

Article original / Original article

Étude des cinétiques sanguines et cérébrales du Δ^9 -tétrahydrocannabinol, de ses métabolites, du cannabidiol et du cannabinoïde chez la souris. Application à l'homme

Kinetic study of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, its metabolites, cannabidiol and cannabinol in the blood and brain of mice. Application to humans

Charlotte Duverneuil-Mayer¹, Philippe Charlier², Emuri Abe¹, Geoffroy Lorin de la Grandmaison²,
Stanislas Grassin-Delye¹, Jean-Claude Alvarez^{1*}

¹ Laboratoire de toxicologie, CHU R. Poincaré, Garches, France

² Service de médecine légale, CHU R. Poincaré, Garches, France

Résumé – Objectif : Le cannabis, drogue la plus consommée dans le monde, engendre de nombreux troubles notamment comportementaux. Le cannabis contient, outre le Δ^9 -THC habituellement étudié, du cannabidiol et du cannabinoïde. Les effets des cannabinoïdes semblant se poursuivre au-delà de leur présence dans le sang, un décalage de cinétique entre cerveau et sang pourrait exister pour ces molécules. **Méthode :** Après mise au point et validation d'une technique permettant le dosage, par CPG/SM, du Δ^9 -THC, de ses métabolites, du cannabinoïde et du cannabidiol, nous avons effectué des cinétiques de ces composés dans le sang, dans les hémisphères cérébraux et dans le cervelet chez la souris. Nous avons également dosé ces composés dans le sang, les urines et sept zones de cerveau chez des patients autopsiés. **Résultats :** Nous avons mis en évidence la présence de cannabidiol dans le cerveau de souris alors qu'il n'est plus présent dans le sang. Une telle persistance a également été retrouvée pour le cannabidiol, mais également le THC et le cannabinoïde, sur des prélèvements de cerveau de personnes décédées. **Conclusion :** Il semble que certains cannabinoïdes persistent dans le cerveau après disparition du sang. Cette persistance pourrait expliquer certains troubles spatio-temporaux durables des personnes consommatrices de cette drogue.

Mots clés : Cannabis, souris, cinétiques, sang, cerveau

Abstract – Objectives: Cannabis, one of the most abused drugs in the world, is the cause of many symptoms including behavioral disorders. Cannabis contains, in addition to the Δ^9 -THC usually studied, cannabidiol and cannabinol. Since the effects of cannabinoids seem to continue beyond their presence in the blood, a kinetic shift between the brain and blood could exist for these compounds. **Method:** After development and validation of a GC/MS method for the simultaneous measurement of Δ^9 -THC, its metabolites, cannabinol and cannabidiol, we examined the kinetics of the cannabinoid compounds in blood and in different cerebral areas in mice. We also measured these compounds in blood, urine and different brain areas in deceased humans after autopsies. **Results:** Cannabidiol is still present in the brain of mice when it has disappeared from the blood. Such persistence was also found in samples from deceased persons for cannabidiol, but also for THC and cannabinol. **Conclusion:** This study highlighted the persistence of some cannabinoids in the brain after they have disappeared from the blood. This may explain the continuing spatio-temporal disorders of people abusing this drug.

Key words: Cannabis, mouse, kinetics, blood, brain

Reçu le 21 avril 2011, accepté après modifications le 4 novembre 2011

Publication en ligne le 15 décembre 2011

* Correspondance : Jean-Claude Alvarez, jean-claude.alvarez@rpc.aphp.fr

1 Introduction

Le cannabis est de loin la drogue la plus répandue et la plus consommée dans le monde entier sous différentes formes (herbe, hashich, huile de cannabis, graines de cannabis). De nombreuses études ayant démontré que le cannabis engendre des altérations significatives de la capacité à conduire un véhicule (notamment l'étude récente de Giroud et coll. [1]), cette drogue appartient aux quatre classes de stupéfiants recherchés en cas d'accident de la circulation routière avec les amphétamines, les opiacés et la cocaïne (délit puni en France depuis 2003, [2, 3]). En France, une étude a montré, dès 2003, la très forte prévalence de consommation de cannabis notamment chez les jeunes [4]. Une étude plus récente publiée par l'OFDT [5] a démontré que cette substance reste majoritairement la plus consommée en France et a indiqué que son usage régulier (consommation de cannabis au moins 10 fois au cours du mois et au moins 120 fois au cours de l'année) concerne plus d'un million de personnes en France. Toujours d'après cette étude, plus de 13 millions de Français ont déclaré avoir expérimenté le cannabis et plus de cinq cent mille personnes consomment quotidiennement du cannabis. Deux études ont par ailleurs mis en évidence une augmentation très importante de la consommation de cannabis chez les conducteurs impliqués dans un accident de la voie publique [6, 7]. De même, nous avons détecté une prépondérance des cannabinoïdes parmi les stupéfiants retrouvés lors de recherche de causes de décès [8]. Ce phénomène de recrudescence du cannabis est inquiétant, car même si « *on ne meurt pas du cannabis... il tue !* » [9] – de manière indirecte. De plus, Reid et coll. [10] ont démontré que les cannabinoïdes peuvent augmenter les concentrations et les actions pharmacologiques d'autres drogues dans le cerveau (telles que la cocaïne ou le PCP). Devant cette augmentation du nombre de consommateurs de cannabis et les effets délétères de cette substance, certains se demandent même s'il ne convient pas aujourd'hui de renforcer les mesures législatives prises dans le cadre de la loi de 2003 [6].

Parmi les cannabinoïdes contenus dans la plante de cannabis, le Δ^9 -trans-tétrahydrocannabinol (plus communément appelé Δ^9 -THC) est l'un des constituants majeurs et représente le principe actif de cette plante de part ses propriétés psychodysléptiques. Le Δ^9 -THC a très largement été étudié ; il est le cannabinoïde recherché lors des dosages sanguins dans le cadre de la loi de 2003. Le Δ^9 -THC est rapidement métabolisé (métabolisme impliquant les cytochromes P450 notamment les enzymes CYP2C9 et CYP3A4 chez l'homme) en 11-hydroxy-tétrahydrocannabinol (11-OH-THC) qui est potentiellement actif. Ce composé est ensuite oxydé pour former l'acide 11-nor-tétrahydrocannabinol carboxylique (THC-COOH), dénué de toute activité psychotrope.

Il est maintenant clairement établi que, la plupart des cannabinoïdes étant très lipophiles, ceux-ci quittent rapidement le système vasculaire pour aller se fixer dans le cerveau et les autres tissus de l'organisme riches en lipides [11]. Cette forte lipophilie du cannabis et l'existence d'un cycle entéro-

hépatique ont pour corollaire une exceptionnelle rémanence de la drogue dans l'organisme. Certains auteurs ont en effet retrouvé des métabolites du Δ^9 -THC (en particulier le THC-COOH) dans les urines de gros fumeurs jusqu'à 72 jours après la dernière cigarette [11]. L'élimination des cannabinoïdes est donc lente. Cette élimination est essentiellement biliaire mais aussi rénale.

