

Université de Montréal

Étude des propriétés signalétiques et analgésiques des opioïdes et des cannabinoïdes :
vers une meilleure prédiction des effets cliniques

Par

Besma Benredjem

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat
en pharmacologie

Novembre 2021

© Besma Benredjem, 2021

Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

**Étude des propriétés signalétiques et analgésiques des opioïdes et des cannabinoïdes :
vers une meilleure prédiction des effets cliniques**

Présentée par

Besma Benredjem

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Pierre Beaulieu

Président-rapporteur

Graciela Pineyro

Directeur de recherche

Denis Deblois

Membre du jury

Ali Salahpour

Examineur externe

Résumé

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les agonistes du récepteur opioïde Mu (MOR) sont la première ligne de traitement pour le soulagement des douleurs aiguës modérées à sévères. Cependant, ces derniers induisent de nombreux effets indésirables, tels que la dépression respiratoire et la constipation, qui limitent leur utilisation pour une gestion appropriée de la douleur. Chacun des effets indésirables des agonistes du MOR est médié par des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes. C'est pourquoi un nombre considérable de recherches précliniques ont été menées afin de découvrir des opioïdes qui induiraient moins d'effets indésirables. Plus particulièrement, de nombreuses études se sont concentrées sur le développement d'agonistes biaisés du MOR qui ont peu ou pas de recrutement de β -arrestine 2 et qui activent préférentiellement les protéines G. Néanmoins, ces recherches n'ont pas réussi à identifier des agonistes biaisés avec un profil amélioré d'effets indésirables en clinique. Nous proposons dans cette thèse que la caractérisation des similarités signalétiques des agonistes du MOR serait une bonne alternative à l'agonisme biaisé pour l'identification d'opioïdes avec des profils d'effets indésirables distincts. Pour ce faire, nous avons développé une méthode basée sur l'utilisation de l'apprentissage non supervisé par clustering pour classifier les ligands du MOR en des catégories pharmacodynamiques. Cette classification s'est faite à l'aide des paramètres qui caractérisaient une panoplie de voies de signalisation médiées par les protéines G et par les β -arrestines. Nous avons pu associer ces différentes catégories pharmacodynamiques avec différentes fréquences de rapport d'effets indésirables d'opioïdes cliniques au programme de pharmacovigilance de la FDA (*Food and drug administration*) tels que des effets respiratoires et gastro-intestinaux. Nous avons également montré que cette méthode peut être plus généralement appliquée à d'autres sous-types et types de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

L'efficacité et l'innocuité des agonistes du MOR pour le soulagement des douleurs chroniques non cancéreuses, telles que les douleurs neuropathiques, est un sujet controversé et plusieurs essais cliniques ne sont pas en faveur de leur utilisation. Or, la douleur neuropathique est une maladie fréquente qui est associée à une très pauvre qualité de vie du patient et pour laquelle seulement 30 à 40% des patients rapportent un soulagement adéquat de la douleur avec les traitements actuels. Dans les modèles précliniques, les cannabinoïdes sont capables de moduler des

processus impliqués dans le développement des douleurs neuropathiques. Ceci les rend des candidats prometteurs pour le soulagement de ces douleurs en clinique. Néanmoins, peu de médicaments à base de cannabis sont présentement approuvés sur le marché pour un usage thérapeutique. Ces derniers sont régulés selon leur contenu en Δ 9-tétrahydrocannabinol (THC) et cannabidiol (CBD) et il existe une présomption selon laquelle les quantités de THC et les ratio THC:CBD permettraient de décrire l'activité biologique du cannabis médical. Or, les extraits commerciaux peuvent contenir jusqu'à 23 phytocannabinoïdes et de nombreux autres composés chimiques. La description de ces derniers uniquement en termes de contenus en THC et en CBD ne prend pas en considération les interactions potentielles qui peuvent arriver entre les multiples autres composants et qui peuvent aboutir à des effets cliniques différents. Nous avons donc testé dans cette thèse s'il y avait réellement une équivalence entre l'activité biologique d'un extrait de cannabis et des traitements cannabinoïdes avec des contenus en THC et/ou en CBD équivalents. Nous avons démontré que les réponses analgésiques du THC et du CBD seuls, d'une combinaison THC:CBD (1 :1) et d'un extrait de cannabis de chémotype II (avec un ratio THC:CBD \approx 1 :1) ne sont pas équivalentes dans un modèle de neuropathie diabétique chez les rats. Aux hautes doses testées, l'extrait était plus efficace à soulager la douleur que la combinaison THC:CBD (1 :1) qui, elle-même, était plus efficace que le THC et le CBD seuls. De plus, ces différents traitements engageaient les cibles moléculaires du système endocannabinoïde CB1 (récepteur cannabinoïde 1), CB2 (récepteur cannabinoïde 2) et TRPV1 de façon distincte. Ensemble ces résultats suggèrent qu'une équivalence au niveau des contenus en THC et des ratios THC:CBD ne se traduit pas par une équivalence d'activité biologique telle que l'analgésie.

Dans son ensemble, cette thèse propose dans un premier temps une méthode basée sur la classification pharmacodynamique de ligands de RCPG qui pourrait être utile pour l'identification de nouveaux candidats opioïdes avec un profil d'effets indésirables amélioré. Dans un second temps, nous avons démontré que les cannabinoïdes induisent des effets analgésiques à travers différentes cibles pharmacodynamiques et que ces dernières étaient engagées de façon distincte par les différents traitements. Notre intention future est de décrire *in vitro* les profils signalétiques des cannabinoïdes sur ces différentes cibles et d'utiliser notre outil de classification pharmacodynamique afin de corrélérer ces réponses signalétiques avec leurs effets analgésiques et indésirables *in vivo*. Ces travaux fournissent des éléments pertinents pour le développement rationnel d'analgésiques plus efficaces et mieux tolérés en clinique.

Mots-clés : Analgésiques, MOR, opioïdes, effets indésirables, clustering, criblage de composés, douleur neuropathique, phytocannabinoïdes, récepteurs cannabinoïdes.

Abstract

According to the World Health Organization (WHO), Mu opioid receptor agonists (MOR) are the first line of treatment for the relief of moderate to severe acute pain. However, they induce numerous adverse effects, such as respiratory depression and constipation, which limit their use for appropriate pain management. Each of the adverse effects of MOR agonists is mediated by complex cellular and molecular mechanisms. As a result, a considerable amount of preclinical research has been conducted to discover opioids that would induce fewer adverse effects. Specifically, many studies have focused on developing biased MOR agonists that have little or no β -arrestin 2 recruitment and preferentially activate G proteins. Despite these investigations, efforts to identify biased agonists with an improved adverse event profile in the clinic have been unsuccessful. In this thesis, we propose that characterizing the signaling similarities of MOR agonists would be a good alternative to biased agonism for identifying opioids with distinct adverse effect profiles. To this end, we developed a method based on the use of unsupervised clustering learning to classify MOR ligands into pharmacodynamic categories. This classification was done using parameters that characterized a panoply of G protein- and β -arrestin-mediated signaling pathways. We were able to associate these different pharmacodynamic categories with different frequencies of clinical opioid adverse event reported to the FDA pharmacovigilance program such as respiratory and gastrointestinal effects. We have also shown that this method can be more generally applied to other subtypes and types of G protein-coupled receptors (GPCRs).

The efficacy and safety of MOR agonists for the relief of chronic non-cancer pain, such as neuropathic pain, is a controversial topic and several clinical trials do not support their use. Neuropathic pain is a common condition that is associated with very poor patient quality of life and for which only 30-40% of patients report adequate pain relief with current treatments. In preclinical models, cannabinoids are able to modulate processes involved in the development of neuropathic pain. This makes them promising candidates for the relief of such pain in the clinic. However, few cannabis-based medications are currently approved for therapeutic use. For safety reasons, these are regulated according to their Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) content under the presumption that THC amounts and THC:CBD ratios would adequately describe the biological activity of medical cannabis. Commercial extracts of medical cannabis may contain up to 23 phytocannabinoids and many other chemical compounds. Describing these

products only in terms of THC and CBD content does not take into consideration the potential interactions that may occur between these multiple components and that may result in different clinical effects. We therefore tested in this thesis whether there was really an equivalence between the biological activity of a cannabis extract and cannabinoid treatments with equivalent THC and/or CBD contents. We demonstrated that the analgesic responses of pure THC and CBD, a THC:CBD (1:1) combination, and a chemotype II cannabis extract (with a THC:CBD ratio \approx 1:1) were not equivalent in a rat model of diabetic neuropathy. At the high doses tested, the extract was more efficacious than the THC:CBD (1:1) combination which, in turn, was more efficacious than pure THC and CBD. Furthermore, these different treatments engaged the molecular targets of the endocannabinoid system CB1 (cannabinoid receptor 1), CB2 (cannabinoid receptor 2), and TRPV1 in distinct ways. Together, these results suggest that equivalence in THC content and THC:CBD ratios does not translate into equivalence in biological activity such as analgesia.

Overall, this thesis firstly proposes a pharmacodynamic-based method of GPCR ligand classification that could be useful for the identification of new opioid candidates with an improved adverse effect profile. Secondly, we demonstrated that cannabinoids produced their analgesic effects via different pharmacodynamic targets and that these targets were distinctively engaged by the different treatments. Our future intention is to describe the *in vitro* signaling profiles of cannabinoids at these different targets, and to use our pharmacodynamic clustering tool to correlate these signaling responses with their *in vivo* their analgesic and adverse effects. This work provides relevant insights for the rational development of more effective and better tolerated analgesics in the clinic.

Keywords: analgesics, MOR, opioids, adverse effects, clustering, drug screening, neuropathic pain, phytocannabinoids, cannabinoid receptors.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	4
Table des matières	6
Liste des tableaux	15
Liste des figures	16
Liste des sigles et abréviations	20
Remerciements	24
Chapitre 1 : Introduction	25
1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G et la douleur	25
1.1.1 Signalisation et régulation des récepteurs couplés aux protéines G.....	25
1.1.1.1 Signalisation des récepteurs couplés aux protéines G	25
1.1.1.1.1 Signalisation classique des récepteurs couplés aux protéines G	26
1.1.1.1.2 Mécanismes de régulation de la réponse des RCPG	27
1.1.1.1.2.1 La désensibilisation du récepteur	28
1.1.1.1.2.2 L'internalisation du récepteur.....	28
1.1.1.1.2.3 Tri post-endocytaire du récepteur	28
1.1.1.1.3 Signalisation dépendante des β -arrestines	29
1.1.2 La douleur	30
1.1.2.1 Douleur aiguë et douleur chronique.....	31
1.1.2.2 Traitements pharmacologiques	33
1.1.3 Les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes	35
1.1.3.1 Les récepteurs opioïdes.....	35
1.1.3.1.1 Récepteurs opioïdes Mu	35

1.1.3.1.1.1	Distribution des récepteurs opioïdes Mu	35
1.1.3.1.1.2	Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs opioïdes Mu	37
1.1.3.1.1.3	Les récepteurs opioïdes Mu et la douleur	39
1.1.3.1.2	Récepteur opioïdes delta.....	40
1.1.3.1.2.1	Distribution des récepteurs opioïdes delta.....	40
1.1.3.1.2.2	Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs opioïdes delta 40	
1.1.3.1.2.3	Les récepteurs opioïdes delta et la douleur.....	40
1.1.3.2	Les récepteurs cannabinoïdes	41
1.1.3.2.1	Récepteurs cannabinoïdes 1.....	41
1.1.3.2.1.1	Distribution des récepteurs cannabinoïdes 1	41
1.1.3.2.1.2	Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs cannabinoïdes 1 42	
1.1.3.2.1.3	Récepteurs cannabinoïdes 1 et douleur	42
1.1.3.2.2	Récepteurs cannabinoïdes 2.....	42
1.1.3.2.2.1	Distribution des récepteurs cannabinoïdes 2	42
1.1.3.2.2.2	Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs cannabinoïdes 2 43	
1.1.3.2.2.3	Récepteurs cannabinoïdes 2 et douleur	44
1.2	Les opioïdes et les effets indésirables	44
1.2.1	Brève introduction.....	44
1.2.2	Les ligands opioïdes	45
1.2.2.1.1	Morphine	45
1.2.2.1.2	Endomorphine-1	46
1.2.2.1.3	Met-enképhaline	46
1.2.2.1.4	DAMGO	46

1.2.2.1.5	Oxycodone.....	46
1.2.2.1.6	Fentanyl	46
1.2.2.1.7	Lopéramide.....	47
1.2.2.1.8	Buprénorphine	47
1.2.2.1.9	Meptazinol.....	47
1.2.2.1.10	Tramadol.....	47
1.2.3	Signalisation du MOR en relation avec son analgésie et ses effets indésirables	48
1.2.3.1	Mécanismes d'action d'analgésie	49
1.2.3.1.1	Action centrale.....	49
1.2.3.1.2	Action spinale	49
1.2.3.1.3	Action périphérique	50
1.2.3.2	Effets indésirables des opioïdes	50
1.2.3.2.1	La dépression respiratoire.....	51
1.2.3.2.2	La constipation	51
1.2.3.2.3	La somnolence.....	52
1.2.3.2.4	Nausées et vomissements	52
1.2.3.2.5	Tolérance analgésique	53
1.2.3.2.6	Hyperalgésie	54
1.2.3.2.7	Dépendance physique	54
1.2.3.2.8	Dépendance psychologique	55
1.2.3.2.9	Système de rapport des effets indésirables de la FDA	56
1.2.4	Agonisme biaisé et effets indésirables	57
1.2.4.1	Définition	58
1.2.4.2	Mesure quantitative de l'agonisme et de l'agonisme biaisé	59
1.2.4.3	Sélectivité fonctionnelle au sein du récepteur opioïde Mu	62

1.2.4.3.1	Agonistes biaisés du MOR et applications cliniques.....	63
1.3	Système endocannabinoïde et phytocannabinoïdes	64
1.3.1	Brève introduction au système endocannabinoïde	64
1.3.2	Système endocannabinoïde	65
1.3.2.1	Récepteurs cannabinoïdes	65
1.3.2.2	Ligands endogènes.....	65
1.3.2.3	Enzymes de synthèse et de dégradation.....	66
1.3.2.4	Autres récepteurs cannabinoïdes.....	67
1.3.2.4.1	Récepteurs cannabinoïdes ionotropes TRP	67
1.3.2.4.1.1	TRPV1	68
1.3.3	Cannabis et phytocannabinoïdes	69
1.3.3.1	Cannabis Sativa.....	69
1.3.3.2	Phytocannabinoïdes	70
1.3.3.2.1	Δ^9 -tétrahydrocannabinol	71
1.3.3.2.2	Cannabinol.....	71
1.3.3.2.3	Cannabidiol.....	72
1.3.3.2.4	Cannabichromène	73
1.3.3.2.5	Cannabigérol.....	73
1.3.3.2.6	Terpènes.....	74
1.3.3.3	Effet d'entourage	74
1.3.3.3.1	Combinaison THC:CBD.....	75
1.3.3.3.2	Classification des extraits de cannabis en chémotypes	75
1.3.3.4	Ligand synthétique WIN 55,212-2	76
1.3.3.5	Agonisme biaisé et cannabinoïdes	77
1.3.4	Cannabinoïdes et douleur	77

1.3.4.1	Utilisation des cannabinoïdes en clinique.....	77
1.3.4.1.1	Modes d'administration et pharmacocinétique du cannabis.....	78
1.3.4.1.2	Effets bénéfiques et indésirables du cannabis	78
1.3.4.1.3	Efficacité clinique pour le traitement de douleurs aiguës.....	80
1.3.4.1.4	Efficacité clinique pour le traitement de douleurs chroniques	80
1.3.4.2	Modes d'action analgésiques des cannabinoïdes.....	81
1.3.4.2.1	Analgésie par action centrale.....	81
1.3.4.2.1.1	Action centrale et douleur neuropathique.....	82
1.3.4.2.2	Analgésie par action spinale	82
1.3.4.2.2.1	Action spinale et douleur neuropathique	82
1.3.4.2.3	Analgésie par action périphérique	84
1.3.4.2.3.1	Action périphérique et douleur neuropathique	85
2	Chapitre 2 : Facteurs pouvant influencer l'analyse des réponses biaisées des ligands de RCPG (Article I).....	87
2.1	Abstract	90
2.2	Introduction	91
2.3	Molecular determinants and cell-dependence of biased signaling.....	91
2.4	Time dependence of biased signals.....	93
2.5	The intrinsic value of directing pharmacological stimuli to specific pathways	94
2.6	'Signaling phenotypes' and stratification strategies as predictive tools in drug discovery	94
2.7	Conflict of interest statement	96
2.8	References and recommended reading.....	96
2.9	Acknowledgements	97
2.10	References	97
2.11	Figures.....	102

3	Chapitre 3 : Hypothèses et objectifs.....	104
3.1	Classification pharmacodynamique des ligands des récepteurs opioïdes pour inférer leurs effets indésirables potentiels	104
3.2	Les contenus en THC et en CBD des médicaments à base de cannabis sont-ils de bons descripteurs de leurs potentiels analgésiques ?	105
4	Chapitre 4 : Classification pharmacodynamique des ligands opioïdes et association avec leurs effets indésirables (Article II)	107
4.1	Abstract	111
4.2	Introduction	112
4.3	Results	113
4.3.1	Clustering ligands according to pharmacodynamic similarities	113
4.3.2	Ligands within the same cluster share quality and magnitude of response	115
4.3.3	Ligand clusters are informative of possible side effects	117
4.3.4	Associating side effects to specific signals	118
4.3.5	Signaling and structural clusters convey complementary information about side effects 119	
4.3.6	Ligand clusters generated with different GPCRs	120
4.4	Discussion	122
4.5	Methods	125
4.6	Data availability	137
4.7	Code availability	137
4.8	References and Notes	138
4.9	Acknowledgements	142
4.10	Author contributions	142
4.11	Competing interests:.....	142
4.12	Tables	143

4.13	Figures.....	147
4.14	Supplementary Figures.....	158
4.15	Description of Additional Supplementary Files.....	180
4.16	Supplementary Data	183
4.17	Source data	183
4.18	Reporting Summary	183
5	Chapitre 5: Caractérisation du potentiel analgésique des phytocannabinoïdes dans un modèle de neuropathie diabétique (Article III).....	184
5.1	Abstract	187
5.2	Abbreviations	188
5.3	Introduction.....	189
5.4	Methods.....	190
5.4.1	Materials.....	190
5.4.2	Animals	191
5.4.3	Intrathecal (i.t.) injections	192
5.4.4	Mechanical allodynia	192
5.4.5	Pharmacological treatments	193
5.4.6	Data analysis	194
5.5	Results.....	195
5.5.1	STZ-induced mechanical allodynia.....	195
5.5.2	Effect of WIN 55, 212-2, THC and CBD on STZ-induced mechanical sensitivity.....	195
5.5.3	Effects of THC:CBD (1:1) mixture and balanced type II cannabis extract on STZ-induced mechanical sensitivity.....	197
5.5.4	Comparative assessment of analgesic responses elicited by THC, CBD, their 1:1 mixture and a “balanced” cannabis extract	198

5.5.5	Contributions of the CB1 and CB2 receptors and TRPV1 channels to analgesia induced by different cannabinoids	199
5.6	Discussion	203
5.7	References:	208
5.8	Tableaux	213
5.9	Figures	215
5.10	Supplementary information.....	226
6	Chapitre 6 : Discussion	236
6.1	La sélectivité fonctionnelle des agonistes du MOR	237
6.1.1	Les clusters pharmacodynamiques peuvent être corrélés avec les effets indésirables des opioïdes	237
6.1.1.1	Les coefficients de transduction $\text{Log}(\tau/K_A)$ ne sont pas des outils fiables pour la quantification du biais et la prédiction des effets indésirables des agonistes du MOR ...	240
6.1.1.2	Les facteurs de biais ne corrèlent pas avec l'incidence des effets indésirables	242
6.1.2	Les réponses médiées par les β -arrestines ne sont pas essentielles pour les effets indésirables des agonistes du MOR	244
6.1.3	La basse efficacité intrinsèque des agonistes du MOR et non l'agonisme biaisé est responsable de leur fenêtre thérapeutique améliorée	245
6.2	Les clusters signalétiques et structuraux donnent des informations complémentaires sur les effets indésirables des agonistes du MOR	247
6.3	Le contenu en THC et les ratios THC:CBD ne décrivent pas l'activité biologique des cannabinoïdes dans un modèle de douleur chronique neuropathique	248
6.3.1	Une caractérisation plus exhaustive des extraits de cannabis est nécessaire afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique.....	251
6.4	Les cibles impliquées dans l'analgésie des cannabinoïdes sont recrutées de façon différentielle	252

6.4.1	Corrélations entre profils signalétiques et effets <i>in vivo</i>	256
6.4.2	Effet d'épargne en opiacés.....	257
7	Chapitre 7 : Perspectives	259
8	Chapitre 8 : Conclusions	263
9	Références bibliographiques	264
10	Annexes	299

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Liste et caractéristiques des ligands du MOR utilisés dans notre étude.....	48
Tableau 2. Principaux effets indésirables liés à l'usage à court et à long terme ou d'une consommation excessive du cannabis	79

Article II

Table 1. Pharmacodynamic and structural categories associate with frequency of report of undesired events for clinically available hMOR ligands#	143
Table 2. Pharmacodynamic categories associate with frequency of report of undesired cardiovascular and respiratory events for clinically available β_{2ADR} ligands#	145

Article III

Table1. Effect of citrate buffer, STZ and vehicle treatments on mechanical sensitivity in neuropathic (STZ) rats.	213
Supplementary Table 1. Summary of agonist treatment groups for experimental procedures. ...	234
Supplementary Table 2. Summary of antagonist treatment groups for experimental procedures.	234
Supplementary Table 3. Effect of vehicle treatments used in antagonism experiments on mechanical paw withdrawal thresholds in STZ rats.....	235

Liste des figures

Introduction

Figure 1.	Cycle d'activation de la protéine G.	27
Figure 2.	Régulation de l'interaction récepteur-ligand par désensibilisation, internalisation, recyclage ou dégradation du récepteur.....	29
Figure 3.	Transmission de la douleur depuis le site de douleur jusqu'à la perception par le cerveau..	31
Figure 4.	Comparaison de la transmission synaptique entre les neurones sensoriels et les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière en situation physiologique (à droite) et après dommage à un nerf périphérique (à gauche).....	33
Figure 5.	Classification des antalgiques de l'Organisation Mondiale de la Santé selon la sévérité de la douleur.....	34
Figure 6.	Distribution des récepteurs opioïdes et des principaux ligands endogènes le long des voies de la douleur.	37
Figure 7.	Signalisation des récepteurs opioïdes mu (MOR).....	38
Figure 8.	Sélectivité fonctionnelle ou agonisme biaisé.	59
Figure 9.	Courbes dose-réponse de différents agonistes à travers différentes voies de signalisation.....	60
Figure 10.	Représentation schématique de l'implication des voies de signalisation médiées par les protéines G et par les β -arrestines dans les effets analgésiques et les effets indésirables des opioïdes .	63
Figure 11.	Schématisation des composants du système endocannabinoïdes au niveau des neurones, des microglies et des astrocytes.....	66
Figure 12.	Structures des phytocannabinoïdes les plus abondants dans Cannabis sativa L.	70
Figure 13.	Exemples de compositions détaillées des trois chémotypes d'extraits de cannabis.	76

Article I

Figure 1.	Comprehensive 'signaling profiles' define 'signaling phenotypes' with predictive value over <i>in vivo</i> responses.	103
-----------	--	-----

Article II

Figure 1. Ligands are classified according to similarities in multidimensional signaling profiles using pharmacodynamic parameters.	148
Figure 2. β arr recruitment and G-protein responses generated by opioid ligands.	150
Figure 3. Assignment of hMOR ligands into clusters is primarily driven by β arr responses.	152
Figure 4. Graphic representation of operational and logistic parameters for hMOR ligands populating different clusters.	153
Figure 5. Signaling profiles of opioid receptor ligands are conserved across species but not receptor subtypes.	155
Figure 6. β 2 _{ADR} ligands cluster according to similarity in G protein and β arr-mediated responses.	157
Supplementary Figure 1. Profiles of virtual compounds classed by Emax average distance.	159
Supplementary Figure 2. Stepwise method used to cluster hMOR ligands according to pharmacodynamic parameters.	161
Supplementary Figure 3. $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ and pEC_{50} values are correlated but not congruent.	162
Supplementary Figure 4. Graphic representation of parameters defining virtual compounds clustered according to similarities in $\text{Log}(\tau)$, Emax and $\text{Log}(\tau/\text{KA})$	164
Supplementary Figure 5. Net BRET values of hMOR and hDOR responses obtained with different biosensors.	166
Supplementary Figure 6. β arr recruitment and G protein responses by novel opioid ligands were monitored using BRET-based biosensors.	168
Supplementary Figure 7. Stepwise method used to determine parameter contribution to ligand segregation into functional clusters.	169
Supplementary Figure 8. Heat maps and cluster assignments obtained using partial hMOR datasets for β arr or G protein parameters.	170
Supplementary Figure 9. Stepwise comparison of clusters produced with different datasets. ...	172
Supplementary Figure 10. Correlating specific signals to reported opioid side effects.	174
Supplementary Figure 11. Structural and signaling clusters display non-random similarity.	175
Supplementary Figure 12. Chemical structures for standard and novel opioid ligands.	176
Supplementary Figure 13. Graphic representation of pharmacodynamic parameters of hDOR ligands in different clusters.	177

Supplementary Figure 14. Graphic representation of pharmacodynamic parameters of β_{2ADR} ligands included in different clusters.178

Article III

Figure 1. Time course and dose-dependent anti-allodynic effects of WIN 55, 212-2, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in STZ rats.216

Figure 2. Time course and dose-dependent anti-allodynic effects of the THC:CBD (1:1) mixture and of the extract in STZ rats.217

Figure 3. Comparison of the anti-allodynic effects of THC, CBD, THC: CBD (1:1) mixture and extract in STZ rats.218

Figure 4. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of WIN 55,212-2.219

Figure 5. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of THC.221

Figure 6. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of CBD.222

Figure 7. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of the THC:CBD (1:1) mixture.223

Figure 8. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of chemotype II cannabis extract.225

Supplementary Figure 1. Evolution of non-fasting glycemia and body weight in type 1 diabetic rats.227

Supplementary Figure 2. Time course and effect of antagonist treatment on mechanical sensitivity in neuropathic (STZ) rats.229

Supplementary Figure 3. Time course of the hind paw withdrawal response to von Frey filaments after intrathecal administration of vehicles for cannabinoids and antagonists used in the study.231

Supplementary Figure 4. Time necessary to get to the peak analgesic response.233

Annexe

Annexe I. Corrélation de signaux spécifiques aux effets indésirables de dépression respiratoire et de somnolence.	301
Annexe II. Ajustement des courbes dose-réponse avec le modèle opérationnel en utilisant des valeurs de KA conditionnelles ou des valeurs de Ki.....	302
Des cellules HEK ont été transfectées avec les récepteurs hMOR et les membranes ont été isolées. Nous avons ensuite effectué des essais de déplacement du radio-ligand.....	302
Annexe III. Courbes dose-réponse de l'effet analgésique du mélange THC:CBD à ratio 1:1 et à ratio 1:1.45	303
Annexe IV. Résumé des effets des prétraitement par les antagonismes des cibles CB1, CB2 et TRPV1 sur les réponses analgésiques des différents traitements cannabinoïdes.....	304
Annexe V. Profils de signalisation des composés Pfizer 3, 4, 11 et 15 au niveau des récepteurs hMOR et hDOR.	305
Annexe VI. Courbe dose-réponse de l'effet analgésique de l'extrait de cannabis de chémotype II en présence ou en absence du terpène β -caryophyllène.....	306

Liste des sigles et abréviations

2-AG : 2-arachidonyleglycérol

5-HT_{1A} : Récepteur sérotoninergique 1A

AC : Adénylate cyclase

AERS : « Adverse Event Reporting System »

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

Ca_v : Canal calcique dépendant du voltage

CB₁ : Récepteur cannabinoïde 1

CB₂ : Récepteur cannabinoïde 2

CBC: Cannabichromène

CBD: Cannabidiol

CBG: Cannabigérol

CBN : Cannabinol

CCI : Lésion par constriction chronique

CGRP : « Calcitonin gene-related peptide »

DAGL : Diacylglycérol lipase

DOR : Récepteur opioïde delta

DRG : Ganglions de la racine dorsale

EC₅₀ : Concentration d'agoniste nécessaire pour obtenir 50% de la réponse maximale

ECL : Boucle extracellulaire

E_{max} : Réponse maximale

FAAH : « Fatty acid amide hydrolase »

FDA : « Food and drug administration »

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GDP : Guanosine diphosphate

GI : Gastro-intestinal

GIRK : «G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels»

GPR55 : «G-protein-coupled receptor 55»

GRK : « G protein-coupled receptor kinase »

GTP : Guanosine triphosphate

ICL : Boucle intracellulaire

Kir : Canal potassique (Inwardly Rectifying K⁺)

KO : «Knock out»

KOR : Récepteur opioïde Kappa

LC : locus coeruleus

MAGL : Monoacylglycérol lipase

MAPK : « Mitogen-activated protein kinases »

MOR : Récepteur opioïde mu

NMDA : Récepteurs au N-méthyl-D-aspartate

NOR : Récepteur opioïde de la nociceptine

PAG : Substance grise périaqueducule

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PNL : Ligature partielle du nerf sciatique « partial sciatic nerve ligation »

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RVM : Moelle rostroventrale

SNC : Système nerveux central

SNI : Branche de nerf sciatique épargnée « spared nerve injury »

THC : Δ^9 -tetrahydrocannabinol

TRP : Transient receptor potential

TRPV1: « Transient receptor potential vanilloid 1 »

WDR: Large spectre (wide dynamic range)

WIN : WIN 55,212-2

WT: Type sauvage (wild type)

*Je dédie cette thèse à mes chers parents,
Pour tous les sacrifices que vous avez faits, je vous suis reconnaissante !*

Remerciements

Mon parcours de doctorat a été une expérience riche en apprentissages autant au niveau académique que personnel. Il n'a pas toujours été facile et les dernières années de pandémie se sont quelquefois avérées un réel défi, mais de nombreuses personnes ont rendu ce parcours agréable et mémorable. J'aimerais donc mettre en avant dans ces remerciements ces personnes qui m'ont soutenu tout le long de mon aventure.

