnaires par hybridation *in situ* (Begbie et al., 2004). Lu et al., 2000, dans une étude menée sur le rat et la souris adulte, ont détecté, par RT-PCR, l'ARNm du récepteur CB2 la rétine de la souris adulte et dans toutes les couches cellulaires de la rétine du rat adulte par hybridation *in situ*. Il était impossible de déterminer si l'ARNm provenait des cellules de Müller (dans l'INL), des astrocytes associés au système vasculaire ou de la couche des fibres optiques. L'étude comparative effectuée par Straiker et al., 1999a a démontré que le CB1R est exprimé dans la rétine de plusieurs espèces : de l'humain, du singe, de la souris, du rat, du poulet, du salamandre et du poisson. Récemment, le CB2R a été localisé dans la rétine du rat adulte (Lopez et al., 2010).

1.4.2 Implications cliniques

Les utilisations thérapeutiques des dérivés des cannabinoïdes ont été nombreuses. L'usage du THC comme traitement a été arrêté à cause de ses effets psychotropes et remplacé par des dérivés synthétiques qui miment l'action du THC. Parmi les plus connus, il y a le médicament nommé dronabinol (Marinol™) qui est un analgésique pour les patients qui ont le cancer, un antiémétique et un stimulateur de l'appétit chez les patients qui souffrent de sida. La drogue Sativex™ est un analgésique sous forme de vaporisateur lingual. Le médicament rimonabant (Accomplia™) est utilisé pour traiter et contrer l'obésité, mais a été retiré du marché en raison de plusieurs de ces effets secondaires intenses allant de la dépression à l'envie de se suicider.

1.4.3 Effets sur la relâche synaptique

Les cannabinoïdes se lient principalement aux récepteurs CB1 localisés à travers le SNC. Ils sont fortement exprimés au niveau des fibres et des terminaisons présynaptiques et plus faiblement exprimés dans les dendrites et le soma des neurones principaux. L'activation du CB1R entraîne une inhibition des canaux calciques et une modulation des canaux potassiques qui se trouvent dans le corps cellulaire et les prolongements des neurones. Cela réduit la relâche de neurotransmetteurs, la durée du potentiel d'action et la fréquence de décharge neuronale (Ameri, 1999). Le CB1R agit sur l'activité de plusieurs protéines, notamment l'adénylate cyclase (Howlett and Fleming, 1984). Le fait que le système des eCBs est synthétisé sur demande et possède des propriétés chimiques particulières lui permet d'agir à contre courant de la transmission synaptique pour réguler de

façon transitoire la libération des neurotransmetteurs. Justement, certains chercheurs ont observé que la dépolarisation des cellules de Purkinje dans le cervelet entraînait une diminution, durant plusieurs dizaines de secondes, des événements postsynaptiques spontanés inhibiteurs GABAergiques (Llano et al., 1991). De cette façon, les endocannabinoïdes se comportent comme des messagers rétrogrades qui, suite à une dépolarisation postsynaptique, diminuent la libération de neurotransmetteurs en agissant à contre-courant de la transmission synaptique inhibitrice ou excitatrice.

Même si les cannabinoïdes inhibent l'activité des neurones, cela ne veut pas dire pour autant qu'ils sont des déprimeurs des fonctions cérébrales. Il peuvent inhiber des neurones inhibiteurs et, donc, causer l'activation de certains neurones. Justement, l'exemple parfait est la rétine. Les PRs relâchent les neurotransmetteurs dans l'obscurité et une activation par la lumière diminue la relâche synaptique. Ainsi, malgré que les cannabinoïdes entraînent l'inhibition de la relâche au niveau des PRs, ils activent ces derniers, augmentant la photosensibilité. Yazulla, 2008 a effectué des études d'électrophysiologie sur chacune des cellules de la rétine.

Les eCBs interagissent avec d'autres systèmes de neurotransmission dans la rétine, tel que la dopamine, le GABA et certains acides aminés. La dopamine a été le premier neurotransmetteur à être étudié dans la rétine en relation avec les cannabinoïdes. Après avoir ajouté un agoniste des CB1R, les courants calciques ont été réduits, diminuant ainsi la relâche de dopamine (Schlicker et al., 1996). Il est cependant difficile d'inférer directement ces résultats à des fonctions *in vivo* des cannabinoïdes puisque des agonistes synthétiques ont été utilisée.

Hypothèses et objectifs de l'étude

Bien que la rétine soit située en périphérie, elle fait intégralement partie du SNC. La plupart des études sur l'expression du CB1R dans la rétine ont utilisés des rongeurs comme modèle animal. Pourtant, le traitement neuronal de l'information visuelle du singe est semblable aux humains et de ce fait, il représente un excellent modèle du système visuel de l'homme. À notre connaissance, il n'y a eu qu'une seule étude comparative qui a montré que le CB1R est présent dans la rétine du singe (Straiker et al., 1999a). Cependant, ni le type cellulaire spécifique exprimant le CB1R ni l'excentricité exacte de l'échantillon prélevé (rétine centrale ou périphérique) n'a été précisée. En outre, l'enzyme de dégradation des ligands du CB1R, la FAAH, n'a jamais été localisée dans la rétine du singe. Par conséquent, notre étude vise à caractériser la distribution et la localisation cellulaire spécifique du récepteur CB1 et de l'enzyme FAAH à différentes excentricités de la rétine de singe adulte. De cette façon, nous établirons si le système endocannabinoïde pourrait moduler tant les fonctions rétinienne centrales (acuité visuelle, vision des couleurs) que périphériques (détection du mouvement, vision scotopique).

Les objectifs de cette étude étaient donc de (1) caractériser l'expression du CB1R et de la FAAH à différentes excentricités de la rétine du singe et (2) définir les types cellulaires spécifiques exprimant ces 2 composantes du système endocannabinoïde.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces deux composantes du système endocannabinoïde sont distribuées dans plusieurs types de cellules rétinienne du primate et ce, au travers de toute la rétine pour être en position de moduler les fonctions rétinienne centrales et périphériques.

Manuscript

**Expression and localization of the cannabinoid receptor CB1
(CB1R) and the enzyme Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) in the
retina of the Vervet Monkey (*Chlorocebus sabaesus*)**

Joseph M Bouskila¹, Mark W Burke², Nawal Zabouri¹, Jean-François
Bouchard¹ & Maurice Ptito¹

¹School of Optometry, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

²Department of Physiology & Biophysics, College of Medicine, Howard
University, Washington D.C.

Correspondence should be addressed to:

Maurice Ptito, PhD, MD
École d'Optométrie, Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada.

ABSTRACT

The presence of a widespread endocannabinoid system within the nervous system including the retina of mammals has been demonstrated in recent years. Expression patterns of CB1R and its degrading enzyme FAAH were mostly found in rodents and data on higher mammals like humans and monkeys are scarce. We therefore studied the distribution pattern of CB1R and FAAH throughout the retina of the vervet monkey (*Chlorocebus sabaeus*) using immunohistofluorescence methods. Our results demonstrate that CB1R and FAAH are expressed throughout the retina, from the foveal pit to the periphery. CB1R and FAAH are present in the photoreceptor, outer plexiform, inner nuclear, inner plexiform and retinal ganglion cell layers (PRL, OPL, INL, IPL and RGCL, respectively). More specifically, at the level of PRL, CB1R and FAAH are preferentially expressed in cones throughout the retina with the strongest concentration in the fovea. In OPL, CB1R immunoreactivity is concentrated in the cone pedicles but also in rod spherules with, however, a less intense staining pattern. Double-labeling immunofluorescence revealed that bipolar cells and ganglion cells express CB1R and FAAH. In IPL, CB1R staining is diffuse. Neither CB1R nor FAAH are found in the retinal glia, the Müller cells. These data show that endocannabinoids are present throughout the primate retina and are therefore in position to modulate central and peripheral visual functions. Since CB1R is highly expressed in central cones, the administration of exogenous cannabinoids may modulate several retinal functions, such as increased photosensitivity and alterations in color discrimination related to cannabis consumption.

INTRODUCTION

The *cannabis sativa* plant contains a group of substances termed cannabinoids that acts as neuromodulators by activating two G protein-coupled receptors, the cannabinoid receptors CB1 (CB1R) and CB2 (CB2R) (Piomelli, 2003 for review; Le Fur *et al.*, 2007). These receptors exert their action through distinct signal transduction mechanisms and respond to endogenous ligands, called endocannabinoids, such as anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Gómez-Ruiz *et al.*, 2007). The activation of the CB1R inhibits transmembrane enzymes, adenylyl cyclases, and modulates calcium and potassium ion channels through $G_{i/o}$. (Freund *et al.*, 2003; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 2005; Turu and Hunyady, 2010). Anatomically, CB1R is prominently present on GABA and glutamatergic terminals (Mouslech *et al.*, 2009) and is widely expressed in nervous tissues such as the hippocampus, cortex basal ganglia and cerebellum (Herkenham *et al.*, 1991), but a range of functions in peripheral tissues has been identified (Graham *et al.*, 2009). It is clearly established that the presynaptic location of CB1R plays a key role in synaptic transmission. Indeed, the endocannabinoid system is a modulatory system that is responsible for regulating a number of tasks, like learning, memory, motor coordination, neuroprotection (Di Marzo *et al.*, 1998) and visual processing (Straiker *et al.*, 1999a; Straiker *et al.*, 1999b). Fatty acid amide hydrolase (FAAH), an intracellular enzyme that is attached to the membrane by the N-terminal domain, is the enzyme responsible of degrading the CB1R ligand AEA to arachidonic acid and glycerol (Deutsh and Chin, 1993, Elphick and Egertova, 2001 for review).

Even though there has been progress in the retinal endocannabinoid field, the specific pharmacological mechanism of action of this system in vision is poorly understood. Several case reports in the 1970's mentioned some visual effects after cannabis consumption, such as the increase in glare recovery at low contrast (Adams et al., 1978), the reduction in Vernier and Snellen acuity (Kiplinger et al., 1971; Moskowitz et al., 1972), blurred vision (Noyes *et al.*, 1975), change in color discrimination (Dawson et al., 1977) and increased in photosensitivity (Dawson et al., 1977). There also has been evidence for central effects of cannabinoid use in vision by binocular depth inversion technique and EEG recordings of the occipital cortex (Semple et al., 2003; Skosnik et al., 2006).

Our understanding of the role of the endocannabinoid system in visual processing arises primarily from studies conducted in lower mammals and vertebrates, namely mouse, rat, goldfish and the tiger salamander (Yazulla et al, 1999; Straiker et al, 1999a; Yazulla 2008 for review). As such, some retinal circuits have a species-specific function that could be acted upon by the endocannabinoid system. For example, the rod pathway is highly preserved across mammals whereas trichromatic color processing is found primarily in humans and most old world monkeys (Rosenberg and Talebi, 2009). The *fovea centralis* that is responsible for color and the most acute vision is a retinal specialization, present only in primates. This biological adaptation optimizes the visual information available in the environment (Herbin et al., 1997). The cannabinoid signaling system may be restricted in its phylogenetic distribution, because to date the existence of CB1R has only been firmly established in vertebrate species (Elphick and Egertová 2001).