La lipophilie des cannabinoïdes leur permet un franchissement aisé de la barrière hémato-encéphalique. Une équipe [12] a montré que les effets du cannabis sur la conduite (après inhalation d'une cigarette de cannabis) sont très rapides, avec un maximum 15 minutes après consommation, et restent observables pendant plusieurs heures ensuite. L'étude de Chiang et Barnett [13] a conclu que les effets dus à l'inhalation de cannabis à différentes doses sont directement proportionnels aux concentrations de THC sanguins seulement entre une et quatre heures après le début de l'inhalation. Cone et Huestis [14] ont mis en évidence un décalage entre cinétique plasmatique du THC et ses effets puisque leur étude a montré, en particulier, qu'il existe une relation directe entre les concentrations de THC dans le sang et les effets observés qu'une fois l'équilibre sang/tissu obtenu. Plus récemment, le Professeur Costentin [15] insiste sur le fait que les effets du Δ^9 -THC se poursuivent bien au-delà de sa présence dans le sang. Il existe donc probablement une différence de cinétique sanguine et cérébrale du Δ^9 -THC pour expliquer ce décalage entre cinétique plasmatique et effets du cannabis.

Outre le Δ^9 -THC, la plante de cannabis contient également du cannabidiol. Il est le constituant prédominant et le précurseur des autres cannabinoïdes [11]. Le cannabidiol (CBD) est dégradé (catabolisme in situ) en cannabinol (CBN). L'étude de ces composés est très intéressante d'un point de vue médico-légal puisque leur mise en évidence dans un échantillon peut être un indicateur supplémentaire de la prise de cannabis. Ceci est notamment vrai en ce qui concerne les échantillons de cheveux, puisque le cannabidiol est souvent le produit majoritairement retrouvé [16]. D'autre part, même si le rôle du cannabidiol dans les effets pharmacologiques de la marijuana reste encore flou, Hayakawa et coll. [17] ont mis en évidence une modification de certains effets du Δ^9 -THC par le cannabidiol, notamment par son action inhibitrice du métabolisme hépatique du Δ^9 -THC [10]. Le cannabidiol a également été décrit comme ayant des effets anxiolytiques, anticonvulsifs et anti-inflammatoires [18, 19]. Le cannabinol possède lui aussi des propriétés anti-inflammatoires [11]. Ainsi, le dosage de ces deux cannabinoïdes, en plus du dosage du Δ^9 -THC et de ses métabolites, pourrait permettre de mieux appréhender la nature du contenu réel des cigarettes inhalées par l'homme.

Une technique de dosage par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est utilisée en routine dans notre laboratoire d'après la technique utilisée par Brunet et coll. [22], elle-même basée sur la technique décrite dans la publication de Kemp et coll. [21]. Nous avons adapté cette méthode analytique au dosage simultané du Δ^9 -THC, de ses métabolites, du cannabinol et du cannabidiol, et nous l'avons validé.

Les effets des cannabinoïdes pouvant se poursuivre même après leur disparition dans le sang [12], l'hypothèse de notre étude est qu'il pourrait exister un décalage des cinétiques des cannabinoïdes entre le sang et le cerveau comme l'a précédemment évoqué le Docteur Mura sur quelques cas [22]. Toutes les études de cinétique ont été réalisées jusqu'à présent dans des prélèvements de sang mais aucune étude n'a comparé les concentrations des cannabinoïdes à la fois dans le sang et dans le cerveau après exposition au cannabis. L'objectif de notre étude est donc de comparer les cinétiques sanguines et cérébrales des cannabinoïdes pour savoir si les concentrations plasmatiques de Δ^9 -THC reflètent réellement le niveau d'imprégnation comme suggéré par Hollister et coll. [23]. Nous avons donc effectué parallèlement des cinétiques sanguines et cérébrales de Δ^9 -THC, de cannabinoïde et de cannabidiol chez la souris. La souris a été utilisée comme modèle en raison de la très forte homologie des récepteurs CB1 aux cannabinoïdes chez cette espèce et chez l'homme [24] et en raison de la similitude de localisation de ces récepteurs [25, 26]. De plus, Senn et coll. [27] ont montré qu'une administration, même d'une très faible dose de Δ^9 -THC (0,001 mg/kg), induisait des détériorations des performances chez la souris avec des effets se poursuivant jusqu'à trois semaines après injection, indiquant donc une probable persistance de cette molécule également chez la souris.

Parallèlement, nous avons dosé les cannabinoïdes dans des prélèvements de sang et de cerveau de personnes décédées connues pour consommer du cannabis. Sept zones de cerveau ont été étudiées car décrites comme particulièrement riches en récepteurs CB1 aux cannabinoïdes [17, 28] : putamen, pallidum, cortex préfrontal, lobes cérébelleux, gyrus cingulaire, hippocampe, noyaux caudés. D'autres régions du cerveau, telles que le thalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière, sont dépourvues de ces récepteurs, expliquant probablement la faible toxicité somatique des cannabinoïdes [11].

2 Matériel et méthodes

2.1 Mise au point et validation de la technique de dosage des cannabinoïdes

Tous les solvants utilisés sont de qualité chromatographique. L'extraction du THC et ses métabolites (le 11-OH-THC, le THC-COOH), le CBD et le CBN est réalisée en deux étapes. Tout d'abord, une extraction basique en présence de NaOH 2M et du mélange d'extraction heptane/acétate d'éthyle (7/1, v/v) permet d'extraire le THC, le 11-OH-THC, le CBD et le CBN.

Après agitation et centrifugation, la phase organique est recueillie et évaporée sous azote. Le résidu est ensuite repris par un mélange de dérivation BSTFA/TMCS, chauffé à 70 °C et injecté dans le chromatographe. Puis, l'extraction acide, à partir de la phase aqueuse restante, en présence d'HCl 1N et du mélange d'extraction heptane/acétate d'éthyle permet d'obtenir le THC-COOH. Après agitation et centrifugation, la phase

organique est recueillie et évaporée sous azote. Le résidu est ensuite repris par un mélange de dérivation BSTFA/TMCS, chauffé à 70 °C et injecté dans le chromatographe. Le dosage est réalisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) sur colonne capillaire. Le système chromatographique utilisé est équipé d'un passeur automatique (ThermoFischer Triplus Duo), d'un chromatographe phase gazeuse (ThermoFischer Focus), d'un spectromètre de masse (ThermoFischer DSQ-2), d'une colonne DB-5MS de type greffée, de longueur 30 m et de diamètre interne 0,25 mm.

Les étalons internes (EI) utilisés sont le tétrahydrocannabinol-D3, le 11-hydroxy-THC-D3 et l'acide 11-nor-THC-carboxylique-D3.

La méthode a été validée sur du plasma humain. Les critères de validation suivants ont été évalués pour cette méthode : rendement d'extraction, linéarité, répétabilité, reproductibilité, exactitude, limite de quantification et de détection et enfin stabilité aux phases de congélation/décongélation. Le rendement d'extraction a été évalué sur 3 niveaux de concentrations (1 ; 2,5 et 10 ng/mL pour le THC, 11-OH-THC, CBD et CBN et 5 ; 12,5 et 50 ng/mL pour le THC-COOH). La linéarité a été évaluée sur six gammes d'étalonnage réalisées pour trois d'entre elles la même journée et pour les trois autres sur des jours différents (une gamme par jour), chaque gamme comportant 8 points de calibration (0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 pour le THC, 11-OH-THC, CBD et CBN et 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 pour le THC-COOH).