Je tiens tout d'abord à remercier ma famille qui a toujours été présente pour moi, même à plus de 6000 km de distance. Je dédie ce travail à mes chers parents et à ma chère grand-mère, qui m'ont toujours supporté tout au long de ma vie et de mes études et qui m'ont apporté tous les conseils et les outils nécessaires à ma réussite. Je n'oublie pas mes petites sœurs et mes petites cousines qui m'ont également toujours soutenu et débordé d'affection ainsi que mes oncles et tantes qui m'ont tant donné depuis mon enfance et m'ont aidé à devenir la personne que je suis aujourd'hui.

Je tiens aussi à remercier le Dre Graciela Pineyro qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a encadré de la meilleure façon qu'il soit. Je la remercie pour son excellent mentorat, sa présence continue ainsi que sa patience à travers des situations qui n'ont pas toujours été faciles à résoudre. C'est une femme exceptionnelle et une scientifique intègre qui est toujours prête à se battre pour son laboratoire. Merci pour tout Graciela, vos efforts ne passent pas inaperçus !! Un grand merci également à tous les membres du laboratoire Iness, Ahmed, Derek, Paul et Giacomo pour leur aide tout au long de mon doctorat et pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens à exprimer mon entière reconnaissance et gratitude envers les membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner mon travail.

Enfin, je tiens à remercier ces personnes spéciales qui m'ont accompagné durant toutes ces années et avec qui j'ai partagé et continuerai de partager d'inoubliables moments : Abdou, Wissam, Marilou, Waheb, Juan et Yury, Narimane, Yasmine T., Yasmine A., Yasmine B., César, Obito, Mounia, Romain ainsi que tous ceux et celles que je n'ai pas mentionnés et qui se reconnaîtront. Un grand merci à ma meilleure amie Cristina C., tu es la personne la plus douce et généreuse qui existe et je te remercie pour tous les beaux moments et belles aventures que nous avons vécues ensemble!

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G et la douleur

1.1.1 Signalisation et régulation des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont l'une des familles les plus importantes de récepteurs membranaires chez les mammifères, comprenant environ 800 membres chez l'humain (1, 2). Ils régulent la plupart des réponses physiologiques de l'organisme à une grande diversité de stimuli extracellulaires, d'hormones et de neurotransmetteurs, les rendant des cibles thérapeutiques de choix (3). Ces récepteurs sont ainsi la cible de 30-40% des médicaments sur le marché et environ 50% de ces récepteurs ont fait l'objet d'essais cliniques (4, 5). Dans le cadre de cette thèse, un intérêt plus particulier sera porté à deux types de RCPG impliqués dans la modulation de la douleur : les récepteurs opioïdes qui sont impliqués dans le traitement des douleurs sévères aiguës et les récepteurs cannabinoïdes qui sont des cibles prometteuses pour la gestion de la douleur chronique.

1.1.1.1 Signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG sont caractérisés par la présence de sept hélices α transmembranaires (dites domaines transmembranaires) connectées par des boucles intra- et extracellulaires (dites ICL et ECL). C'est pourquoi la nomenclature de « récepteur à sept domaines transmembranaires » (7-DTM) est parfois préférée. Ils possèdent aussi un domaine N-terminal extracellulaire ainsi qu'un domaine C-terminal intracellulaire (6).

La liaison d'un ligand à son récepteur entraîne des changements conformationnels du récepteur qui vont aboutir à une signalisation intracellulaire. Ce sont les boucles intracellulaires, les domaines transmembranaires et la partie C-terminale des RCPG qui sont impliquées dans cette signalisation et dans sa régulation (7-9). Ceci se fait par interaction du récepteur avec au moins l'un des deux partenaires de signalisation majeurs : à savoir les protéines G et les β -arrestines (7, 8, 10, 11). Pour les besoins de cette thèse, nous allons brièvement décrire la signalisation médiée par les protéines G et la régulation médiée par les β -arrestines.

1.1.1.1.1 Signalisation classique des récepteurs couplés aux protéines G

Lorsqu'un agoniste se lie au RCPG, il induit des changements de conformation au niveau des domaines transmembranaires 3, 5 et 6. Ceci permet une séparation des boucles ICL2 et ICL3 du récepteur et le logement d'une protéine G hétérotrimérique dans le creux ainsi formé (12). Cette dernière a pour rôle de transmettre le signal du RCPG à un effecteur intracellulaire (13).

Les protéines G hétérotrimériques sont formées de trois sous-unités polypeptidiques distinctes : α , β et γ . Les sous-unités β et γ forment un dimère obligatoire $\beta\gamma$ (14). Dans sa forme inactive, la sous-unité α est fortement liée à une molécule de guanosine diphosphate (GDP). Après liaison du ligand, l'activation du récepteur entraîne des changements de conformation de la sous-unité α . Ces derniers mènent alors à l'échange du GDP par une molécule de guanosine triphosphate (GTP) rendant la protéine G active. Les complexes $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ se séparent alors et chacun ira stimuler différentes molécules effectrices intracellulaires qui sont responsables de la transduction du message. Ces effecteurs peuvent être enzymatiques et vont alors moduler les niveaux de seconds messagers, ou ils peuvent être des canaux ioniques qui vont alors moduler l'entrée ou la sortie d'ions dans la cellule (13). À la fin du cycle de signalisation, il y aura hydrolyse du GTP en GDP, inactivation de la protéine G, réassemblage de l'hétérotrimère et détachement du ligand du récepteur (9, 13). La Figure 1 résume les différentes étapes de l'activation de la protéine G décrites ci-dessus.

Les protéines G sont classées en quatre familles selon la similarité de séquences des sous-unités α : la famille G_s , la famille $G_{i/o}$, la famille $G_{q/11}$ et la famille $G_{12/13}$ (15). De façon classique, les récepteurs opioïdes (16-18) et cannabinoïdes (19-22) interagissent avec la famille $G_{\alpha_{i/o}}$. Cette dernière comprend les protéines G dont les sous-unités α sont : α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_{oA} , α_{oB} , α_z , α_{t1} , α_{t2} , et α_{gu} . Les membres de la famille $G_{\alpha_{i/o}}$ inhibent l'effecteur enzymatique adénylate cyclase qui est responsable de la production du second messager adénosine monophosphate cyclique (AMPC). À travers le dimère $G\beta\gamma$, les protéines $G_{\alpha_{i/o}}$ peuvent activer les canaux potassiques de la famille Kir3 ou GIRK (pour *G-protein gated inward rectifying potassium channel*) et peuvent inhiber les canaux calciques de type Ca_v2 (canaux calciques dépendants du voltage) (13). Ces effecteurs sont importants dans la modulation de la douleur par les ligands opioïdes et cannabinoïdes et de plus amples détails seront donnés plus bas (voir sections 1.1.3.1.1.2, 1.1.3.2.1.2 et 1.1.3.2.2.2).

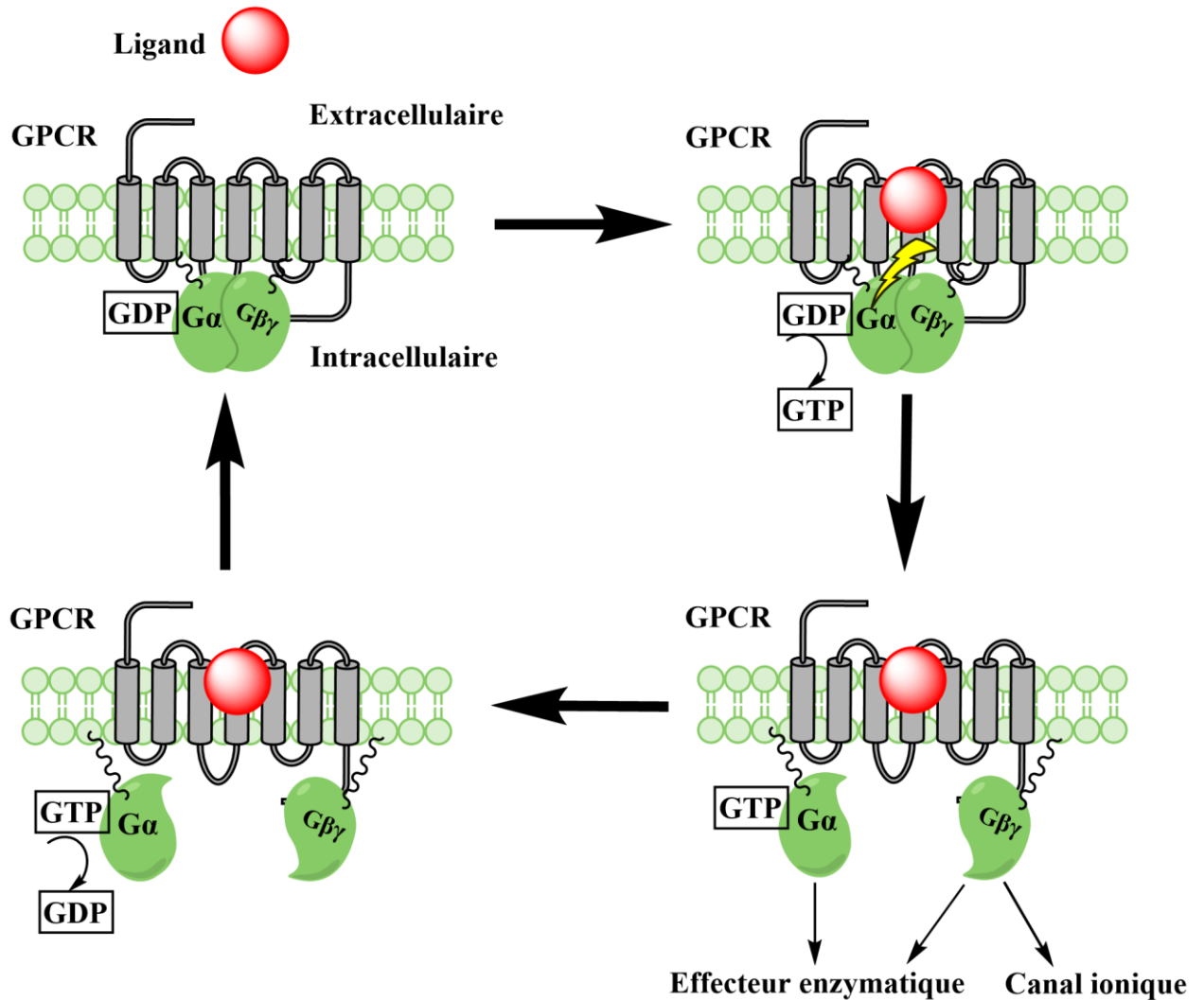


Figure 1. Cycle d'activation de la protéine G. Après liaison d'un ligand (rouge), les GPCR (gris) subissent des changements conformationnels (jaune) qui mènent à l'échange du GDP par du GTP. Cet échange déstabilise le complexe récepteur-protéine G et permet aux sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de se séparer. Elles vont alors aller interagir avec des protéines effectrices enzymatiques ou des canaux ioniques. Le signal se termine par l'hydrolyse du GTP en GDP par $G\alpha$. Les sous-unités $G\beta\gamma$ sont représentés en tant qu'une seule sous-unité pour simplifier la figure)

1.1.1.1.2 Mécanismes de régulation de la réponse des RCPG

En cas d'exposition prolongée ou répétée du récepteur au ligand, des mécanismes de régulation de la signalisation se mettent en place. Ces derniers consistent en la désensibilisation, l'internalisation, le recyclage et la dégradation du récepteur (7, 10, 13). Ce sont des mécanismes essentiels pour empêcher une surstimulation du système en réponse à un stimulus soutenu.

1.1.1.1.2.1 La désensibilisation du récepteur

L'extrémité C-terminale et la boucle ICL3 du RCPG contiennent des résidus sérine et thréonine qui peuvent être phosphorylés par des kinases cytosoliques appelées GRK (*G Protein Coupled Receptor Kinase*). Quatre types de GRK sont responsables de la phosphorylation de la plupart des RCPG à savoir : GRK2, -3, -5 et 6 (23). La phosphorylation du récepteur par les GRK augmente son affinité pour une protéine cytosolique appelée β -arrestine (1 et 2) (7). Cette dernière se lie au récepteur d'abord au niveau de l'extrémité C-terminale (*tail conformation*) puis vient s'insinuer entre les boucles ICL2 et ICL3 (*core conformation*), déplaçant la sous-unité $G\alpha$ qui y était logée (11, 24). Le récepteur est alors désensibilisé et n'est plus capable de signaler à la membrane (Figure 2.A).

1.1.1.1.2.2 L'internalisation du récepteur

Lorsque la β -arrestine est en conformation « *tail* », elle peut faire office de protéine d'échafaudage pour recruter vers le récepteur différentes protéines endocytiques telles que l'AP-2, la clathrine et l'enzyme dynamine (11, 24) (Figure 2.B). La clathrine se polymérise en cages et permet la déformation progressive de la membrane jusqu'à la formation des vésicules d'endocytose (25). Ce phénomène dépend de la présence de la protéine adaptatrice AP-2 qui fait la connexion entre le récepteur, les cages de clathrine et de nombreuses autres protéines accessoires (25). Enfin, lorsque la vésicule de clathrine est achevée, elle est détachée de la membrane via l'action de l'enzyme dynamine qui induit la fission de la vésicule (26). Ceci entraîne la séquestration ou l'internalisation du complexe récepteur-ligand à l'intérieur de la cellule.

1.1.1.1.2.3 Tri post-endocytique du récepteur

Une fois que les vésicules sont internalisées, il y aura désassemblage des cages de clathrine et transport du récepteur vers des compartiments internes, appelés endosomes. Le récepteur peut alors soit subir un recyclage, soit subir une dégradation par les lysosomes (Figure 2.C) (8). Le sort du récepteur dépend de son affinité pour la β -arrestine. Ainsi, si le récepteur a une très haute affinité et forme un complexe stable avec cette dernière, il va être ubiquitiné ce qui va le diriger vers le lysosome pour être dégradé. Si au contraire, le récepteur a une faible affinité avec la β -arrestine, il se dissocie de cette dernière puis sera déphosphorylé et renvoyé vers la membrane, via le recyclage, pour reprendre un nouveau cycle de signalisation, un phénomène appelé « resensibilisation » (8, 27).

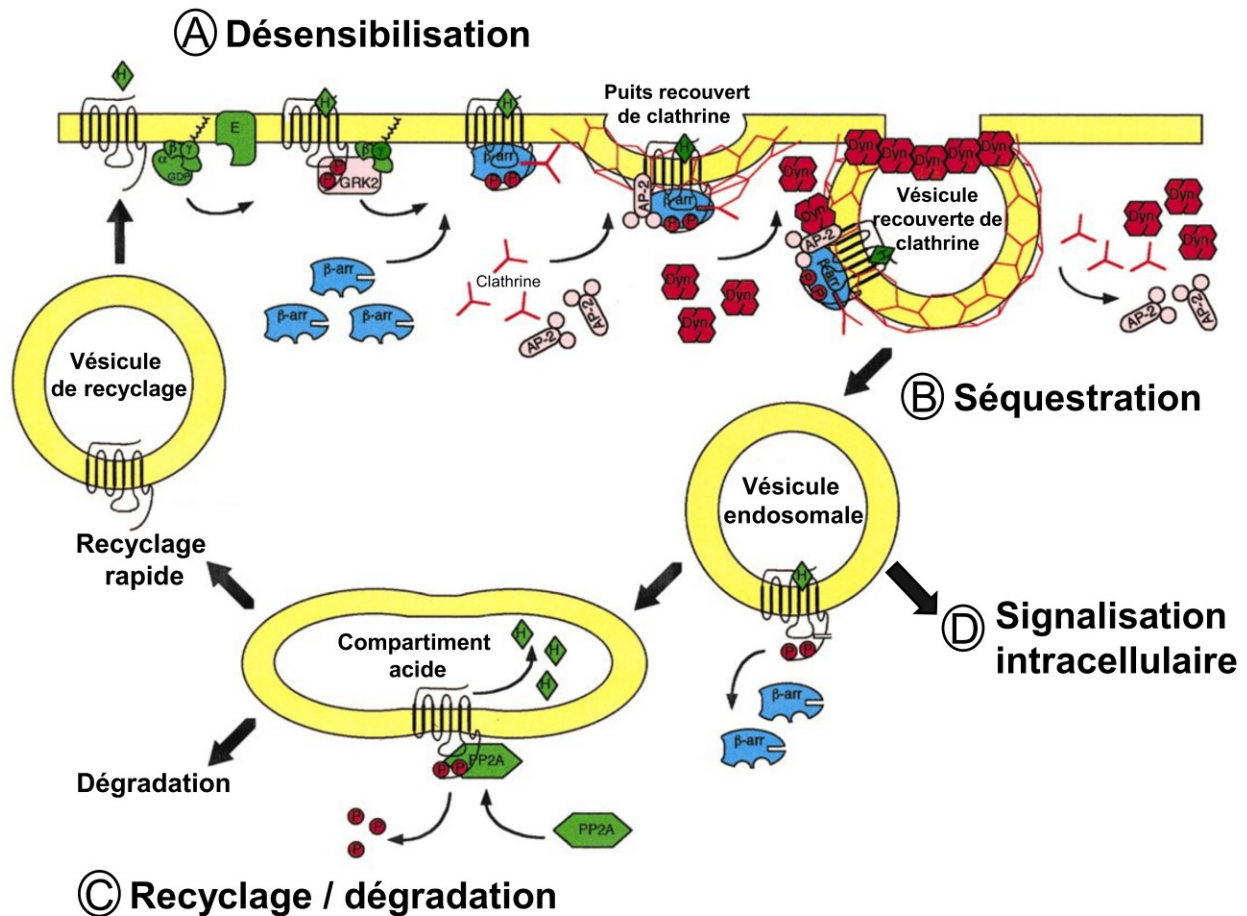


Figure 2. Régulation de l'interaction récepteur-ligand par désensibilisation, internalisation, recyclage ou dégradation du récepteur. Figure modifiée et reproduite avec permission (8).

1.1.1.1.3 Signalisation dépendante des β -arrestines

En plus de son rôle traditionnel dans la désensibilisation du récepteur, la β -arrestine peut initier ses propres voies de signalisation (23). Ce sont les protéines de la voie ERK/MAP kinase qui sont les mieux étudiées et à travers lesquelles la β -arrestine peut moduler plusieurs fonctions cellulaires (10). Plus récemment, la découverte d'une signalisation endosomale des récepteurs à travers les protéines G a été mise en évidence (28)(29) (Figure 2.D). Cette signalisation est dépendante de la liaison de la β -arrestine au récepteur en conformation « tail ». Elle a notamment été démontrée pour les récepteurs opioïdes mu et delta (30, 31). Ces résultats suggèrent que le trafic des RCPG vers les endosomes n'implique pas forcément un arrêt de la signalisation et qu'il y a toujours possibilité d'une signalisation intracellulaire du récepteur.

Enfin, les RCPG peuvent également signaler à partir de différentes organelles subcellulaires. Ainsi, les récepteurs opioïdes peuvent signaler au niveau de l'appareil de Golgi (31) et les récepteurs cannabinoïdes 1 au niveau de la mitochondrie (32). Pour plus d'informations sur cette signalisation compartimentée des RCPG, voir les revues (33, 34).

1.1.2 La douleur

La douleur joue un rôle physiologique crucial pour prévenir le corps de la présence d'une atteinte tissulaire afin d'entamer les mécanismes de guérison nécessaires et afin d'apprendre à éviter les stimuli nociceptifs de l'environnement. Pour ce faire, des neurones sensoriels spécialisés appelés nocicepteurs acheminent le message douloureux depuis le site de l'insulte vers la corne dorsale de la moelle épinière. Le message est ensuite transmis vers le thalamus et le cortex par des neurones afférents secondaires et tertiaires afin de pouvoir percevoir et localiser la sensation de douleur (Figure 3) (35). Les nocicepteurs sont constitués de fibres nerveuses non myélinisées C ou de fibres myélinisées A δ . Les fibres A δ sont principalement des mécanonocicepteurs alors que les fibres C, qui sont les fibres les plus nombreuses, sont des nocicepteurs polymodaux qui répondent à plusieurs stimuli (mécaniques, thermiques et chimiques) (36).

La modulation du message douloureux peut se faire au niveau spinal et au niveau central. En particulier, il existe des contrôles inhibiteurs descendants issus du tronc cérébral qui mettent en jeu des voies noradrénergiques, sérotoninergiques et enképhalinergiques qui s'exercent sur la transmission spinale des messages nociceptifs (37). Il existe aussi des mécanismes locaux de régulation du signal nerveux au niveau spinal qui sont médiés par des interneurones excitateurs ou inhibiteurs (interneurones GABAergiques ou glycinergiques). Pour des revues détaillant la pathophysiologie de la douleur et ces différents mécanismes de régulation, voir (35, 38, 39).

On distingue principalement deux types de douleur : la douleur aiguë et la douleur chronique. Pour les besoins de cette thèse, nous allons brièvement décrire ces deux types de douleur et les traitements pharmacologiques y associés.

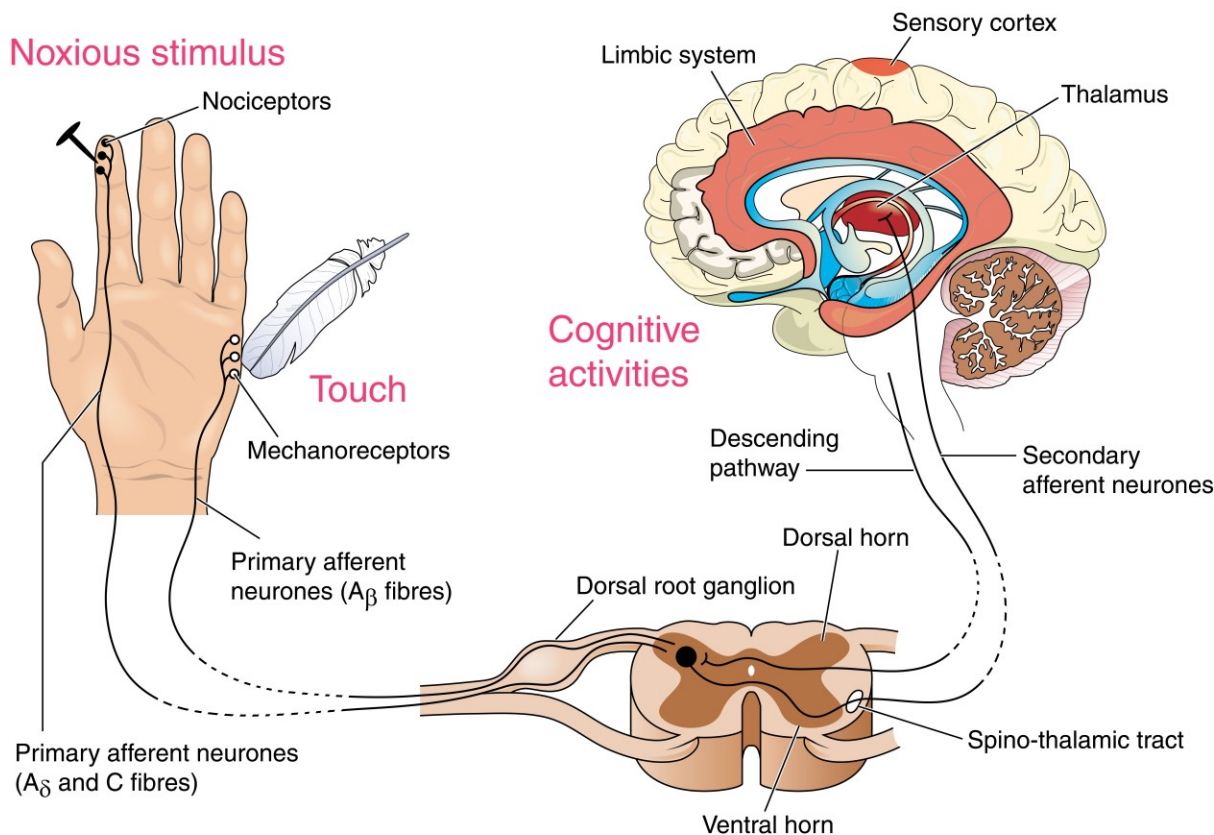


Figure 3. Transmission de la douleur depuis le site de douleur jusqu'à la perception par le cerveau. Figure reproduite avec permission. ©Peter Lamb/123RF.

1.1.2.1 Douleur aiguë et douleur chronique

En situation normale, la douleur est transitoire (< 3 mois) et est alors qualifiée d'« aiguë » (40). Elle peut faire suite à une lésion tissulaire, une inflammation ou une maladie qui sont d'une durée relativement courte (des jours ou des semaines). Quoiqu'il en soit, il importe d'identifier l'origine de la douleur et de la traiter. Ce traitement est essentiellement pharmacologique et repose sur la prise d'analgésiques (ou antalgiques) jusqu'à la disparition des symptômes douloureux (40).

À l'inverse, si la douleur se manifeste de façon prolongée et persiste au-delà de trois mois, elle se développe alors en « douleur chronique ». Elle n'a alors plus de rôle physiologique et n'est plus un symptôme d'une atteinte tissulaire ou d'une maladie, mais devient un problème médical à

part entière (41). La douleur chronique est accompagnée de troubles émotionnels et d'une détérioration des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient (42).

La douleur neuropathique représente 15 à 25% des douleurs chroniques et se caractérise par une lésion ou une maladie affectant le système somato-sensoriel (43, 44). C'est une maladie fréquente qui touche en moyenne 6 à 10% de la population adulte (44). Elle est associée à une très pauvre qualité de vie du patient et se caractérise par la présence d'une douleur spontanée (sensation de brûlure, chocs électriques, souvent au repos), d'allodynie (douleur produite par un stimulus non douloureux), et d'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux). La douleur neuropathique peut être de type périphérique, centrale ou mixte. Ses causes les plus communes sont d'origine traumatique (lésion nerveuse), infectieuse (herpès ou VIH), médicamenteuse (chimiothérapie) ou métabolique (diabète). Il s'agit dans la plupart des cas de dommages aux nerfs périphériques et les neuropathies diabétiques en sont les formes les plus répandues dans la population (45-47). Pour une revue plus détaillée sur cette dernière, voir (48).