In a comparative study, the presence of the CB1R found in the retina of many species suggested that the endocannabinoid signaling system could play an important role in retinal function (Straiker et al., 1999a). Studies have reported the presence of the endocannabinoid system in various retinal cell types (cones, bipolar, ganglion, horizontal and amacrine cells) and, later, visual effects of cannabinoids at all stages of retinal processing (see Yazulla 2008 for review). Moreover, critical proteins defining cannabinoid circuitry like diacylglycerol lipase- α and $-\beta$ (DGL α/β), involved in the production of 2-AG, monoacylglycerol lipase (MGL) and α/β -hydrolase domain 6 (ABHD6), implicated in the production of 2-AG, cannabinoid receptor-interacting protein 1a (CRIP1a), a protein that could modulate CB1R function, FAAH and N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA) that breaks down AEA have been localized in mouse retina (Shu-Jung Hu et al., 2010). Each retinal cell taken apart for electrophysiological recordings has a different cannabinoid function than the global visual effect of cannabinoids. For example, when an exogenous CB1R agonist is added to photoreceptor cell cultures, the neurotransmitter release is enhanced therefore diminishing the photosensitivity (Yazulla 2008). When the photosensitivity is tested on long-term-marijuana users, the global response is a higher photosensitivity (Dawson et al., 1977). In a developmental study, Buckley et al., (1998) made the first cellular localization of CB1R mRNA in the retina detected by *in situ* hybridization in the rat embryo. In fact, CB1R was found transiently expressed in the ganglion cells by E15 and in the inner nuclear layer by E20 (Buckley et al., 1998). CB1R expression was later detected by E18 in the ganglion cells by *in situ* hybridization in the chick embryo (Begbie et al, 2004). In the retina of adult rodents, CB1R and FAAH are expressed in cones, amacrine cells and ganglion cells and have been both localized in the

rat retina essentially in horizontal and rod bipolar cells (Yazulla et al., 1999), showing a differential expression among retinal cells.

The neural processing through the visual pathway of the monkey is strikingly similar to humans and hence it represents an excellent model of the human visual system (Sandell et al., 1979). To our knowledge, there has been only one comparative study that showed the presence of CB1R in the monkey retina; however, the complete specific retinal cell types expressing CB1R and FAAH neither the eccentricity of the specimen were mentioned (Straiker et al., 1999a). In our laboratory, the developmental profile of CB1R expression was determined for each of the main retinal cell types of the rodent, from birth to adulthood (Zabouri et al., 2010). The present study aims to detail the cellular localization of the CB1R and FAAH at different eccentricities of the Vervet monkey retina. We have found that these two components of the endocannabinoid system are distributed in various retinal cell types in this species and are similar to other species. Yet, the Vervet monkey's fovea, composed exclusively of cones (Herbin et al. 1997), has greater concentration of CB1R and FAAH compared to a rat that does not have a fovea or a central vision, mainly due to its anatomical organization.

MATERIALS AND METHODS

Animal Preparation. Two male and one female vervet monkeys (*Chlorocebus sabaeus*) were used for this study. The animals were born and raised in enriched environments in the laboratories of the Behavioral Sciences Foundation located in St Kitts (West Indies). The animals were fed with primate chow (Harlan Teklad High Protein Monkey Diet; Harlan Teklad, Madison, WI) and fresh local fruits, with water available *ad libitum*. The subjects in this study are part of an ongoing developmental study and the experimental protocol was reviewed and approved by the local Animal Care and Use Committee and the Institutional Review Board of Behavioural Science Foundation. At about 42 months of age, each animal was sedated with ketamine (10 mg/kg, i.m.), deeply anaesthetised with sodium pentobarbital (25 mg/kg, i.v.) and perfused transcardially with phosphate buffer saline (PBS pH 7.4), followed by 4% paraformaldehyde.

Tissue preparation. The eyes were extracted and the retina was dissected free from the eyecup in a PBS bath. The retina was laid flat so that the vitreous body could be removed by blotting with filter paper and gentle brushing (Burke et al., 2009). Samples of retina (4 mm²) were taken at 2, 6 and 10 mm from the center of the optic disc in the temporal, nasal, dorsal and ventral eccentricities along with the fovea. Each sample was then cryoprotected in 30% sucrose overnight and embedded in Shandon embedding media at -65°C. Retinal samples were then sectioned in a cryostat (16 µm) and mounted onto gelatinized glass microscope slides, air-dried and stored at -20°C for further processing.

Immunohistochemistry. In order to address whether retinal cells were CB1R or FAAH immunoreactive, coronal sections taken at different eccentricities of the monkey retina were immunostained with antibodies against CB1R and the FAAH enzyme. Single- double- and triple-labeling of the retina were performed according to previously published methods (Zabouri et al., 2010). Briefly, sections were postfixated for 5 minutes in 70% ethanol, rinsed 3 x 5 minutes in Tris 0.1 M buffer, pH 7.4/Triton 0.03% and blocked for 90 minutes in 10% normal goat serum (NDS) in Tris 0.1 M buffer/0.5% Triton. Sections were incubated overnight at room temperature with primary antibody in blocking solution. The CB1R (Sigma C1233, 1:150) or FAAH (Cayman Chemical, 101600, 1:150) antibody was used conjointly with a known retinal cell type marker: calbindin (Sigma C9848, 1:100) to select cones (Chiquet et al., 2002), CHX10 (Santa Cruz Biotechnology sc-21690, 1:100) to select all bipolar cells and PKC α (Santa Cruz Biotechnology sc-8393, 1:500) to identify rod bipolar cells (Zabouri et al., 2010), syntaxin (Sigma S0664, 1:500) to mark amacrine and horizontal cells (Nag and Wadhwa, 2001), Brn-3a (Chemicon International MAB1585, 1:100) to stain retinal ganglion cells (Nadal-Nicolas et al., 2009) and glutamine synthetase (Chemicon International MAB302, 1:2000) to select Müller cells (Nishikawa and Tamai, 2001) (Table 1). The next day, sections were washed for 10 minutes and 2 x 5 minutes in Tris 0.1 M/Triton 0.03%, blocked in 10% NDS, Tris 0.1 M/0.5% Triton for 30 minutes and incubated with secondary antibody for 1 hour: Alexa 488 donkey anti-mouse, Alexa 488 donkey anti-goat, Alexa 555 donkey anti-rabbit or Alexa 647 donkey anti-mouse (1:200) all in blocking solution as described above. Sections were washed again in Tris buffer, counterstained with bisbenzimidazole, a fluorescent nuclear marker, and coverslipped with GelTol Mounting Medium (Thermo Electron Corporation).

In order to test the specificity of our antibodies directed either against CB1R or FAAH, immunolabelings on mice retinal tissue, one where the *cnr1* gene has been deleted (generously provided by Dr Beat Lutz) (*cnr1*^{-/-} - Marsicano et al., 2002) and the *faah* knock-outs (generously provided by Dr Piomelli), were performed. The pictures are illustrated in the results section in Figure 1. No specific staining was visible in the *cnr1*^{-/-} retinal tissue and *faah* knockout mouse (-/-) while a clear signal was found in the matched wild type animals.

Confocal microscopy. Fluorescence was detected with a Leica TCS SP2 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Exton, PA), using a 40X or a 100X objective. Images were obtained sequentially from the green, red and far-red channels on optical slices of less than 0.9 μm of thickness. Throughout the *results* section, images taken from the green channel correspond to the retinal cell markers and from the red channel to the CB1R, and for the triple labeling, the far-red channel relates to an additional cell marker.

RESULTS:

Single-label immunocytochemistry

Even though the CB1R and FAAH antibody were targeting rat protein sequences, it generated robust staining in the vervet monkey retina (Figures 1 and 2). CB1R and FAAH were found throughout the retinal layers and at all eccentricities studied, from the monkey far peripheral retina to the *fovea centralis*. However, the intensity of the immunoreactivity decreases with the eccentricity of the sample. The distributions, with the exception of Müller cells, are not complimentary but rather appear to be overlapping. Control sections in which primary antibodies were omitted were processed in parallel and did not show any specific immunoreactivity (Figure 2). Single-labeling was also performed to test the specificity of the CB1R or FAAH antibodies in *cnr1* or *faah* knockout mouse retinas and no staining was found (Figure 1).

Insert Figure 1 about here

Cellular Distribution of CB1R and FAAH

In order to verify the specific retinal cell expression, double immunostaining was carried out for CB1R or FAAH and a well-known molecular marker for primate retinal cells (Calbindin for cones, CHX10 for bipolar cells, Brn3a for ganglion cells, Syntaxin for interneurons and Glutamine synthetase for Müller cells). A consistent staining pattern across all three monkey retinas was found for each double staining. Although labeling was located in all layers of the retina, from the photoreceptor to the ganglion cell layers, CB1R immunoreactivity in the plexiform layers and the retinal ganglion cell layer was the most prominent (Figure 2). FAAH distribution was similar to the CB1R distribution and densely located to the photoreceptor and ganglion cell

layers. Also, the same staining pattern was found at different eccentricities, from the foveal pit to the far peripheral retina (Figure 3a and 3b). In fact, the CB1R and FAAH distribution profile showed a consistent expression pattern across the monkey retina, as illustrated in the low magnification views of immunostained retinal sections shown in Figure 3a and Figure 3b.

Insert Figure 2 and 3 about here

In order to determine the cellular distribution of CB1R or FAAH in the central versus peripheral parts of retina, sections were double-immunostained for either CB1R or FAAH and retinal cell markers (Table 1). The antibody against the calbindin protein is a specific marker for cones, a subset of horizontal cells and cone bipolar cells in the primate retina (Chiquet et al., 2002; Martinez-Navarrete et al., 2008). CB1R immunoreactivity in the photoreceptor layer was found throughout the cones, with positive staining in the membrane and cytosol (Figure 4). CB1R is present in the outer and inner segments, in the cell body and in the pedicles. CB1R is preferentially expressed in cones with little evidence of staining in the inner segments and spherules of rods. On the other hand, FAAH was more prominent in the nerve fiber layer and cone pedicles (Figure 3b and Figure 5). The CB1R receptor and FAAH are expressed in cones in the central and peripheral retina (Figure 3a and Figure 3b). The central versus peripheral differential staining is probably due to the rod versus cone distribution.

Insert Figure 4, Figure 5 and Table 1 about here

The inner nuclear layer comprises bipolar, horizontal, amacrine and Müller cells. To distinguish the cone and rod bipolar cells from the

other cell types, a triple labeling was completed. The antibodies targeting the homeobox transcription factor CHX10 present in all bipolar cells nuclei and the protein kinase c (PKC) only present in rod bipolar cells and a subset of amacrine cells were used to identify endocannabinoid components in rod or cone bipolar cells (Zabouri et al., 2010). Both cone and rod bipolar cells were CB1R and FAAH immunoreactive (Figure 6). No difference in central versus peripheral staining was found for bipolar cells.

Given that the POU-domain transcription factor Brn3 has been shown to specifically label the nuclei of retinal ganglion cells in rodents (Nadal-Nicolas et al., 2009), we successfully used this antibody to label those cells in monkey. CB1R staining was detected in the ganglion cell layer; in the ganglion cell cytosol (Figure 7) and heavy diffuse labeling in the retinal ganglion cell axons (Figure 8). The latter was performed by syntaxin, a membrane protein found in nerve endings at synapses (Wiedenmann and Franke, 1985; Nag and Wadhwa, 2001). Double labeling Brn3a/CB1R and syntaxin/CB1R allowed us to show that this cannabinoid receptor 1 is expressed throughout the ganglion cells and their axons.

Insert Figure 6, 7 and 8 about here

The monoclonal antibody HPC-1, which recognizes syntaxin, was also used to label the retinal interneurons, horizontal and amacrine cells. Those lateral projecting neurons show little expression of CB1 receptor (Figure 9). The CB1R and FAAH staining in horizontal and amacrine cells were limited to the membrane of the soma as well as the cytosol (Figures 9 and 10). Large amacrine cell bodies were slightly more

labeled than others (Figure 10). No difference was found in the eccentricities studied.

In order to assess if retinal glia express the endocannabinoid components, the antibody against glutamine synthetase (GS) was used. This antibody labels Müller cells across the monkey retina (Nishikawa and Tamai, 2001). Müller cells do not express either the cannabinoid CB1 receptor or FAAH (Figure 11). In all three pairs of monkey retinas, we found the same staining pattern. Even though the retinal-pigmented epithelium was present in all sections, it was difficult to evaluate if either of those two proteins were present because of the heavy pigmentation of this tissue. Regarding the expression of CB1R and FAAH in the eccentricities studied, we did not find any differences.