La répétabilité a été déterminée par la variabilité de six déterminations de chaque CQ (Contrôles de Qualité) chaque jour pendant trois jours, la reproductibilité par la variabilité du jour de l'analyse et l'exactitude par la moyenne de la concentration calculée avec la concentration cible du contrôle de qualité.

La validation n'a pas été effectuée sur les cerveaux. Toutefois, les contrôles de qualité analysés lors de chaque série de dosage réalisés sur cette matrice ont été réalisés dans des cerveaux vierges surchargés.

2.2 Cinétiques sanguines et cérébrales des cannabinoïdes chez la souris

Les animaux utilisés sont des souris non consanguines Swiss, mâles de poids compris entre 16 et 20 grammes (âgées de 4 à 5 semaines). Des injections intrapéritonéales simultanées de THC, de CBD et de CBN ont été réalisées. Différentes doses ont été injectées : une solution contenant une dose de 0,25 mg/kg de THC, de CBD et de CBN, une contenant 1 mg/kg des 3 cannabinoïdes, une contenant 10 mg/kg de THC et 3 mg/kg de CBD et de CBN, une quatrième contenant 10 mg/kg de CBD seul et une dernière contenant 50 mg/kg de Δ^9 -THC.

Les souris sont anesthésiées avec du thiopental (Pentothal®) préparé à la dose de 1 gramme pour 100 mL d'eau avec une injection intra-péritonéale de 0,3 mL par souris. Les souris sont ensuite sacrifiées par décapitation. Des souris témoins, ayant reçu une injection de même volume de chlorure de sodium à

Tableau I. Rendements d'extraction des différentes molécules à trois niveaux de concentration obtenus dans du plasma humain.

Niveaux de concentration	Molécules	Rendements d'extraction
Concentration de Δ^9 -THC, 11-OH-THC, CBD, CBN : 1 ng/mL Concentration de THC-COOH : 5 ng/mL	Δ^9 -THC	97,4 %
	11-OH-THC	110,0 %
	THC-COOH	99,1 %
	CBD	93,3 %
	CBN	108,0 %
Concentration de Δ^9 -THC, 11-OH-THC, CBD, CBN : 2,5 ng/mL Concentration de THC-COOH : 12,5 ng/mL	Δ^9 -THC	97,2 %
	11-OH-THC	88,0 %
	THC-COOH	100,2 %
	CBD	96,4 %
	CBN	93,2 %
Concentration de Δ^9 -THC, 11-OH-THC, CBD, CBN : 10 ng/mL Concentration de THC-COOH : 50 ng/mL	Δ^9 -THC	99,6 %
	11-OH-THC	90,2 %
	THC-COOH	100,3 %
	CBD	85,2 %
	CBN	90,5 %

CBD : cannabidiol ; CBN : cannabinol

0,9 %, sont également sacrifiées par décapitation après anesthésie. Trois prélèvements sont réalisés pour chaque souris : du sang dans la région cardiaque, les hémisphères cérébraux et le cervelet excepté pour l'expérience avec le CBD où seuls les hémisphères cérébraux ont été prélevés.

Les prélèvements d'hémisphères cérébraux et de cervelet sont pesés, broyés à l'aide de potters, puis repris dans 1 mL d'eau ultrapure (Millipore, Direct-Q[®] 3, Molsheim). À 500 μ L de sang, sont ajoutés 20 μ L de la solution d'étalons internes. Les cannabinoïdes sont extraits à partir des prélèvements des souris (prise d'essai pour le cerveau : 1 mL) et dosés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse selon la technique décrite précédemment.

2.3 Dosages sanguins et cérébraux des cannabinoïdes chez des personnes décédées

Un dépistage urinaire est réalisé lors des autopsies lorsqu'il existe une présomption de consommation de cannabis ou lorsqu'il existe des antécédents de consommation. Lorsque ce dépistage est positif ou s'il s'agit de personnes connues pour être consommatrice, les médecins légistes prélèvent le sang périphérique et sept zones du cerveau particulièrement riches en récepteurs aux cannabinoïdes. Dans tous les cas, les personnes ont été autopsiées le lendemain ou le surlendemain de leur mort et les prélèvements réalisés ont été congelés. Après décongélation, les prélèvements sont broyés après avoir été pesés et repris par 5 mL d'eau Millipore. Le broyage est réalisé à 15 000 rpm grâce à un broyeur POLYTRON (KINEMATICA AG, Suisse).

Les cannabinoïdes sont dosés à partir des prélèvements de sang périphérique et de cerveaux selon notre technique validée. Les sept prélèvements de chaque cerveau humain sont dosés en double.

3 Résultats

3.1 Mise au point et validation de la technique de dosage des cannabinoïdes

Notre méthode montre des rendements d'extraction supérieurs à 85 % pour les trois niveaux de CQ utilisés (tableau I), des CV intra-séries et inter-séries inférieurs respectivement à 13 et 14 %, une exactitude vérifiée (tableau II) et une stabilité à la congélation/décongélation des contrôles de qualité. Les limites de quantification s'établissent à 0,2 ng/mL pour le Δ^9 -THC et à 0,5 ng/mL pour le 11-OH-THC, le CBN, le CBD et à 1,5 ng/mL pour le THC-COOH. Un chromatogramme obtenu à la limite de quantification est présenté sur la figure 1. La limite de détection est de 0,1 ng/mL pour le Δ^9 -THC, de 0,2 ng/mL pour le 11-OH-THC, le CBN et le CBD et de 0,5 ng/mL pour le THC-COOH. Dans le cerveau, les limites de quantification sont de 0,3 ng/g pour le Δ^9 -THC et de 0,7 ng/g pour le CBN et le CBD.

3.2 Cinétiques sanguines et cérébrales des cannabinoïdes chez la souris

Les cinétiques obtenues pour le Δ^9 -THC, le CBD et le CBN à différentes doses sont représentées respectivement sur les figures 2-4. Les principaux métabolites du Δ^9 -THC chez l'homme, le 11-OH-THC et le THC-COOH, n'ont pas été retrouvés dans le sang des souris analysées, à aucune dose injectée de Δ^9 -THC.

Le Δ^9 -THC est détecté dans le sang dès le premier temps de cinétique (15 min), puis la concentration augmente jusqu'à atteindre un maximum (C_{max}) de 1,4 ng/mL à un T_{max} de 30 minutes après injection. Ensuite, la concentration de Δ^9 -THC diminue jusqu'à disparaître 4 heures après injection (figure 2A). L'apparition du Δ^9 -THC dans les hémisphères

Tableau II. Justesse, coefficients de variation (CV) intra- et inter-séries exprimés en pourcentage pour les trois niveaux de contrôles de qualité réalisés dans du plasma humain.