Les mécanismes à travers lesquels la douleur neuropathique se développe ne sont pas encore complètement élucidés, mais ils impliquent des mécanismes de sensibilisation centrale et périphérique des neurones sensoriels (49). Il est de plus en plus reconnu qu'une neuroinflammation aberrante au niveau du système nerveux central (SNC) ou périphérique jouerait un rôle majeur dans le développement et le maintien de cette douleur (50). Au niveau spinal, cette neuroinflammation exagérée résulte en particulier de l'activation de cellules gliales, les microglies et les astrocytes, qui sont le type cellulaire le plus abondant du système nerveux (70%) (Figure 4). Dans des conditions physiologiques, ces dernières ont un rôle de maintien de l'homéostasie et de soutien neuronal (51). Par contre, dans des conditions pathologiques telles qu'une atteinte à un nerf périphérique, il y a une activation et une prolifération rapide des microglies dans la corne dorsale où les neurones afférents primaires projettent. Ces dernières vont à leur tour activer les astrocytes et ensemble ils vont libérer des cytokines pro-inflammatoires qui augmentent l'excitabilité des neurones secondaires de la couche I de la corne dorsale de la moelle épinière et diminuent l'activité des interneurons inhibiteurs (GABAergiques ou glycinergiques) dans les couches superficielles, perpétuant ainsi la condition douloureuse (50-53). De plus amples informations sur les mécanismes de douleur neuropathique et de neuroinflammation sont très bien décrites dans les revues récentes (48, 49, 54-57).

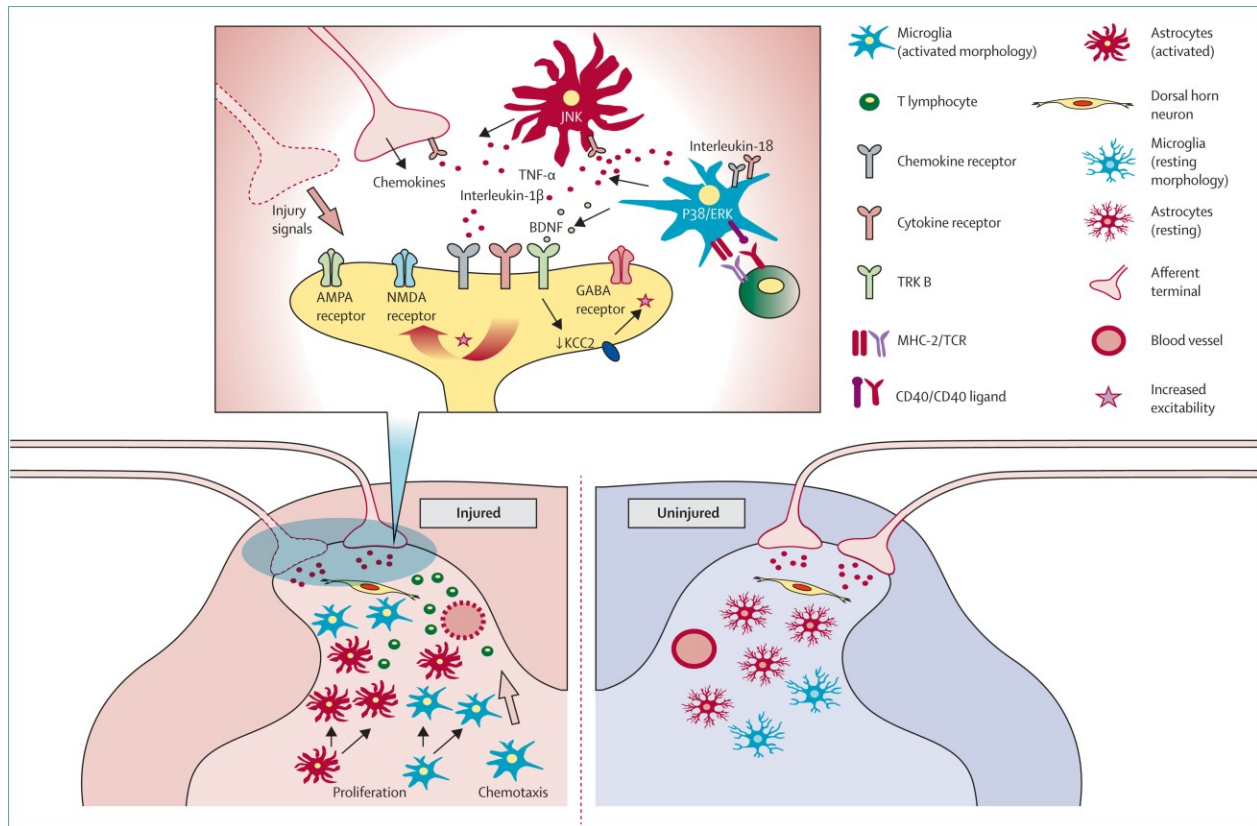


Figure 4. Comparaison de la transmission synaptique entre les neurones sensoriels et les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière en situation physiologique (à droite) et après dommage à un nerf périphérique (à gauche). Figure reproduite avec permission (56).

1.1.2.2 Traitements pharmacologiques

Le traitement pharmacologique des douleurs par excès de nociception fait appel aux antalgiques décrits par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette dernière a défini trois paliers d'utilisation des antalgiques selon l'intensité de la douleur (Figure 5) : palier I (douleurs faibles à modérées) utilisant les antalgiques non opioïdes (acétaminophène ou médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens), palier II (douleurs modérées à sévères) utilisant des opioïdes « faibles » tels que le tramadol ou la codéine, et palier III (douleurs intenses) utilisant des opioïdes « forts » (morphine, hydromorphone, oxycodone, fentanyl ou méthadone). Des médicaments additionnels (adjuvants), qui peuvent augmenter l'efficacité du médicament analgésique choisi, peuvent également être ajoutés.

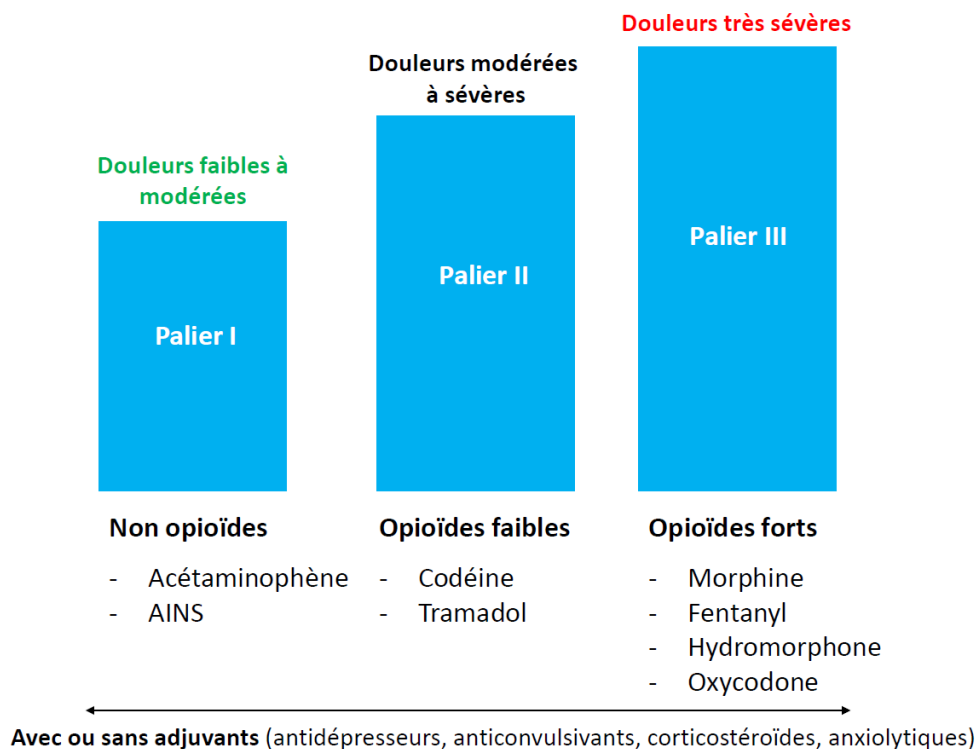


Figure 5. Classification des antalgiques de l'Organisation Mondiale de la Santé selon la sévérité de la douleur. AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Les opioïdes tels que la morphine et ses dérivés sont donc la première ligne de traitement pour les douleurs aiguës sévères, mais ils peuvent aussi être utilisés pour soulager les patients avec des douleurs chroniques qui sont réfractaires à d'autres traitements. Néanmoins, un usage à long terme de ces derniers est associé à un risque d'addiction (ou dépendance), car ils activent le système de la récompense (58). Les opioïdes sont aussi associés à une multitude d'effets indésirables pouvant nuire à une bonne gestion de la douleur du patient et qui seront discutés plus bas (voir section 1.2.3.2).

En ce qui concerne les douleurs neuropathiques, il n'y a pas encore de traitements efficaces et seulement 30 à 40% des patients rapportent un bon soulagement de leur douleur (59). Les traitements utilisés actuellement sont des anticonvulsivants, des antidépresseurs, des antiarythmiques et l'utilisation de certains opioïdes (tels que le tramadol) (60). Dans les modèles précliniques, les cannabinoïdes sont capables de moduler les processus qui contribuent à la neuroinflammation et à la sensibilisation centrale et périphérique (voir section 1.3.4.2). Ceci les rend des alternatives prometteuses pour le soulagement des douleurs neuropathiques (61-65) et de

nombreuses études cliniques sont en train d'évaluer le rôle des cannabinoïdes dans le soulagement de différents types de douleurs neuropathiques (66-69). Pour l'instant, Nabiximols (Sativex®) est le seul médicament à base de cannabis accepté au Canada pour le traitement des douleurs neuropathiques associées à la sclérose en plaques (70). L'utilisation des cannabinoïdes peut néanmoins être associée à des effets secondaires psychoactifs importants tels que la psychose (71) (voir section 1.3.4.1.2) et de plus amples études sur leur sécurité à long terme sont encore nécessaires.

1.1.3 Les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes

Que l'on utilise les agonistes opioïdes ou les cannabinoïdes pour traiter la douleur, ces derniers exercent une grande partie de leurs actions analgésiques à travers les récepteurs opioïdes et cannabinoïdes.

1.1.3.1 Les récepteurs opioïdes

Il existe trois principaux types de récepteurs opioïdes « classiques » : mu ou MOR (*Mu opioid receptor*), delta ou DOR (*Delta Opioid receptor*) et kappa ou KOR (*Kappa opioid receptor*) (72). Ils sont activés par des peptides opioïdes endogènes, mais également par des alcaloïdes naturels et par des composés synthétiques et semi-synthétiques (73). Un quatrième récepteur l'ORL1 (*Opioid Receptor Like 1*) ou récepteur à la nociceptine/orphanine FQ (NOR) a plus tard été découvert par clonage par homologie (74, 75), mais ce dernier n'est pas activé par les mêmes ligands (76, 77) et n'est pas considéré comme un récepteur opioïde typique.

Les opioïdes les plus fréquemment utilisés en clinique pour soulager la douleur agissent sur les récepteurs MOR (78). Pour les besoins de cette thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement à ces récepteurs. Nous allons également brièvement décrire les récepteurs DOR.

1.1.3.1.1 Récepteurs opioïdes Mu

1.1.3.1.1.1 Distribution des récepteurs opioïdes Mu

Le MOR a été cloné pour la première fois en 1993 (79-82). C'est le récepteur opioïde qui est le plus exprimé au niveau du SNC et il a une très forte localisation dans le cerveau le long des structures limbiques, corticales et du mésencéphale (83) (pour une localisation plus détaillée, voir (84)). Il est en particulier exprimé dans les régions impliquées dans la modulation de la douleur

telles que le cortex cérébral, l'hippocampe, l'amygdale, le thalamus, le locus coeruleus, la substance grise périaqueducale (PAG), la moelle rostroventrale (RVM) et les couches superficielles (I et II) de la corne dorsale de la moelle épinière (85-88) (Figure 6).

Cette localisation du MOR explique les effets analgésiques des agonistes de ce récepteur. Cependant, sa localisation au niveau des régions du cerveau impliquées dans la récompense (noyau accumbens du striatum) et dans les émotions ainsi qu'au niveau du tronc cérébral est responsable de l'apparition des effets indésirables de dépression respiratoire, d'obnubilation, d'euphorie et de dépendance psychologique induits par ses agonistes. Enfin, le MOR est également exprimé en périphérie au niveau des cellules immunitaires, des ganglions de la racine dorsale (DRG), du tractus gastro-intestinal (GI), des fibres nerveuses de la peau et du tractus optique (89-92). Cette localisation périphérique est responsable de l'analgésie périphérique des agonistes du MOR, mais également des effets indésirables au niveau du tractus GI (constipation) et du tractus optique (myosis).

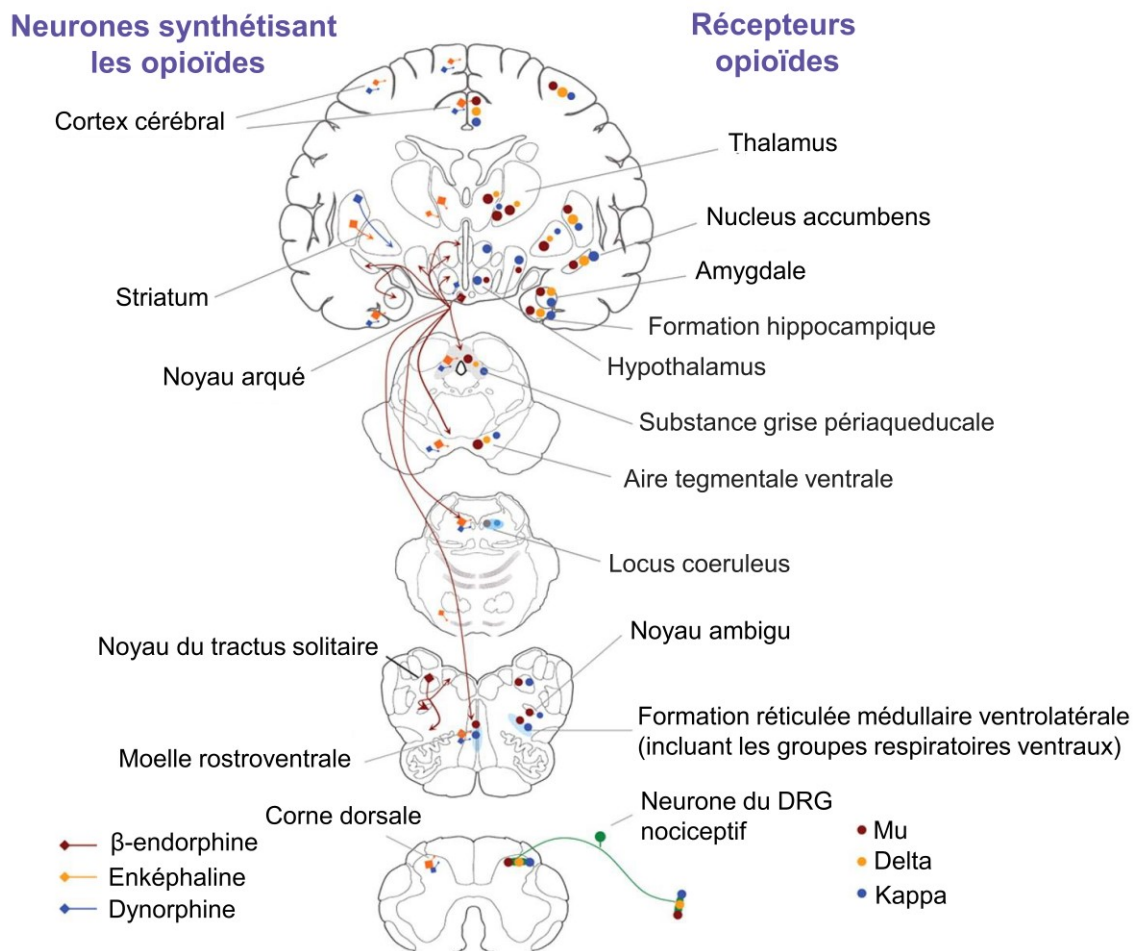


Figure 6. Distribution des récepteurs opioïdes et des principaux ligands endogènes le long des voies de la douleur. Reproduction et traduction avec permission (93).

1.1.3.1.1.2 Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs opioïdes Mu

Suivant l'activation du MOR par un agoniste endogène (tel que l'endorphine) ou exogène (tel que la morphine), il y a séparation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de la protéine G qui vont chacune moduler différents effecteurs intracellulaires impliqués dans la transmission du message douloureux.

Le MOR étant un récepteur couplé à la protéine $G\alpha_{i/o}$, il y aura alors inhibition de la production d'AMPc (94) (Figure 7). Ce dernier joue un rôle de second messenger et va relayer les signaux extracellulaires aux effecteurs intracellulaires. Il active principalement la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), qui régule par phosphorylation l'activité de nombreuses kinases secondaires, facteurs de transcription, récepteurs, enzymes et canaux (95, 96). Par exemple, l'inhibition de l'activité de la PKA par l'activation de $G\alpha_{i/o}$ va mener à une inhibition de l'activité des canaux sodiques dépendants du voltage Na_v et à une réduction de l'excitabilité neuronale (97).

D'un autre côté les sous-unités $G\beta\gamma$ vont aller directement interagir avec les extrémités N- et C-terminale de canaux potassiques Kir3 (canaux potassiques à rectification entrante de type 3) et les ouvrir (Figure 7). Il y aura alors une entrée d'ions potassium (K^+) dans la cellule et une « hyperpolarisation » de la membrane. Ceci mène à une inhibition du tonus neuronal, entre autres au niveau des fibres nerveuses nociceptives (98-100). Les sous-unités $G\beta\gamma$ vont également inhiber l'activation des canaux calciques dépendants du voltage de la famille Ca_v2 (canaux de type N et P/Q) (101, 102) (Figure 7). Ceci se fait par une interaction de $G\beta\gamma$ avec les extrémités N- et C-terminales et avec la boucle ICL1 de la sous-unité α du canal (103). Cette liaison va alors déplacer le seuil auquel les senseurs de voltage s'activent pour ouvrir le canal, réduisant ainsi sa sensibilité à la dépolarisation (104). Comme les canaux calciques de la famille Ca_v2 régulent la libération de neurotransmetteurs au niveau des terminaisons présynaptiques, la modulation de ces derniers par les récepteurs MOR permet d'inhiber la sécrétion de neurotransmetteurs dont ceux impliqués dans la transmission de la douleur tels que le glutamate (101). Un résumé du mode de signalisation du MOR est schématisé dans la Figure 7.

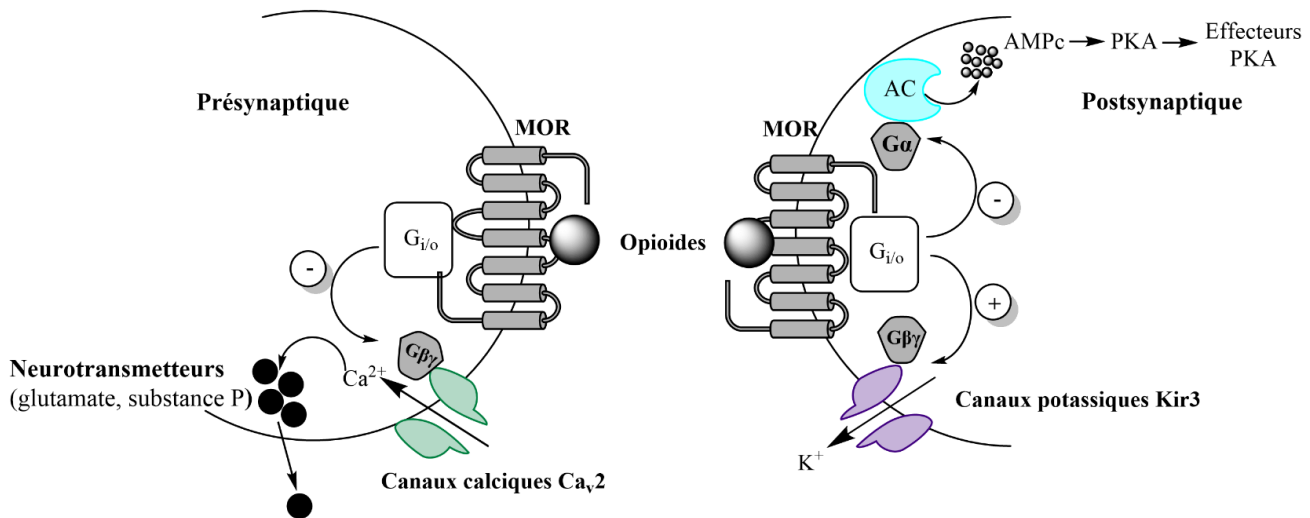


Figure 7. Signalisation des récepteurs opioïdes mu (MOR). L'activation des récepteurs MOR par un ligand opioïde entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par la sous-unité $G\alpha$ menant à une inhibition de la production d'AMPc ; une activation des canaux potassiques Kir3 au niveau postsynaptique par les sous-unités $G\beta\gamma$ entraînant la sortie d'ions potassium K^+ de la cellule ; et une inhibition des canaux calciques Ca_v2 au niveau présynaptique par les sous-unités $G\beta\gamma$ empêchant l'entrée d'ions calcium Ca^{2+} dans la cellule et la libération conséquente de neurotransmetteurs dans la fente synaptique.

La signalisation médiée par les protéines G du MOR peut être régulée à travers les mécanismes de régulation mentionnés dans la section 1.1.1.1.2. Cette modulation fait intervenir un système de kinases qui vont phosphoryler le récepteur dans la région C-terminale, et le recrutement conséquent de β -arrestines au récepteur (83). Nous verrons dans la section 1.2.3 comment cette signalisation et cette régulation des récepteurs MOR sont associées aussi bien à leurs effets analgésiques qu'à leurs effets indésirables.

Enfin, il est à noter qu'une signalisation indépendante des protéines G et des β -arrestines est également possible. Par exemple, à la suite de l'activation du MOR par un ligand tel que la morphine, la calmoduline peut se lier via une interaction protéine-protéine à la 3^{ème} boucle intracellulaire du récepteur et entrer en compétition avec les protéines G pour la liaison au récepteur (105, 106). Cette interaction avec la calmoduline expliquerait comment les récepteurs opioïdes peuvent réguler certaines voies de signalisation du calcium de façon indépendante des protéines G. Le MOR a également une multitude d'autres partenaires signalétiques qui peuvent influencer sa signalisation et son trafic intracellulaire via des interactions protéines-protéines (voir (7, 106) pour plus d'informations).

1.1.3.1.1.3 Les récepteurs opioïdes Mu et la douleur

L'activation des MOR est impliquée dans la modulation de la douleur aiguë sévère chez l'humain et dans des modèles animaux. Ainsi, l'administration systémique de morphine n'a pas d'effets analgésiques chez des souris KO du MOR (MOR^{-/-}) dans les tests de la plaque chauffante et d'immersion de la queue (tail-flick) (107). Ces tests mesurent l'analgésie au niveau spinal (tail-flick qui mesure le réflexe de retrait spinal (108, 109)) et supraspinal (plaque chauffante (109, 110)), et les observations obtenues avec les souris KO démontrent l'implication des récepteurs MOR dans l'analgésie induite par la morphine à ces niveaux. Par ailleurs, les souris KO non traitées avaient des temps de latence plus courts dans les tests de tail-flick et de la plaque chauffante que les souris WT (107). Ceci démontre l'implication des récepteurs MOR dans l'analgésie opioïde endogène, entre autres via l'action d'endomorphines (111). Les effets analgésiques des agonistes spécifiques des récepteurs DOR (DPDPE) et KOR (U50488) n'ont pas été affectés chez les souris KO MOR^{-/-} comparativement aux souris WT (111).

Bien qu'ils soient la première ligne de traitement pour le soulagement des douleurs aiguës modérées à sévères, l'utilisation des agonistes du MOR pour le soulagement des douleurs chroniques non cancéreuses, telles que les douleurs neuropathiques, est un sujet controversé. En effet, l'efficacité analgésique des opioïdes forts tels que la morphine, le fentanyl ou l'oxycodone, fait face à des incertitudes considérables. Plusieurs essais cliniques étudiant l'efficacité et l'innocuité de ces derniers ne sont pas en faveur de leur utilisation pour les douleurs chroniques neuropathiques (112). Ces observations ont relégué les opioïdes forts en tant que troisième ligne de traitement pour ces types de douleur, en grande partie à cause de préoccupations de sécurité sur l'utilisation prolongée de ces derniers (113). À l'inverse, les opioïdes faibles tels que le tramadol ont démontré une efficacité analgésique modérée et sont utilisés en tant que deuxième ligne de traitement, dans le même groupe que la lidocaïne et la capsaïcine (113).

La recherche d'alternatives thérapeutiques pour le traitement de ces douleurs chroniques est en plein essor et des candidats prometteurs tels que les agonistes cannabinoïdes (voir section 1.3.4.2), les agonistes biaisés du MOR (voir section 1.2.4) ou encore les agonistes du DOR sont en train d'être étudiés.

1.1.3.1.2 Récepteur opioïdes delta

1.1.3.1.2.1 Distribution des récepteurs opioïdes delta

Les DOR sont les premiers récepteurs opioïdes à avoir été clonés en 1992 (114, 115). Alors que les MOR sont largement distribués dans le cerveau, les DOR sont surtout exprimés dans des régions restreintes du prosencéphale, avec des densités élevées dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral, l'amygdale, le nucleus accumbens et le striatum (pour une localisation plus détaillée, voir (84)). Cette localisation explique le fait que les agonistes de ce récepteur produisent moins d'effets indésirables que les agonistes du MOR, en particulier ceux de dépression respiratoire (116-119). Les DOR jouent un rôle important dans la régulation de la douleur et sont largement exprimés tout le long des voies de la douleur : dans les terminaisons des afférents primaires, les neurones du DRG, la moelle épinière et dans des structures importantes des voies ascendantes et descendantes de la douleur (telles que la PAG et la RVM) (120-123) (Figure 6). Ils sont également exprimés en périphérie (124-126).

Contrairement au MOR, le DOR a une expression majoritairement intracellulaire (83). C'est un récepteur dynamique qui peut être acheminé à la membrane plasmique à la suite de conditions spécifiques telles que des lésions tissulaires avec une inflammation chronique (127). Cette localisation du DOR dans les compartiments intracellulaires et la possibilité d'augmenter son expression à la surface cellulaire sous des conditions inflammatoires et neuropathiques font de ce récepteur une cible attrayante pour le traitement des douleurs chroniques.

1.1.3.1.2.2 Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs opioïdes delta

Les mécanismes de transduction des signaux des DOR sont similaires à ceux des MOR et sont schématisés dans la Figure 7.

1.1.3.1.2.3 Les récepteurs opioïdes delta et la douleur

Comparativement aux agonistes du MOR, les agonistes du DOR ont un effet analgésique modeste dans les tests de douleur aiguë (plaque chauffante, tail-flick) chez les animaux sains, et ce, quel que soit leur mode d'administration (122). En revanche, la puissance et l'efficacité anti-nociceptive des agonistes du DOR dans des modèles de douleurs chroniques, en particulier neuropathiques et inflammatoires, sont supérieures à celles des agonistes du MOR (122). Ceci

serait dû à l'augmentation des niveaux d'expression membranaire du DOR par les conditions douloureuses chroniques (122).

Il n'y a actuellement pas d'agonistes du DOR approuvés pour une pratique en clinique. En effet, bien que ces derniers semblent produire moins d'effets indésirables que les agonistes du MOR (tels que la dépression respiratoire), l'activation des DOR peut causer des crises épileptiques et présente un très grand potentiel de tolérance analgésique (128, 129).

1.1.3.2 Les récepteurs cannabinoïdes

Deux RCPG sont considérés comme étant les deux récepteurs cannabinoïdes majeurs : ce sont les récepteurs cannabinoïdes 1 (CB1) et 2 (CB2). Ces derniers présentent 44% d'homologie entre eux et diffèrent principalement au niveau des sites de liaison des ligands (130). Ces deux récepteurs sont couplés à la protéine $G\alpha_{i/o}$ (19-22, 131).

Il est à noter que les cannabinoïdes peuvent toutefois moduler d'autres RCPG tels que les récepteurs GPR55 (*G-protein-coupled receptor 55*), GPR35, GPR119 ou $\alpha 2$ -adrenergiques qui peuvent aussi être impliqués dans la régulation de la douleur (132-135). Ils peuvent par ailleurs réguler d'autres familles de récepteurs tel que nous verrons dans la section 1.3.2.4. Pour les besoins de cette thèse, nous allons nous concentrer, dans ce qui suit, sur les récepteurs CB1 et CB2.