Insert Figure 9, 10 and 11 about here

Discussion

The present study reports that the distribution of the cannabinoid receptor CB1R and the FAAH enzyme is widespread in the retina of the Vervet monkey. These endocannabinoid components are present in different retinal cell types, namely cones, bipolar, ganglion, horizontal and amacrine cells and this localization is consistent with that found in rodent retina (Yazulla et al., 1999; Yazulla 2008, for review). The global expression pattern of CB1R labeling in the Vervet monkey retina resembles that found in other vertebrates, particularly the Rhesus monkey (Straiker et al., 1999a) and humans (Straiker et al., 1999b). However, specific cellular localization and eccentricity expression has not been thoroughly investigated in these species and we provide here a comprehensive set of results that further extend the data obtained by Straiker et al (1999a). Indeed, not only did we study the distribution of CB1R throughout the retina but also the expression of FAAH. Although CB1R is clearly present throughout the cone photoreceptors, the pedicles generated a more prominent labeling. No CB1R immunoreactivity was found in rods inner segment. Dense CB1R staining was observed in the cone pedicles not only in the foveal pit but also throughout the retina. However, FAAH-IR was present throughout the cone with a more intense staining in the inner segments including pedicles.

Like the photoreceptors, the bipolar cells within the inner nuclear layer (cone and rod bipolar cells) express CB1R and FAAH. This suggests that endocannabinoids modulate cone (photopic) and rod (scotopic) vision. Hence, there is evidence that marijuana use alters color discrimination (Dawson et al., 1977) and increases the glare recovery at low contrast (Adams et al., 1978). Since the CB1 receptor is more expressed in the vertical cone-bipolar-RGC pathway, it suggests

that it plays an important role in glutamate release in each one of the retinal cell types (Wässle, 2004; Yazulla 2008). However, the observed low expression of CB1R in horizontal and amacrine cells (the lateral pathway) in this study and in lower mammals (Yazulla 1999) reinforces the pivotal role exerted by the vertical retinal pathway. The presence of this cannabinoid system in the plexiform layers also suggests an autoregulatory mechanism in horizontal and amacrine inhibitory neurons. The different expression of the endocannabinoid components within the vertical and lateral retinal pathways, could result in a modulation of the synaptic gain in the plexiform layers by the inhibition of neurotransmitter release in cone pedicles (Yazulla et al., 1999).

In the central nervous system (CNS), the activation of CB1R modulates the neuronal membrane permeability to Ca^{2+} and K^{+} ions and the activity of adenylate cyclase, thereby affecting neurotransmitter release and action (Di Marzo, 1998). Electrophysiological research carried out in the mammalian retina to find a specific endocannabinoid neuromodulatory action has not been conclusive (Straiker et al., 1999; Yazulla 2008 for review). For example, recordings in goldfish cone photoreceptors following the application of WIN 55,212-2 (a CB1R agonist) showed that the photocurrent recovered to baseline more quickly than in controls. It was therefore concluded that the functional consequence of this effect was to increase the photosensitivity to bright flashes (Yazulla, 2008). On the contrary, Adam et al., (1978) reported an increase time in the glare recovery in photopic conditions under the influence of marijuana in humans. Those two results appear to be contradictory but given that the expression of CB1R is more widely expressed throughout the monkey cone photoreceptor than in goldfish cones (Yazulla et al., 2000), it would be plausible that the sites of action of THC are broader in higher mammals.

The most prominent CB1R and FAAH expression was found in cone synaptic terminals and in the ganglion cell layer. This suggests that cannabinoids act on photoreceptors as previously reported (Yazulla 2008 for review) but also directly on ganglion cells. Indeed, CB1R and FAAH are strongly expressed in the cytosol and axons of retinal ganglion cells. This appears to be unusual because in the mammalian CNS it has been thought that CB1R is only present in small pre-synaptic neurons and not in large caliber neurons, like pyramidal and Purkinje (Elphick and Egertova, 2001). Since ganglion cells are considered having large caliber axons and they still strongly express CB1R and FAAH, it is difficult to reconcile. However, recent studies have shown, as in the present study, that the eCB system is also found in large caliber axons (Marsicano and Lutz, 1999; Hill et al., 2007). It is therefore possible, as proposed by Yazulla (2008), that endocannabinoids serve an autoregulatory function to modulate the output of associational ganglion cells. Those ganglion cells have axons that do not leave the retina and presumably serve intraretinal communication (Sagar and Marshall, 1988).

Our results showed that Müller cells in monkeys do not express CB1R or FAAH, which is in agreement with studies conducted on the retina of lower mammals. Only Yazulla et al., (2000) reported the presence of CB1R in Müller cells of the goldfish retina. The existence of the endocannabinoids system within the retinal glia is largely unexplored and further research is needed to establish its presence across species and its specific functions.

There also is evidence for a developmental function of CB1R in the visual system (Leonelli et al., 2005, Zabouri et al., 2010). Indeed, the

latter study showed a transient expression of CB1R in the developing chick retinotectal system. Previous work in our laboratory demonstrated that the CB1R is present in the rodent retina at several postnatal ages to adulthood (Zabouri et al., 2010). In fact, CB1R was transiently expressed only in bipolar, Müller and some amacrine cells suggesting a potential role of this receptor in developmental processes, such as migration, sub-identity acquisition and patterned retinal spontaneous activity (Zabouri et al., 2010). Moreover, the activation of CB1R acts as a negative regulatory signal for dendritogenesis, dendritic and axonal outgrowth as well as branching (Vitalis et al., 2008). These findings support the notion that the endocannabinoid system is involved in developmental processes of the nervous system.

Conclusion

To our knowledge, it is the first time that CB1R and FAAH have been localized in specific cell types in the monkey retina at all eccentricities of tissue sampling. The distribution of cannabinoids throughout the retina might explain the deleterious effects of marijuana consumption on visual functions.

References

- Adams, A.J. and B. Brown, *Alcohol prolongs time course of glare recovery*. *Nature*, 1975a. **257**(5526): p. 481-3.
- Adams, A.J., et al., 1975b *Alcohol and marijuana effects on static visual acuity*. *Am J Optom Physiol Opt.* **52**(11): p. 729-35.
- Adams, A.J., et al., *Marijuana, alcohol, and combined drug effects on the time course of glare recovery*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1978. **56**(1): p. 81-6.
- Arevalo-Martin, A., et al., *Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis*. *J Neurosci*, 2003. **23**(7): p. 2511-6.
- Begbie, J., P. Doherty, and A. Graham, *Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo*. *J Anat*, 2004. **205**(3): p. 213-8.
- Buckley, N.E., et al., *Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat*. *Neuroscience*, 1998. **82**(4): p. 1131-49.
- Cabral, G.A., et al., *CB2 receptors in the brain: role in central immune function*. *Br J Pharmacol*, 2008. **153**(2): p. 240-51.
- Chiquet, C., et al., *Characterization of calbindin-positive cones in primates*. *Neuroscience*, 2002. **115**(4): p. 1323-33.
- Dawson, W.W., et al., *Marijuana and vision--after ten years' use in Costa Rica*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1977. **16**(8): p. 689-99.
- Deutsch, D.G. and S.A. Chin, *Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist*. *Biochem Pharmacol*, 1993. **46**(5): p. 791-6.
- Di Marzo, V., et al., *Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action*. *Trends Neurosci*, 1998. **21**(12): p. 521-8.

- Elphick, M.R. and M. Egertova, *The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1407): p. 381-408.
- Freund, T.F., I. Katona, and D. Piomelli, *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 1017-66.
- Gomez-Ruiz, M., et al., *An overview on the biochemistry of the cannabinoid system*. Molecular Neurobiology, 2007. **36**(1): p. 3-14.
- Graham, E.S., J.C. Ashton, and M. Glass, *Cannabinoid receptors: a brief history and "what's hot"*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 944-57.
- Green, K., *The ocular effects of cannabinoids*. Curr Top Eye Res, 1979. **1**: p. 175-215.
- Herbin, M., D. Boire, and M. Ptito, *Size and distribution of retinal ganglion cells in the St. Kitts green monkey (*Cercopithecus aethiops sabeus*)*. J Comp Neurol, 1997. **383**(4): p. 459-72.
- Herkenham, M., et al., *Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat*. Brain Res, 1991. **547**(2): p. 267-74.
- Herkenham, M., et al., *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. J Neurosci, 1991. **11**(2): p. 563-83.
- Hill, E.L., et al., *Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons*. J Neurophysiol, 2007. **97**(4): p. 2580-9.
- Kiplinger, G.F., et al., *Dose-response analysis of the effects of tetrahydrocannabinol in man*. Clin Pharmacol Ther, 1971. **12**(4): p. 650-7.
- Le Fur, G., et al., *Pharmacology of cannabinoid receptors*. Bull Acad Natl Med, 2007. **191**(4-5): p. 933-8; discussion 938-40.

- Leonelli, M., et al., *Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system*. Developmental brain research, 2005. **156**(2): p. 176-182.
- Marsicano, G. and B. Lutz, *Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(12): p. 4213-25.
- Martínez-Navarrete, G.C., et al., *Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans*. The Journal of Comparative Neurology, 2008. **511**(4): p. 557-580.
- Martinez-Orgado, J., et al., *The seek of neuroprotection: introducing cannabinoids*. Recent Pat CNS Drug Discov, 2007. **2**(2): p. 131-9.
- Moskowitz, H., S. Sharma, and W. McGlothlin, *Effect of marihuana upon peripheral vision as a function of the information processing demands in central vision*. Percept Mot Skills, 1972. **35**(3): p. 875-82.
- Mouslech, Z. and V. Valla, *Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice*. Neuro Endocrinol Lett, 2009. **30**(2): p. 153-79.
- Nadal-Nicolas, F.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): p. 3860-8.
- Nag, T.C. and S. Wadhwa, *Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina*. J Biosci, 2001. **26**(2): p. 179-91.
- Nishikawa, S. and M. Tamai, *Muller cells in the human foveal region*. Curr Eye Res, 2001. **22**(1): p. 34-41.

- Noyes, R., Jr., et al., *The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine*. Clin Pharmacol Ther, 1975. **18**(1): p. 84-9.
- Osterberg, G., *Topography of the layer of rods and cones in the human retina*. Actaophthal. suppl., 1935. **6**: p. 11-97.
- Piomelli D, et al., *Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 11;96(10):5802-7.
- Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 873-84.
- Rodriguez de Fonseca, F., et al., *The Endocannabinoid System: Physiology and Pharmacology*. Alcohol Alcohol., 2005. **40**(1): p. 2-14.
- Rosenberg, A. and V. Talebi, *The primate retina contains distinct types of Y-like ganglion cells*. The journal of neuroscience, 2009. **29**(16): p. 5048-5050.
- Sandell, J.H., C.G. Gross, and M.H. Bornstein, *Color categories in macaques*. J Comp Physiol Psychol, 1979. **93**(4): p. 626-35.
- Semple, D.M., F. Ramsden, and A.M. McIntosh, *Reduced binocular depth inversion in regular cannabis users*. Pharmacol Biochem Behav, 2003. **75**(4): p. 789-93.
- Shu-Jung Hu, S., et al., *Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina*. J Comp Neurol, 2010. **518**(18): p. 3848-66.
- Skosnik, P.D., et al., *The effect of cannabis use and gender on the visual steady state evoked potential*. Clin Neurophysiol, 2006. **117**(1): p. 144-56.
- Straiker, A., et al., *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): p. 14565-70.