Niveaux de concentration	Molécules	CV intra-série	CV inter-série	Justesse
Concentration de Δ^9 -THC, 11-OH-THC, CBD, CBN : 1 ng/mL Concentration de THC-COOH : 5 ng/mL	Δ^9 -THC	7,31 %	6,63 %	101,3 %
	11-OH-THC	7,86 %	13,08 %	102,2 %
	THC-COOH	5,33 %	2,13 %	96,4 %
	CBD	13,01 %	13,97 %	101,2 %
	CBN	11,38 %	10,30 %	104,3 %
Concentration de Δ^9 -THC, 11-OH-THC, CBD, CBN : 2,5 ng/mL Concentration de THC-COOH : 12,5 ng/mL	Δ^9 -THC	4,07 %	7,75 %	106,7 %
	11-OH-THC	6,28 %	12,16 %	105,3 %
	THC-COOH	4,64 %	3,27 %	92,7 %
	CBD	8,86 %	11,30 %	103,6 %
	CBN	10,55 %	12,29 %	99,8 %
Concentration de Δ^9 -THC, 11-OH-THC, CBD, CBN : 10 ng/mL Concentration de THC-COOH : 50 ng/mL	Δ^9 -THC	4,02 %	11,38 %	105,4 %
	11-OH-THC	4,61 %	4,36 %	105,8 %
	THC-COOH	3,03 %	2,48 %	102,9 %
	CBD	6,74 %	12,06 %	94,7 %
	CBN	6,23 %	13,12 %	100,8 %

CBD : cannabidiol ; CBN : cannabinoïde

cérébraux et le cervelet est plus tardive que dans le sang, le Δ^9 -THC n'étant pas encore détecté dans ces deux matrices 15 minutes après injection. La concentration maximale de Δ^9 -THC est également obtenue plus tardivement (T_{\max} à 45 minutes dans les hémisphères cérébraux, figure 2B et à 1 heure dans le cervelet, figure 2C). La concentration maximale de Δ^9 -THC obtenue dans le cervelet est supérieure à celle obtenue dans les hémisphères cérébraux.

La concentration de CBD dans le sang semble à son maximum dès le premier temps de cinétique (15 min) puis décroît jusqu'à disparition dans le sang dès 45 minutes après injection (figure 3A). À l'inverse, le CBD commence à être détectable dans le cerveau (figure 3B) seulement entre 15 et 30 minutes après injection avec une C_{\max} de 0,96 ng/g à un T_{\max} de 45 minutes. Deux heures après injection, le CBD n'est plus retrouvé dans le cerveau.

Dans le sang (figure 4A), la concentration de CBN montre une augmentation progressive entre 15 minutes et sa concentration maximale atteinte une heure après injection. Quatre heures après injection, le CBN est toujours détectable dans le sang. Les cinétiques du CBN dans les hémisphères cérébraux (figure 4B) et dans le cervelet (figure 4C) présentent un même profil avec un T_{\max} 30 minutes après injection puis une diminution importante de la concentration entre 30 minutes et 45 minutes et une disparition du CBN dans ces deux milieux deux heures après injection.

3.3 Dosages sanguins et cérébraux des cannabinoïdes chez des personnes décédées

Les tableaux III–VIII présentent les résultats des analyses effectuées chez six patients décédés (sang et sept zones de cerveau).

Dans le cas de M. A. (tableau III) et M. D. (tableau VI), des cannabinoïdes ont été retrouvés à la fois dans le sang et à la fois dans les prélèvements de cerveau.

Chez M. C., seul du THC-COOH a été mesuré dans le sang et les urines, et il a été mis en évidence du CBD sur cinq des sept zones et du CBN sur trois des sept zones (tableau V). Concernant Mme B (tableau IV) et M F (tableau VIII), il a été retrouvé du THC-COOH dans les urines avec absence de cannabinoïdes dans le sang. En revanche, il a été détecté la présence de Δ^9 -THC, de CBD et de CBN dans différentes zones cérébrales.

Concernant M. E. (tableau VII), aucun des cinq cannabinoïdes n'a été retrouvé ni dans le sang ni dans l'urine, tandis que du Δ^9 -THC, du CBD et du CBN ont été mis en évidence dans certaines zones de cerveau.

4 Discussion

L'analyse des cannabinoïdes dans le sang humain par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est utilisée en routine dans de nombreux laboratoires. Seulement, la plupart du temps, seuls le Δ^9 -THC et ses métabolites (le 11-OH-THC et le THC-COOH) sont recherchés [29, 22, 30]. Notre technique mise au point ici permet de doser dans une même méthode également le cannabinoïde et le cannabidiol. Nous utilisons, en raison du caractère non volatil des cannabinoïdes, une étape de dérivation indispensable [31]. En effet, Nadulski et coll. [32] ont montré que sans cette étape de dérivation, les métabolites du Δ^9 -THC ne seraient pas détectés et les sensibilités seraient insuffisantes. Ainsi, les cinq molécules étudiées sont dosées avec notre technique avec une reproductibilité, une répétabilité et une exactitude satisfaisantes. Les limites de quantification obtenues avec cette technique (0,2 ng/ml pour le Δ^9 -THC,

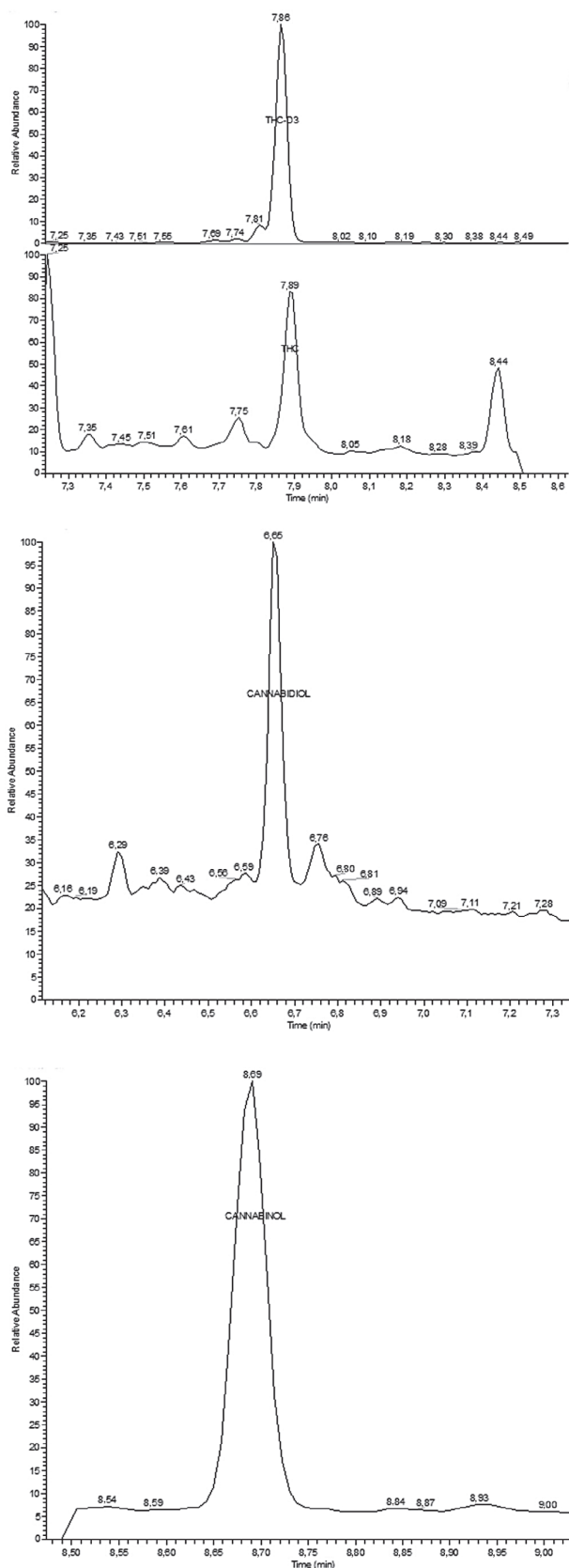


Fig. 1. Tracés chromatographiques du THC, CBD et CBN obtenus à la limite de quantification (0,2 ng/mL pour le THC et 0,5 ng/mL pour le CBD et le CBN).