1.1.3.2.1 Récepteurs cannabinoïdes 1

1.1.3.2.1.1 Distribution des récepteurs cannabinoïdes 1

Le récepteur cannabinoïde 1 (CB1) est le premier récepteur cannabinoïde à avoir été mis en évidence dans les années 1990 (21, 136, 137). Il est fortement exprimé dans le SNC et est l'un des RCPG les plus abondants (voire le plus abondant) dans le cerveau des mammifères (138, 139). Il est en particulier exprimé dans les régions responsables des effets psychotropes des cannabinoïdes (140), mais également tout le long des voies de la douleur incluant les couches superficielles de la moelle épinière, les ganglions de la racine dorsale (DRG), les fibres nociceptives afférentes primaires A δ et C, le cortex cingulaire antérieur, l'amygdale, le thalamus, la substance grise périaqueducule (PAG) et la moelle rostroventrale (RVM) (138, 141). Enfin, le récepteur CB1 est aussi exprimé dans certains tissus périphériques et sur les astrocytes (138, 142).

1.1.3.2.1.2 Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs cannabinoïdes 1

L'activation des récepteurs cannabinoïdes CB1 inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (AC) par l'intermédiaire d'une protéine $G\alpha_{i/o}$ (19-21, 143) et permet l'activation des voies MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) telles que p44/42, p38, ERK1/2 (*extracellular signal-related protein kinase*) et c-Jun N-terminal kinase (JNK)(144, 145). Ces voies peuvent entraîner l'activation de facteurs de transcription et ainsi réguler l'expression de plusieurs gènes. Tout comme les récepteurs opioïdes, l'activation des récepteurs CB1 est également associée à une régulation négative des canaux calciques de type Ca_v2 (146, 147) et à une régulation positive des canaux potassiques de la rectification entrante GIRK (143). Ces mécanismes permettent ultimement de diminuer la transmission de l'influx douloureux tel que décrit plus haut (section 1.1.3.1.1.2).

1.1.3.2.1.3 Récepteurs cannabinoïdes 1 et douleur

Les agonistes du récepteur CB1 ont des effets analgésiques dans plusieurs modèles de douleurs précliniques, dont des modèles de douleur aiguë (148, 149), de douleur inflammatoire (150-152), de douleur cancéreuse (153) et de douleur neuropathique (151, 154-158) (voir section 1.3.4.2 pour plus de détails). Néanmoins, la principale restriction avec l'utilisation des agonistes CB1 est les effets indésirables psychoactifs induits par ce récepteur (159-161) et qui sont similaires à ceux de la consommation de marijuana(162). Dans les modèles animaux, le cannabis et le THC induisent, à travers le récepteur CB1, des effets comportementaux dénommés « tétrade » qui consistent en de la catalepsie (attitude figée), de l'akinésie (rareté de mouvement), de l'hypothermie et de l'analgésie (154, 163).

1.1.3.2.2 Récepteurs cannabinoïdes 2

1.1.3.2.2.1 Distribution des récepteurs cannabinoïdes 2

Après le récepteur CB1, c'était au tour du récepteur cannabinoïde 2 (CB2) d'être identifié par clonage par homologie (130). Contrairement au récepteur CB1, l'expression du CB2 dans les tissus neuronaux est très controversée et il a longtemps été cru qu'il était un récepteur périphérique qui était uniquement exprimé au niveau du système immunitaire (rate, thymus et cellules immunitaires) et des tissus périphériques. Des études plus récentes suggèrent néanmoins qu'il existe une expression du récepteur CB2 dans les cerveaux en conditions physiologiques, mais à

des niveaux qui seraient à la limite de la détection des méthodes conventionnelles (164). Son expression a par ailleurs été démontrée au niveau des régions du cerveau reliées à la modulation de la douleur telles que la PAG et le cortex, au niveau des cellules gliales et également au niveau des DRG et de la corne dorsale de la moelle épinière (165). Quoiqu'il en soit, une observation qui fait l'unanimité dans la communauté scientifique est que le récepteur CB2 a une expression qui est induite par des lésions et des conditions inflammatoires en particulier dans les microglies et le DRG (au niveau des corps cellulaires des fibres afférentes) (164, 166-169).

De par sa localisation, le récepteur CB2 n'est pas impliqué dans les effets psychotropes des cannabinoïdes (154, 170-172). Ainsi, l'injection systémique de l'agoniste CB2 AM1241 (3.3 mg/kg) n'a pas produit les effets sur le SNC d'hypothermie, de catalepsie ou d'inhibition de l'activité ambulatoire ; alors que l'injection d'une même dose de l'agoniste mixte CB1/CB2 WIN 55,212-2 a induit ces effets (171). La localisation du récepteur CB2 explique également ses actions anti-inflammatoires, analgésiques et d'immunomodulatrices (153, 173-176).

1.1.3.2.2 Mécanismes de transduction des signaux des récepteurs cannabinoïdes 2

Le récepteur CB2 est capable d'assurer ses actions anti-inflammatoires et immunomodulatrices à travers son couplage avec la protéine $G\alpha_{i/o}$ (22). Similairement au récepteur CB1, ce couplage assure l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) (22) et l'activation de voies MAPK lui permettant de réguler la transcription de plusieurs gènes (177) (178). À titre d'exemple, l'un des mécanismes à travers lequel l'agoniste spécifique du CB2 AM1241 a modulé l'activation des microglies au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière était en diminuant l'expression membranaire des récepteurs purinergiques P2Y12 et P2Y13 dont les niveaux sont augmentés après une lésion du nerf sciatique chez des rats (179). Cette inhibition reposait sur la modulation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B par l'agoniste CB2 et a induit un effet anti-hyperalgésique. Enfin, les propriétés anti-inflammatoires des cannabinoïdes sur les cellules gliales impliquent l'inhibition de la transcription de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires via le facteur de transcription nucléaire NF- κ B (180).

Contrairement aux récepteurs CB1, les récepteurs CB2 ne semblent pas moduler l'activité des canaux calciques de type L, N et P/Q et des canaux potassiques GIRK (143).

1.1.3.2.2.3 Récepteurs cannabinoïdes 2 et douleur

Le récepteur CB2 a des propriétés analgésiques dans différents modèles de douleurs aiguës (171, 172, 181), postopératoires (170), cancéreuses (178), neuropathiques (154, 155, 182, 183) et inflammatoires (154, 184).

Comme mentionné plus haut, il a été observé que l'expression de ce récepteur était augmentée dans les conditions neuroinflammatoires et neuropathiques en particulier au niveau des microglies où ils joueraient un rôle important pour la modulation de leur activation en empêchant une réponse exacerbée de ces dernières (167-169, 185). Ainsi, l'administration d'agonistes CB2, que ça soit de façon systémique, périphérique ou spinale était en mesure de renverser l'hypersensibilité mécanique et thermique associée à l'inflammation ou la neuropathie (166, 182). Les agonistes CB2 ont également diminué l'activation dans la corne dorsale des astrocytes et des microglies, ainsi que les niveaux des facteurs pro-inflammatoires (168, 170, 186-188). De plus amples détails sur le rôle du CB2 dans les mécanismes d'analgésie des cannabinoïdes sont donnés à la section 1.3.4.2.

1.2 Les opioïdes et leurs effets indésirables

1.2.1 Brève introduction

L'opium est le latex qui provient de la plante *Papaver somniferum* et qui contient de nombreux alcaloïdes naturels dont la morphine, la codéine, la thébaïne, la noscapine et la papavérine (73). Bien qu'ils soient des analgésiques très efficaces, l'histoire des opioïdes tels que la morphine et ses dérivés (héroïne) est également marquée par des épidémies d'abus d'opioïdes (189). La « crise des surdoses d'opioïdes » que nous connaissons actuellement est la troisième et de la plus importante épidémie d'opioïdes depuis la mise en vente de l'opium et de la morphine au 19^e siècle (189, 190). De plus, les opioïdes induisent d'autres effets indésirables qui compliquent la gestion appropriée de la douleur (voir section 1.2.3.2). Ces données soulignent l'importance de développer des agonistes opioïdes plus sécuritaires et dépourvus d'effets secondaires.

1.2.2 Les ligands opioïdes

Le système opioïde endogène comprend quatre gènes précurseurs de peptides opioïdes endogènes codant pour les enképhalines (dérivées des précurseurs proenképhalines) (191, 192), les dynorphines (dérivés des prodynorphines), les β -endorphines (dérivées de la proopiomélanocortine), et les nociceptines ou orphanines FQ (N/OFQ) (dérivées de la préproN/OFQ). Ces différents peptides endogènes ont des affinités différentes pour les différents récepteurs opioïdes (191). De nouveaux peptides opioïdes endogènes ont plus tard été découverts tels que l'endomorphine-1 et -2 (193) qui ont une affinité et une sélectivité exceptionnellement élevée pour le MOR (191).

Les opioïdes exogènes peuvent être divisés en fonction de leur structure chimique en composés naturels (morphine, codéine, thébaine, noscapine, papavérine), synthétiques ou semi-synthétiques (dérivés de la thébaine) (73, 194).

Dans le cadre de nos recherches, nous nous sommes intéressés aux ligands du récepteur MOR. Ces derniers peuvent être classés en fonction de leur efficacité à activer le MOR en agonistes complets, agonistes partiels et antagonistes. Ainsi, un agoniste complet (tel que le DAMGO) est un agoniste qui a une bonne affinité et une efficacité maximale pour le récepteur ; un antagoniste (tel que la naloxone) a de l'affinité, mais pas d'efficacité sur le récepteur ; et un agoniste partiel (tel que la buprénorphine) est un ligand qui a de l'affinité pour le récepteur, mais une efficacité partielle. Par ailleurs, les opioïdes peuvent également être classés en fonction de leur sélectivité pour le récepteur MOR. Ainsi, des ligands tels que le DAMGO ou l'endomorphine-1 (voir sections 1.2.2.1.2 et 1.2.2.1.4) sont fortement sélectifs pour le MOR, mais d'autres ligands peuvent aussi agir sur d'autres récepteurs en tant qu'agoniste (tramadol, voir section 1.2.2.1.10) ou en tant qu'antagoniste (buprénorphine, voir section 1.2.2.1.8). Nous allons très brièvement décrire dans ce qui suit les différents agonistes du MOR utilisés dans nos travaux.

1.2.2.1.1 Morphine

La morphine est le principal élément actif de l'opium, elle tient son nom de « morphée », dieu du sommeil. Elle est l'agoniste prototype du MOR et est indiquée dans le soulagement des douleurs modérées à sévères. La morphine est l'opioïde de référence pour comparer l'analgésie entre opioïdes (73).

1.2.2.1.2 Endomorphine-1

L'endomorphine-1 est l'agoniste qui a la plus grande affinité et sélectivité pour le MOR de tous les opioïdes peptidiques de mammifères. Dans des modèles de douleur aiguë et neuropathique, cette dernière a produit une analgésie avec une puissance similaire ou supérieure à celle de la morphine et d'autres opioïdes (195-197). De plus, l'endomorphine-1 engendre moins d'effets indésirables que ces derniers (198, 199). Néanmoins, sa faible perméabilité membranaire et sa forte susceptibilité à la dégradation enzymatique restreignent son utilisation en tant qu'agent analgésique (199).

1.2.2.1.3 Met-enképhaline

La met-enképhaline a une affinité égale à celle de la morphine pour les MOR et supérieure pour les DOR (200, 201). Elle exerce à travers ces deux récepteurs un effet analgésique dans les voies de contrôles descendantes de la douleur (73) et semble avoir une plus grande efficacité analgésique que la morphine (202). Cependant, tout comme l'endomorphine-1, la met-enképhaline est rapidement sujette à une dégradation enzymatique par des neuropeptidases (moins d'une minute après son injection i.c.v dans le cerveau de rat), limitant ainsi son utilisation en clinique (201).

1.2.2.1.4 DAMGO

Le DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin) est un agoniste synthétique analogue de la met-enképhaline. Il est très efficace avec une très haute sélectivité pour le MOR (500 fois supérieure à celle du DOR et du KOR) (203).

1.2.2.1.5 Oxycodone

L'oxycodone est un opioïde semi-synthétique dérivé de l'opioïde naturel thébaine. C'est un agoniste des récepteurs MOR et KOR, et est un puissant analgésique avec une biodisponibilité élevée.

1.2.2.1.6 Fentanyl

Le fentanyl est le plus vieux composé synthétique dérivé de la pipéridine. C'est un analgésique très efficace qui interagit principalement avec le MOR et qui est à peu près 80 fois plus puissant que la morphine (194).

1.2.2.1.7 Lopéramide

Le lopéramide est un opioïde synthétique dérivé de la pipéridine (204). Il a une très faible absorption orale et traverse très peu la barrière hématoencéphalique ; il est donc dépourvu des effets centraux typiques des autres opioïdes (205). C'est un puissant agoniste du récepteur MOR (206), mais il est largement utilisé pour le traitement de diarrhées plutôt que de la douleur. En effet, ce dernier a des effets analgésiques faibles, mais son action puissante au niveau des récepteurs MOR de l'intestin permet de réduire la motilité intestinale (207).

1.2.2.1.8 Buprénorphine

La buprénorphine est un composé semi-synthétique dérivé de la thébaïne. Elle a une haute affinité pour le MOR, mais une faible efficacité engendrant un effet partiel. C'est également un antagoniste du récepteur KOR, la rendant un opioïde qui est utilisé en tant qu'analgésique, mais également dans les thérapies de remplacement des opioïdes (189, 194).

1.2.2.1.9 Meptazinol

Le meptazinol est un analgésique synthétique utilisé principalement au Royaume-Uni et en Europe pour traiter les douleurs modérées à sévères de type postopératoire, obstétrique et colique néphrétique (208, 209). Il a été développé dans les années 1970 pour être un opioïde avec un profil d'effets indésirables amélioré (209-211), mais son utilisation est associée à une plus grande incidence de nausées et vomissements (209, 212, 213). D'un point de vue pharmacologique, c'est un agoniste partiel avec une très haute affinité pour le MOR (214, 215). Son effet analgésique est également soutenu par des effets cholinergiques centraux (216).

1.2.2.1.10 Tramadol

Le tramadol est un analogue synthétique de la codéine. C'est un opioïde atypique qui a une activité mixte : c'est un agoniste partiel au MOR qui exerce des effets centraux additionnels au niveau des récepteurs catécholamine et sérotoninergiques en inhibant la recapture de sérotonine et de noradrénaline (189, 194). Le tramadol est considéré comme un opioïde à faible activité et il est recommandé pour le traitement de douleurs faibles à modérées (189). Il aurait également une utilité dans le traitement des symptômes de sevrage aux opioïdes similaire à celle de la buprénorphine (217).

Le tableau 1 ci-dessous résume les informations décrites plus haut sur les différents agonistes MOR de l'étude.

Opiöide	Origine	Activité sur le MOR	Activité sur d'autres récepteurs
Morphine	Naturelle (opium)	Agoniste de référence	Agoniste faible du DOR Agoniste faible du KOR Agoniste du MRGPRX2
Endomorphine-1	Peptide endogène	Forte affinité et selectivité	
Met-enképhaline	Peptide endogène	Puissant agoniste : Affinité égale à celle de la morphine	Puissant agoniste du DOR: Affinité supérieure à la morphine
DAMGO	Synthétique (analogue de met-enképhaline)	Agoniste complet et très haute selectivité (500 fois supérieure à celle du DOR et du KOR)	
Oxycodone	Semi-synthétique (dérivé de thébaine)	Puissant agoniste	Agoniste du KOR
Fentanyl	Synthétique (dérivé de pipéridine)	80 fois plus puissant que la morphine	Agoniste faible du DOR
Lopéramide	Synthétique (dérivé de pipéridine)	Puissant agoniste	
Buprénorphine	Semi-synthétique (dérivé de thébaine)	Agoniste partiel Haute affinité	Antagoniste du KOR
Meptazinol	Synthétique	Agoniste partiel Haute affinité	Activité cholinergique
Tramadol	Synthétique (analogue de codéine)	Agoniste partiel	Inhibiteur du recaptage de la norépinéphrine et de la sérotonine

Tableau 1. Liste et caractéristiques des ligands du MOR utilisés dans notre étude.

1.2.3 Signalisation du MOR en relation avec son analgésie et ses effets indésirables

Les opioïdes peuvent être administrés par différentes voies et peuvent avoir une action centrale, spinale et périphérique. Pour les besoins de cette thèse, nous allons très brièvement décrire comment les voies de signalisation activées par les opioïdes induisent leurs effets analgésiques. Nous allons par la suite nous concentrer sur la relation entre ces voies de signalisation et les effets indésirables des opioïdes.

1.2.3.1 Mécanismes d'action d'analgésie

1.2.3.1.1 Action centrale

Un mécanisme majeur d'action central des opioïdes passe à travers l'activation des récepteurs opioïdes au niveau du mésencéphale, en particulier de la substance grise périaqueducale (PAG) et des voies descendantes inhibitrices issues de la moelle rostroventromédiale (RVM) pour inhiber l'excitabilité des neurones nociceptifs de la corne dorsale de la moelle épinière (73, 218-220). Ceci se fait via une inhibition de cellules « *on* » qui facilitent la transmission de l'information nociceptive depuis la moelle épinière, et une désinhibition des cellules « *off* » qui inhibent cette transmission. Pour plus de détails, voir la revue (221).

1.2.3.1.2 Action spinale

La moelle épinière est un site important des effets analgésiques des opioïdes. En effet, l'inhibition de la transmission douloureuse suivant une injection intrathécale et épidurale d'opioïdes a été démontrée aussi bien chez les animaux que chez les humains (222-227). Les récepteurs opioïdes, et les MOR de façon prédominante, sont retrouvés en grandes concentrations dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière. Ils sont plus spécifiquement exprimés au niveau des fibres afférentes présynaptiques, d'interneurones et des neurones de projection post-synaptiques (228). La stimulation de ces récepteurs permet d'inhiber la transmission du message douloureux à travers la moelle épinière par un mécanisme d'action majoritairement présynaptique en inhibant la libération de neurotransmetteurs pronociceptifs tels que le glutamate, la substance P et le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) par les fibres afférentes primaires C et A δ . Ceci se fait à travers l'inhibition des canaux calciques Ca_v2 par les sous-unités G $\beta\gamma$ (Figure 7) (101). Un mécanisme d'action postsynaptique est également possible via l'activation des canaux potassiques Kir3 par G $\beta\gamma$ et hyperpolarisation du deuxième neurone de la voie de la douleur (98) (Figure 7). L'inhibition de l'AC par la sous-unité G $\alpha_{i/o}$ aura également pour conséquence d'inhiber l'activité de la PKA qui, lorsqu'activée, phosphoryle les canaux sodiques (parmi d'autres) permettant l'entrée d'ions sodium dans la cellule et sa dépolarisation (97). L'inhibition de la PKA par les opioïdes va donc mener à une diminution de l'excitabilité du neurone sensoriel et donc à une diminution de la transmission des impulsions nociceptives.

1.2.3.1.3 Action périphérique

Les récepteurs opioïdes sont synthétisés au niveau du DRG puis sont transportés vers les terminaisons présynaptiques des neurones afférents primaires au niveau de la corne dorsale, mais ils sont également transportés vers les terminaisons périphériques où les peptides opioïdes endogènes vont activer ces récepteurs. Cette activation va mener à une diminution de l'excitabilité et de la fréquence de décharge du neurone afférent. Ceci se fait par activation des canaux potassiques Kir3 et par inhibition de canaux calciques Ca_v2 ce qui va inhiber la libération de composés pronociceptifs (tels que la substance P) à partir des terminaisons périphériques (229-231). Par ailleurs, les cellules immunitaires périphériques, en particulier les macrophages, expriment également des récepteurs opioïdes. L'activation de ces derniers peut mener à une analgésie (232, 233) et à une diminution de la synthèse ou de la libération de cytokines et d'interleukines pro-inflammatoires (73). Pour plus de détails sur ces mécanismes, voir (234, 235).

1.2.3.2 Effets indésirables des opioïdes

L'activation des récepteurs opioïdes produit des effets indésirables qui varient selon le type de récepteur stimulé ou de l'agoniste utilisé. En clinique, les effets indésirables les plus fréquemment associés à un traitement aux opioïdes sont la dépression respiratoire, la sédation, la constipation, les nausées et vomissements et l'euphorie. L'usage répété de ces derniers est également associé au développement de tolérance analgésique, d'hyperalgésie et de dépendance physique et psychologique (236-238). Ces effets indésirables sont médiés principalement par l'activation des récepteurs de type MOR. En effet, de nombreuses études génétiques par KO ont démontré l'implication des MOR dans les effets respiratoires et gastro-intestinaux induits par les opioïdes, qui sont parmi ceux qui représentent le plus grand défi en clinique (111, 239-241). Ainsi, l'administration de morphine à une dose létale chez des souris sauvages n'a pas causé de morts par dépression respiratoire chez les souris KO MOR^{-/-} (111). De même, l'injection systémique de morphine a significativement inhibé le transit gastro-intestinal (GI) chez les souris sauvages, mais pas chez le souris KO (241).

Chacun des effets indésirables des agonistes du MOR est médié par des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes. Nous allons discuter dans ce qui suit des mécanismes impliqués dans les effets indésirables les plus fréquents des opioïdes.

1.2.3.2.1 La dépression respiratoire

La dépression respiratoire est la cause la plus fréquente de mort par surdose d'opioïde (242). Elle implique une diminution dose-dépendante de la réponse des centres respiratoires aux stimuli hypoxémiques (faible taux d'oxygène dans le sang) et hypercapniques (volume de dioxyde de carbone dans le sang plus élevé que la normale). Cette inhibition de l'activité respiratoire est principalement médiée par l'activation des MOR au niveau des centres respiratoires du tronc cérébral en particulier au niveau des neurones du complexe de pré-Bötzing (PB) et du noyau Kölliker-Fuse (KF) (243). Ceci se fait à travers une signalisation médiée par la protéine G. En particulier, l'activation des canaux Kir3 par les sous-unités $G\beta\gamma$ mène à une hyperpolarisation et donc à une inhibition des neurones du PB et du KF (244, 245). Un mécanisme présynaptique au niveau du PB via inhibition des canaux Ca_v2 a également été suggéré (246).

Il a longtemps été cru que la β -arrestine 2 était largement impliquée dans le développement de la dépression respiratoire. Cette hypothèse a été formulée après qu'une étude de KO de β -arrestine 2 ait rapporté que les taux de dépression respiratoire induite par la morphine étaient grandement réduits chez les souris KO (247). Cependant, des études récentes de KO de β -arrestine 2 réalisées dans trois laboratoires indépendants n'ont pas pu reproduire ces observations (248). De plus, un modèle génétique utilisant le knock-in de récepteurs MOR dont tous les sites de phosphorylation de la région C-terminale ont été mutés en Alanine (11S/T-A), a rapporté que les souris transgéniques exhibaient une plus grande dépression respiratoire que les souris WT (249). Or, dans ce modèle, les MOR ne sont pas capables d'être phosphorylés et ne peuvent donc pas interagir avec la β -arrestine 2. Ensemble, ces études démontrent que, contrairement à l'hypothèse initiale, la β -arrestine 2 ne serait pas essentielle pour le développement de la dépression respiratoire induite par les opioïdes.

1.2.3.2.2 La constipation

La constipation est l'effet indésirable GI le plus fréquent des opioïdes et est très problématique lors de leur usage chronique puisqu'il n'y a pas de tolérance qui se développe pour cet effet indésirable (250). Elle est médiée par des MOR localisés dans les corps cellulaires neuronaux et les fibres nerveuses des plexus du tube digestif. Leur activation mène à l'activation des canaux Kir3 et l'inhibition des canaux Ca_v par les sous-unités $G\beta\gamma$. Ceci mène à l'augmentation

du tonus musculaire de repos (le muscle reste tonique lorsqu'il devrait se relâcher), inhibe la motilité et la propulsion intestinale et réduit la sécrétion d'ions chlorure Cl^- dans la lumière de l'intestin (l'eau suit le mouvement de ces ions vers la lumière) (236, 251).

Tout comme pour la dépression respiratoire, l'implication des β -arrestine 2 dans les effets GI des opioïdes a également été suggérée suivant les études initiales de KO mentionnées plus haut (247). Cependant, des études plus récentes ont encore une fois montré que la morphine et le fentanyl entraînaient de la constipation comparable aux animaux WT que ça soit chez des KO β -arrestine 2 (248, 252) ou chez les souris exprimant les MOR mutés 11S/T-A (249).

La constipation est donc induite par des mécanismes dépendants de la protéine G, mais sa persistance dans le temps (absence de développement de tolérance après usage prolongée d'opioïdes) elle, est médiée par des mécanismes dépendants de la β -arrestine 2 (253). En effet, alors que les muscles lisses du colon de souris WT ne développent pas de tolérance à des doses répétées de morphine, ceux de souris KO en β -arrestine 2 le font. Ceci suggère un rôle crucial de la β -arrestine 2 pour dans la persistance de la constipation chez les animaux traités chroniquement avec de la morphine. Ces mécanismes seraient médiés via une activation de la voie ERK et du facteur de transcription CREB (254).

1.2.3.2.3 La somnolence

La sédation/somnolence est due à l'inhibition des neurones du système d'éveil de l'hypothalamus. Celle-ci est médiée par l'activation des canaux Kir3 et l'inhibition des canaux Ca_v2 par $\text{G}\beta\gamma$ (236).

1.2.3.2.4 Nausées et vomissements

Les nausées et des vomissements sont fréquemment observés lors de la prise d'opioïdes (20 à 60% des patients) (73). Les mécanismes derrière ces effets indésirables sont complexes et se produisent au niveau central et périphérique (pour les mécanismes détaillés, voir (255-257)). En bref, l'activation des récepteurs MOR mène à une stimulation du centre de vomissement du mésencéphale, ce qui résulte en l'apparition des symptômes de nausées et vomissements. Cependant, l'utilisation prolongée des opioïdes induit un développement rapide de tolérance à ces effets et une diminution importante de leur intensité (255-257).

1.2.3.2.5 Tolérance analgésique

La tolérance fait référence à une réduction progressive des effets pharmacologiques produits par une dose constante de la drogue. Cette dernière se développe dans les 12 à 24 heures après administration de morphine (73). Il faut alors augmenter la dose nécessaire pour obtenir le même effet pharmacologique. Bien que l'utilisation prolongée des opioïdes induit de la tolérance aux effets indésirables tels que la dépression respiratoire, d'autres effets tels que la constipation subissent malheureusement moins de tolérance que les effets analgésiques (258).

La tolérance analgésique résulte d'adaptations moléculaires et cellulaires. La désensibilisation des récepteurs opioïdes est un des mécanismes moléculaires de tolérance aiguë (259) (voir section 1.1.1.1.2.1). Les récepteurs alors perdent leur capacité à répondre aux opioïdes exogènes et aux neurotransmetteurs endogènes. Toutefois, les mécanismes de tolérance diffèrent selon l'opioïde utilisé. Par exemple, la tolérance à la morphine est dépendante de la présence de la kinase JNK (260) alors que celle du fentanyl dépend de celle des GRK3 (261).

Il a également été proposé que la β -arrestine 2 serait impliquée dans la désensibilisation des récepteurs. Cette dernière est recrutée après la phosphorylation du récepteur et mène à son internalisation pour après être recyclé à la membrane ou dégradé dans les lysosomes (voir section 1.1.1.1.2.3). Ainsi, il a été observé que la réponse analgésique de la morphine est plus marquée et prolongée chez des souris transgéniques qui n'expriment pas la β -arrestine 2 (262). Cependant, des études de KO plus récentes n'ont pas pu reproduire ces résultats (263). En revanche, les souris exprimant les MOR mutés 11S/T-A avaient une réponse analgésique aiguë plus grande et une tolérance réduite par rapport aux souris WT (249). Ensemble, ces résultats mixtes suggèrent un rôle de la phosphorylation des récepteurs et du recrutement des β -arrestines dans le développement de la tolérance analgésique, mais de plus amples études sont nécessaires.

Au niveau cellulaire, les mécanismes adaptatifs de tolérance chronique impliquent des changements de l'expression génétique de certaines protéines. Par exemple, l'administration prolongée de morphine augmente l'expression génétique des GRK et des β -arrestine2 dans différentes régions du cerveau impliquées dans la modulation de la douleur (264, 265). Par ailleurs, des changements adaptatifs au niveau de la voie de l'AC peuvent également contribuer au développement de tolérance via un mécanisme dépendant des protéines G (voir section 1.2.3.2.7) (266, 267).