- Straiker, A.J., et al., *Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(10): p. 2442-8.
- Turu, G. and L. Hunyady, *Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor*. J Mol Endocrinol, 2010. **44**(2): p. 75-85.
- Vitalis, T., et al., *The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro*. Eur J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 1705-18.
- Waksman, Y., et al., *The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **288**(3): p. 1357-66.
- Wassle, H., *Parallel processing in the mammalian retina*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(10): p. 747-57.
- Wiedenmann, B. and W.W. Franke, *Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles*. Cell, 1985. **41**(3): p. 1017-28.
- Wyss-Coray, T. and L. Mucke, *Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword*. Neuron, 2002. **35**(3): p. 419-32.
- Yazulla, S., *Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection*. Progress in Retinal and Eye Research, 2008. **27**(5): p. 501-526.
- Yazulla, S., et al., *Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina*. The Journal of Comparative Neurology, 1999. **415**(1): p. 80-90.
- Yazulla, S., et al., *Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings*. Vis Neurosci, 2000. **17**(3): p. 391-401.

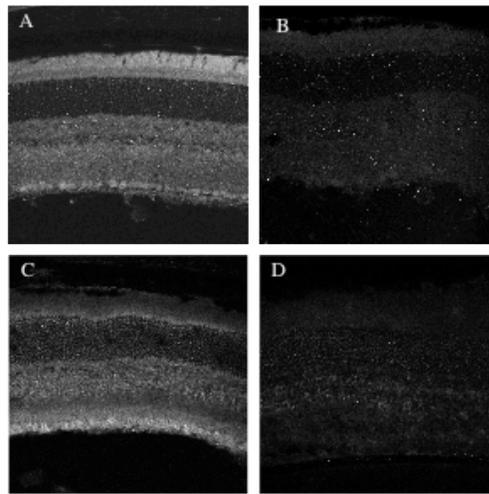


Figure 1. Single-label immunofluorescence showing the specificity of the antibodies targeting the endocannabinoid receptor CB1 (CB1R) and fatty acid amide hydrolase (FAAH). A) CB1R immunoreactivity in a wild type mouse retina. B) No CB1R labeling in the *cnr1*^{-/-} knockout mouse. C) FAAH enzyme immunoreactivity in a wild type mouse retina. D) Lack of FAAH immunofluorescence in the *faah* knockout mouse. Scale bar = 75 μ m.

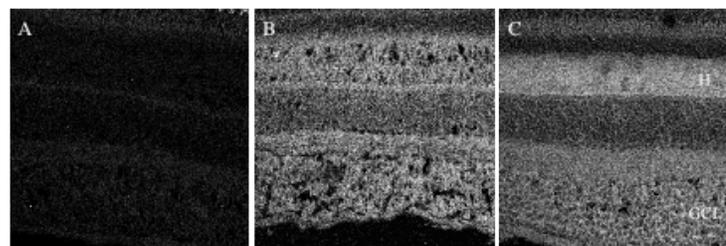


Figure 2. Localization of CB1R-IR and FAAH-IR in the monkey central retina. At low magnification, CB1R and FAAH were strongly expressed in the Henle fiber layer (H) and ganglion cell layer (GCL). A) Control section in which the primary antibody was omitted. B) CB1R-IR in monkey central retina. C) FAAH-IR in monkey central retina. Scale bar = 75 μ m.

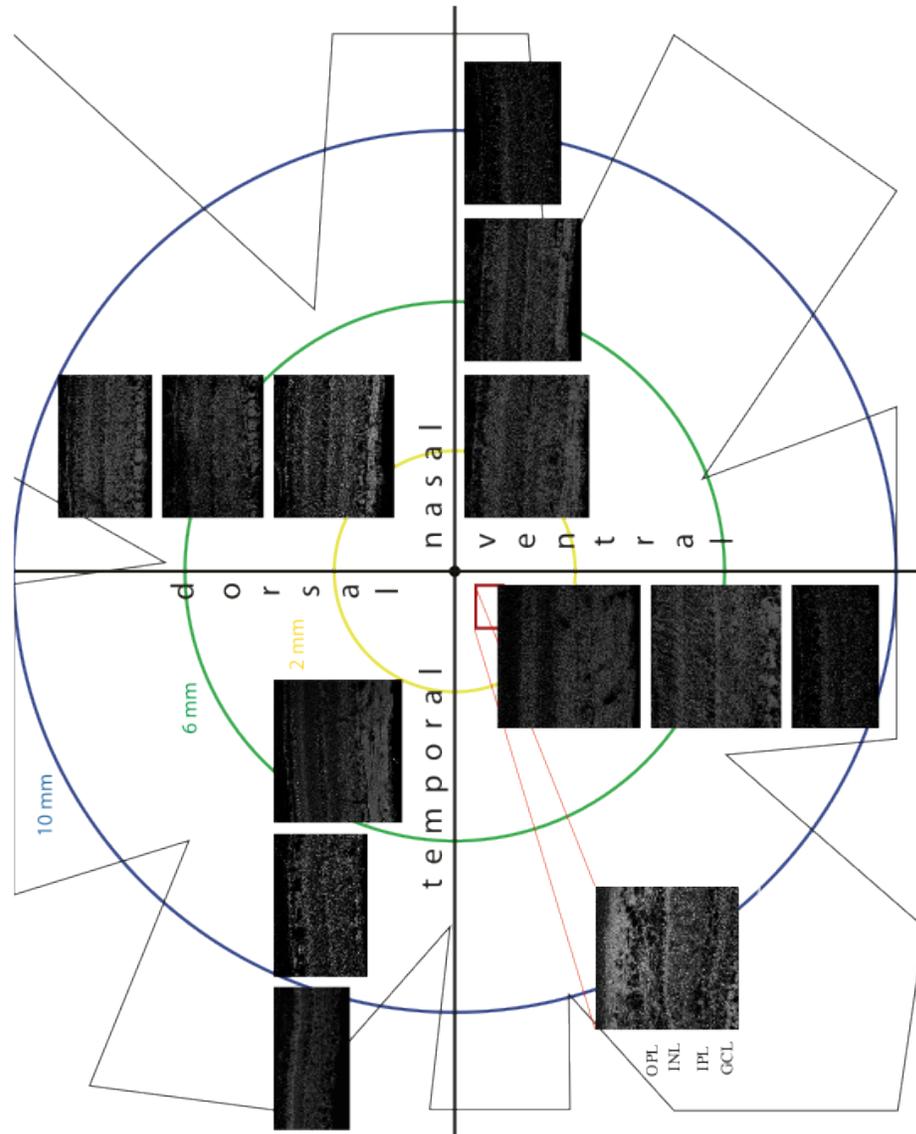


Figure 3a. Schematic illustration of the labeling pattern of CB1R-IR throughout the monkey retina. The CB1 receptor is expressed throughout the monkey retina: OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar = 75 μ m.

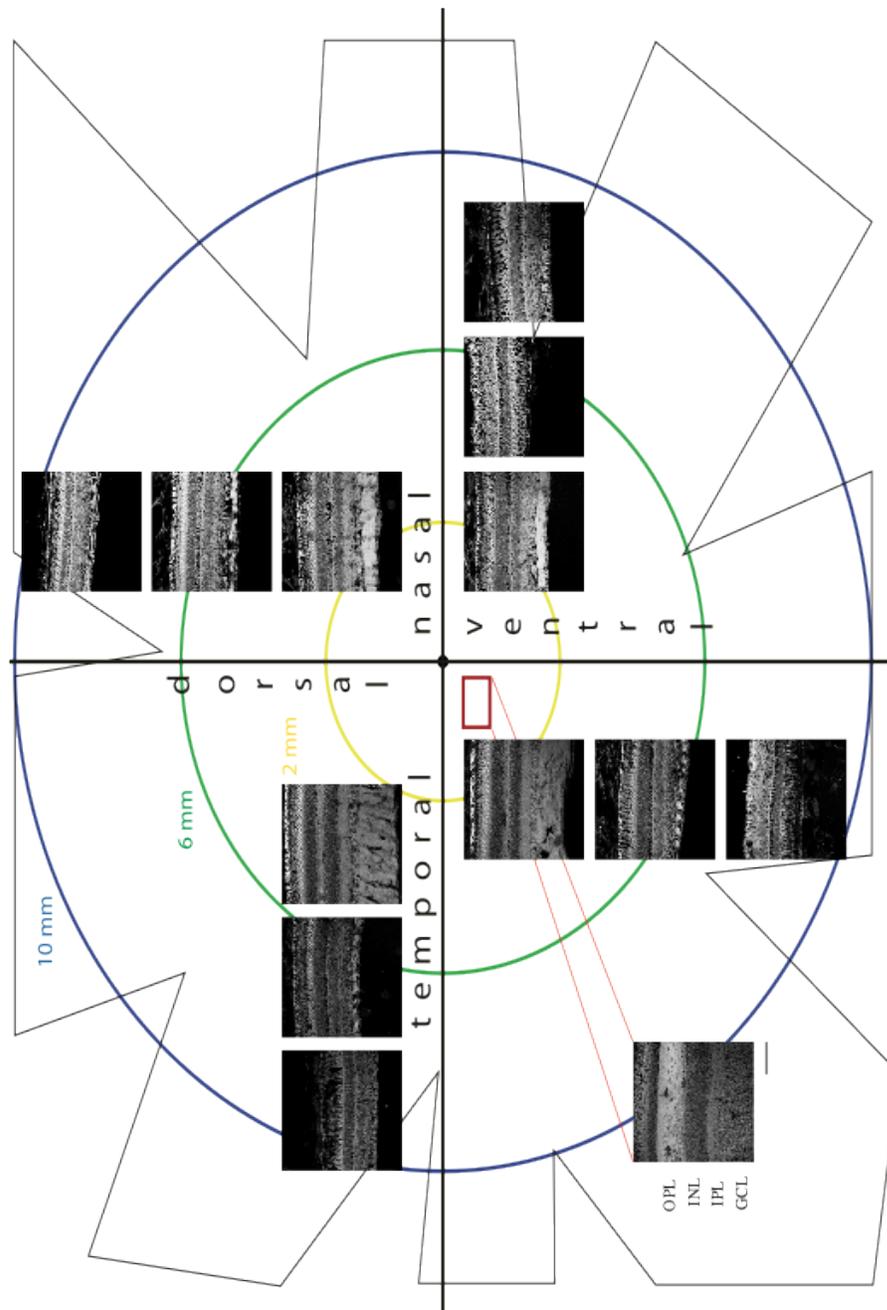


Figure 3b. Schematic illustration of the labeling pattern of FAAH-IR throughout the monkey retina. The FAAH enzyme is expressed throughout the monkey retina: OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar = 75 μ m.

Table 1. Primary antibodies used for immunohistochemistry				
Molecular marker ¹	Antibody	Source	Working dilution	Target Cell Type
CB D-28K	Mouse monoclonal, clone CB-955	Sigma Chemical (St. Louis, MO), C9848	1:500	Cones, some bipolars
CHX10	Goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), sc-21690	1:100	Bipolar cells
PKC α	Mouse monoclonal, Clone H-7	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), sc-8393	1:500	Rod bipolar cells, some amacrine cells
Syntaxin	Mouse monoclonal, clone HPC-1	Sigma Chemical (St. Louis, MO), S0664	1:500	Horizontal and amacrine cells, GC axons
Brn-3	Goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), sc-6026	1:25	RGC
GS	Mouse monoclonal, clone GS-6	Chemicon (Temecula, CA), MAB302	1:2000	Müller cells
CB1R*	Rabbit polyclonal	Sigma Chemical (St. Louis, MO), C1233	1:150	-
FAAH**	Rabbit polyclonal	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), 101600	1:100	-

¹Abbreviations: CB, Calbindin; PKC α , Protein Kinase C (α isoform); GS, Glutamine Synthetase; CB1R, Cannabinoid Receptor type 1; FAAH, Fatty Acid Amide Hydrolase.

Recorded are the primary antibodies used in this study. The antibody column lists antigen and animal origin. The clone designation is given for monoclonal antibodies. The commercial company and catalog reference are indicated in the source column. The working dilution column specifies the dilution at which each antibody was used on retinal sections. The last column provides the specific cell type targeted by the antibody.