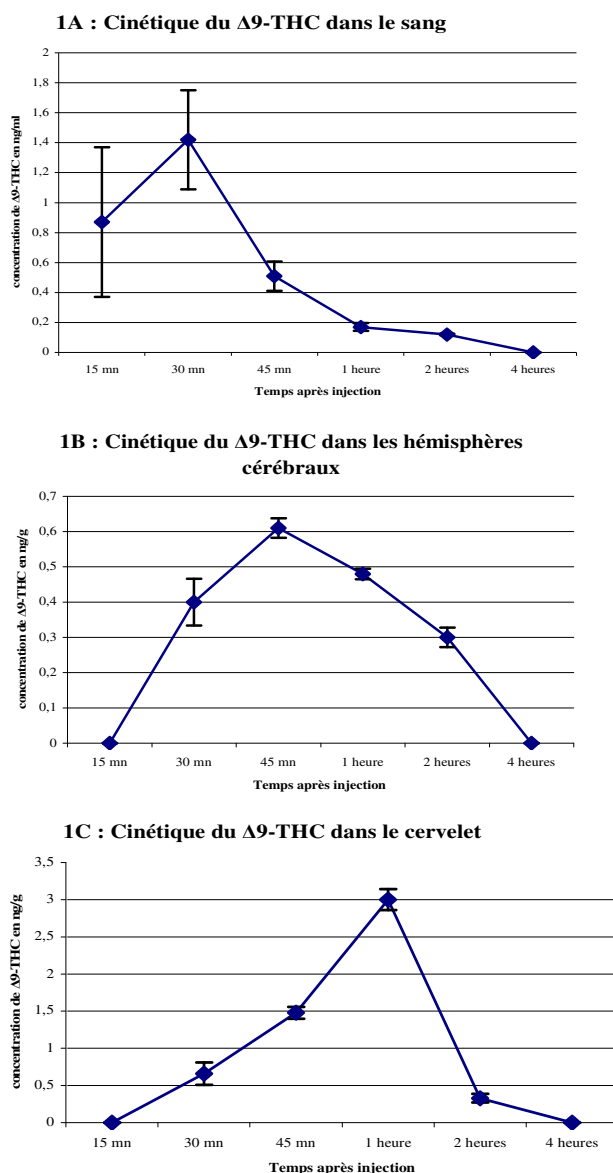


Fig. 2. Cinétiques du Δ^9 -THC (50 mg/kg) dans le sang (A), dans les hémisphères cérébraux (B) et dans le cervelet (C). Chaque point représente une moyenne ($n = 3$ souris) avec les barres d'erreurs représentant les écarts types.

0,5 ng/mL pour le 11-OH-THC, le CBN et le CBD et 1,5 ng/mL pour le THC-COOH) sont également satisfaisantes pour permettre des études cinétiques.

Le modèle souris nous apparaissait un modèle satisfaisant pour étudier les cannabinoïdes : très faibles contraintes d'expérimentation et facilité de manipulation de ces animaux. De plus, une très forte homologie de séquence des récepteurs CB1 aux cannabinoïdes a été montrée entre la souris et l'homme [24] ainsi qu'une homologie anatomique du cortex préfrontal [28] et un profil de métabolites primaires très proche de celui de l'homme [33]. Les effets des cannabinoïdes ont été très largement étudiés chez les rongeurs avec même parfois une

Tableau III. Cas humain n° 1 : M. A, 30 ans, décédé lors d'un accident de la route.

Lieu de prélèvement	THC	11-OH	CBD	CBN	THC-COOH
Gyrus	24 ng/g	neg	neg	3,35 ng/g	neg
Cortex préfrontal	neg	neg	neg	neg	neg
Hippocampe	neg	neg	neg	neg	neg
Putamen	11,3 ng/g	neg	neg	neg	neg
Pallidum	neg	neg	neg	neg	neg
Lobes	8,9 ng/g	neg	neg	neg	neg
Noyau caudé	1,25 ng/g	neg	neg	neg	neg
Sang	3,7 ng/mL	2,4 ng/mL	ND	ND	130 ng/mL
Urines	abs	abs	ND	ND	abs

Neg : négatif ; ND : non déterminé, Abs : absence de prélèvement

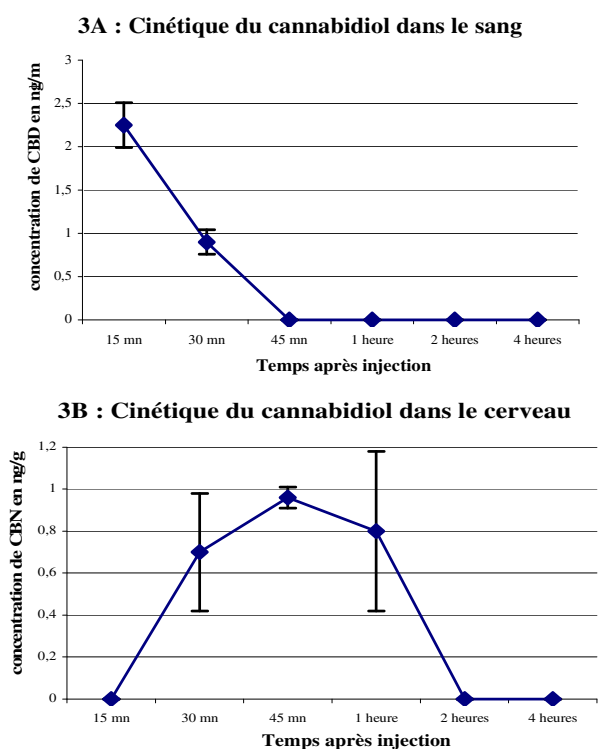


Fig. 3. Cinétiques du cannabidiol (10 mg/kg) dans le sang (A) et dans le cerveau (B). Chaque point représente une moyenne ($n = 3$ souris) avec les barres d'erreurs représentant les écarts types.

persistance des troubles engendrés par ces molécules [27] comme celle observée chez l'homme.