1.2.3.2.6 Hyperalgésie

L'hyperalgésie implique un abaissement du seuil de la douleur à la suite de l'utilisation prolongée d'opioïdes. Tout comme la tolérance, son apparition implique une perte de la réponse thérapeutique, mais leurs mécanismes sont différents. Ainsi, Le mécanisme d'hyperalgésie induite par les opioïdes le plus étudié implique l'activation anormale au niveau présynaptique des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ces derniers sont des récepteurs glutamatergiques qui régulent l'influx d'ions calciques à l'intérieur des neurones et qui permettent la transmission de signaux douloureux lorsqu'un certain seuil de dépolarisation est atteint (pour plus d'informations voir (268, 269)). Les opioïdes peuvent activer les récepteurs NMDA de façon directe à travers leurs métabolites (en particulier le dérivé 3-glucuroconjugué de la morphine (270)) ou, dans le cas d'une utilisation prolongée, à travers l'activation de la protéine kinase C et la phosphorylation des récepteurs NMDA par cette dernière (271, 272). L'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA tels que la kétamine prévient l'apparition de l'hyperalgésie induite par les opioïdes (269).

L'administration prolongée de morphine peut également augmenter la production de cholécystokinine (CCK) dans la RVM. Ceci active les voies descendantes facilitatrices de la douleur et mène à une production et une libération exagérée du peptide endogène dynorphine dans la moelle épinière (273). Celui-ci va être clivé et son métabolite va produire une sensibilisation à la douleur à travers son action sur les récepteurs bradykinine 2 (274, 275). Ceci mène ultimement à l'augmentation de la sécrétion de molécules algésiques et pro-inflammatoires telles que la substance P, le CGRP, le glutamate et la prostaglandine 2, exacerbant alors la douleur (274).

1.2.3.2.7 Dépendance physique

La dépendance physique survient généralement après deux semaines de prise continue d'opioïdes (73). C'est le locus coeruleus (LC) qui serait le principal responsable des nombreuses manifestations physiques du syndrome de manque (dépendance physique). En effet, chez les animaux traités de façon chronique avec de la morphine, l'injection i.c.v d'un antagoniste tel que la naloxone a précipité le syndrome de manque. Cet effet était le plus prononcé suivant une injection au niveau du LC, mais il y avait également une forte implication de la PAG (276).

Similairement à la tolérance analgésique, la dépendance physique est induite par le développement de changements compensatoires en réponse à l'administration prolongée d'opioïdes, en particulier au niveau de la voie de l'AMPc. Ainsi, afin de contrecarrer l'inhibition prolongée de l'adénylate cyclase (AC) par l'activation du récepteur opioïde et de la protéine $G\alpha_{i/o}$, il y a une suractivation de la voie cyclase. Ceci se manifeste par une augmentation de la synthèse de l'AC et une réduction de la dégradation de la sous-unité catalytique de la PKA dans les neurones du LC. Ceci va augmenter l'activité de la PKA qui va aller phosphoryler différents effecteurs, dont des canaux sodiques. Il y aura alors entrée d'ions sodium et augmentation de l'excitabilité des neurones du LC (277).

En présence de l'opioïde, cette excitabilité neuronale est sous contrôle. Mais en absence de l'opioïde ou en présence d'un antagoniste des récepteurs opioïdes, il y aura une hyperexcitabilité des neurones du LC. Cette hyperactivité contribue aux symptômes du syndrome de manque à travers les multiples projections du LC vers le cortex préfrontal (hypervigilance), le striatum (hyperactivité motrice), l'hypothalamus (hyperactivité du système nerveux autonome) et le noyau du tractus solitaire (hyperactivité cardiovasculaire) (278, 279) .

1.2.3.2.8 Dépendance psychologique

La dépendance psychologique est une maladie caractérisée par un état de manque, une perte de contrôle, une utilisation compulsive d'une drogue, et un déni des conséquences négatives reliées à ce comportement. Son développement à la suite d'une exposition thérapeutique aux opioïdes survient généralement chez un individu préalablement vulnérable sur le plan biologique et (ou) psychosocial (73).

L'exposition aux opioïdes, tout comme les autres drogues d'abus, cause une augmentation de dopamine dans le circuit de la récompense, en particulier au niveau du noyau accumbens (NA) (280). Ce circuit a pour rôle de repérer les actions qui mènent à de la satisfaction/récompense dans un contexte donné et génère un signal d'apprentissage pour inciter l'individu à répéter ce comportement à l'avenir (281). La libération de dopamine se fait à partir des terminaisons dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (280). En situation normale, ces neurones sont inhibés par l'activité de neurones GABAergiques. Ces neurones GABAergiques expriment des récepteurs de type MOR. En présence d'opioïdes, il y aura une inhibition de la

transmission GABAergique au niveau présynaptique par une hyperpolarisation somatodendritique de l'interneurone (via action de $G\beta\gamma$ sur les canaux Kir 3) ou par l'inhibition de la libération de GABA par les terminaisons (282-285). Ceci résulte en une désinhibition et en une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV ce qui mène ultimement à une augmentation de la libération de dopamine au niveau du NA.

Une étude récente a démontré que l'inhibition du tonus GABAergique par la morphine implique également un mécanisme médié par la β -arrestine 2 et la kinase c-Src puisque l'utilisation de souris KO β -arrestine 2 ou l'injection d'inhibiteur de c-Src réduisent significativement l'effet inhibiteur de la morphine sur les interneurons GABAergiques (286).

1.2.3.2.9 Système de rapport des effets indésirables de la FDA

Afin de pouvoir détecter, évaluer et prévenir les effets indésirables des opioïdes et d'autres médicaments sur le marché, il existe des systèmes de pharmacovigilance mis en place (287). Cette surveillance de la sécurité du médicament peut se faire à l'étape de pré-commercialisation du médicament (via l'analyse des résultats des phases précliniques et des phases I-III des essais cliniques) et à l'étape de post-commercialisation (288). La principale méthode de surveillance post-commercialisation utilisée par la FDA (*Food and Drug Administration*) repose un système passif de rapports des effets indésirables (289). Les rapports sont volontairement envoyés par les patients, les consommateurs et les professionnels de la santé directement à la FDA ou au manufacturier qui, lui, a l'obligation de les faire parvenir à la FDA. Ils seront par la suite ajoutés à une base de données dénommée AERS (*Adverse Event Reporting System*). Si un souci de sécurité est identifié dans AERS, des investigations plus poussées sont réalisées et la FDA pourra prendre des mesures réglementaires adaptées telles que la mise à jour des étiquetages des médicaments, la restriction de l'usage du médicament ou son retrait du marché (289).

Bien que la surveillance passive via AERS soit une approche facile, rentable et efficace pour la détection des signes précoces d'effets indésirables, elle a également des limites bien connues telles qu'une association incorrecte entre le médicament et les effets indésirables, des rapports dupliqués, des sous-signalements et des problèmes de qualité des données rapportées (informations requises manquantes) (289, 290). Il existe aussi des biais de rapport où on remarque un sur-signalement des cas d'effets indésirables suivant une attention médiatique (289). Les sous-

signalements ,eux, seraient reliés à la gravité du rapport, à la durée d'existence du médicament sur le marché (les nouveaux médicaments ont plus de rapports d'effets indésirables que les médicaments matures) et au manque de connaissances sur la façon de signaler un effet indésirable (290). Enfin, le système AERS ne tient pas en compte de données telles que la dose du médicament, la durée de traitement et la maladie du patient qui permettraient de mieux contextualiser l'évènement indésirable rapporté.

Toutefois, malgré ces limitations, il est possible d'utiliser cette base de données et d'identifier des fréquences de rapports élevés d'effet indésirables de médicaments (tels que les opioïdes) et de détecter des potentielles associations causales (291). Pour ce faire, de nombreuses approches statistiques ont été développées afin de quantifier ces signaux (292). Pour les besoins de cette thèse, nous citerons la méthode de « *Standardized gamma score* » (SD gamma) qui est basée sur un modèle de distribution multinomiale (293). Dans cette approche, le paramètre gamma (γ) qui caractérise l'association entre le médicament (i) et l'effet indésirable (j) est standardisé par rapport à l'erreur standard (SE) suivant la formule suivante :

$$\gamma_{i,j}^* = \frac{\gamma_{i,j}}{SE(\gamma_{i,j})}$$

La méthode de SD gamma comporte les mêmes avantages que les méthodes statistiques communément utilisées en pharmacovigilance et contourne les limitations que ces dernières ont lorsque la fréquence de rapports des effets indésirables est basse (293).

1.2.4 Agonisme biaisé et effets indésirables

La thérapie aux opioïdes est donc associée à une multitude d'effets indésirables. En clinique, la pauvre tolérabilité de la morphine et d'autres opioïdes par les patients complique la gestion appropriée de la douleur à l'hôpital et empêche les médecins d'augmenter les doses d'opioïdes à celles permettant un soulagement total de la douleur (50% des patients en postopératoire utilisant des opioïdes rapportent tout de même des douleurs modérées à sévères) (294, 295). Ces effets indésirables réduisent également l'observance thérapeutique chez les patients traités chroniquement (296). À ceci se rajoutent les potentiels effets mortels de dépression respiratoire induite par l'opioïde qui constituent un défi majeur pour la santé du patient. D'autres médicaments non opioïdes peuvent avoir moins d'effets indésirables, mais aucun d'entre eux n'est

aussi efficace à soulager les douleurs modérées à sévères que les opioïdes, c'est pourquoi ces derniers resteront pour l'instant la thérapie principale pour soulager ces douleurs. De nombreuses stratégies sont en cours d'étude pour développer des analgésiques opioïdes plus sécuritaires (pour une revue détaillant ces stratégies à voir (236)). Parmi ces dernières, un intérêt considérable a été porté au concept de sélectivité fonctionnelle ou agonisme biaisé. C'est ce dont nous allons discuter dans ce qui suit.

1.2.4.1 Définition

L'agonisme biaisé, le biais ou la sélectivité fonctionnelle est défini par la capacité de différents ligands d'un même récepteur de stabiliser différentes conformations actives qui sont sélectives pour certaines voies de signalisation ou de régulation. Ainsi, un agoniste biaisé va activer préférentiellement une voie de signalisation comparativement à une autre (Figure 8). Avec ce concept est née l'idée que l'identification de ligands biaisés qui stabiliseraient spécifiquement certaines conformations de récepteurs pourrait permettre de cibler les voies de signalisation associée aux effets thérapeutiques recherchés et d'éviter les voies associées aux effets indésirables (297, 298).

Les avancées dans les essais pour mesurer les réponses de signalisation cellulaires permettent maintenant de mesurer de multiples signaux suivant l'activation d'un récepteur par un ligand. Il est néanmoins important de rigoureusement analyser ces données afin de bien pouvoir discerner entre l'existence d'un véritable biais et d'un effet qui serait dû à la sensibilité du test (biais d'observation) ou au type de système utilisé (biais du système) (299).

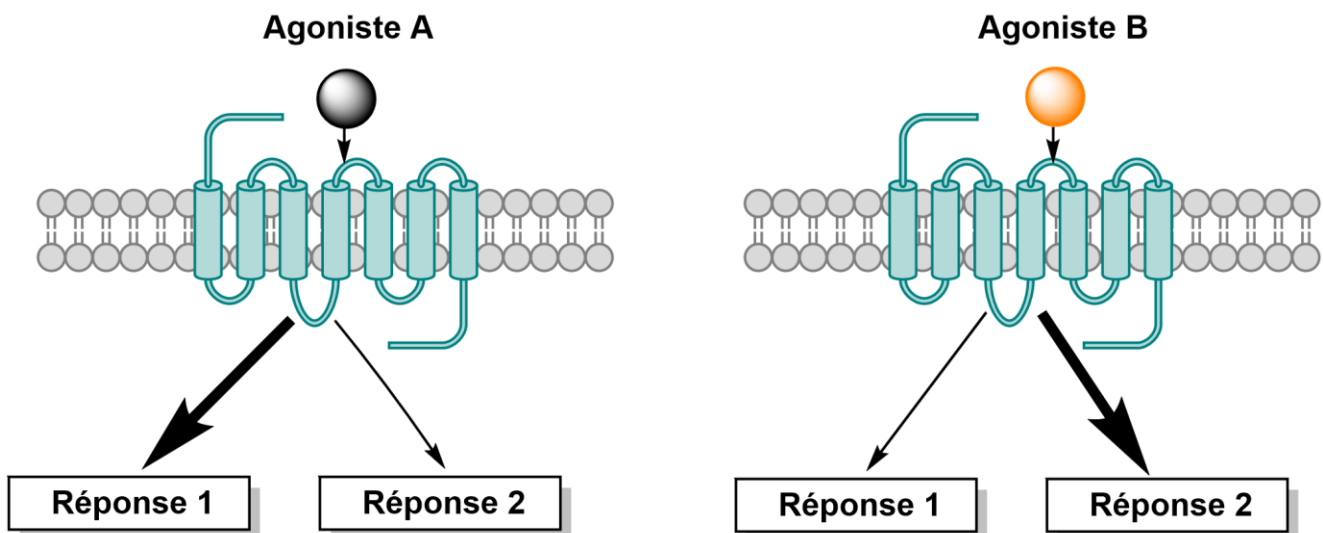


Figure 8. Sélectivité fonctionnelle ou agonisme biaisé. L'agoniste A stabilise une conformation du RCPG qui induit sélectivement la réponse de signalisation cellulaire 1 alors que l'agoniste B stabilise une autre conformation du récepteur qui induit un biais vers la réponse cellulaire 2.

1.2.4.2 Mesure quantitative de l'agonisme et de l'agonisme biaisé

Les courbes Log (dose)-réponse ont depuis longtemps été un outil de choix pour étudier les réponses fonctionnelles d'agonistes après liaison au récepteur. Ces dernières permettent d'extraire les paramètres pharmacologiques d'efficacité (E_{max}) et de puissance (EC_{50}). E_{max} représente la réponse maximale du ligand et EC_{50} représente la concentration de ligand nécessaire pour produire la moitié de la réponse maximale (Figure 9A). La pente de la relation concentration-réponse peut aussi être définie par un coefficient de Hill n .

Bien que les paramètres E_{max} et EC_{50} puissent être utiles pour comparer les effets de différents agonistes au sein d'une seule réponse cellulaire, la comparaison de ces paramètres entre de multiples voies de signalisation ou de multiples essais est problématique (Figure 9B-D). En effet, ces derniers sont fortement influencés par le système biologique où la mesure se fait de façon telle que des paramètres cellulaires tels que le type cellulaire et les taux d'expression de récepteurs et des protéines accessoires contribuent de façon significative à la réponse fonctionnelle (300). De plus, l'utilisation exclusive des valeurs de puissance EC_{50} pour caractériser l'activité d'un agoniste n'est pas appropriée pour des agonistes qui produisent des réponses maximales différentes (Figure 9B). De même, l'utilisation de la réponse maximale seulement n'est pas adéquate pour différencier des agonistes pleins qui produisent des réponses dépassant les limites du système (tous les agonistes ont la même réponse maximale) (Figure 9D). C'est pourquoi une mesure qui tient en compte autant de la puissance que de l'efficacité est requise (299). Plusieurs méthodes ont par conséquent été décrites pour quantifier l'agonisme et le biais (pour des revues les détaillant, voir (300, 301)), et de nombreuses d'entre elles sont basées sur le modèle opérationnel de Black et Leff (302).

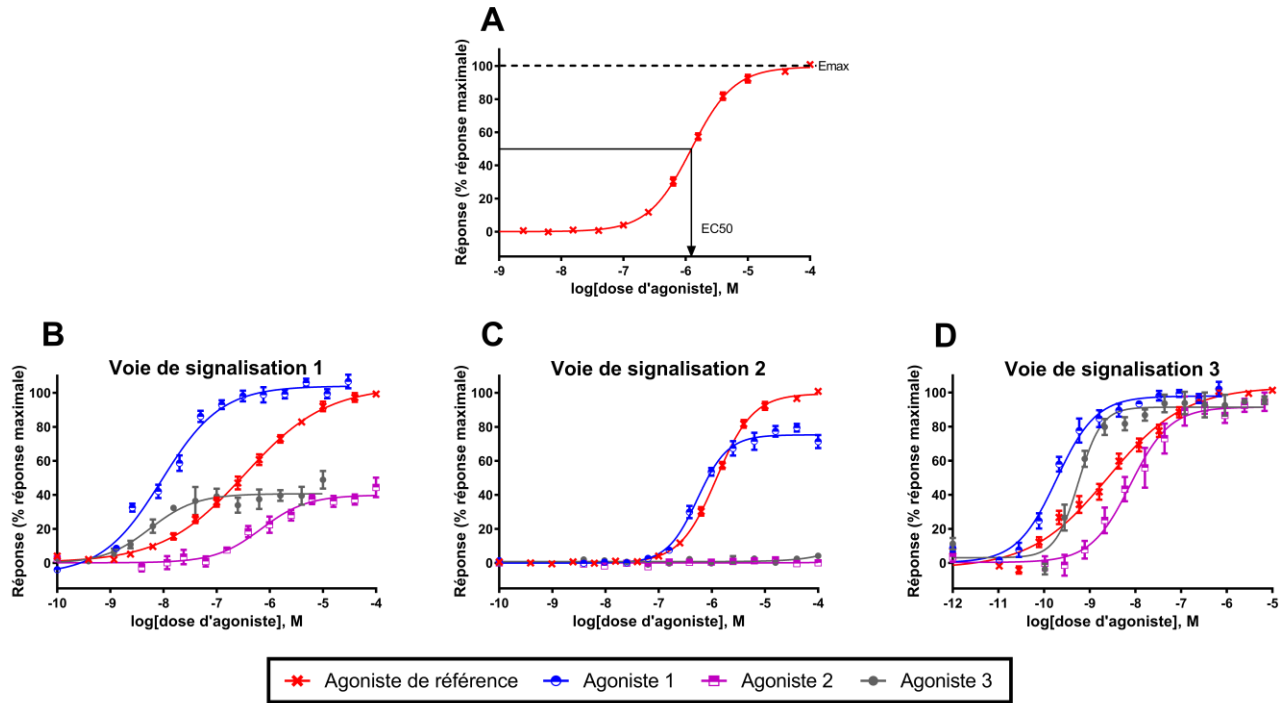


Figure 9. Courbes dose-réponse de différents agonistes à travers différentes voies de signalisation.

Avec le modèle opérationnel, l'une des approches les plus utilisées est celle proposée par les docteurs (Dr.) Kenakin et Christopoulos (299, 303). Celle-ci propose de quantifier l'agonisme en considérant à la fois l'affinité opérationnelle et l'efficacité des agonistes sous la forme d'un coefficient de transduction τ/K_A . Le paramètre τ , une valeur ajoutée du modèle opérationnel, décrit l'efficacité de l'agoniste en incorporant la densité des récepteurs (R_t) et l'efficacité de couplage à une voie de signalisation en particulier (K_E). Il permet de mieux estimer les efficacités relatives des ligands et de discerner entre des ligands même dans des systèmes où ils auraient des réponses maximales équivalentes. La constante de dissociation à l'équilibre K_A mesure l'affinité conditionnelle de l'agoniste pour le récepteur (affinité d'un ligand pour le RCPG quand la protéine G est liée) et non pas l'affinité du ligand pour le récepteur non couplé (obtenue par essais de liaison). Ainsi, les valeurs de K_A peuvent être directement dérivées en ajustant les paramètres du modèle opérationnel aux données fonctionnelles. Ces différents paramètres sont reliés par l'équation du modèle opérationnel suivante :

$$\text{Réponse} = \frac{[L]^n \times \tau^n \times E_{max}}{[L]^n \times \tau^n + ([L] + K_A)^n}$$

Où : $[L]$ représente la concentration du ligand, n représente la pente de la courbe dose réponse et $\tau = [R_t]/K_E$ (303).

Après avoir ajusté les courbes dose-réponse suivant l'équation ci-dessus, le ratio de transduction τ/K_A peut alors être utilisé afin de jauger l'activité intrinsèque d'un agoniste pour une voie donnée, c'est-à-dire l'efficacité avec laquelle un ligand évoque un effet particulier (300, 303). Par la suite, la présence potentielle d'un agonisme biaisé peut être détectée en comparant les coefficients de transduction des agonistes (τ/K_A) à travers les différentes voies. Pour ce faire, il faut d'abord exprimer des ratios $\text{Log}(\tau/K_A)$ en fonction d'un agoniste de référence défini ($\Delta\text{log}(\tau/K_A)$), cette normalisation permettrait de nullifier l'impact du biais de système et du biais d'observation (299). Par convention, l'agoniste de référence est un agoniste qui n'est pas biaisé vers aucune voie ; il est généralement un agoniste endogène ou un médicament utilisé en clinique. Par la suite, les différences de $\Delta\text{log}(\tau/K_A)$ de chaque agoniste entre les différentes voies de signalisation ou essais peuvent être calculées en tant que $\Delta\Delta\text{log}(\tau/K_A) = \Delta\text{log}(\tau/K_A)_{\text{réponse 1}} - \Delta\text{log}(\tau/K_A)_{\text{réponse 2}}$. On peut alors extraire une valeur de biais définie par $10^{\Delta\Delta\text{log}(\tau/K_A)}$ (300). Ce dernier définit l'étendue de différence dans d'activité intrinsèque relative d'un agoniste entre deux réponses et permet de comparer statistiquement les efficacités de signalisation des ligands entre différentes voies. Ainsi, plus le facteur de biais est élevé, plus le ligand est efficace pour induire une réponse dans une voie par rapport à l'autre (299, 303).

Il est à noter que d'autres utilisations alternatives du modèle opérationnel ont été proposées (300, 301, 304) et que des auteurs tels que les Dr. Rajagopal, Costa et Onaran critiquent l'utilisation d'une affinité conditionnelle dans la méthode décrite ci-dessus (304). Ainsi, ils argumentent que l'affinité conditionnelle K_A est un facteur confusionnel qui ne permet pas de bien estimer l'efficacité de l'agoniste. Ils proposent alors de dériver les valeurs de K_A en utilisant les valeurs de K_i déterminées pour chaque ligand par des expériences de radio-liaison (300, 304, 305). Néanmoins, les Dr. Kenakin et Christopoulos maintiennent l'argument qu'un ligand peut avoir différentes affinités pour différentes conformations du récepteur et que celles-ci doivent être prises en compte lors de la mesure de l'agonisme biaisé (306).

1.2.4.3 Sélectivité fonctionnelle au sein du récepteur opioïde Mu

La plupart des études de biais se concentrent sur l'interaction entre les GPCR et les β -arrestines comparativement à l'activation des protéines G. Ceci car les mécanismes de signalisation et de régulation médiés par les β -arrestines peuvent être liés à des effets pharmacologiques d'intérêt (307, 308). Dans le cas du MOR, les recherches se sont concentrées sur le développement d'agonistes biaisés vers l'activation de la protéine $G\alpha_{i/o}$ et qui n'activent pas la voie de la β -arrestine 2. Le rôle de la β -arrestine 2 dans les effets du MOR a été initialement étudié par Laura Bohn et al. (262) à l'aide de souris KO en β -arrestine 2. Tel que mentionné plus haut, ces derniers ont rapporté que chez les animaux KO la morphine avait un effet analgésique prolongée dans des essais de douleur aiguë, qu'il n'y avait une apparition plus tardive ou pas d'apparition de tolérance analgésique et qu'il y avait moins de dépression respiratoire et de constipation, comparativement aux souris sauvages (247, 262, 309, 310). Ces observations ont donné naissance à l'hypothèse que des mécanismes médiés par la β -arrestine 2 seraient responsables des effets indésirables de la morphine. Ceci a alimenté l'idée que les ligands capables de stabiliser les récepteurs MOR dans une conformation qui permettrait d'activer la signalisation médiée par les protéines G et d'éviter celle médiée par la β -arrestine 2 pourraient constituer de nouveaux analgésiques plus sécuritaires. C'est ainsi que les efforts de recherche subséquents se seront concentrés sur le développement d'agonistes qui ont peu ou pas de recrutement de β -arrestine 2 et qui présentent un biais envers l'activation des protéines G (308, 311, 312). Cependant, comme discuté plus haut, le rôle de la β -arrestine 2 dans le développement de la dépression respiratoire et de la constipation induite par les opioïdes a été remis en question (voir sections 1.2.3.2.1 et 1.2.3.2.2 et Figure 10) (248, 249, 252). Par ailleurs, il n'y a pas d'évidences physiologiques directes démontrant que la β -arrestine 2 est responsable de ces effets indésirables. À l'inverse, de nombreuses évidences démontrent l'implication d'une signalisation dépendante de la protéine G dans ces effets (voir sections 1.2.3.2.1 et 1.2.3.2.2 et Figure 10). C'est pourquoi la supposition que des agonistes du MOR biaisés vers la protéine G pourraient être plus sécuritaires n'est plus aussi plausible et c'est ce que nous allons voir dans la section qui suit.

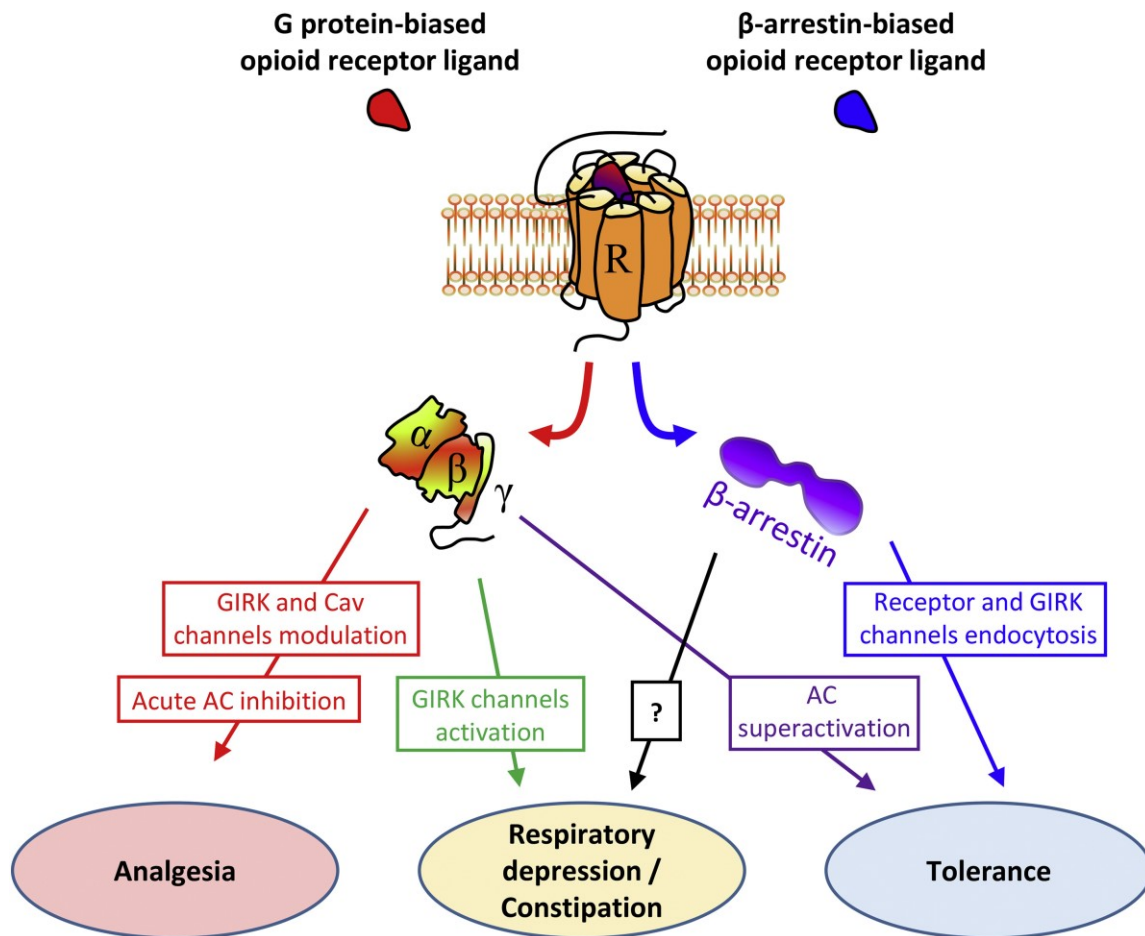


Figure 10. Représentation schématique de l'implication des voies de signalisation médiées par les protéines G et par les β-arrestines dans les effets analgésiques et les effets indésirables des opioïdes (313).

1.2.4.3.1 Agonistes biaisés du MOR et applications cliniques

La morphine est l'opioïde de référence pour comparer l'analgésie entre les opioïdes. C'est pourquoi le développement d'agonistes biaisés du MOR s'est principalement concentré à comparer leurs effets analgésiques, respiratoires et gastro-intestinaux à ceux de la morphine.