* The CB1R antibody targets the first 77 amino acid residues of the rat cannabinoid receptor CB1 and recognizes this sequence in many species including the monkey.

** The FAAH antibody targets the 561-579 amino acids of the rat Fatty Acid Amide Hydrolase.

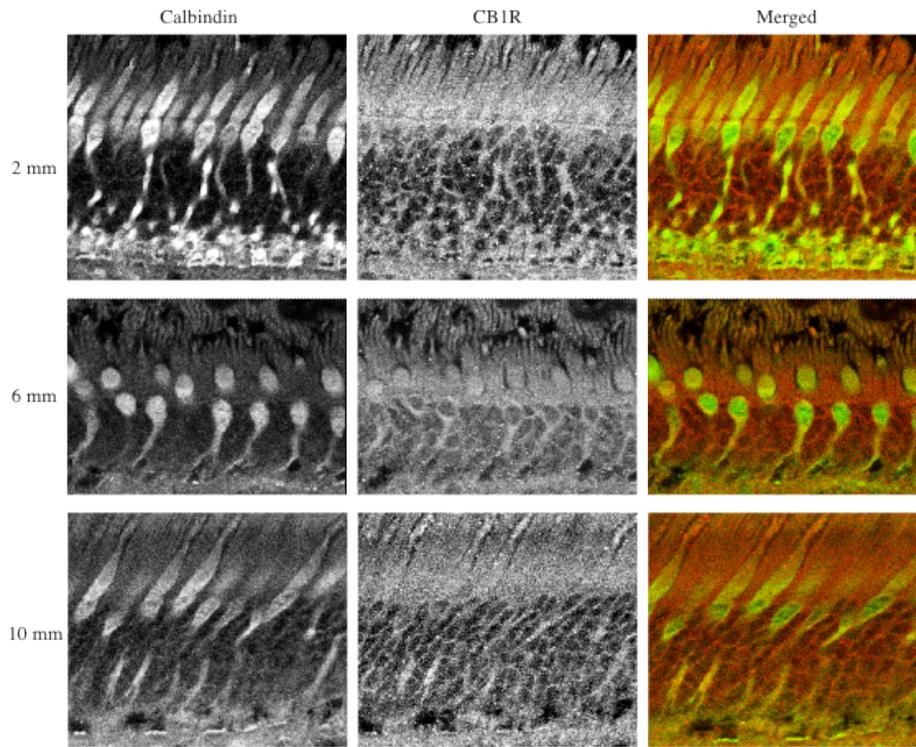


Figure 4. Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB1R-IR with calbindin. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R (red) and calbindin (green), a specific marker for cones in the primate, at different retinal eccentricities. Scale bar = 25 μ m.

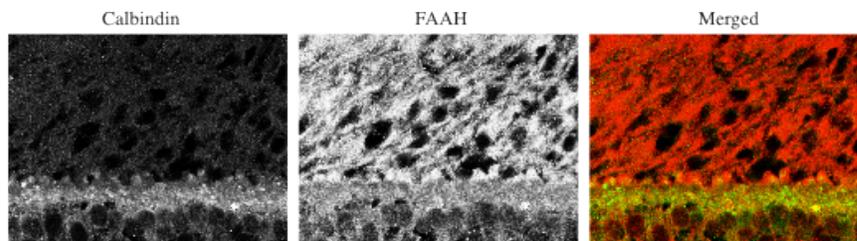


Figure 5. Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of FAAH-IR with calbindin in the foveal region. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for FAAH (red) and calbindin (green), a specific marker for horizontal cells in the *fovea centralis*. Scale bar = 25 μ m.

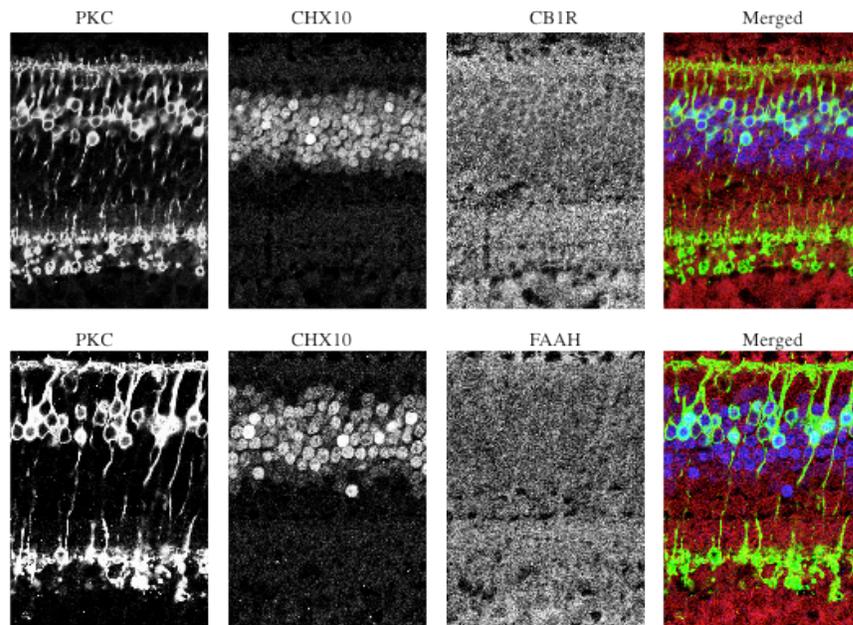


Figure 6. Triple-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB1R-IR and FAAH-IR with PKC-CHX10 in the paraveal region. Confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R or FAAH (red) and PKC (green) and CHX10 (blue), specific markers for bipolar cells.

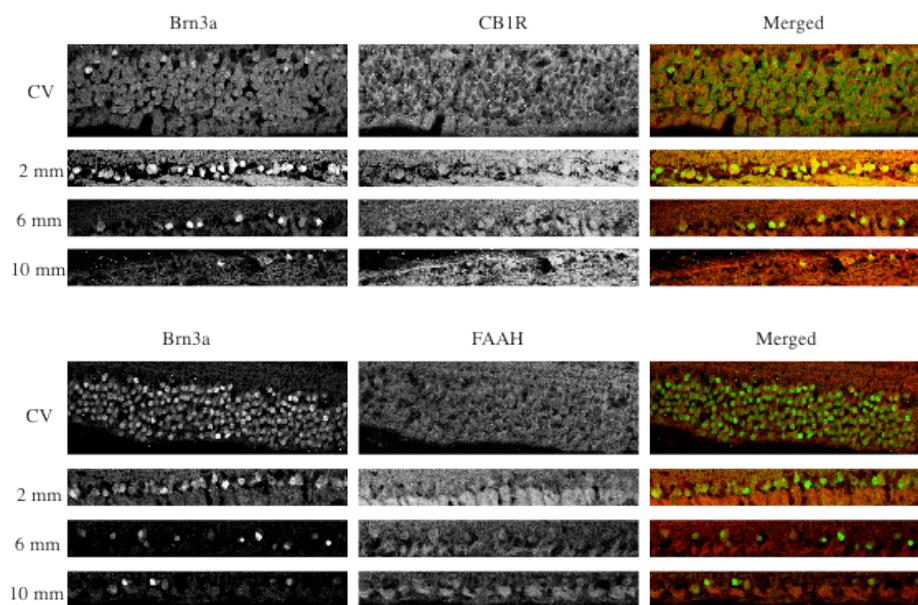


Figure 7. Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB1R-IR (top) or FAAH (bottom) with Brn3a. The antibody against Brn3a labels the nucleus of ganglion cells in the monkey retina and these cells were also all CB1R and FAAH immunoreactive. The intense labeling of CB1R and FAAH in the ganglion cells was localized in the ganglion cells cytosol. Scale bar = 75 μ m.

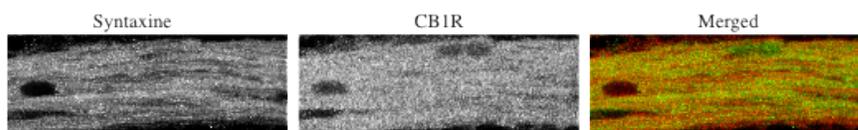


Figure 8. Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB1R-IR with syntaxin-IR in a paraveal region taken at 2 mm of eccentricity. High magnification confocal micrographs of retinas co-immunolabeled for CB1R (red) and Syntaxin (green), a marker of RGC axons. Scale bar = 18,75 μ m.

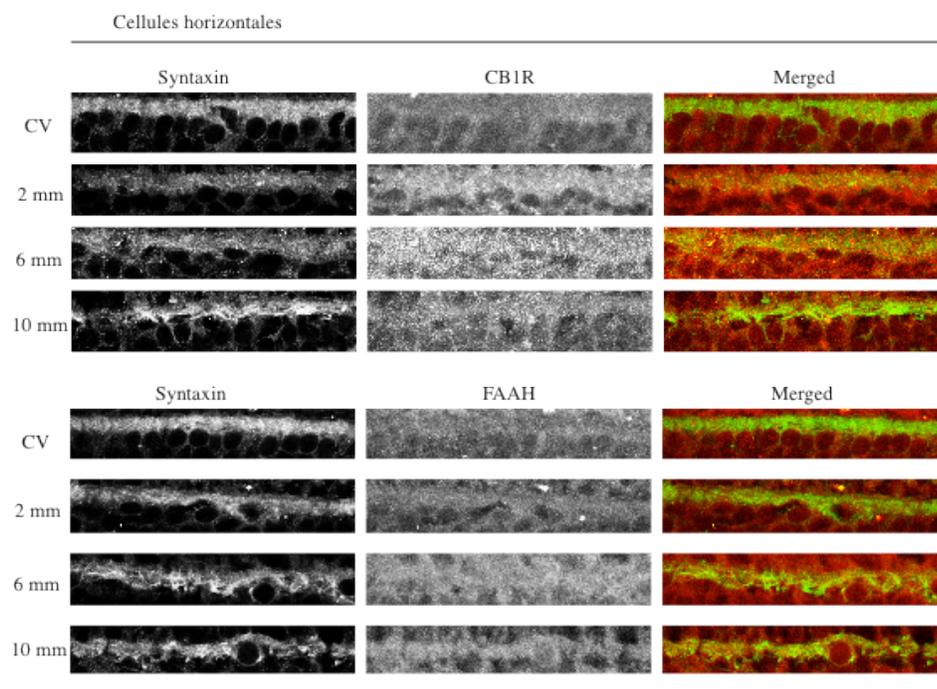


Figure 9. Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB1R-IR or FAAH-IR (red) with syntaxin-IR in horizontal cells at the *fovea centralis* and at 2 mm, 6 mm and 10 mm of eccentricity. Syntaxin-IR labeled heavily the membrane of horizontal cells and OPL but lightly their cytosol. Syntaxin-immunoreactive horizontal cells were double labeled for CB1R and FAAH. Scale bar = 75 μ m.