Nous avons choisi comme première dose à injecter, la dose de 0,25 mg/kg de Δ^9 -THC, de cannabinoles et de cannabidiol. Pour le Δ^9 -THC, cette dose correspond à la quantité administrée en moyenne par l'homme lors de l'inhalation de la fumée d'un joint. De plus, Senn et ses collaborateurs [27] ayant mis en évidence, chez la souris, des déficits cognitifs à long terme après

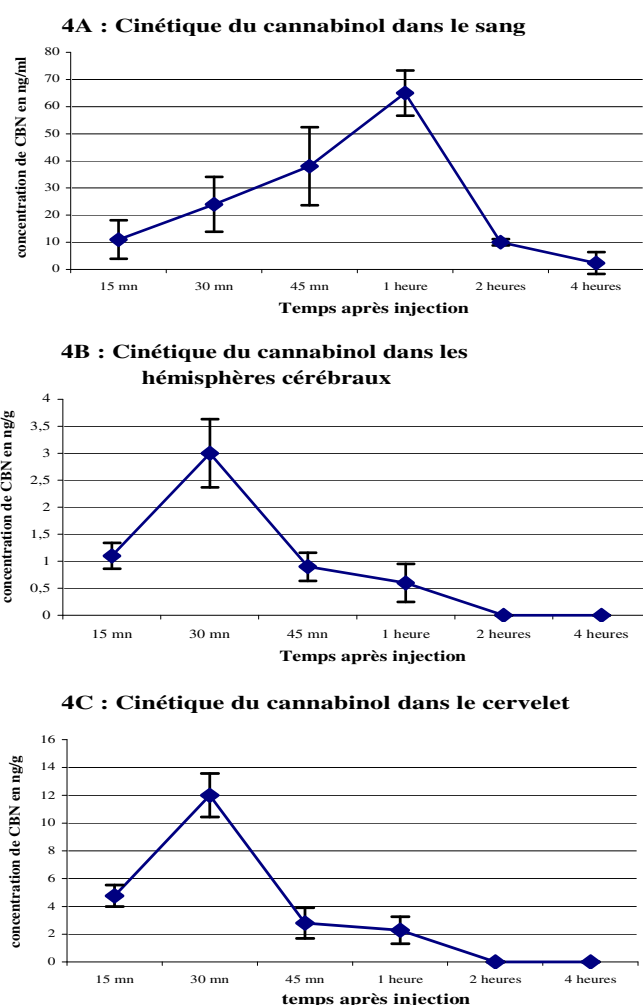


Fig. 4. Cinétiques du cannabinoles (3 mg/kg) dans le sang (A), dans les hémisphères cérébraux (B) et dans le cervelet (C). Chaque point représente une moyenne ($n = 3$ souris) avec les barres d'erreurs représentant les écarts types.

Tableau IV. Cas humain n° 2 : Mme B., décédée par défénéstration.

Lieu de prélèvement	THC	11-OH	CBD	CBN	THC-COOH
Gyrus	neg	neg	61 ng/g	neg	neg
Cortex préfrontal	4,7 ng/g	neg	91 ng/g	2,5 ng/g	neg
Hippocampe	neg	neg	103 ng/g	neg	neg
Putamen	neg	neg	88 ng/g	neg	neg
Pallidum	neg	neg	303 ng/g	8,6 ng/g	neg
Lobes	neg	neg	29 ng/g	neg	neg
Noyau caudé	neg	neg	neg	7,2 ng/g	neg
Sang	neg	neg	ND	ND	neg
Urines	neg	neg	ND	ND	60 ng/mL

Neg : négatif ; ND : non déterminé

Tableau V. Cas humain n° 3 : M. C., 26 ans, alcoolique chronique, consommateur de cannabis, décédé chez lui.

Lieu de prélèvement	THC	11-OH	CBD	CBN	THC-COOH
Gyrus	neg	neg	116 ng/g	neg	neg
Cortex préfrontal	neg	neg	neg	neg	neg
Hippocampe	neg	neg	80 ng/g	neg	neg
Putamen	neg	neg	310 ng/g	4,8 ng/g	neg
Pallidum	neg	neg	684 ng/g	7,5 ng/g	neg
Lobes	neg	neg	neg	neg	neg
Noyau caudé	neg	neg	165 ng/g	4,7 ng/g	neg
Sang	neg	neg	ND	ND	9,8 ng/mL
Urines	neg	neg	ND	ND	41 ng/mL

Neg : négatif ; ND : non déterminé

Tableau VI. Cas humain n° 4 : M. D., 38 ans, SDF, décédé dans un squat.

Lieu de prélèvement	THC	11-OH	CBD	CBN	THC-COOH
Gyrus	0,6 ng/g	neg	16,5 ng/g	2,4 ng/g	neg
Cortex préfrontal	2,04 ng/g	neg	neg	3,5 ng/g	neg
Hippocampe	1,38 ng/g	neg	neg	neg	neg
Putamen	neg	neg	7,7 ng/g	1,8 ng/g	neg
Pallidum	neg	neg	neg	neg	neg
Lobes	neg	neg	neg	neg	neg
Noyau caudé	neg	neg	neg	neg	neg
Sang	2,2 ng/mL	2,9 ng/mL	ND	ND	28,8 ng/mL
Urines	neg	neg	ND	ND	82 ng/mL

Neg : négatif ; ND : non déterminé

Tableau VII. Cas humain n° 5 : M. E., 27 ans, notion de toxicomanie au cannabis, décédé chez lui d'une overdose à l'héroïne.

Lieu de prélèvement	THC	11-OH	CBD	CBN	THC-COOH
Gyrus	0,59 ng/g	neg	10 ng/g	1,1 ng/g	neg
Cortex préfrontal	neg	neg	neg	neg	neg
Hippocampe	8,9 ng/g	neg	50 ng/g	neg	neg
Putamen	neg	neg	11 ng/g	neg	neg
Pallidum	1,12 ng/g	neg	8,4 ng/g	neg	neg
Lobes	neg	neg	neg	neg	neg
Noyau caudé	neg	neg	neg	neg	neg
Sang	neg	neg	ND	ND	neg
Urines	neg	neg	ND	ND	neg

Neg : négatif ; ND : non déterminé

Tableau VIII. Cas humain n° 6 : M. F., décédé en prison, notion de consommation de cannabis.

Lieu de prélèvement	THC	11-OH	CBD	CBN	THC-COOH
Gyrus	neg	neg	neg	neg	neg
Cortex préfrontal	0,42 ng/g	neg	10,7 ng/g	2,1 ng/g	neg
Hippocampe	0,98 ng/g	neg	neg	neg	neg
Putamen	neg	neg	neg	neg	neg
Pallidum	neg	neg	neg	neg	neg
Lobes	0,31 ng/g	neg	neg	1,1 ng/g	neg
Noyau caudé	1,2 ng/g	neg	neg	neg	neg
Sang	neg	neg	ND	ND	neg
Urines	neg	neg	ND	ND	128 ng/mL

Neg : négatif ; ND : non déterminé

une injection d'une très faible dose de Δ^9 -THC (0,001 mg/kg), nous pensons donc que la dose de 0,25 mg/kg serait suffisante pour permettre de détecter la présence de cannabinoïdes dans le sang et dans le cerveau. Malgré une technique analytique reproductible et sensible, nous avons constaté une forte variabilité inter-individuelle des concentrations de cannabinoïdes mesurées chez les souris (et parfois souvent leur absence) à cette dose de 0,25 mg/kg. Cette grande dispersion des résultats, notamment aux faibles doses, provient probablement de la variabilité métabolique de chaque souris. Cela étant, un défaut de reproductibilité de l'injection intra-péritonéale et des différences au niveau de l'absorption peuvent également intervenir. Cette dose de 0,25 mg/kg était probablement trop faible car, comme le soulignent Brunet et coll. [20], les rongeurs sont peu sensibles au THC et requièrent donc l'utilisation de fortes doses de THC, supérieures à celles consommées par l'homme.