Le premier agoniste biaisé du MOR développé et à avoir été mis sur le marché était l'olicéridine (anciennement nommé TRPV130) (308, 314). Bien qu'il fut initialement développé en tant que puissant analgésique avec un profil réduit d'effets indésirables (315), des essais cliniques subséquents ont montré qu'il entraînait des effets indésirables de dépression respiratoire, de potentiel d'abus, de constipation et de nausées et vomissements typiques des opioïdes (236, 314).

Par la suite, un autre ligand biaisé vers la protéine G, PZM21, a été découvert en utilisant une technique de simulation d'amarrage de ligand (311). PZM21 était initialement décrit comme un agoniste du MOR qui ne recrute pas la β -arrestine2, et qui a des propriétés antagonistes sur le KOR. Dans des essais *in vitro*, il avait démontré une meilleure efficacité et une meilleure puissance que l'olicéridine (TRV130) et dans les essais *in vivo*, il produisait moins d'effets indésirables que la morphine dont la dépression respiratoire et la constipation (311). Néanmoins, des études subséquentes ont montré qu'il était un agoniste partiel du MOR et qu'il produisait de la dépression respiratoire et de la tolérance analgésique similaire à ceux de la morphine chez des souris (316).

En réponse à ces résultats peu prometteurs des agonistes biaisés, une étude plus récente du laboratoire du Dr. Bohn a suggéré que l'existence d'une sélectivité fonctionnelle n'était pas le seul critère important pour pouvoir prédire la fenêtre thérapeutique (séparation des doses qui produisent l'analgésie de celles qui produisent les effets indésirables) de l'opioïde et que le degré du biais, tel que mesuré par le facteur de biais, serait un meilleur prédicteur (239). Ainsi, plus le facteur de biais est élevé pour la voie de la protéine G et plus la fenêtre thérapeutique serait élevée. Inversement, plus les agonistes sont biaisés vers la β -arrestine 2, plus ils seraient enclins à produire de la dépression respiratoire. Les auteurs ont alors développé des agonistes synthétiques qui étaient sélectifs pour le MOR et ont pu identifier des agonistes qu'ils considéraient comme étant « fortement biaisés » vers la protéine G, tels que le SR-17018. Ces derniers avaient une fenêtre thérapeutique beaucoup plus large que la morphine en termes de dépression respiratoire. Cependant, une étude subséquente a démontré que SR-17018 était en réalité un agoniste avec une efficacité intrinsèque relative τ plus faible que celle de la morphine et du fentanyl dans les essais d'activation de la protéine G (317). C'est cette faible efficacité intrinsèque, et non pas un agonisme biaisé, qui expliquerait le meilleur profil d'effets indésirables du SR-17018.

1.3 Système endocannabinoïde et phytocannabinoïdes

1.3.1 Brève introduction au système endocannabinoïde

Les plantes ont longtemps été utilisées dans les médecines traditionnelles en tant que traitements pour différentes conditions médicales (318). C'est le cas de la plante de *Cannabis Sativa L.* qui a été utilisée depuis des millénaires pour traiter différentes conditions telles que la douleur et les nausées (319). Pourtant, suite à des craintes par rapport au risque de toxicomanie,

l'emploi thérapeutique du cannabis dans la médecine occidentale a été fortement restreint par la loi et par son retrait de la pharmacopée États-Unis en 1942 (320, 321). Néanmoins, les récents progrès dans le domaine de la pharmacologie du cannabis ont conduit à un regain d'intérêt pour le potentiel thérapeutique de ce dernier. Ainsi, l'usage du cannabis médical fut autorisé au Canada en 2001 et un nombre croissant d'états permettent son utilisation aux États-Unis depuis 1996 (320, 322).

Un moment clé dans la recherche du cannabis était l'isolement en 1964 du principal constituant psychoactif du cannabis, le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) (323). C'est en essayant d'élucider les mécanismes d'action du THC que des groupes de chercheurs ont fait une découverte marquante : l'identification d'un « système endocannabinoïde ».

1.3.2 Système endocannabinoïde

Le système endocannabinoïde est un système complexe principalement constitué de récepteurs cannabinoïdes, de ligands cannabinoïdes endogènes ou « endocannabinoïdes » et d'enzymes responsables de leur synthèse et de leur dégradation (130, 136, 321, 324-328). Le système endocannabinoïde est impliqué dans différentes fonctions physiologiques incluant le contrôle de la douleur, la neuroprotection, l'immunité, l'appétit, la mémoire et le système cardiovasculaire (329).

1.3.2.1 Récepteurs cannabinoïdes

Les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 sont des RCPG localisés à tous les niveaux des voies de la douleur expliquant l'efficacité des cannabinoïdes exogènes et endogènes dans énormément de modèles de douleur animaux, indépendamment de la voie d'administration. Ces récepteurs ont été décrits plus haut dans la section 1.1.3.2.

1.3.2.2 Ligands endogènes

Parallèlement à la découverte des récepteurs cannabinoïdes, leurs ligands endogènes, ou endocannabinoïdes, ont été isolés. Ce sont des médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique et sont formés à partir de phospholipides membranaires (330, 331). L'anandamide (AEA) et le 2-arachidonyleglycérol (2-AG) sont les deux principaux endocannabinoïdes (324-326), mais d'autres ont été découverts plus récemment tels que l'oléoyléthanolamide (OEA), le palmitoyléthanolamide (PEA) et le N-arachidonyle dopamine (NADA) (332).

Les endocannabinoïdes ont des particularités qui les différencient des neurotransmetteurs classiques : ils sont synthétisés « à la demande » et ne sont pas stockés dans les vésicules synaptiques, suggérant un rôle de neuromodulateur (333). D'autre part, les endocannabinoïdes agissent de façon rétrograde au niveau synaptique voulant dire qu'ils sont relâchés par des neurones postsynaptiques pour aller activer les récepteurs cannabinoïdes au niveau présynaptique (334) (Figure 11). Ils sont alors capables d'inhiber la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate ou le GABA au niveau de la moelle épinière, entre autres (335). Ainsi, la signalisation intracellulaire des endocannabinoïdes (131) permet de contrôler l'excitabilité neuronale au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices et de produire des effets analgésiques et anti-inflammatoires (336-343).

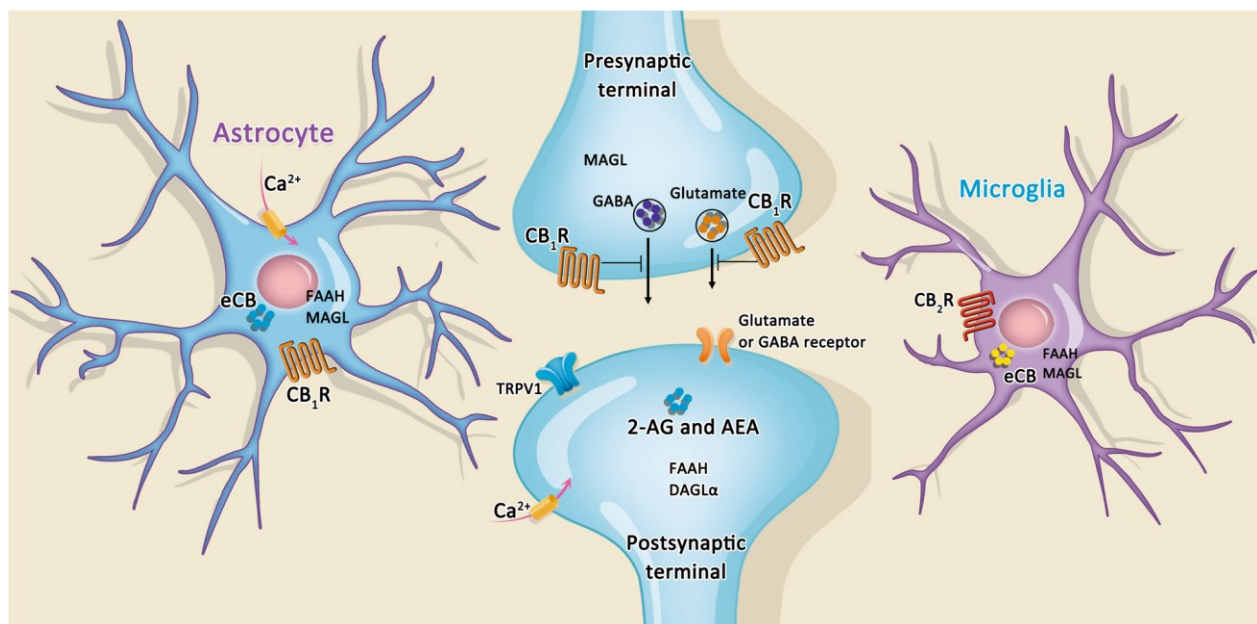


Figure 11. Schématisation des composants du système endocannabinoïdes au niveau des neurones, des microglies et des astrocytes. Figure reproduite avec permission (344).

1.3.2.3 Enzymes de synthèse et de dégradation

Mis à part les récepteurs et ligands endocannabinoïdes, les enzymes métaboliques sont les autres composants essentiels du système endocannabinoïdes. Ainsi, l'anandamide est synthétisée à l'aide de la phospholipase D NAPE-PLD (*N-acylphosphatidylethanolamine (NAPE)-specific phospholipase d-like hydrolase*) (345) alors que le 2-AG est synthétisé à l'aide des diacylglycérol lipase α (DAGL α) et β (DAGL β) (346).

Une fois leur rôle accompli, les endocannabinoïdes sont recaptés puis dégradés localement. Plus particulièrement, l'anandamide est hydrolysée par l'enzyme FAAH (*Fatty Acid Amide Hydrolase*) au niveau des neurones postsynaptiques (328) alors que le 2-AG est dégradé principalement par une monoacylglycéril lipase (MAGL) au niveau présynaptique (327) (Figure 11).

1.3.2.4 Autres récepteurs cannabinoïdes

Les endocannabinoïdes engendrent des réponses pharmacologiques au niveau d'autres récepteurs CB1 et CB2 incluant d'autres RCPG (voir section 1.1.3.2) et les récepteurs nucléaires PPAR (*Peroxisomes Proliferator Activated Receptor*) (347). Ils peuvent aussi activer et désensibiliser des récepteurs ionotropes (laissant passer des ions) de la famille des TRP (*Transient receptor potential*) (348, 349). Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous intéresser dans ce qui suit à ces récepteurs ionotropes TRP et plus particulièrement au canal TRPV1.

1.3.2.4.1 Récepteurs cannabinoïdes ionotropes TRP

Les canaux TRP (*Transient Receptor Potential*) représentent une famille de canaux perméables aux cations (348). Ils sont exprimés partout dans l'organisme et leur activation au niveau des neurones sensoriels permet de convertir différents stimuli physiques ou chimiques en des influx nerveux à transmettre au cerveau. Ils sont ainsi impliqués dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques incluant la douleur (350).

La superfamille des TRP comporte 28 canaux qui sont divisés en six sous-groupes : canoniques (TRPC), vanilloïdes (TRPV), polycystines (TRPP), mucolipines (TRMPL), ankyrines (TRPA) et mélastatines (TRPM) (351). Parmi ces derniers, six canaux sont activés par une variété de ligands cannabinoïdes leur valant l'appellation de « récepteurs cannabinoïdes ionotropes ». Ces six canaux sont TRPV1-TRPV4, TRPA1 et TRPM8 (348).

Une des caractéristiques clés des canaux TRP qui est très convoitée en clinique, surtout pour le canal TRPV1, est la désensibilisation qui leur confère des propriétés analgésiques. Pour les besoins de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement au canal TRPV1 et à son rôle en tant que cible analgésique des cannabinoïdes (Pour des revues décrivant plus en détail les autres

canaux TRP, leur rôle dans les conditions douloureuses et l'action des cannabinoïdes sur ces derniers, voir (348, 352, 353)).

1.3.2.4.1.1 TRPV1

Le canal TRPV1 (*Transient receptor potential vanilloid 1*), aussi connu sous le nom de récepteur à capsaïcine, était le premier récepteur de la famille TRPV à être découvert et cloné en 1997 (354). C'est un canal à cation non sélectif qui conduit le calcium et le sodium à l'intérieur des cellules. Il est exprimé par les neurones nociceptifs, surtout au niveau des fibres C non myélinisées et légèrement au niveau des fibres A δ , et est important pour la détection de stimuli nocifs (350, 352, 355, 356). Dans la douleur neuropathique, l'activation des canaux TRPV1 sur des fibres nerveuses C et leur régulation à la hausse au niveau de fibres myélinisées A δ et A β augmentent l'activité de ces fibres. Ainsi ce récepteur joue un rôle majeur dans le développement d'hyperalgésie thermique (357, 358) et de l'allodynie mécanique observées dans ces conditions pathologiques (359, 360).

L'agonisme et l'antagonisme des canaux TRP ont tous deux une utilité au niveau clinique pour le traitement de la douleur (349, 361). Ainsi, bloquer le canal TRPV1 avec un antagoniste (tel que la capsazépine) est efficace pour traiter de la douleur aiguë. À l'inverse, pour de la douleur chronique et en particulier neuropathique, le désensibiliser en utilisant des agonistes est plus efficace. En effet, le canal TRPV1 est connu pour être activé et rapidement désensibilisé après exposition prolongée à des ligands canoniques. Ainsi, la capsaïcine (dérivée du piment) et le résiniferatoxine (dérivé de la plante *Euphorbia resinifera*) sont des agonistes qui activent fortement le TRPV1 et qui évoquent des sensations de brûlure dues à la libération de neuropeptides vasoactifs tels que la substance P et le CGRP (362). Suivant l'activation du TRPV1, du calcium rentre dans les fibres afférentes primaires à travers le pore du canal et stimule une signalisation dépendante du calcium qui va mener à la déphosphorylation et ainsi à la désensibilisation du canal (363). TRPV1 devient alors réfractaire à toute stimulation subséquente et il y a une perte d'intégration du message sensitif. C'est ce qui explique l'effet analgésique paradoxal de ces canaux (364). Ce mécanisme est à la base de l'utilisation des crèmes de hautes doses de capsaïcine topique dans le traitement des douleurs chroniques, en particulier neuropathiques (365, 366). Cependant, une application continue de capsaïcine peut entraîner une ablation des terminaisons des nocicepteurs et entraîner une perte de la capacité à reconnaître de futurs stimuli nocifs (366). Cette limitation a incité les chercheurs à

investiguer des alternatives afin de désensibiliser le canal sans entraîner ces effets néfastes. Parmi ces alternatives, sa modulation par les cannabinoïdes.

L'anandamide est le premier agoniste endogène à activer TRPV1 qui a été identifié. Il a une affinité pour le canal similaire à la capsaïcine, mais il l'active avec une puissance qui lui est inférieure (367, 368). Des études ultérieures ont trouvé que des analogues de l'anandamide tels que PEA et le NADA sont tous capables d'activer TRPV1 (348). De nombreux phytocannabinoïdes peuvent également moduler le TRPV1. De plus amples détails seront donnés à la section 1.3.3.2.

Les différents composants du système endocannabinoïde discutés ci-dessus et les cibles d'intérêt CB1, CB2 et TRPV1 sont schématisés dans la Figure 11.

1.3.3 Cannabis et phytocannabinoïdes

1.3.3.1 Cannabis Sativa

La plante de *Cannabis Sativa L.* a depuis longtemps été utilisée pour traiter de nombreux symptômes. De nos jours, une des principales utilisations thérapeutiques rapportée du cannabis médical est pour le soulagement de la douleur chronique (369-374); bien que cette indication fasse l'objet d'une grande controverse (375, 376) (voir section 1.3.4.1.4).

La résine de la plante de cannabis est extrêmement riche en composés chimiques et contient plus de 550 de ces derniers incluant plus de 100 phytocannabinoïdes, des flavonoïdes, des terpènes et des acides gras; tous avec de potentiels effets thérapeutiques (377). Les composés les plus actifs de la plante sont les cannabinoïdes qui se divisent en cannabinoïdes majeurs et mineurs (Figure 12). Les cannabinoïdes majeurs comportent le THC qui est le principal composé psychoactif de la plante (159-161), et le cannabidiol (CBD) qui est non psychoactif (378-380). Les cannabinoïdes mineurs sont les cannabinoïdes qui sont retrouvés en plus petites quantités dans la plante : cannabinoïde (CBN), cannabigérol (CBG), cannabichromène (CBC), tétrahydrocannabivarine (THCV), cannabivarine (CBV) et cannabidivarine (CBDV) en sont les principaux (381).

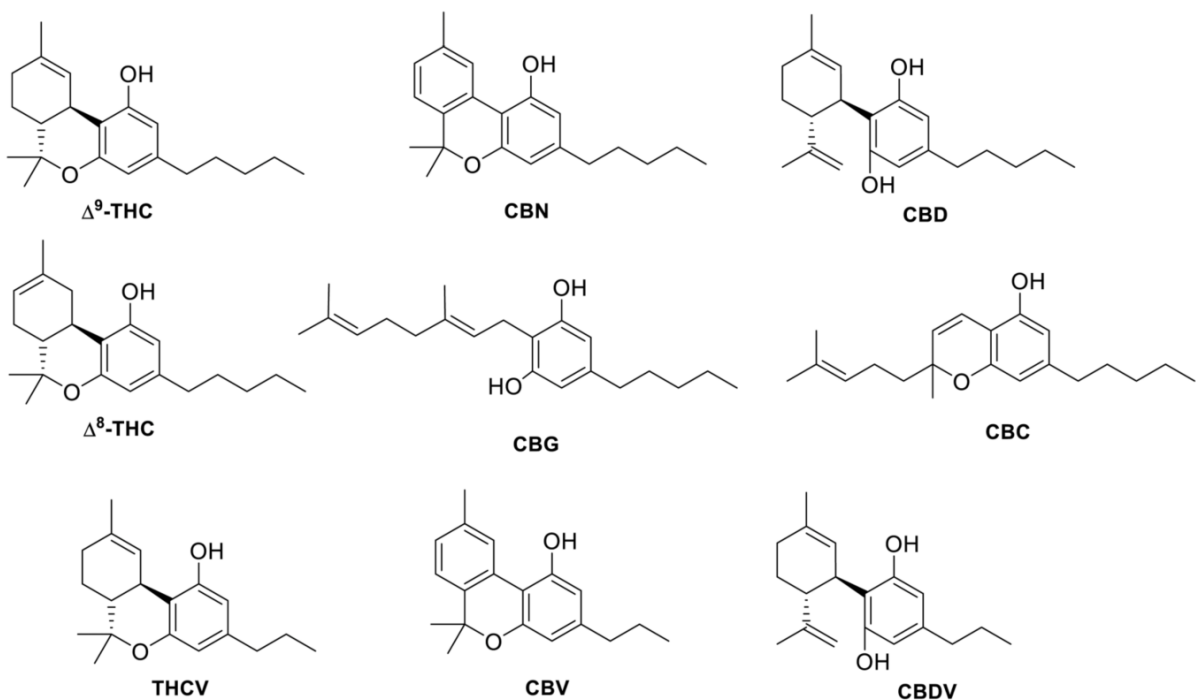


Figure 12. Structures des phytocannabinoïdes les plus abondants dans Cannabis sativa L.

Δ^9 -THC : Δ^9 -tétrahydrocannabinol ; CBN : cannabinoïde ; CBD : cannabidiol ; Δ^8 -THC : Δ^8 -Tétrahydrocannabinol ; CBG : cannabigérol ; CBC : cannabichromène ; THCV : tétrahydrocannabivarine ; CBV : cannabivarine et CBDV : cannabidivarine. Reproduction avec permission (381).

1.3.3.2 Phytocannabinoïdes

Bien que l'extrait entier de cannabis ait des propriétés analgésiques (372, 382), des composés isolés de la plante tels que THC et CBD ont également démontré des propriétés anti-nociceptives dans le traitement des douleurs aiguës et chroniques (383-386). Cependant, le composant psychoactif THC n'est pas une approche thérapeutique désirable dû à ses actions sur le SNC (160, 161, 386). Les composants non psychoactifs tels que le CBD, des cannabinoïdes mineurs (CBC, CBG) ainsi que des terpènes (β -caryophyllène) pourraient tous être des traitements alternatifs pour le contrôle de la douleur (65, 378, 384, 387, 388). Ces derniers ont tous des affinités variables pour les récepteurs du système endocannabinoïde.

Pour les besoins de cette thèse, nous allons résumer les propriétés thérapeutiques de différents phytocannabinoïdes ainsi que les cibles à travers lesquelles ils exercent leurs effets analgésiques.

1.3.3.2.1 Δ^9 -tétrahydrocannabinol

Le THC est considéré comme étant le principal responsable des effets analgésiques de la plante (389) et a des effets antispasmodiques et de relaxants musculaires (390). Il est également connu pour être le principal composant psychoactif du cannabis. En effet, dans les modèles animaux seulement le THC (et dans une moindre mesure, le CBN) produit des effets similaires à la marijuana (tels que la sédation) et les effets de la tétrade (catalepsie, akinésie, hypothermie et analgésie) (160, 386, 391, 392).

Le THC est un agoniste partiel des récepteurs CB1 et CB2 (393-395). Son action au niveau des récepteurs CB1 médie ses effets analgésiques, mais également ses effets psychoactifs via une activation centrale de ces récepteurs (159-161, 386). L'activation du récepteur CB2, elle, est associée à des effets analgésiques et anti-inflammatoires (396). Il a également d'autres cibles que le CB1 et CB2 à travers lesquelles il peut exercer ses effets thérapeutiques (397-399) (pour des revues détaillant ces cibles, voir (381, 400)). De façon intéressante, THC est un modulateur allostérique des récepteurs opioïdes MOR et DOR (401) et peut potentialiser les effets analgésiques de la morphine (402). Enfin, THC est un puissant agoniste des récepteurs de glycine et cette activité semble contribuer à ses effets analgésiques (403).

Pour ce qui est de son activité au niveau des récepteurs cannabinoïdes ionotropes, THC a été décrit comme un puissant et très efficace agoniste des canaux TRPA1 (404). Ce canal est impliqué dans les douleurs neuropathiques (405) et l'action du THC sur ce dernier (via sa désensibilisation) pourrait contribuer à ces actions analgésiques. De même, THC peut moduler d'autres canaux TRP, mais leur implication dans ses effets analgésiques doit être évaluée (pour une revue détaillant les effets du THC au niveau des TRP, voir (348)).

1.3.3.2.2 Cannabinol

Le cannabinol (CBN) est le premier phytocannabinoïde à avoir été identifié et isolé de la plante de cannabis (406). C'est un métabolite de l'oxydation non enzymatique du THC qui a lieu

après une longue période de stockage de la plante, en particulier à des températures plus élevées. Cependant, contrairement à THC, les effets psychoactifs du CBN sont très faibles (407). CBN a démontré des effets analgésiques dans des modèles précliniques, bien qu'avec une puissance et une efficacité inférieures à celles du THC (408-410). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que CBN se lie aux récepteurs CB1 et CB2 avec une puissance quatre fois plus petite que celle du THC. Pour ce qui est des récepteurs ionotropes, CBN active et désensibilise fortement le canal TRPA1, mais son implication dans la réponse analgésique du CBN reste à être éclaircie (381).

1.3.3.2.3 Cannabidiol

Le cannabidiol (CBD) est le principal cannabinoïde non psychoactif du cannabis et a de nombreuses vertus thérapeutiques. Ce dernier a des effets analgésiques, anti-inflammatoires, anticonvulsivants et anxiolytiques tout en étant dépourvu des effets addictifs et euphoriques du THC (379, 384, 411). Il a par ailleurs été montré que CBD peut contrecarrer les effets psychoactifs du THC (378-380, 412) (bien que cela semble dépendre de nombreux facteurs tels que le mode d'administration, la durée d'administration et la dose de cannabis utilisé (413)). Ceci peut, entre autres, être expliqué par le fait que CBD n'active pas les récepteurs CB1 et CB2. Il agit plutôt comme un modulateur allostérique négatif du CB1 (414) et comme un agoniste inverse du récepteur CB2 (415, 416).

CBD peut également induire ses effets pharmacologiques, et notamment ses effets analgésiques, en agissant sur une multitude d'autres récepteurs (pour des revues détaillant ces cibles à voir (377, 417)). Plus particulièrement, son activité agoniste sur le récepteur 5-HT1A (418) a atténué l'allodynie mécanique dans des modèles de douleurs neuropathiques et a eu des effets anxiolytiques (419). Ces effets sont fortement désirés pour le traitement de ces types de douleurs. En ce qui concerne les récepteurs ionotropes, CBD est capable d'activer et de désensibiliser le canal TRPV1 avec une efficacité similaire à celle de l'agoniste prototype capsaïcine (420). Il peut également faciliter l'inhibition de TRPV1 en favorisant sa déphosphorylation par la calcineurine (421). L'injection orale, intraplantaire ou sous cutanée de CBD a réduit l'hyperalgésie thermique et mécanique dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique et ces effets étaient bloqués par un prétraitement avec l'antagoniste de TRPV1 capsazépine (384, 387). CBD peut également moduler d'autres canaux TRP (tels que TRPA1), mais leur implication dans ses effets

analgésiques n'a pas été évaluée (pour une revue détaillant les effets du CBD au niveau des TRP, voir (364, 417)).

Enfin, CBD inhibe la recapture de l'anandamide et sa dégradation par la FAAH prolongeant ainsi l'analgésie endogène (420).

1.3.3.2.4 Cannabichromène

CBC est un phytocannabinoïde mineur qui a des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et antidépressives (378). Il est capable de réduire l'intoxication au THC chez des souris (378) et de potentialiser son effet analgésique (422). CBC a une très faible affinité pour les récepteurs CB1 et CB2 (423) et n'a pas d'activité au niveau du CB1. Il peut néanmoins activer le CB2 avec une plus grande efficacité que le THC (424).

En termes d'effets analgésiques, le CBC a des effets anti-nociceptifs dans l'essai de tail-flick (425) et ces derniers étaient sensibles aux antagonistes des récepteurs CB1 (activation indirecte), adénosine A1 et TRPA1 (425). En effet, CBC peut activer et désensibiliser le canal TRPA1 avec une très grande puissance et efficacité (404). Il peut interagir avec d'autres canaux TRP (404, 426), mais leur implication dans ses effets analgésiques n'a pas été évaluée (pour une revue détaillant les effets du CBC au niveau des TRP, voir (348, 400)).

Enfin, CBC peut également moduler le système endocannabinoïde et la douleur en inhibant l'enzyme de recapture de l'anandamide et l'enzyme de dégradation du 2-AG (MAGL) (404).

1.3.3.2.5 Cannabigérol

CBG est un phytocannabinoïde mineur non psychoactif dont la forme carboxylique acide CBGA (acide cannabigérolique) est le précurseur de tous les autres phytocannabinoïdes. Il a été rapporté que la puissance analgésique du CBG dans un modèle préclinique de douleur aiguë était supérieure à celle du THC (mais CBG avait une efficacité analgésique inférieure) (427).

Comme le CBD et le CBC, CBG a une faible affinité pour les récepteurs cannabinoïdes (423), mais il peut stimuler de façon partielle le récepteur CB2 (428). Cette action au niveau du CB2 soutiendrait ses effets analgésiques et anti-inflammatoires (427, 429). D'autre part, CBG peut moduler d'autres cibles impliquées dans la douleur : c'est un puissant activateur du récepteur α_2 adrénergique et il peut stimuler et désensibiliser les canaux TRP tels que TRPV1 et TRPA1 (pour

une revue détaillant les effets du CBG au niveau des TRP voir (348, 400)). Il est également capable d'inhiber la recapture de l'anandamide (404).

Enfin, CBG bloque modérément le récepteur sérotoninergique 5-HT1A (430) suggérant des effets anti-dépresseurs.

1.3.3.2.6 Terpènes

Plus de 200 de terpènes ont été identifiés dans la plante de cannabis (378). Ils sont responsables de l'arôme de la plante et des évidences précliniques suggèrent qu'ils auraient un potentiel thérapeutique (377, 431). En effet, β -caryophyllène, l'un des terpènes les plus répandus dans les souches de cannabis, a des effets antidépresseurs (432), anti-inflammatoires (433) et anxiolytiques (434) dans les modèles précliniques. Il a également été montré qu'elle pouvait se lier au récepteur CB2 et atténuer l'allodynie mécanique et la libération de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de douleur neuropathique (388). D'autres évidences ont montré qu'une injection locale de β -caryophyllène avait des effets analgésiques dans un modèle de douleur aiguë induite par la capsaïcine en activant localement le récepteur CB2 qui, lui, va stimuler la libération d'endorphines endogènes (435).