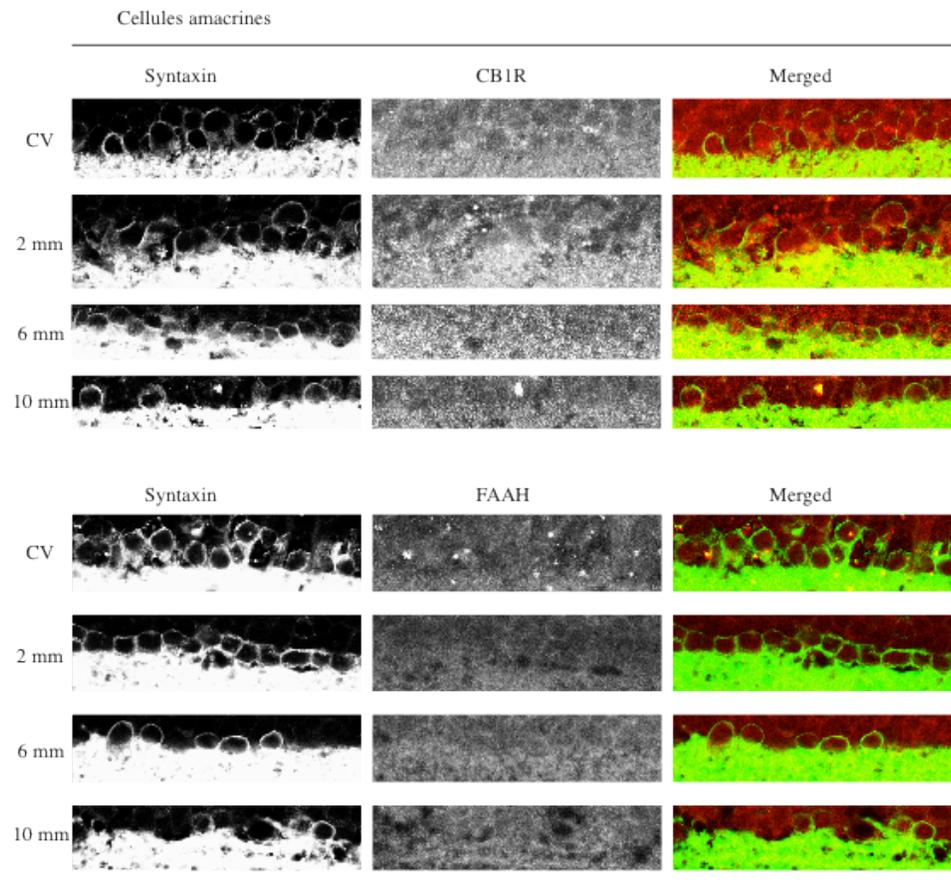


Figure 10. Double-label immunofluorescence illustrating colocalization of CB1R-IR or FAAH-IR (red) with syntaxin-IR in amacrine cells at the *fovea centralis* and at 2 mm, 6 mm and 10 mm of eccentricity. Syntaxin-IR labeled heavily the membrane of amacrine cells and IPL but lightly their cytosol. Syntaxin-immunoreactive amacrine cells were double labeled for CB1R and FAAH. Scale bar = 75 μ m.

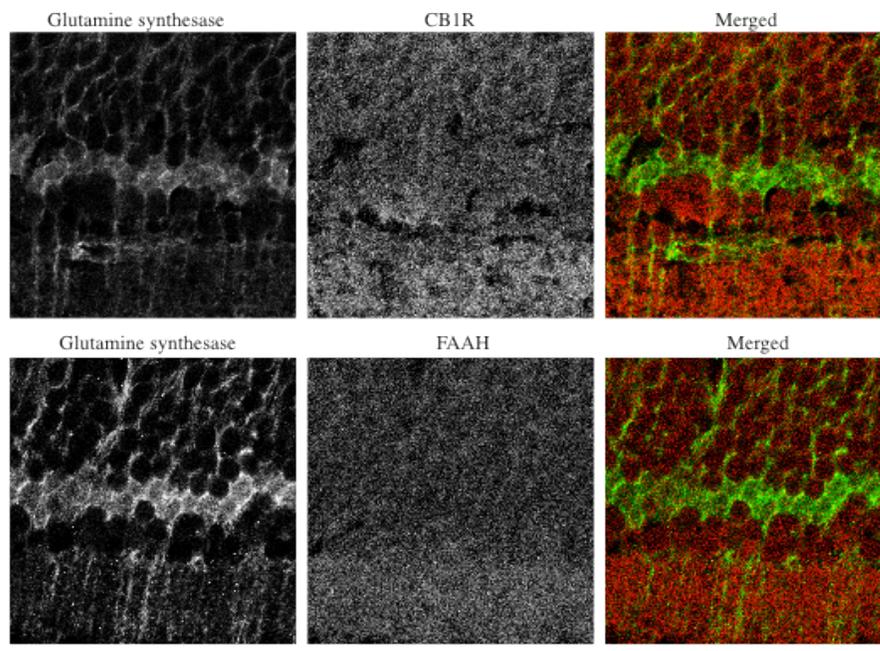


Figure 11. CB1R and FAAH immunoreactivity in Müller cells in the central monkey retina. Shown are retinal sections immunolabeled for CB1R and FAAH taken from a central part of the retina. Scale bar = 75 μ m.

Discussion

Le but de cette étude était de caractériser l'expression et la localisation du système des endocannabinoïdes dans la rétine du primate non-humain. Une attention particulière a été portée sur le type cellulaire spécifique et l'excentricité de l'échantillon de rétine prélevé. Deux importantes composantes de ce système, soient le CB1R et l'enzyme FAAH, ont été présentes à travers toutes les excentricités étudiées. Ils sont en position parfaite pour moduler le premier traitement de l'information visuelle qui se déroule au niveau de la rétine et, probablement, le long du trajet de l'information visuelle.

Choix du modèle animal

Nous avons choisi d'effectuer cette expérimentation sur le primate non-humain puisqu'il comporte certaines caractéristiques reliées au système visuel qui sont propres à l'ordre des primates. Tout d'abord, la rétine du primate possède une macula avec une partie fovéale qui n'est pas présente chez les rongeurs. Ensuite, le traitement neuronal qui se fait le long du trajet visuel est très similaire à l'homme (Sandell et al., 1979). Il n'y a qu'une seule étude comparative qui a montré la présence du récepteur CB1 dans la rétine du singe, mais aucune précision n'a été soulevée quant à l'expression cellulaire spécifique et l'excentricité du spécimen prélevé (Straiker et al., 1999a). Dans notre laboratoire, l'expression du CB1R au cours du développement a été déterminé pour chacun des types cellulaires du rongeur, de la naissance à l'âge adulte (Zabouri et al., 2010).

Distribution du CB1R et FAAH

Nous démontrons que le récepteur cannabinoïde CB1 est largement exprimé dans la rétine du primate. De plus, la distribution de l'enzyme de dégradation FAAH est aussi assez large dans la rétine du singe. Mais il est nécessaire de se baser sur les études effectuées sur le SNC pour comprendre et extrapoler ces notions au niveau de la rétine. Ainsi, une stimulation du CB1R peut résulter par une activation de plusieurs voies de signalisation pour moduler finalement la plasticité synaptique (Howlett et al., 2002). Le CB1R agit sur l'activité de plusieurs protéines, notamment l'adénylate cyclase (Howlett and Fleming, 1984). Le fait que le système des eCBs est synthétisé sur demande et possède des propriétés chimiques particulières lui permet d'agir à contre courant de la transmission synaptique pour réguler de façon transitoire la libération des neurotransmetteurs. Justement, certains chercheurs ont observé que la dépolarisation des cellules de Purkinje dans le cervelet entraîne une diminution, durant plusieurs dizaines de secondes, des événements postsynaptiques spontanés inhibiteurs GABAergiques (Llano et al., 1991). De cette façon, les endocannabinoïdes se comportent comme des messagers rétrogrades qui, suite à une dépolarisation postsynaptique, diminuent la libération de neurotransmetteurs en agissant à contre-courant de la transmission synaptique inhibitrice ou excitatrice.

La distribution de CB1R et FAAH largement répandu dans la rétine du singe suggère que les cannabinoïdes peuvent influencer plusieurs fonctions physiologiques de l'œil. Par exemple, certaines études ont démontré que fumer du cannabis peut réduire la pression intraoculaire (PIO) (Hepler and Frank, 1971). Plusieurs sites d'actions ont été proposés pour expliquer cette baisse de PIO, notamment le

corps ciliaire, endroit où l'humeur aqueuse est formée (Straiker et al, 1999b). En outre, la présence du CB1R dans les centres visuels du cerveau suggère que ce système est globalement impliqué dans la fonction visuelle. Le fait que les cannabinoïdes peuvent influencer la PIO reflète tant une régulation centrale qu'un contrôle local (Straiker et al., 1999b). Il existe également quelques évidences qui montrent une fonction du CB1R dans le développement du système visuel (Leonelli et al., 2005). En effet, cette dernière étude illustre que le CB1R possède une expression transitoire au cours du développement du système rétinotectal du poulet. Les travaux menés dans notre laboratoire ont aussi démontré que le CB1R est présent dans la rétine de rongeurs à plusieurs âges après la naissance et chez adulte (Zabouri et al., 2010). En fait, l'expression du CB1R est transitoire seulement pour les cellules bipolaires, les cellules de Müller et certaines cellules amacrine suggérant un rôle potentiel de ce récepteur dans les processus développementaux, tels que la migration neuronale, l'acquisition du type cellulaire et la synaptogenèse. En outre, l'activation du CB1R comme un signal négatif pour la régulation de la dendritogenèse, le guidage axonal ainsi que le branchement (Vitalis et al., 2008). Ces résultats soutiennent la notion que le système endocannabinoïde est impliqué dans les processus développementaux du système nerveux.

Importance pour le développement

Le rôle du système endocannabinoïde durant le développement du système nerveux central, du moins durant le développement du système visuel, est très peu connu. Ce qui est sûr c'est que le CB1R participe au développement du SNC. Les travaux menés par le laboratoire du Dr. Jean-François Bouchard ont démontré que le CB1R

est présent à différents âges post natals ainsi que chez l'adulte dans la rétine du rongeur. Ces résultats suggèrent que ce système contribue aux fonctions rétinienne. En effet, la consommation de marijuana affecte certaines fonctions visuelles qui prennent place au niveau de la rétine, comme la photosensibilité et la vision des couleurs.

Perspective

Ce projet peut être vu comme le début d'une étude développementale. Nous avons investigué l'expression du système eCBs dans la rétine de 3 singes tous âgés de 3 ans et demi (l'équivalent d'un jeune homme). Il nous restera qu'à compléter les intervalles d'âges manquant pour avoir une bonne idée de la distribution de ce système dans le développement. De plus, nous pourrions même ajouter un modèle animal qui a été exposé à de l'alcool. Au laboratoire, ce modèle est très courant et il a été démontré qu'il peut affecter le développement normal du cerveau. En comparant un groupe témoin versus un groupe alcoolique, nous allons voir comment le système eCBs réagit. Il ne reste qu'à vérifier l'expression de ce système au cours de la maturation rétinienne, chez des singes normaux et alcooliques. En effet, une consommation d'alcool chronique peut réguler négativement le nombre et la fonction du CB1R chez les rongeurs, ce qui peut suggérer que cette baisse de CB1R résulte de l'hyperstimulation du CB1R par les eCBs (Basavarajappa and Hungund 2005). Des bas niveaux du CB1R ont aussi été retrouvés chez des rats consommant préférentiellement de l'alcool dès leur naissance (Ortiz et al. 2004). Ceci étant, nous nous attendons à voir une baisse des niveaux du CB1R au niveau de la rétine de singes alcooliques.

Récemment, plusieurs études ont illustré que le système des eCBs participe aux processus développementaux du SNC (Leonelli *et al.*, 2005). Effectivement, elles ont démontré que les récepteurs cannabinoïdes sont exprimés très tôt durant le développement du cerveau. Ainsi, elles ont suggéré que ce système possède un rôle important dans des processus tel que la migration et prolifération neuronale, le guidage axonal et la synaptogenèse (voir plus haut pour le détail sur l'expression transitoire du CB1R au cours du développement).

Migration neuronale et guidage axonal

Les eCBs jouent un rôle important dans la migration neuronale. C'est grâce au facteur neurotrophique dérivé du cerveau, le BDNF, un facteur qui module la migration et la différenciation de cellules progénitrices neuronales, que les eCBs régulent la migration (Berghuis *et al.* 2005). De cette façon, l'AEA et le WIN55212-2 peuvent provoquer la migration des interneurones GABAergiques *in vitro* (Berghuis *et al.* 2005). Ces interneurones parcourent de longs trajets pour arriver enfin dans certaines couches spécifiques du cortex et de l'hippocampe. Le CB1R est aussi impliqué dans la croissance des neurites et la formation de synapses. L'AEA, un ligand du CB1R, peut inhiber la croissance des neurites dans des cultures d'interneurones GABAergiques embryonnaires (Rueda *et al.*, 2002). Jusqu'à ce jour, les mécanismes moléculaires qui contrôlent ces processus font l'objet de recherches intenses.