D'autres doses ont été testées. Tout d'abord des doses de 1 mg/kg de Δ^9 -THC, de CBN et de CBD, dose intermédiaire souvent administrée à la souris lors de tests comportementaux concernant le Δ^9 -THC. Ensuite, une dose de 10 mg/kg de Δ^9 -THC (dose induisant certains troubles tels qu'une hypothermie, une hypoactivité [34], une diminution de la

sensation de douleur, de la température rectale [35]), et des doses de 3 mg/kg de CBD et de CBN. Nous n'avons pas obtenu de résultats interprétables concernant le Δ^9 -THC et le CBD, ces doses étant probablement encore trop faibles. En effet, outre la faible sensibilité des rongeurs au THC, Wiley et son équipe [35] ont montré la nécessité d'injecter de plus fortes doses en intrapéritonéal pour obtenir les mêmes effets par rapport à une injection intraveineuse ou une inhalation pour lesquels le passage des cannabinoïdes est très rapide. De plus, comme l'ont observé Tseng et coll. [36] après injection de THC radiomarqué en intrapéritonéal, une majorité du THC, en raison de son extrême lipophilie, va se fixer directement sur le péritoine. Le mode d'injection utilisé dans notre expérimentation est donc très probablement à l'origine des très faibles concentrations en principes actifs et de l'absence de métabolites observés dans le sang de nos souris (les concentrations sanguines obtenues en THC sont si faibles que les concentrations des métabolites produits restent indétectables). Un autre type d'administration aurait probablement été préférable mais plus difficilement réalisable (injection intra-veineuse demandant une grande expérience chez la souris ou système d'inhalation en enceinte fermée non disponible au laboratoire).

En revanche, concernant le cannabinoïde, nous avons pu établir des cinétiques dans le sang, dans les hémisphères cérébraux et dans le cervelet (figures 4A–4C) avec cette dose de 3 mg/kg. Les résultats sont surprenants puisque le pic de CBN est obtenu plus précocement dans les hémisphères cérébraux et dans le cervelet par rapport au sang. Une hypothèse peut être que le CBN se concentre très rapidement dans le cerveau puis est relargué dans le sang d'où un pic sanguin plus tardif.

Mc Mahon et coll. [34] ont mis en évidence des effets maximums (hypothermie, catalepsie et hypoactivité) avec des injections intrapéritonéales allant de 30 à 100 mg/kg de Δ^9 -THC. Nous avons donc choisi d'injecter à nos souris une dose de 50 mg/kg de Δ^9 -THC seul. Avec cette dose, notre hypothèse de persistance du THC dans le cerveau après disparition du sang n'a pas été vérifiée, puisque deux heures après administration on retrouve du THC dans l'ensemble des prélèvements et qu'après 4 heures, tous les résultats sont négatifs. D'autres analyses seraient nécessaires, notamment l'étude des concentrations à des temps intermédiaires entre 2 et 4 heures après injection. Par contre, un décalage de cinétique a été observé avec un pic plasmatique obtenu précocement (T30 min) par rapport au T_{max} correspondant à la concentration maximale observée dans les hémisphères cérébraux (T45 min) et le cervelet (T1 heure).

Concernant le cannabidiol, il a été effectivement mis en évidence une persistance cérébrale après disparition du sang après injection d'une dose de 10 mg/kg de CBD (figures 3A et 3B). En effet, 45 minutes après administration, le cannabidiol a totalement disparu du sang alors qu'il est à sa concentration maximale dans les hémisphères cérébraux. Entre 45 minutes et deux heures après son administration, le cannabidiol est donc absent du sang et présent uniquement dans le cerveau. Ce résultat semble donc confirmer la présence de certains cannabinoïdes dans le cerveau alors même qu'ils ont disparu du sang.

Concernant les prélèvements humains, les dosages sanguins ayant été réalisés avec la technique de routine du laboratoire, le cannabinoïde et le cannabidiol n'ont pas été dosés. Malgré tout, notre objectif principal concernant ces prélèvements de personnes décédées était de mettre en évidence la présence de cannabinoïdes dans les zones de cerveau étudiées alors même que le THC n'était plus présent dans le sang. Une telle persistance a pu être mise en évidence pour quatre des six personnes étudiées (tableaux IV, V, VII et VIII). Ces résultats concordent avec ceux de l'équipe de Mura [22]. Cette persistance semble durer relativement longtemps puisque chez M. E. (tableau VII), le THCCOOH urinaire, connu pour persister plusieurs jours dans les urines, est négatif alors que l'ensemble des cannabinoïdes, à savoir THC, CBN et CBD sont encore retrouvés au niveau cérébral. Il est impossible de tirer de conclusion quant à la présence plus longue de l'un ou l'autre des cannabinoïdes sur un nombre aussi peu élevé d'échantillons. Toutefois, il semblerait que lorsque le THC est encore présent dans le sang, (tableaux III et VI), le cerveau contient essentiellement du THC et peu ou pas de CBD et de CBN, alors que lorsque le THC n'est plus présent dans le sang (tableaux IV, V, VII), ce sont le CBN

et le CBD qui deviennent majoritaires au niveau cérébral, avec notamment des concentrations en CBD parfois élevées. Une étude basée sur l'étude des effets cognitifs et non sur des mesures de concentrations cérébrales [37] a également permis de mettre en évidence une persistance de ces effets jusqu'à sept jours après abstinence et donc après disparition du THC dans le sang. Dans nos résultats, il est intéressant de constater que les concentrations les plus fortes observées dans le cerveau concernent le cannabidiol. Or, une persistance dans le cerveau a également été observée pour cette molécule après disparition totale du sang chez les souris que nous avons étudié. Le cannabidiol pourrait donc être la molécule la plus impliquée dans les phénomènes de rémanence des effets du cannabis. Pourtant, cette molécule semble être dénuée de propriétés psychoactives, et pourrait même avoir des effets antipsychotiques [38]. Il semblerait nécessaire de conduire de nouvelles expériences avec ce composé pour en déterminer le rôle exact au niveau cérébral.

Concernant les zones de cerveau étudiées, nous avons choisi de nous intéresser à différentes zones riches en récepteurs CB1. Cependant, le nombre de sujets analysés est trop faible pour mettre en évidence un tropisme particulier des cannabinoïdes envers une zone particulière du cerveau parmi ces 7 zones sélectionnées. Il aurait été également intéressant d'analyser des zones pauvres en récepteurs CB1 afin d'effectuer une comparaison par rapport aux zones riches et ainsi affiner le tropisme cérébral du THC.

Notre étude est malgré tout la première, à notre connaissance, à montrer une persistance dans le cerveau de cannabidiol après disparition dans le sang aussi bien chez l'homme que chez la souris, en plus du décalage de cinétique constaté pour le Δ^9 -THC.

5 Conclusion

Ces résultats préliminaires semblent montrer qu'il existe bien un décalage de cinétique au niveau des T_{max} du Δ^9 -THC, du cannabidiol et du cannabinoïde entre le cerveau et le sang avec par ailleurs persistance du cannabidiol dans le cerveau après disparition totale du sang. Ces résultats doivent être confirmés sur un nombre plus important de patients décédés consommateurs de cannabis. Des prélèvements dans ce sens se poursuivent dans notre laboratoire.