1.3.3.3 Effet d'entourage

Les terpènes peuvent agir de façon synergique avec les cannabinoïdes afin de produire des effets bénéfiques, un concept connu sous le nom « d'effet d'entourage » (378). Ce dernier décrit l'interaction complexe entre les cannabinoïdes, les terpènes et les autres composés phytochimiques présents dans la plante de cannabis, et stipule que leur combinaison donnerait une efficacité médicinale plus intéressante (431). Une étude récente a ainsi rapporté que différents terpènes pouvaient augmenter l'activité analgésique du cannabinoïde synthétique WIN 55,212-2 via une action sur les récepteurs CB1, CB2 et adénosine A2a (431).

De même, un effet d'entourage peut également être observé lorsqu'on combine des phytocannabinoïdes entre eux (408). L'exemple le plus répandu dans la littérature de cette interaction est celui de la combinaison du THC et du CBD.

1.3.3.3.1 Combinaison THC:CBD

De nombreuses recherches se sont concentrées sur l'interaction entre le THC et le CBD. L'influence du CBD sur les effets du THC variait selon l'effet mesuré et dépendait de nombreux facteurs tels que le mode d'administration et la dose de cannabinoïde utilisée (pour de plus amples détails, voir (379, 413, 436)). Dans les modèles animaux étudiant les effets de la tétrade, CBD peut antagoniser les effets psychoactifs et les autres effets indésirables du THC (378, 379). Dans des études cliniques, la combinaison du CBD avec le THC fumé diminue l'effet de « high » et les niveaux d'anxiété ressentis comparativement au THC seul (437, 438). À l'inverse, CBD peut potentialiser l'activité analgésique du THC. Par exemple, dans des modèles de douleur neuropathique par chimiothérapie et par CCI (constriction chronique du nerf sciatique), de très petites doses de THC et de CBD, qui étaient inefficaces à elles seules, avaient un effet synergique lorsqu'elles étaient administrées en combinaison THC:CBD à ratio 1 :1 (439, 440).

Cette synergie entre le THC et le CBD permet de fortement réduire la dose de chaque cannabinoïde nécessaire pour produire un effet analgésique et donc de diminuer les effets indésirables potentiels y associés. Ces observations sont à la base de la commercialisation du Sativex, un spray d'extrait de cannabis contenant principalement du THC et du CBD à un ratio 1 :1 ainsi que quelques cannabinoïdes mineurs, terpènes et autres composants chimiques de la plante (441). Une étude comparative a rapporté une plus grande efficacité du Sativex par rapport au THC seul pour le soulagement de la douleur chez des patients avec des douleurs chroniques réfractaires aux opioïdes (442). Cette observation appuie l'existence en clinique d'un effet bénéfique additionnel du CBD et potentiellement des autres constituants de l'extrait de cannabis.

1.3.3.3.2 Classification des extraits de cannabis en chémotypes

Ces études d'interaction entre le CBD et le THC ont également mené à une adoption par la communauté scientifique d'une chimiotaxonomie (classification en fonction de la composition chimique) des extraits de cannabis basée sur leurs contenus en THC et en CBD. Ainsi, les extraits de cannabis peuvent être classés en trois grands chémotypes selon leurs ratios THC:CBD : chémotype I (ratio THC:CBD > 1), chémotype II (ratio THC:CBD \approx 1) et chémotype III (ratio THC:CBD < 1) (Figure 13) (443, 444). Les lois et les recommandations qui guident la régulation, la prescription et la commercialisation des médicaments à base de cannabis, notamment au Canada,

sont également basées sur cette chimiotaxonomie (445, 446). Or, comme nous pouvons voir dans la Figure 13, cette classification ne tient pas en compte du reste des cannabinoïdes des extraits (qui peuvent eux-mêmes avoir des effets cliniques), et ne prend pas en considération l'« effet d'entourage » qui peut résulter de l'interaction entre les différents composants chimiques de la plante.

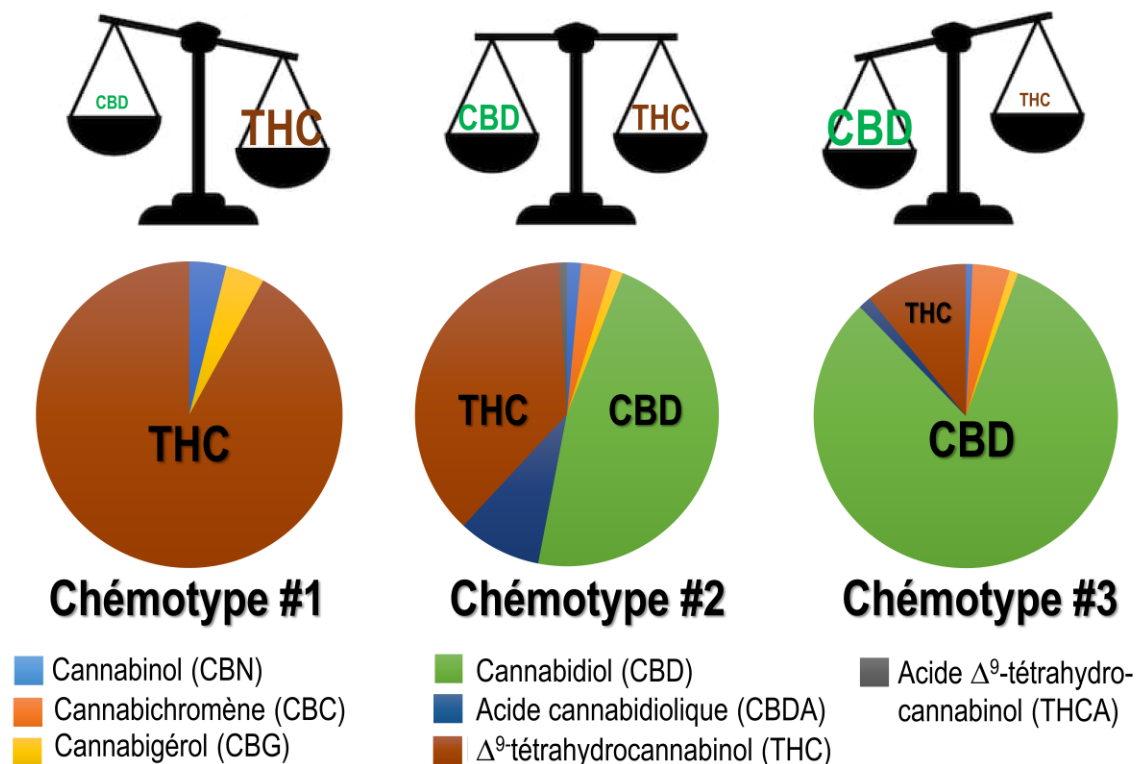


Figure 13. Exemples de compositions détaillées des trois chémotypes d'extraits de cannabis.

1.3.3.4 Ligand synthétique WIN 55,212-2

À la suite de l'identification et du clonage des récepteurs cannabinoïdes, des cannabinoïdes synthétiques ont été développés. Ces derniers peuvent être des agonistes synthétiques non sélectifs, des agonistes sélectifs pour le récepteur CB1 ou des agonistes sélectifs pour le récepteur CB2 (447-449). Ils sont généralement plus hydrophiles et plus efficaces que le Δ⁹-THC.

Pour les besoins de cette thèse, nous allons brièvement décrire l'agoniste non sélectif WIN 55,212-2 (WIN). Ce dernier est un puissant activateur des récepteurs CB1 et CB2 (143, 149, 395) à travers lesquels il a des actions anti-allodyniques et anti-hyperalgésiques dans plusieurs modèles

animaux que ça soit des modèles de douleur aiguë (148, 149), inflammatoire (450, 451), cancéreuse (153) ou neuropathique (155, 452, 453). Similairement au THC, les effets du WIN sur le CB1 sont associés à des effets indésirables au niveau du SNC tels que les effets de la tétrade (149).

Enfin, il existe des évidences suggérant qu'à de hautes concentrations, WIN serait capable de déphosphoryler le canal TRPV1 et d'inhiber les courants entrants évoqués par la capsaïcine. Cette déphosphorylation est dépendante de l'activation du canal TRPA1 qui mène à un influx de calcium, à une activation de calcineurine et à la déphosphorylation du TRPV1 (454, 455).

1.3.3.5 Agonisme biaisé et cannabinoïdes

Il existe peu de données dans la littérature sur la signalisation biaisée des phytocannabinoïdes (en général, seul le THC est utilisé). La plupart des études majeures qui ont rapporté l'existence d'un agonisme biaisé des ligands cannabinoïdes avaient trouvé un degré de biais significatif qui impliquait les essais de phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ et d'accumulation de l'AMPc (456-460). Les résultats de ces études sont cependant peu fiables car les mesures des essais mentionnés dépendent fortement du type cellulaire et ont des niveaux d'amplification qui peuvent produire de grandes erreurs dans l'estimation des efficacités opérationnelles et mener à des estimations de biais faussées (461, 462) (voir l'article I (463) et la section 6.1.1.1 pour plus de détails).

1.3.4 Cannabinoïdes et douleur

1.3.4.1 Utilisation des cannabinoïdes en clinique

Au Canada, hormis la marijuana médical (cannabis séché), deux autres dérivés de cannabis sont disponibles sur le marché (70) : le nabilone (Cesamet ®), un dérivé synthétique du THC approuvé pour le traitement des nausées et vomissements liés à la chimiothérapie; et le nabiximols (Sativex ®), le seul médicament à base de cannabis approuvé au Canada pour le soulagement de douleurs neuropathiques associées à la sclérose en plaques (379). Un autre dérivé du THC, le dronabinol (Marinol ®), était également approuvé, mais il a été retiré du marché canadien par le manufacturier pour des raisons non précisées (70).

1.3.4.1.1 Modes d'administration et pharmacocinétique du cannabis

Une des critiques principales de la marijuana médicale est son administration par inhalation. C'est pourquoi, l'émergence de nouvelles formulations orales sous formes d'huiles de cannabis et de gélules a fait de ces options la méthode d'administration de cannabis favorisée pour un usage thérapeutique (464, 465). Toutefois, l'utilisation des composés oraux ne prodigue généralement pas les mêmes effets bénéfiques. Ceci peut s'expliquer entre autres par la pharmacocinétique des cannabinoïdes (464, 466, 467).

Les profils plasmatiques du THC après inhalation par combustion sont similaires à une injection intraveineuse. Il est presque immédiatement transféré des poumons au sang après la première inhalation et ses niveaux atteignent rapidement un plateau (468). À l'inverse, les formulations orales de THC telles que le nabilone ont une absorption lente et erratique et un premier passage hépatique très important. Ceci résulte en des concentrations plasmatiques de THC irrégulières et inférieures à celles obtenues par inhalation (467, 468). De plus, le délai pour atteindre les concentrations maximales est plus grand (120 minutes).

L'administration oromucosale des cannabinoïdes, tels que le Sativex, peut éviter ou diminuer le fort premier passage hépatique observé après administration orale (467). En effet, Sativex est rapidement absorbé via la muqueuse buccale et produit des concentrations plasmatiques de THC plus élevées que l'administration orale de ce dernier, mais qui demeurent toutefois plus basses que celle du THC inhalé. De plus, une partie de la dose pulvérisée du Sativex peut être avalée et absorbée par voie orale.

1.3.4.1.2 Effets bénéfiques et indésirables du cannabis

Le cannabis est la drogue la plus consommée dans le monde avec 2.5% de la population mondiale la consommant à des fins thérapeutiques et récréatives (469). Ses principaux effets bénéfiques au niveau du SNC sont l'analgésie (141, 371, 383), une activité antiémétique et une stimulation de l'appétit ce qui est bénéfique pour engendrer un gain de poids chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (sida) ou de cancer (470).

En raison du peu de recherches épidémiologiques effectuées, la grande partie des données sur les effets indésirables du cannabis médical provient d'études avec des utilisateurs de cannabis récréatif. Ces données montrent que la toxicité aiguë du cannabis est très faible et, à la différence

des opioïdes, aucune mort humaine par intoxication au cannabis n'a été rapportée (321). Ceci est dû à la quasi-absence du récepteur CB1 au niveau du tronc cérébral qui contient les centres médullaires des contrôles cardiovasculaire et respiratoire (138, 471). Toutefois, de nombreux effets indésirables associés à la prise de cannabis ont été rapportés.

Les principaux effets à court et à long terme ou d'une consommation excessive de cannabis sont énumérés dans le Tableau 2. La majorité des effets psychoactifs au niveau du SNC sont attribués au THC et à ses effets sur le récepteur CB1 (159, 161, 386, 472).

Effets indésirables liés à l'usage de cannabis
Effets indésirables à court terme
Sensation d'euphorie Anxiété / nervosité Somnolence Troubles de coordination motrice Troubles de la mémoire à court terme Jugement altéré Paranoïa ou de la psychose à de hautes doses
Effets indésirables à long terme ou d'une consommation excessive
Dépendance (moins de 5% dans la population générale) Syndrome de manque Altérations cognitives Malformations lors du développement et la maturation du cerveau Diminution de la satisfaction de vie Augmentation des troubles de psychose tels que la schizophrénie et les dépressions psychotiques Conditions cardiovasculaires telles qu'un infarctus de myocarde Bronchites chroniques (si administré par inhalation)

Tableau 2. Principaux effets indésirables liés à l'usage à court et à long terme ou d'une consommation excessive du cannabis (71, 162, 321, 473-475).

1.3.4.1.3 Efficacité clinique pour le traitement de douleurs aiguës

Malgré leur efficacité dans les modèles animaux de douleurs aiguës et inflammatoires, les cannabinoïdes ne semblent pas être efficaces dans le traitement de la douleur aiguë chez les humains (476-479). Dans les instances où ces derniers offraient un peu de soulagement, ce n'était pas plus avantageux que l'utilisation d'analgésiques non opioïdes (477). Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires en raison de la variété des cannabinoïdes testés et des différences dans les protocoles jusqu'à présent utilisés (321).

1.3.4.1.4 Efficacité clinique pour le traitement de douleurs chroniques

De nombreux essais cliniques randomisés ont évalué la place des cannabinoïdes dans le traitement des douleurs chroniques. Dans l'ensemble, bien qu'ils améliorent la qualité de vie et de sommeil des patients, les données sur l'efficacité des cannabinoïdes dans le traitement des douleurs cancéreuses sont mitigées (61, 69, 442, 480). Leur rôle le plus prometteur est dans le traitement des douleurs neuropathiques (62, 66, 67, 69). Ainsi, des études comparatives entre le nabilone et la gabapentine (la première ligne de traitement actuellement utilisée pour soulager les douleurs neuropathiques) ont suggéré un effet analgésique similaire entre les deux médicaments chez des patients souffrant de neuropathies périphériques (481). De même, un soulagement significatif de la douleur était obtenu avec l'administration par voie oromucosale du Sativex chez des patients réfractaires aux traitements conventionnels (482). Enfin le dronabinol oral était efficace dans la diminution de l'intensité de la douleur chez des patients souffrant de sclérose en plaques (481).

Malgré ces résultats prometteurs, de récentes recommandations indiquent que l'utilisation des cannabinoïdes en clinique est très controversée (375, 376). Ils sont alors considérés seulement comme troisième ligne de traitement des douleurs neuropathiques (375, 376, 483). L'inquiétude principale reliée à l'utilisation d'agents qui modulent le récepteur cannabinoïde CB1 sont les risques d'effets psychotropes majeurs (71, 161, 162, 475). À cet égard, l'utilisation d'agonistes sélectifs du récepteur CB2 serait une solution intéressante puisque ces derniers ont également des effets anti-nociceptifs dans plusieurs modèles animaux de douleurs neuropathiques avec très peu ou pas d'effets psychotropes (154, 484).

1.3.4.2 Modes d'action analgésiques des cannabinoïdes

Que ça soit en utilisant des cannabinoïdes exogènes ou en augmentant la signalisation endogène, la transmission de la douleur peut être modulée à différents niveaux : en périphérie, au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière ou au niveau des régions supraspinales du cerveau.

Pour les besoins de cette thèse, nous allons décrire les principaux mécanismes d'analgésie des cannabinoïdes à ces différents niveaux avec une emphase sur l'analgésie spinale ainsi que sur le rôle des cibles moléculaires CB1, CB2 et TRPV1 et leur modulation dans les conditions de douleur neuropathique.

1.3.4.2.1 Analgésie par action centrale

Les premières évidences directes d'une action centrale des cannabinoïdes vient de l'observation que les effets anti-nociceptifs d'une administration systémique des cannabinoïdes CP-55,940, THC et WIN étaient abolis après une transection de la moelle épinière (485, 486). Ceci suggère un rôle important des voies descendantes inhibitrices dans cette analgésie. De plus, l'administration directe du WIN dans différentes régions du cerveau impliquées dans la douleur telles que l'amygdale, le thalamus, la PAG et la RVM entraîne une antinociception alors que les injections faites en dehors de ces zones n'ont aucun effet (487-490). Similairement aux opioïdes, ces effets analgésiques du WIN après son injection au niveau de la PAG et de la RVM sont associés à l'activation des voies inhibitrices descendantes, inhibant la transmission du message douloureux au niveau de la moelle épinière (491). Ceci implique une inhibition de cellules « *on* » et une augmentation de l'activité spontanée des cellules « *off* » (pour de amples détails sur ces mécanismes, voir (165)). Ces effets peuvent être bloqués par l'antagoniste du récepteur CB1 rimonabant (492).

Un autre récepteur qui serait impliqué dans les effets centraux des cannabinoïdes est le canal TRPV1 qui est activé par l'anandamide et d'autres ligands cannabinoïdes (348, 381). En effet, l'injection dans la PAG de l'agoniste du TRPV1 capsaïcine a entraîné une libération de glutamate dans la RVM, activant alors les cellules « *off* » et produisant de l'analgésie (493). Enfin, les cannabinoïdes ont des actions anti-inflammatoires centrales en stimulant la libération de facteurs anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) et en inhibant la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF α) et d'interleukines (IL-6 et IL-1 β) par les cellules gliales et les neurones (174, 176).

1.3.4.2.1.1 Action centrale et douleur neuropathique

Des niveaux augmentés d'anandamide et de 2-AG ont été observés dans la PAG et la RVM de rats 7 jours suivant une lésion par CCI. Cette augmentation des endocannabinoïdes s'est faite de façon concomitante au développement et à l'aggravation des symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie mécanique (494). De façon similaire, il y a une régulation à la hausse de l'ARNm du récepteur CB1 au niveau du thalamus dans un autre modèle de lésion du nerf sciatique chez les rats (495). Cette augmentation de l'expression des récepteurs CB1 et des endocannabinoïdes dans les voies de la douleur jouerait probablement un rôle protecteur en visant à potentialiser les effets analgésiques des endocannabinoïdes sous ces conditions pathologiques.

Enfin, le taux d'expression du canal TRPV1 est augmenté dans les neurones glutamatergiques du cortex préfrontal médian dans un modèle de branche de nerf sciatique épargnée (SNI ou *spared nerve injury*) (496); ceci est aussi associé à une augmentation des niveaux d'endovanilloïdes et d'endocannabinoïdes au niveau de cette région. L'augmentation de l'expression du TRPV1 jouerait un rôle dans le maintien de la sensibilisation centrale et l'augmentation conséquente des niveaux d'endocannabinoïdes jouerait encore une fois un rôle protecteur en désensibilisant le canal.

1.3.4.2.2 Analgésie par action spinale

L'administration directement dans l'espace subarachnoïdien de la moelle épinière de l'agoniste cannabinoïde synthétique levonantradol et du phytocannabinoïde THC ont produit des effets anti-nociceptifs dans les tests de la plaque chauffante et de tail-flick chez les rongeurs (497). Ces études représentaient les premières évidences d'une composante spinale dans les effets anti-nociceptifs des cannabinoïdes. Depuis, de nombreuses autres études ont appuyé ces observations (153, 156, 170, 178, 186, 385, 386, 453, 498-500).

1.3.4.2.2.1 Action spinale et douleur neuropathique

Dans les modèles de douleur neuropathique chez les rats, les cannabinoïdes inhibent les réponses au niveau de la moelle épinière évoquées par l'activation répétée et continue des fibres C (501). Plus spécifiquement, les cannabinoïdes inhibent d'une manière sélective le phénomène de « *wind-up* » dans la corne dorsale de la moelle épinière (502). Ce phénomène a lieu lorsque des stimulations répétées des fibres C à des fréquences >0.3 Hz entraînent une augmentation

progressive de la fréquence de décharge des neurones de la corne dorsale (en particulier celle des neurones nociceptifs non spécifiques dits WDR (*wide dynamic range*)) (503). Cette augmentation d'excitabilité est l'un des mécanismes pouvant mener à une sensibilisation centrale qui va rendre les neurones nociceptifs de la corne dorsale sensibles aux informations provenant des fibres afférentes A β . Ces fibres ont un seuil de sensibilité bas aux stimuli mécaniques et n'engendrent pas d'influx douloureux dans les conditions physiologiques (Figure 3). La sensibilisation centrale est ainsi une composante importante dans l'apparition des symptômes d'allodynie et d'hyperalgésie caractéristiques de la douleur neuropathique, et l'inhibition de ce phénomène par les cannabinoïdes expliquerait leur efficacité analgésique pour ce type de douleur (165). Pour de plus amples détails sur les mécanismes de sensibilisation centrale, voir les revues (49, 57, 504).

La sensibilisation des neurones afférents primaires et des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière entraîne une régulation à la hausse des taux d'endocannabinoïdes (494, 505) et des principales cibles du système endocannabinoïde. En effet, il y a une augmentation significative de l'expression du récepteur CB1 dans la corne dorsale de rats avec des douleurs neuropathiques (499, 506). Cette régulation à la hausse a augmenté les effets analgésiques du WIN dans des essais d'hyperalgésie thermique et d'allodynie mécanique dans un modèle de douleur par CCI (506). De même, l'injection spinale d'un agoniste synthétique du CB1 (ACEA) dans un modèle de neuropathie diabétique chez les rats (un autre modèle où les niveaux de CB1 spinaux sont augmentés (499)) a entraîné des effets anti-allodyniques qui étaient renversés par l'antagonisme du CB1 (156). Ces résultats suggèrent que la modulation des niveaux spinaux du récepteur CB1 après lésion de nerfs périphériques pourrait contribuer au rôle thérapeutique de cannabinoïdes exogènes dans la douleur neuropathique. En effet, la stimulation des récepteurs CB1 à ce niveau diminue la libération, par les neurones afférents primaires, des neurotransmetteurs impliqués dans la transmission de la douleur (507, 508). Toutefois, l'augmentation d'expression et l'activation du récepteur CB1 ne sont pas toujours bénéfiques et peuvent au contraire avoir un rôle maladapté. Il a ainsi été rapporté que la régulation à la hausse du CB1 protège contre le développement d'allodynie au froid, mais contribue au développement d'hyper-sensibilité mécanique dans un modèle de SNI chez des souris (509). Ces inconsistances témoignent de la complexité du système endocannabinoïde et des variabilités possibles de données selon le modèle de douleur utilisé.

Les lésions nerveuses mènent également à une augmentation de l'expression du récepteur CB2 au niveau des microglies de la corne dorsale où il module l'inflammation (167, 499). Il a été observé que des souris déficientes en récepteurs CB2 (CB2 KO) avaient une réactivité accrue des microglies et des astrocytes au niveau de la moelle épinière et des symptômes de douleur neuropathique. À l'inverse, les souris surexprimant le récepteur CB2 avaient une réactivité diminuée des cellules gliales et moins de douleur neuropathique (510). De même, l'administration d'agonistes sélectifs du CB2 a supprimé l'activation des microglies et a réduit les symptômes de douleur neuropathique (166, 186). En neuropathie diabétique, l'injection intrathécale de l'agoniste CB2 L-759,656 ou de l'agoniste mixte WIN a renversé l'hyperalgésie thermique (499) et ceci était bloqué par un prétraitement avec l'antagoniste du CB2 AM630 mais pas avec l'antagoniste du CB1 AM251.

Les taux d'expression des canaux TRPV1 sont également augmentés dans la corne dorsale des animaux neuropathiques (360, 511, 512). L'antagonisme de ce canal par une injection intrathécale de capsazépine a renversé l'allodynie mécanique dans un modèle de neuropathie diabétique chez les rats (360). Dans un modèle de CCI, la capsazépine a potentialisé les actions anti-hyperalgésiques d'une injection intrathécale d'AM404, un inhibiteur de recapture d'endocannabinoïdes. Ceci suggère que le TRPV1 joue un rôle pronociceptif dans des modèles de douleur neuropathique et que sa modulation par les cannabinoïdes induirait un effet anti-nociceptif (513).

1.3.4.2.3 Analgésie par action périphérique

Une étude utilisant des souris génétiquement modifiées possédant une délétion conditionnelle du gène du récepteur CB1 exclusivement dans les nocicepteurs périphériques a démontré l'implication majeure de ce récepteur dans le contrôle de la douleur au niveau périphérique (151). En effet, la perte des récepteurs CB1 périphériques a significativement diminué l'analgésie produite par des injections locales et systémiques, mais pas intrathécales du cannabinoïde WIN dans des modèles de douleur neuropathique et inflammatoire. Les actions périphériques des récepteurs CB1 sont attribuées à une inhibition de la libération du facteur de croissance nerveux (NGF, *nerve growth factor*) et de le CGRP, des médiateurs qui favorisent la sensibilisation des fibres nerveuses périphériques (514).

L'activation sélective des récepteurs CB2 périphériques résulte également en des réponses analgésiques (171). De façon intéressante, cette activation des CB2 stimule la libération de β -endorphines par les kératinocytes. Ces derniers vont activer les récepteurs MOR au niveau des neurones afférents primaires et produire un effet analgésique (181). Ainsi, les effets anti-nociceptifs de l'agoniste sélectif CB2 ont été complètement bloqués par l'injection de l'antagoniste du récepteur MOR, la naloxone, ou d'un sérum immunisant contre les β -endorphines. Par leur localisation sur les cellules du système immunitaire, les récepteurs CB2 sont également impliqués dans les effets anti-inflammatoires des cannabinoïdes en inhibant la libération d'agents pronociceptifs tels que le TNF- α et les interleukines IL-1 α et IL-1 β (175, 515).

1.3.4.2.3.1 Action périphérique et douleur neuropathique

L'administration intraplantaire d'endocannabinoïdes et de cannabinoïdes exogènes dans des modèles de ligature partielle du nerf sciatique (PNL) et de section d'un nerf spinal (SNL) ont renversé l'hyperalgésie mécanique via une activation périphérique des récepteurs CB1 et CB2 (157, 336, 501). Dans les conditions de douleur neuropathique périphérique, l'activation des récepteurs CB1 diminue la sensibilisation périphérique des fibres afférentes primaires en atténuant la libération de neurotransmetteurs et de neuropeptides au niveau présynaptique (516). L'activation des récepteurs CB2 périphériques quant à elle diminue les réponses nociceptives évoquées par la stimulation mécanique des neurones à large spectre (WDR) de la corne dorsale (501). Ces actions permettent aux cannabinoïdes de moduler les processus qui contribuent à la sensibilisation centrale.

Dans ces conditions neuropathiques, il y a une augmentation des niveaux protéiques du récepteur CB2 au niveau des neurones du DRG et au niveau des cellules gliales satellites du système nerveux périphérique (517). L'activation spécifique de ces récepteurs par l'analogue du THC, O-3223, a réduit l'hyperalgésie thermique de façon similaire à l'agoniste mixte CP-55, 940 dans un modèle de CCI. Cependant, O-3223 n'a pas engendré les effets indésirables d'hypothermie et de troubles moteurs que CP-55,940 a engendré via l'activation du récepteur CB1. Ces observations soulignent l'intérêt de cibler les récepteurs CB2 périphériques pour obtenir une action analgésique et anti-inflammatoire tout en évitant les effets indésirables médiés par CB1.