Neurogenèse dans la rétine adulte

La rétine de mammifères adultes ne présente aucune évidence de régénération neuronale et neurogenèse. Il a été bien longtemps admis que la rétine ne contient pas de cellules souches et n'est pas capable de régénération neuronale. Cependant, après la caractérisation *in vitro* et l'isolement de cellules multipotentes auto-régénératrice (Martinez-Navarrete *et al.*, 2008), cette idée a changé et suggère maintenant que la rétine adulte possède des cellules souches rétiniennes. Cette récente découverte ouvre la porte à de nouveaux traitements pour de nombreuses pathologies de la rétine.

Implication physiologique de la distribution rétinienne du système endocannabinoïde

Dans ce projet, le système eCB a été précisément localisé dans la rétine du primate. Il faut se baser sur les données d'électrophysiologie effectuées sur d'autres espèces pour inférer qu'elle est la fonction de ce système au niveau de la rétine. La distribution des composantes du système des endocannabinoïdes dans la rétine nous renseigne sur les bases neuronales des effets pharmacologiques des cannabinoïdes et sur la fonction des cannabinoïdes endogènes. Le rôle fonctionnel de cette distribution immunohistochimique a été bien décrit par Yazulla, 2008 principalement sur la salamandre et le poisson rouge. Les données présentées dans le cadre de ce projet portant sur la distribution de l'immunoréactivité de CB1R et FAAH dans la rétine du primate non-humain nous donne une cible cellulaire pour de projets futurs sur le rôle des cannabinoïdes sur la fonction rétinienne, le traitement de l'information visuelle et la perception visuelle.

Conclusion

Les neurones de la rétine expriment les composantes du système des endocannabinoïdes. Suite à l'activation des cellules photoréceptrices par la lumière, les neurones répondent, comme dans le SNC, en activant le système endocannabinoïde et modulant ainsi l'information visuelle qui est acheminée au cerveau. Le contrôle du message lumineux effectué par le système endocannabinoïde rétinien est fonction de l'excentricité du signal visuel. Il demeure à vérifier si ce système régule l'information dans les centres supérieurs du cerveau. Il reste néanmoins séduisant d'envisager la manipulation pharmacologique de ce mécanisme de régulation, aussi impliqué dans le développement (Zabouri et al., 2010), pour maintenir ou rétablir la fonction du système visuel adulte pendant et suite à une condition pathologique comme les maladies rétinienne. Puisque les neurones rétiens sont des acteurs primordiaux dans la régulation des informations visuelles, la modulation du système des endocannabinoïdes à ce niveau se présente comme une cible thérapeutique de choix. Nous pouvons imaginer des thérapies basées sur le contrôle de ce système rétinien, permettant des avancées dans la recherche pour le traitement des maladies de la rétine.

Bibliographie

- Adams, A.J. and B. Brown, *Alcohol prolongs time course of glare recovery*. *Nature*, 1975. **257**(5526): p. 481-3.
- Adams, A.J., et al., *Alcohol and marijuana effects on static visual acuity*. *Am J Optom Physiol Opt*, 1975. **52**(11): p. 729-35.
- Adams, A.J., et al., *Marijuana, alcohol, and combined drug effects on the time course of glare recovery*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1978. **56**(1): p. 81-6.
- Ameri, A., *The effects of cannabinoids on the brain*. *Progress in Neurobiology*, 1999. **58**(4): p. 315-348.
- Andrade da Costa, B.L. and J.N. Hokoc, *Photoreceptor topography of the retina in the New World monkey Cebus apella*. *Vision Res*, 2000. **40**(18): p. 2395-409.
- Aquatias, S., et al., *Cannabis : quels effets sur le comportement et la santé ?*, ed. INSERM. 2001, Paris. 429.
- Arevalo-Martin, A., et al., *Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis*. *J Neurosci*, 2003. **23**(7): p. 2511-6.
- Bari M, et al., *New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential*. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Mar;6(3):257-68. Review.
- Basavarajappa, B.S. and B.L. Hungund, *Role of the endocannabinoid system in the development of tolerance to alcohol*. *Alcohol Alcohol*, 2005. **40**(1): p. 15-24.
- Begbie, J., P. Doherty, and A. Graham, *Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo*. *J Anat*, 2004. **205**(3): p. 213-8.
- Beinfeld MC, Connolly K. *Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat*

- hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids.* Neurosci Lett. 2001 Mar 23;301(1):69-71.
- Beltramo M, et al., *Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.* Science. 1997 Aug 22;277(5329):1094-7.
- Berghuis P, et al., *Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 27;102(52):19115-20.
- Bisogno, T., *Endogenous cannabinoids: structure and metabolism.* J Neuroendocrinol, 2008. **20 Suppl 1**: p. 1-9.
- Brown, A.J., *Novel cannabinoid receptors.* Br J Pharmacol, 2007. **152(5)**: p. 567-75.
- Buckley, N.E., et al., *Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat.* Neuroscience, 1998. **82(4)**: p. 1131-49.
- Budney AJ, and Moore BA. *Development and consequences of cannabis dependence.* J Clin Pharmacol. 2002 Nov;42(11 Suppl):28S-33S.
- Budney AJ, et al., *The time course and significance of cannabis withdrawal.* J Abnorm Psychol. 2003 Aug;112(3):393-402.
- Burke, M., et al., *The gateway to the brain: dissecting the primate eye.* Journal of Visualized Experiments, 2009(27).
- Butler, H. and M. Korbonits, *Cannabinoids for clinicians: the rise and fall of the cannabinoid antagonists.* Eur J Endocrinol, 2009. **161(5)**: p. 655-62.
- Cabral, G.A., et al., *CB2 receptors in the brain: role in central immune function.* Br J Pharmacol, 2008. **153(2)**: p. 240-51.

- Carriba P, et al., *Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids*. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Nov;32(11):2249-59.
- Chen, J., et al., *Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(4): p. 1062-7.
- Chen, X., K.C. Wikler, and P.R. MacLeish, *Cone properties of retinal margin cells in the monkey (Macaca mulatta)*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. **41**(8): p. 2019-22.
- Chevaleyre V, Castillo PE. *Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability*. *Neuron*. 2003 May 8;38(3):461-72. Erratum in: *Neuron*. 2003 Jun 19;38(6):997.
- Chiquet, C., et al., *Characterization of calbindin-positive cones in primates*. *Neuroscience*, 2002. **115**(4): p. 1323-33.
- Clapper JR, et al., *The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence*. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1:235-43. Epub 2008 Jul 19. Review.
- Clarke R. C. and Watson D. P., *Cannabis and Natural Cannabis Medicines*, Chapter 1, *Marijuana and the cannabinoids*, edited by Mahmoud A. ElSohly, 2006. Pages 1-17.
- Dawson, W.W., et al., *Marijuana and vision--after ten years' use in Costa Rica*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1977. **16**(8): p. 689-99.
- De Petrocellis L, et al., *The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase*. *J Neurochem*. 2001 Jun;77(6):1660-3.
- De Petrocellis, L., M.G. Cascio, and V. Di Marzo, *The endocannabinoid system: a general view and latest additions*. *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(5): p. 765-74.

- Deeg, C.A., et al., *Defining cytochemical markers for different cell types in the equine retina*. *Anat Histol Embryol*, 2006. **35**(6): p. 412-5.
- Derkinderen P, et al., *Cannabis and cannabinoid receptors: from pathophysiology to therapeutic options*. *Rev Neurol (Paris)*. 2004 Jul;160(6-7):639-49. Review. French.
- Deutsch, D.G. and S.A. Chin, *Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist*. *Biochem Pharmacol*, 1993. **46**(5): p. 791-6.
- Di Marzo, V., et al., *Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action*. *Trends Neurosci*, 1998. **21**(12): p. 521-8.
- Diana G, et al., *Effects of Win 55,212-2 on hippocampal CA1 long-term potentiation in experiments controlled for basal glutamatergic synaptic transmission*. *Eur J Pharmacol*. 2002 Oct 25;453(2-3):251-4.
- Diana MA, Marty A. *Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE)*. *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(1):9-19. Epub 2004 Apr 20. Review.
- Ducobu, J., *The endocannabinoid system and the regulation of the metabolism*. *J Pharm Belg*, 2005. **60**(3): p. 84-8.
- El-Talatini, M.R., et al., *Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary*. *PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4579.
- Elphick, M.R. and M. Egertova, *The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001. **356**(1407): p. 381-408.
- Facci L, et al., *Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and*

- palmitoylethanolamide*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Apr 11;92(8):3376-80.
- Fattore L, et al., *Neurobiological mechanisms of cannabinoid addiction*. Mol Cell Endocrinol. 2008 Apr 16;286(1-2 Suppl1):S97-S107. Epub 2008 Feb 16.
- Fegley D, et al., *Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 8;101(23):8756-61.
- Felder CC, et al., *LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation*. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Jan;284(1):291-7.
- Freund, T.F., I. Katona, and D. Piomelli, *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 1017-66.
- Frohlich, E. and C. Klessen, *Glutamine synthetase and marker enzymes of the blood-retina barrier in fetal bovine retinal pigment epithelial cells*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2000. **238**(6): p. 500-7.
- Fuentes JA, et al., *Cannabinoids as potential new analgesics*. Life Sci. 1999;65(6-7):675-85. Review.
- Fujitani, Y., et al., *Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development*. Development, 2006. **133**(22): p. 4439-50.
- Galligan, J.J., *Cannabinoid signalling in the enteric nervous system*. Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(9): p. 899-902.
- Gerdeman GL, et al., *Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum*. Nat Neurosci. 2002 May;5(5):446-51.

- Giuffrida A, et al., *Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum*. Nat Neurosci. 1999 Apr;2(4):358-63.
- Glaser, S.T., et al., *Endocannabinoids in the intact retina: 3 H-anandamide uptake, fatty acid amide hydrolase immunoreactivity and hydrolysis of anandamide*. Vis Neurosci, 2005. **22**(6): p. 693-705.
- Gomez-Ruiz, M., et al., *An overview on the biochemistry of the cannabinoid system*. Molecular Neurobiology, 2007. **36**(1): p. 3-14.
- Graham, E.S., J.C. Ashton, and M. Glass, *Cannabinoid receptors: a brief history and "what's hot"*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 944-57.
- Green, K., *The ocular effects of cannabinoids*. Curr Top Eye Res, 1979. **1**: p. 175-215.
- Hepler, R.S. and I.R. Frank, *Marihuana smoking and intraocular pressure*. JAMA, 1971. **217**(10): p. 1392.
- Herbin, M., D. Boire, and M. Ptito, *Size and distribution of retinal ganglion cells in the St. Kitts green monkey (Cercopithecus aethiops sabeus)*. J Comp Neurol, 1997. **383**(4): p. 459-72.
- Herkenham, M., et al., *Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat*. Brain Res, 1991. **547**(2): p. 267-74.
- Herkenham, M., et al., *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. J Neurosci, 1991. **11**(2): p. 563-83.
- Hill, E.L., et al., *Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons*. J Neurophysiol, 2007. **97**(4): p. 2580-9.
- Hirano, A.A., et al., *Robust syntaxin-4 immunoreactivity in mammalian horizontal cell processes*. Vis Neurosci, 2007. **24**(4): p. 489-502.
- Hoover, H.S., et al., *Selectivity of inhibitors of endocannabinoid biosynthesis evaluated by activity-based protein profiling*.

- Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**(22): p. 5838-5841.
- Howlett AC, Fleming RM. *Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes*. Mol Pharmacol. 1984 Nov;26(3):532-8.
- Howlett AC, et al., *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors*. Pharmacol Rev. 2002 Jun;54(2):161-202. Review.
- Howlett AC, et al., *Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress*. Neuropharmacology. 2004;47 Suppl 1:345-58. Review.
- Kandel et al., *Principles of Neural Science*, 1991. 3rd ed. McGraw-Hill, New York. ISBN 0-8385-7701-6
- Kathuria S, et al., Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. Nat Med. 2003 Jan;9(1):76-81.
- Kearn CS, et al., *Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk?* Mol Pharmacol. 2005 May;67(5):1697-704.
- Kiplinger, G.F., et al., *Dose-response analysis of the effects of tetrahydrocannabinol in man*. Clin Pharmacol Ther, 1971. **12**(4): p. 650-7.
- Kolb, H. *The neural organization of the human retina*. In "Principles and Practices of Clinical Electrophysiology of Vision", 1991, Eds. Heckenlively, J.R. and Arden, G.B., Mosby Year Book Inc. , St. Louis, pp. 25-52.
- Kolb, H. *How the Retina Works*. 2003, Sigma Xi, The Scientific Research Society.
- Krebs, W. and Krebs, I., *Primate Retina and Choroid. Atlas of Fine Structure in Man and Monkey*. 1991, Berlin: Springer. 160 pages.

- Lambot, M.A., et al., *Mapping labels in the human developing visual system and the evolution of binocular vision*. J Neurosci, 2005. **25**(31): p. 7232-7.
- Lameirao, S.V., et al., *Rod bipolar cells in the retina of the capuchin monkey (Cebus apella): characterization and distribution*. Vis Neurosci, 2009. **26**(4): p. 389-96.
- Le Foll B, Goldberg SR. *Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence*. J Pharmacol Exp Ther. 2005 Mar;312(3):875-83. Epub 2004 Nov 3. Review.
- Le Fur, G., et al., *Pharmacology of cannabinoid receptors*. Bull Acad Natl Med, 2007. **191**(4-5): p. 933-8; discussion 938-40.
- Leonelli, M., et al., *Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system*. Developmental brain research, 2005. **156**(2): p. 176-182.
- Llano I, et al., *Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents*. Neuron. 1991 Apr;6(4):565-74.
- Lopez, E.M., et al., *Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina*. Synapse, 2010.
- Lu, Q.J., et al., *Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina*. Vis. Neurosci 2000. 17, 91–95.
- Luvone, T., et al., *Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders?* CNS Neurosci Ther, 2009. **15**(1): p. 65-75.
- Mackie, K., *Cannabinoid receptors: where they are and what they do*. J Neuroendocrinol, 2008a. **20 Suppl 1**: p. 10-4.
- Mackie, K., *Signaling via CNS cannabinoid receptors*. Mol Cell Endocrinol, 2008b. **286**(1-2 Suppl 1): p. S60-5.
- Marcellino D, et al., *Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined*

- neurochemical and behavioral analysis*. *Neuropharmacology*. 2008 Apr;54(5):815-23.
- Marsicano G, et al., *CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity*. *Science*. 2003 Oct 3;302(5642):84-8.
- Marsicano, G., et al., *Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1*. *J. Neurochem* 2002. 80, 448–456.
- Marsicano, G. and B. Lutz, *Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain*. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(12): p. 4213-25.
- Martínez-Navarrete, G.C., et al., *Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans*. *The Journal of Comparative Neurology*, 2008. **511**(4): p. 557-580.
- Martinez-Navarrete, G.C., et al., *Alpha synuclein gene expression profile in the retina of vertebrates*. *Mol Vis.*, 2007. **13**: p. 949-61.
- Martinez-Orgado, J., et al., *The seek of neuroprotection: introducing cannabinoids*. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2007. **2**(2): p. 131-9.
- Masland, R.H., *The fundamental plan of the retina*. *Nat Neurosci*, 2001. **4**(9): p. 877-86.
- Matsuda LA, et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):561-4.
- Mechoulam R, Gaoni Y. *A total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish*. *J Am Chem Soc*. 1965 Jul 20;87:3273-5.
- Mechoulam R, et al., *Endocannabinoids and neuroprotection*. *Sci STKE*. 2002 Apr 23;2002(129):re5. Review.

- Meissirel, C., et al., *Early divergence of magnocellular and parvocellular functional subsystems in the embryonic primate visual system.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5900-5.
- Moskowitz H, et al., *Effect of marihuana upon peripheral vision as a function of the information processing demands in central vision.* Percept Mot Skills. 1972 Dec;35(3):875-82.
- Mouslech, Z. and V. Valla, *Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice.* Neuro Endocrinol Lett, 2009. **30**(2): p. 153-79.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.* Nature. 1993 Sep 2;365(6441):61-5.
- Nadal-Nicolas, F.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): p. 3860-8.
- Nag, T.C. and S. Wadhwa, *Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina.* J Biosci, 2001. **26**(2): p. 179-91.
- Nassi, J.J. and E.M. Callaway, *Parallel processing strategies of the primate visual system.* Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 360-72.
- Nishikawa, S. and M. Tamai, *Muller cells in the human foveal region.* Curr Eye Res, 2001. **22**(1): p. 34-41.
- Noyes, R., Jr., et al., *The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine.* Clin Pharmacol Ther, 1975. **18**(1): p. 84-9.
- Ortiz S, et al., *Differences in basal cannabinoid CB1 receptor function in selective brain areas and vulnerability to voluntary alcohol consumption in Fawn Hooded and Wistar rats.* Alcohol Alcohol. 2004 Jul-Aug;39(4):297-302.

- Osterberg, G., *Topography of the layer of rods and cones in the human retina*. Actaophthal. suppl., 1935. **6**: p. 11-97.
- Panikashvili D, et al., *An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury*. Nature. 2001 Oct 4;413(6855):527-31.
- Pazos, M.R., et al., *Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2005. **81**(2): p. 239-247.
- Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 873-84.
- Perkonig A, et al., *The natural course of cannabis use, abuse and dependence during the first decades of life*. Addiction. 2008 Mar;103(3):439-49; discussion 450-1.
- Purves, D., et al., *Neuroscience*, 2004, Sinauer Associates Inc: Massachusetts, Third edition, 761 pages.
- Raymon L. P. and Chip Walls H., *Pharmacology of cannabinoids*, chapter 5, Marijuana and the cannabinoids, edited by Mahmoud A. ElSohly, 2006. Page 99.
- Rios C, et al., *mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis*. Br J Pharmacol. 2006 Jun;148(4):387-95.
- Robbe D, et al., *Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 11;99(12):8384-8.
- Rodriguez de Fonseca F, et al., *Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal*. Science. 1997 Jun 27;276(5321):2050-4.
- Rodriguez de Fonseca F, et al., *Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity*. Neurobiol Dis. 1998 Dec;5(6 Pt B):483-501. Review.

- Rodriguez de Fonseca, F., et al., *The Endocannabinoid System: Physiology and Pharmacology*. Alcohol Alcohol., 2005. **40**(1): p. 2-14.
- Rosenberg, A. and V. Talebi, *The primate retina contains distinct types of Y-like ganglion cells*. The journal of neuroscience, 2009. **29**(16): p. 5048-5050.
- Rueda, D., et al., *The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46645-50.
- Ryan, D., et al., *Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels*. J Neurosci, 2009. **29**(7): p. 2053-63.
- Sandell, J.H., C.G. Gross, and M.H. Bornstein, *Color categories in macaques*. J Comp Physiol Psychol, 1979. **93**(4): p. 626-35.
- Scheen, A.J., *The endocannabinoid system: a promising target for the management of type 2 diabetes*. Curr Protein Pept Sci, 2009. **10**(1): p. 56-74.
- Schlicker E, et al., *Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1996 Dec;354(6):791-5.
- Schlicker E, Kathmann M. *Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors*. Trends Pharmacol Sci. 2001 Nov;22(11):565-72. Review.
- Semple, D.M., F. Ramsden, and A.M. McIntosh, *Reduced binocular depth inversion in regular cannabis users*. Pharmacol Biochem Behav, 2003. **75**(4): p. 789-93.
- Sernagor, E., *Retinal development*. 2006, Cambridge: Cambridge University Press. xvi, 383 p., 8 p. of plates.
- Shu-Jung Hu, S., et al., *Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina*. J Comp Neurol, 2010. **518**(18): p. 3848-66.

- Silveira, L.C.L., et al., *Comparative Anatomy and Physiology of the Primate Retina*, in *The Primate Visual System*, K. Jan, Editor. 2006. p. 127-160.
- Skosnik, P.D., et al., *The effect of cannabis use and gender on the visual steady state evoked potential*. Clin Neurophysiol, 2006. **117**(1): p. 144-56.
- Stella N, et al., *A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation*. Nature. 1997 Aug 21;388(6644):773-8.
- Straiker, A., et al., *Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999a. **96**(25): p. 14565-70.
- Straiker, A.J., et al., *Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999b. **40**(10): p. 2442-8.
- Tanda G, Goldberg SR. *Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms--a review of recent preclinical data*. Psychopharmacology (Berl). 2003 Sep;169(2):115-34. Epub 2003 Jun 24. Review.
- Taupin, P., *Chapter X: Adult Retinal Stem Cells*, in *Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells in Mammals*. 2006, Nova Science Publishers, Incorporated. p. 208.
- Taupin, P. and F.H. Gage, *Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals*. Journal of Neuroscience Research, 2002. **69**(6): p. 745-749.
- Terranova JP, et al., *Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716*. Psychopharmacology (Berl). 1996 Jul;126(2):165-72.
- Tsou, K., et al., *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience 1998a **83**, 393–411.

- Tsou, K., et al., *Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry*. *Neurosci. Lett.* 1998b 254, 1–4.
- Turu, G. and L. Hunyady, *Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor*. *J Mol Endocrinol*, 2010. **44**(2): p. 75-85.
- Valenzuela, C., et al., *A role for the endocannabinoid system in obesity*. *Rev Med Chil*, 2010. **138**(5): p. 621-9.
- Vignot, S., et al., *Cannabis and cancer*. *Bull Cancer*, 2006. **93**(2): p. 163-70.
- Vitalis, T., et al., *The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro*. *Eur J Neurosci*, 2008. **28**(9): p. 1705-18.
- Waksman, Y., et al., *The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **288**(3): p. 1357-66.
- Wassle, H., *Parallel processing in the mammalian retina*. *Nat Rev Neurosci*, 2004. **5**(10): p. 747-57.
- Wei, Y., X. Wang, and L. Wang, *Presence and regulation of cannabinoid receptors in human retinal pigment epithelial cells*. *Molecular vision*, 2009. **15**: p. 1243-1251.
- Wiedenmann, B. and W.W. Franke, *Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles*. *Cell*, 1985. **41**(3): p. 1017-28.
- Wilson RI, Nicoll RA. *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses*. *Nature*. 2001 Mar 29;410(6828):588-92. Erratum in: *Nature* 2001 Jun 21;411(6840):974.
- Wilson RI, et al., *Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus*. *Neuron*. 2001 Aug 16;31(3):453-62.

- Wilson RI, Nicoll RA. *Endocannabinoid signaling in the brain*. Science. 2002 Apr 26;296(5568):678-82. Review.
- Xiang, M., 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): p. 4762-4785.
- Yazulla, S., *Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection*. Progress in Retinal and Eye Research, 2008. **27**(5): p. 501-526.
- Yazulla, S. and K.M. Studholme, *Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry*. J Neurocytol, 2001. **30**(7): p. 551-92.
- Yazulla, S., et al., *Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina*. The Journal of Comparative Neurology, 1999. **415**(1): p. 80-90.
- Yazulla, S., et al., *Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings*. Vis Neurosci, 2000. **17**(3): p. 391-401.