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Bibliographie

1. Giroud C, Battistella G, Thomas A, Maeder P, Mall JF, Annoni JM, Appenzeller M, Buclin T, Staub C, Mangin P, Fornari E, Favrat B. Effets du cannabis sur les fumeurs occasionnels. *Ann Toxicol Anal.* 2011; 23(S1): S1–S8.
2. *Journal Officiel de la République Française*, 4 février 2003: 2103 p. (loi n° 2003-87 du 3 février 2003 relative à la conduite sous

- l'influence de substances ou plantes classées comme stupéfiants).
3. Journal Officiel de la République Française, 1^{er} avril 2003: 5702 p. (Décret n° 2003-293 du 31 mars 2003 relatif à la sécurité routière et modifiant le code de procédure pénale et le code de la route).
 4. Mura P, Kintz P, Ludes B, Gaulier JM, Marquet P, Martin-Dupont S, Vincent F, Kaddour A, Goullé JP, Nouveau J, Moulisma M, Tilhet-Coartet S, Pourrat O. Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects : results of a French collaborative study. *Forensic Sci Int.* 2003; 133: 79–85.
 5. Beck F, Guignard R, Richard JB, Tovar ML, Spilka S. Les niveaux d'usage des drogues en France en 2010. *Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies.* 2011; 76: 1–6.
 6. Mura P, Brunet B, Favreau F, Hauet T. Cannabis et accidents de la voie publique : résultats de dernières études françaises. *Ann Pharm Fr.* 2006; 64: 192–196.
 7. Mura P, Chatelain C, Dumestre V, Gaulier JM, Ghysel MH, Lacroix C, Kergeris MF, Lhermitte M, Moulisma M, Pépin G, Vincent F, Kintz P. Use of drugs of abuse in less than 30-year-old drivers killed in a road crash in France: A spectacular increase for cannabis, cocaine and amphetamines. *Forensic Sci Int.* 2006; 160: 168–172.
 8. Duverneuil C, Etting I, Mathieu B, Paraire F, Lorin de la Grandmaison G, Rambaud C, Durigon M, De Mazancourt P, Alvarez JC. Intérêt des analyses toxicologiques lors de recherche des causes de décès (résultats de 358 analyses). *Ann Toxicol Anal.* 2005; XVII: 187–193.
 9. Goullé JP, Mura P, Pépin G, Dumestre-Toulet V, Kintz P. On ne meurt pas du cannabis... mais il tue ! *Toxicorama.* 1999; 11: 12–16.
 10. Reid MJ, Bornheim LM. Cannabinoid-induced alterations in brain disposition of drugs of abuse. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61: 1357–1367.
 11. Mura P, Piriou A. Cannabis. In : Kintz (coordinateur), *Toxicologie et pharmacologie médico-légales.* Amsterdam, Oxford, Paris, New York, Tokyo, Elsevier. 1998: 543–554.
 12. Barnett G, Licko V, Hompson T. Behavioral pharmacokinetics of marijuana. *Psychopharmacology.* 1985; 85: 51–56.
 13. Chiang CW, Barnett G. Marijuana effect and delta-9-tetrahydrocannabinol plasma level. *Clin Pharmacol Ther.* 1984; 36(2): 234–238.
 14. Cone EJ, Huestis MA. Relating blood concentrations of tetrahydrocannabinol and metabolites to pharmacologic effects and time of marijuana usage. *Therapeutic Drug Monitoring.* 1993; 15(6): 527–532.
 15. Costentin J. Le cannabis – données neurobiologiques récentes éclairant les perturbations de la conduite des véhicules. *Ann Pharm Fr.* 2006; 64: 148–159.
 16. Cirimele V, Sachs H, Kintz P, Mangin P. Testing human hair for cannabis. Rapid screening procedure for the simultaneous identification of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol. *J Anal Toxicol.* 1996; 20: 13–16.
 17. Hayakawa K, Mishima K, Hazekawa M, Sano K, Irie K, *et al.* Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Δ^9 -tétrahydrocannabinol *via* CB1 receptor-dependent mechanism. *Brain Res.* 2008; 1188: 157–164.
 18. Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol : an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42: 11S–19S.
 19. Varvel SA, Wiley JL, Yang R, Bridgen DT, Long K, Lichtman AH, Martin B.R. Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. *Psychopharmacology.* 2006; 186: 226–234.
 20. Brunet B, Doucet C, Venisse N, Hauet T, Hébrard W, Papet Y, Mauco G, Mura P. Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues. *Forensic Sci Int.* 2006; 161: 169–174.
 21. Kemp PM, Abukhalaf IK, Manno JE, Manno BR, Alford DD, Abusada GA. Cannabinoids in humans. I. Analysis of delta 9-tetrahydrocannabinol and six metabolites in plasma and urine using GC-MS. *J Anal Toxicol.* 1995; 19(5) : 285–291.
 22. Mura P, Kintz P, Dumestre V, Raul S, Hauet T. THC can be detected in brain while absent in blood. *J Anal Toxicol.* 2005; 29.
 23. Hollister LE, Gillespie HK, Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A and Agurell S. Do plasma concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol reflect the degree of intoxication? *J Clin Pharmacol.* 1981; 21: 171S–177S.
 24. Brown SM, Waer-Miller J, Mackie K. Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1576: 255–264.
 25. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Neurosci.* 1991; 11: 563–583.
 26. Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci.* 1998; 83: 393–411.
 27. Senn R, Keren O, Hefetz A, Sarne Y. Long-term deficits induced by a single, extremely low dose of tetrahydrocannabinol (THC): Behavioral, pharmacological and biochemical studies in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 88: 230–237.
 28. Egerton A, Allison C, Brett RR, Pratt JA. Cannabinoids and prefrontal cortical function: insights from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30: 680–695.
 29. Teske J, Putzbach K, Engewald W, Müller RK. Determination of cannabinoids by gas chromatography-mass spectrometry and large-volume programmed-temperature vaporiser injection using 25 μ L of biological fluid. *J Chromatogr B.* 2002; 772: 299–306.
 30. Steinmeyer S, Bregel D, Warth S, Kraemer T, Moeller MR. Improved and validated method for the determination of Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in serum, and in human liver microsomal preparations using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2002; 772: 239–248.
 31. Nicolas O, Robert D, Kelly MT, Bressolle F. Traitements de l'échantillon biologique avant l'analyse chromatographique. Applications à la pharmacocinétique et à la toxicologie. *Ann Toxicol Anal.* 2004; XVI: 199–213.
 32. Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M, Stadelmann AM, Roser P, Scheffter T, Pragst F. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(8): 782–789.
 33. Harvey DJ, Brown NK. Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991; 40(3): 533–540.

34. McMahon LR, Koek W. Differences in the relative potency of SR 141716A and AM251 as antagonists of various in vivo effects of cannabinoid agonists in C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol.* 2007; 569: 70–76.
35. Wiley JL, Martin BR. Cannabinoid pharmacological properties common to other centrally acting drugs. *Eur J Pharmacol.* 2003; 471: 185–193.
36. Tseng AH, Harding JW, Craft RM. Pharmacokinetic factors in sex differences in Δ^9 -tétrahydrocannabinol-induced behavioural effects in rats. *Behav Brain Res.* 2004; 154: 77–83.
37. Pope HG, Gruber AJ, Hudson JI, Huestis MA, Yurgelun-Todd D. Neuropsychological performance in long-term cannabis users. *Arch Gen Psychiatry.* 2001; 58: 909–915.
38. Schubart CD, Sommer IE, Van Gastel WA, Goetgebuer RL, Kahn RS, Boks MP. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizophr Res.* 2011; 130(1–3): 216–221.