Enfin, une augmentation de l'expression des récepteurs TRPV1 au niveau des tissus périphériques et au niveau des somas des neurones du DRG a également été observée (359, 360, 512, 518). De façon intéressante, dans un modèle de neuropathie diabétique, bien que les taux

protéiques totaux de TRPV1 avaient baissé au niveau des DRG (probablement un mécanisme compensatoire pour essayer de réduire la transmission du message douloureux), la fonction de ces récepteurs elle, avait augmenté (519). Ceci s'est traduit par une augmentation de l'expression membranaire de TRPV1, une augmentation de sa phosphorylation et une plus faible désensibilisation du canal. Il y avait également une augmentation des niveaux de TRPV1 dans les fibres afférentes A β qui, en conditions physiologiques, en expriment très peu. Cette régulation à la hausse au niveau des fibres A β favoriserait une transmission des messages nociceptifs à travers ces fibres et le maintien d'une sensibilisation périphérique et centrale. À cet égard, une injection intraplantaire de CBD a permis de renverser l'hyperalgésie thermique et mécanique dans des modèles de douleur neuropathique par CCI et par SNI ; ceci était bloqué par l'injection systémique de l'antagoniste du TRPV1 capsazépine (384, 387)

2 Chapitre 2 : Facteurs pouvant influencer l'analyse des réponses biaisées des ligands de RCPG (Article I)

Avec le concept de sélectivité fonctionnelle est née l'idée que des ligands biaisés de RCPG pourraient avoir de nouvelles propriétés pharmacologiques distinctes de celles des agonistes ou des antagonistes classiques (307). Plus particulièrement, les agonistes biaisés pourraient éliminer les effets indésirables liés à la cible (« *on-target* ») en évitant les voies responsables de ces effets et en dirigeant le stimulus pharmacologique vers les voies responsables des effets thérapeutiques. C'est pourquoi de nombreuses recherches se sont concentrées sur l'identification et la quantification de l'agonisme biaisé au sein des RCPG, en particulier entre les voies des protéines G et de la β -arrestine (239, 298, 307, 308, 311). Des exemples types des recherches qui ont été menées sont l'étude du biais envers la β -arrestine pour les agonistes du récepteur de l'angiotensine II de type 1 qui pourraient avoir des propriétés protectrices dans les maladies cardiaques (307, 520), et l'étude du biais vers les protéines G pour les agonistes du récepteur MOR qui pourraient avoir des effets analgésiques sans entraîner les effets indésirables typiques des opioïdes tels que la constipation et la dépression respiratoire (239, 308, 311).

La méthode la plus utilisée pour quantifier le biais repose sur le calcul des facteurs de biais (303, 306). L'article qui suit passe en revue comment certains facteurs confusionnels peuvent affecter la quantification de ces facteurs. En particulier, nous discutons comment des variations cinétiques dans la liaison du ligand et des variations temporelles dans la signalisation des RCPG font que le biais peut varier avec le temps. Nous explorons également comment le contexte cellulaire peut influencer la magnitude et la directionnalité du biais. Il est important de tenir en compte ces facteurs confusionnels, car un biais mesuré *in vitro* sous certaines conditions pourrait ne pas être prédictif de la façon dont l'agoniste biaisé agira *in vivo*.

Contributions des auteurs

Besma Benredjem : Révision de la littérature, création de figures et écriture du manuscrit.

Paul Dallaire : Création de figures et révision du manuscrit.

Graciela Pineyro : Révision de la littérature et écriture du manuscrit.

Publié dans la revue « Current Opinion in Pharmacology » 6 décembre 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.11.008>

Analyzing biased responses of GPCR ligands

Besma Benredjem^{1,2}, Paul Dallaire^{2,3}, Graciela Pineyro^{1,2,3}.

1 Department of Pharmacology, University of Montreal, 2900 Boulevard Edouard-Montpetit, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

594 Ste-Justine Hospital Research Center, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada

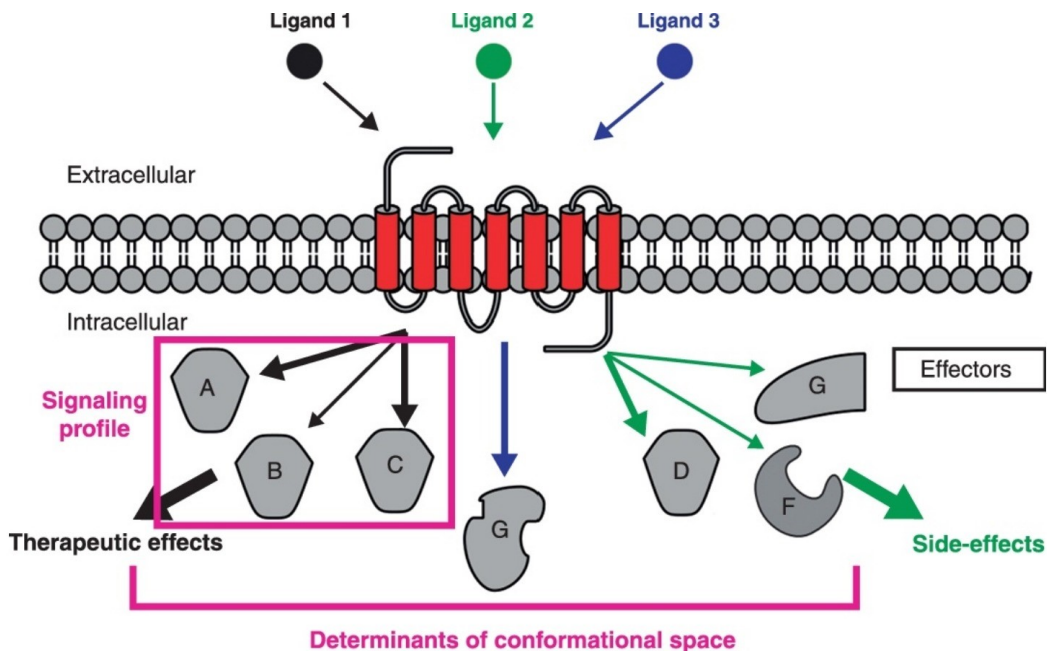
594 Department of Psychiatry, University of Montreal, 2900 Boulevard Edouard-Montpetit, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

Corresponding authors: Benredjem, Besma (besma.benredjem@umontreal.ca) and Pineyro, Graciela (89nti-inf.pineyro.filpo@umontreal.ca)

2.1 Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) are valuable targets for drug discovery. They exist in interconverting states differentially stabilized by diverse signaling partners. A ligand's capacity to distinguish among receptors associated with different partners is the basis of bias. This feature of GPCR signaling may allow development of ligands which specifically modulate effectors supporting desired actions. However, bias is time-dependent and cell-dependent such that *in vitro* bias may not predict bias displayed *in vivo*. Then again, certain signaling idiosyncrasies transcend these limitations and emerging signaling characteristics may be used to categorize ligands in terms of the signaling diversity, which is the other face of bias. Here, we discuss how time and cellular background influence magnitude/directionality of bias, and highlight approaches to categorize ligands according to signaling diversity.

Graphical abstract



2.2 Introduction

Biased agonism (or functional selectivity) refers to the ability of GPCR ligands to trigger a subset of responses among all those controlled by a receptor. Discovery of this signaling modality was paradigm shifting and moved our view of agonism from a purely quantitative and static notion of efficacy to one where signaling diversity drives outcomes. Accordingly, drug efficacy is not solely described in terms of response magnitude but also in terms of the specific complement of signals a ligand elicits from the receptor (1, 2). Since bias theoretically allows one to direct pharmacological stimuli towards pathways that are therapeutically beneficial while avoiding those associated with undesired actions (3), this recently-described signaling modality is the focus of active investigation. Significant advances have been made in terms of bias quantification (4), making it possible to use transduction coefficients ($\text{Log}(\tau/\text{KA})$) to accurately compare *in vitro* signaling preferences of different ligands while correcting for ‘observational’ or ‘system’ bias (5••, 6). On the other hand, a number of peculiarities of such measures raises the question of whether these snapshots of signaling preferences as measured *in vitro* may be predictive of how biased ligands will behave *in vivo*. In the first place, temporal variation inherent to GPCR signaling (7, 8) and differences in kinetics of ligand binding imply that bias may vary over time (9••). Second, even if current quantitative analysis allows us to correct for pathway and methodological confounders, bias remains cell-dependent (10•, 11); this means that signaling preferences identified in immortalized cell lines such as those used in ligand screening campaigns may not represent the type of bias that ligands will display when administered for therapeutic purposes. Here we consider how these peculiarities may influence information extracted from bias analysis.

2.3 Molecular determinants and cell-dependence of biased signaling

There is now considerable empirical evidence supporting a model of signaling bias where GPCRs adopt ligand-specific conformations that are differentially recognized and stabilized via direct interaction with distinct signaling partners (2, 12). First, nuclear magnetic resonance (NMR) studies have shown that a prototypical GPCR like the β 2-adrenergic receptor (β 2AR), exists in dynamic interconverting states that can be differentially stabilized by ligands of different efficacies (13, 14). This heterogeneity of ligand-bound states reduces to a fully active conformation of the

receptor through interaction with a G protein or a nanobody acting as a G protein mimic (15, 16), underscoring the importance of intracellular interactions in stabilizing the agonist-bound receptor. The fact that conformations stabilized by different intracellular nanobodies displayed distinct agonist affinities (17•) further emphasizes the extent to which cellular interaction partners may influence receptor pharmacology. Finally, differences in orientation for TM1, TM4, TM5, TM6 and TM7 in the crystal structure of G protein-associated (18) and β -arrestin-associated (19) receptors confirm that different interaction partners stabilize distinct receptor conformations. Moreover, NMR studies revealing that intracellular ends of TM3, TM5 and TM6 of mu-opioid receptors (MORs) adopt different cytosolic positions when bound to biased ligands or ligands with no preference of G protein activation over β -arrestin recruitment (20), also support a model where conformational diversity underlies distinct pharmacological responses.

Interaction partners thus define the receptor's conformational space within the cell. Since partners available for association with the receptor differ across cell types, the ensemble of signaling complexes stabilized for each ligand also varies across cellular backgrounds, as do the responses supported by these ligands. In other words, even if receptors expressed in different cells are the same genetically-encoded protein, their interactions turn them into different thermodynamic entities for which ligands display differential binding/signaling preferences. Consequently, biased responses by any given ligand are not necessarily conserved from one cell type to another (10•), or even within the same cell type under conditions of health and disease.

A supplementary layer of complexity is associated for integrative signaling responses such as cAMP production, Ca²⁺ mobilization, ERK1/2 MAP kinase phosphorylation or receptor internalization (11, 21, 22), which may represent the result of convergent signaling events. In such cases, in addition to cell-specific conformational states, ligand responses may be subject to differential processing by different cell types. For example, PKC and GRK2 are both required for delta-opioid receptor (DOR) internalization in cortical neurons, but are minimally involved in DOR sequestration in HEK 293 cells. Since the influence of PKC on internalization is ligand-specific, it is possible to appreciate how cellular characteristics may influence biased responses (11). In keeping with this notion, systematic comparison of integrative responses such as cAMP production and receptor internalization induced by MOR ligands in CHO and AtT20 cells revealed important variations, not only in the magnitude, but also in the direction of bias across these cell lines (10•, 23). At the same time, it was also observed that despite the differences associated with cellular

background, signaling properties allowed the segregation of ligands into similar groups, independent of the cell-type in which bias was assessed (10•, 23). The fact that similar clusters could be generated independently of cellular background, implies that certain signaling idiosyncrasies transcend cellular phenotypic differences and these could be used to categorize ligands in terms of the signaling diversity which supports bias. The resulting categories may not necessarily inform us of the type of signaling bias underlying desired/undesired *in vivo* responses, but it is reasonable to expect compounds with similar emerging signaling properties to display similar *in vivo* effects.

2.4 Time dependence of biased signals

The time course of different signaling processes (24, 25) and the time course of receptor occupancy by different ligands (26) are kinetic variables that determine the moment at which drug responses attain their maximal amplitude. Since the influence of time on maximal response varies according to signaling pathway and to ligand binding kinetics (9••, 10•, 27••), the magnitude of bias and the directionality of signaling preferences are also expected to undergo time-related variations. This was clearly demonstrated by Klein Herenbrink et al. (9••) who studied several dopamine D2 receptor agonists which attained maximal receptor occupancy within very different time frames (1 min, 10 min or 90 min). For the slowest binding ligands, the potency of functional responses such as cAMP accumulation, cellular impedance and G α oB activation all increased over time, an observation consistent with their progressive occupation of the receptor. For ligands with rapid dissociation kinetics, potency in the first two assays decreased with time, while that of G α oB activation was minimally modified, differences that were attributed to distinct times course of desensitization. The time course of bias between G α oB and the other two outcomes was then assessed for slow binding ligands, using a rapid dissociating agonist as the standard. Preferential activation of G α oB versus cAMP accumulation and versus cellular impedance were observed at initial time points, but this preference was reversed within 90 min of receptor stimulation, reaching almost 200-fold bias in favour of the integrative signals. The authors concluded that ligand-binding kinetics and the kinetics intrinsic to different cellular processes profoundly influenced biased agonism. Like influences of cellular background on signaling preferences, these findings have major implications for the way we analyze and interpret directionality and/or magnitude of bias in terms of how these measures correlate with *in vivo* drug effects.

2.5 The intrinsic value of directing pharmacological stimuli to specific pathways

Translating bias information into novel mechanistic insight and/or improved therapeutic ligands is limited by time and cell-dependent factors. However, it is important to realize that these limitations are integral to the way signaling preferences are assessed, and not to the notion of directing the pharmacological stimulus towards specific pathways (2). Opioid analgesics are a good example of how signaling preferences may help improve *in vivo* drug responses. Use of transgenic mice has allowed the identification of β -arrestin2 as a clear mediator of unwanted side effects for MOR analgesics (28). Based on this information, ligands that more effectively activate G protein-mediated signaling relative to promoting β -arrestin2 recruitment were synthesized and tested in preclinical models, revealing the agonist TRV130 which displayed similar analgesic properties as morphine but reduced tendency to induce constipation and respiratory depression (29). A strategy of directing pharmacological stimulus towards preferential G protein activation over β -arrestin2 recruitment was more recently applied to optimize novel chemical scaffolds docked to MORs (30•). The resulting lead compound (PZM21) did not engage MORs in the same way as TRV130, but still shared its preference for G protein signaling over β -arrestin2 recruitment. More importantly, despite differences in structure and in the way they bound to the receptor, PZM21 and TRV130 displayed analgesic efficacy with minimal constipation and respiratory depression (29, 30•), confirming trafficking of pharmacological stimuli towards specific pathways as a strategy to obtain desired *in vivo* outcomes. The analgesic efficacy of TRV130 in the treatment of moderate to severe acute pain has been clinically confirmed (31, 32), but typical opioid-related side effects were also present (32). The authors suggested that fixed dosing methodology used in this phase II trial precluded robust tolerability comparisons, and that efficacy assessment in a more clinically relevant dosing scheme such as patient-controlled analgesia would more effectively reveal tolerability benefits of the biased ligand (32).

2.6 ‘Signaling phenotypes’ and stratification strategies as predictive tools in drug discovery

Because β -arrestin2 signaling has been directly linked to desirable and adverse clinical responses (3), the majority of studies have focused on bias between β -arrestin2-dependent and G

protein-dependent signaling (30•, 33, 34, 35). However, ligand signaling preferences have also been observed with respect to activation of different $G\alpha$ subunits (27••, 36, 37, 38) as well as engagement of the $G\beta\gamma$ -RGS7 complex (39). Although the clinical benefits associated with these and other types of signaling preferences (e.g. differential activation of heterotrimeric G proteins with distinct $G\beta\gamma$ combinations (40, 41)) are only starting to be considered, they herald unprecedented complexity in drug signaling properties, and raise the question as to how to handle signaling granularity in terms of ligand characterization.

Cell-dependent and time-dependent confounders introduce variation which hampers the use of bias estimates as the sole guide to obtain ligands with the best desirable versus side effect profiles (9••, 10•). At the same time, bias is the functional expression of specific signaling complexes formed by the ligand, the receptor and a directly interacting signaling partner. These partners delineate a unique conformational space which defines textured signaling profiles for each ligand-receptor pair (12). A way to scan this conformational space and trace the signaling phenotypes it determines for different ligands is to monitor compound efficacy to modify signaling partners which directly stabilize the ligand-occupied receptor. BRET-based and/or FRET-based sensors allow to monitor rearrangements among heterotrimeric $G\alpha\beta\gamma$ subunits (27••, 42, 43, 44), between receptors and G proteins (43, 44), G proteins and downstream effectors (45, 46) or receptors and β -arrestins (47). These tools can be used in heterologous systems to produce ‘conformation-based signaling phenotypes’ which should be less influenced by cell-specific confounders than integrative cellular responses. Figure 1a shows ligand preferences for receptors associated with different signaling partners. Ligand-induced conformational changes at the interface of receptor and each interaction partner can be monitored; the resulting measures of response (pEC50, Emax and/or $\text{Log}(\tau/\text{KA})$) at each of these interfaces can be then combined to produce a signaling profile for each ligand. Profiles containing comprehensive information for multiple ligands may be then stratified using clustering methods to group compounds according to signaling similarities (phenotypes) (Figure 1b). Ligands that are representative of each of the resulting clusters can be then tested in pre-clinical models to determine which phenotypes most frequently/efficiently support desired and undesired *in vivo* responses (Figure 1c). Being generated with biosensors and using immortalized cell-lines, these phenotypes would not necessarily generate a mechanistic link between signaling phenotypes and the clinical outcome being sought. They nonetheless provide a starting point for associating specific phenotypes with desired/undesired clinical outcomes.

One can further envision the use of inducible pluripotent stem cells (48) to characterize signaling phenotypes in more relevant cell models which mediate desired therapeutic actions and undesired, on-target effects. In these circumstances application of label-free methods in combination with integrative pharmacologic approaches (49, 50) should allow generation of signaling profiles while simultaneously embracing the intricacies of cell-specific responses. By clustering ligands according to these signaling phenotypes, it should be possible to identify compounds whose signaling efficacies predominantly evoke responses in cells mediating desired therapeutic actions and ligands that preferentially engage signaling in cells responsible for side effects. Returning to the MOR ligand example, this type of approach could allow a better definition of the overall contingent of signals responsible for central/peripheral analgesic actions of opioids versus myenteric signals contributing to constipation.

In conclusion, trafficking of pharmacological stimuli towards specific signaling pathways is a promising avenue for development of novel and better therapeutic GPCR ligands. The way signaling preferences are currently assessed introduces cell and time-specific confounders that complicate the identification of promising ligands. The introduction of novel cellular models and use of clustering methods to manage signaling diversity should warrant further exploration of this promising avenue for drug discovery.

2.7 Conflict of interest statement

Nothing declared.

2.8 References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

2.9 Acknowledgements

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [Grant 311997] and the Canadian Institutes of Health Research [Grant MOP 324876]. BB was supported by a scholarship granted by the Algerian government and the Ministry of Education, Recreation and Sports (Canada), and PD is recipient of a Mathematics of Information Technology and Complex Systems (MITACS) postdoctoral fellowship.

2.10 References

1 J.D. Urban, W.P. Clarke, M. Von Zastrow, D.E. Nichols, B. Kobilka, H. Weinstein, J.A. Javitch, B.L. Roth, A. Christopoulos, P.M. Sexton, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology *J Pharmacol Exp Ther*, 320 (2007), pp. 1-13.

2 T. Kenakin. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol*, 72 (2007), pp. 1393-1401.

3 J.D. Violin, A.L. Crombie, D.G. Soergel, M.W. Lark. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress *Trends Pharmacol Sci*, 35 (2014), pp. 308-316.

4 T. Kenakin, C. Watson, V. Muniz-Medina, A. Christopoulos, S. Novick. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias *ACS Chem Neurosci*, 3 (2012), pp. 193-203.

5•• L.A. Stott, D.A. Hall, N.D. Holliday. Unravelling intrinsic efficacy and ligand bias at G protein coupled receptors: a practical guide to assessing functional data *Biochem Pharmacol*, 101 (2016), pp. 1-12.

This review focuses on quantitative analysis of bias particularly comparing strengths and weakness of the Black and Leff operational model to those of other current methods of bias: quantification using logistic curve fitting and a version of the operational model which takes into account constitutive activity of the system.

6 T. Kenakin, A. Christopoulos. Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nat Rev Drug Discov*, 12 (2013), p. 483.

7 S. Ferrandon, T.N. Feinstein, M. Castro, B. Wang, R. Bouley, J.T. Potts, T.J. Gardella, J.P. Vilardaga. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol*, 5 (2009), pp. 734-742.

8 R. Irannejad, J.C. Tomshine, J.R. Tomshine, M. Chevalier, J.P. Mahoney, J. Steyaert, S.G. Rasmussen, R.K. Sunahara, H. El-Samad, B. Huang, et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*, 495 (2013), pp. 534-538.

9•• C. Klein Herenbrink, D.A. Sykes, P. Donthamsetti, M. Canals, T. Coudrat, J. Shonberg, P.J. Scammells, B. Capuano, P.M. Sexton, S.J. Charlton, et al. The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. *Nat Commun*, 7 (2016), p. 10842.

This article uses the example of the D2 receptor to provide detailed account of how ligand binding kinetics and the time course of response may influence the magnitude and directionality of bias.

10• G.L. Thompson, J.R. Lane, T. Coudrat, P.M. Sexton, A. Christopoulos, M. Canals. Systematic analysis of factors influencing observations of biased agonism at the mu-opioid receptor. *Biochem Pharmacol*, 113 (2016), pp. 70-87.

Authors examined biased agonism for MOR ligands in two different cellular backgrounds, in cells with different protein complements and using receptors from different species (hMOR and mMOR). They provide examples of how each of these variables influence bias estimates.

11 I. Charfi, K. Nagi, O. Mnie-Filali, D. Thibault, G. Balboni, P.W. Schiller, L.E. Trudeau, G. Pineyro. Ligand- and cell-dependent determinants of internalization and cAMP modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cell Mol Life Sci*, 71 (2014), pp. 1529-1546.

12 T. Kenakin, L.J. Miller. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev*, 62 (2010), pp. 265-304.

13 Y. Kofuku, T. Ueda, J. Okude, Y. Shiraishi, K. Kondo, M. Maeda, H. Tsujishita, I. Shimada. Efficacy of the beta(2)-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat Commun*, 3 (2012), p. 1045.

14 R. Nygaard, Y. Zou, R.O. Dror, T.J. Mildorf, D.H. Arlow, A. Manglik, A.C. Pan, C.W. Liu, J.J. Fung, M.P. Bokoch, et al. The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell*, 152 (2013), pp. 532-542.

15 R. Sounier, C. Mas, J. Steyaert, T. Laeremans, A. Manglik, W. Huang, B.K. Kobilka, H. Demene, S. Granier. Propagation of conformational changes during mu-opioid receptor activation. *Nature*, 524 (2015), pp. 375-378.

16 A. Manglik, T.H. Kim, M. Masureel, C. Altenbach, Z. Yang, D. Hilger, M.T. Lerch, T.S. Kobilka, F.S. Thian, W.L. Hubbell, et al. Structural insights into the dynamic process of beta2-adrenergic receptor signaling. *Cell*, 161 (2015), pp. 1101-1111.

17• D.P. Staus, R.T. Strachan, A. Manglik, B. Pani, A.W. Kahsai, T.H. Kim, L.M. Wingler, S. Ahn, A. Chatterjee, A. Masoudi, et al. Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature*, 535 (2016), pp. 448-452.

Here authors use β 2ARs reconstituted into nanodiscs in combination with radioligand binding to show that positive (Nb80) and negative (Nb60) allosteric nanobodies stabilize receptor

conformations with differential affinities for full and partial agonists. It is a very elegant demonstration of how intracellular interactions may determine receptor pharmacology.

18 S.G. Rasmussen, B.T. DeVree, Y. Zou, A.C. Kruse, K.Y. Chung, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477 (2011), pp. 549-555.

19 Y. Kang, X.E. Zhou, X. Gao, Y. He, W. Liu, A. Ishchenko, A. Barty, T.A. White, O. Yefanov, G.W. Han, et al. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*, 523 (2015), pp. 561-567.

20 J. Okude, T. Ueda, Y. Kofuku, M. Sato, N. Nobuyama, K. Kondo, Y. Shiraishi, T. Mizumura, K. Onishi, M. Natsume, et al. Identification of a conformational equilibrium that determines the efficacy and functional selectivity of the mu-opioid receptor. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54 (2015), pp. 15771-15776.

21 V.A. Alvarez, S. Arttamangkul, V. Dang, A. Salem, J.L. Whistler, M. Von Zastrow, D.K. Grandy, J.T. Williams. Mu-Opioid receptors: ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization, and internalization *J Neurosci*, 22 (2002), pp. 5769-5776

22 R.S. Ostrom, A.S. Bogard, R. Gros, R.D. Feldman. Choreographing the adenylyl cyclase signalosome: sorting out the partners and the steps. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 385 (2012), pp. 5-12.

23 G.L. Thompson, J.R. Lane, T. Coudrat, P.M. Sexton, A. Christopoulos, M. Canals. Biased agonism of endogenous opioid peptides at the mu-opioid receptor. *Mol Pharmacol*, 88 (2015), pp. 335-346.

24 S.K. Shenoy, M.T. Drake, C.D. Nelson, D.A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R.T. Premont, O. Lichtarge, R.J. Lefkowitz. Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 281 (2006), pp. 1261-1273.

25 C. Blanchet, C. Luscher. Desensitization of mu-opioid receptor-evoked potassium currents: initiation at the receptor, expression at the effector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002), pp. 4674-4679.

26 D. Guo, J.M. A.P. I.J. Hillger, L.H. Heitman. Drug-target residence time — a case for G protein-coupled receptors. *Med Res Rev*, 34 (2014), pp. 856-892.

27•• I. Masuho, O. Ostrovskaya, G.M. Kramer, C.D. Jones, K. Xie, K.A. Martemyanov. Distinct profiles of functional discrimination among G proteins determine the actions of G protein-coupled receptors. *Sci Signal*, 8 (2015), p. Ra123.

By using BRET-based biosensors this article provides various examples of pleiotropic coupling to multiple G-proteins. Maximal response and kinetics of G-protein engagement are used as criteria to define differential profiles of G protein activation by different receptors and their ligands.

28 K.M. Raehal, J.K. Walker, L.M. Bohn. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 314 (2005), pp. 1195-1201.

29 S.M. DeWire, D.S. Yamashita, D.H. Rominger, G. Liu, C.L. Cowan, T.M. Graczyk, X.T. Chen, P.M. Pitis, D. Gotchev, C. Yuan, et al. A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 344 (2013), pp. 708-717.

30• A. Manglik, H. Lin, D.K. Aryal, J.D. McCorvy, D. Dengler, G. Corder, A. Levit, R.C. Kling, V. Bernat, H. Hubner, et al. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*, 537 (2016), pp. 185-190.

By computationally docking more than 3 million molecules on the MOR structure authors identified a new scaffold unlike other known opioids. The study shows a nice example of structure optimization to obtain a MOR-selective ligand which activates Gi with minimal β arr2 recruitment.

31 D.G. Soergel, R.A. Subach, N. Burnham, M.W. Lark, I.E. James, B.M. Sadler, F. Skobieranda, J.D. Violin, L.R. Webster. Biased agonism of the mu-opioid receptor by TRV130 increases analgesia and reduces on-target adverse effects versus morphine: a randomized, double-blind, placebo- controlled, crossover study in healthy volunteers. *Pain*, 155 (2014), pp. 1829-1835.

32 E.R. Viscusi, L. Webster, M. Kuss, S. Daniels, J.A. Bolognese, S. Zuckerman, D.G. Soergel, R.A. Subach, E. Cook, F. Skobieranda. A randomized, phase 2 study investigating TRV130, a biased ligand of the mu-opioid receptor, for the intravenous treatment of acute pain. *Pain*, 157 (2016), pp. 264-272.

33 J.A. Allen, J.M. Yost, V. Setola, X. Chen, M.F. Sassano, M. Chen, S. Peterson, P.N. Yadav, X.P. Huang, B. Feng, et al. Discovery of beta-arrestin-biased dopamine D2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (2011), pp. 18488-18493.

34 Z. Rankovic, T.F. Brust, L.M. Bohn. Biased agonism: an emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, 26 (2016), pp. 241-250.

35 D. Wacker, C. Wang, V. Katritch, G.W. Han, X.P. Huang, E. Vardy, J.D. McCorvy, Y. Jiang, M. Chu, F.Y. Siu, et al. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 340 (2013), pp. 615-619.

36 S. Allouche, J. Polastron, A. Hasbi, V. Homburger, P. Jauzac. Differential G-protein activation by alkaloid and peptide opioid agonists in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *Biochem J*, 342 (Pt 1) (1999), pp. 71-78.

37 A.G. Soto, T.H. Smith, B. Chen, S. Bhattacharya, I.C. Cordova, T. Kenakin, N. Vaidehi, J. Trejo. N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 at extracellular loop 2 regulates G-protein signaling bias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (2015), pp. E3600-E3608.

- 38 L. Gazi, S.A. Nickolls, P.G. Strange. Functional coupling of the human dopamine D2 receptor with G α i1, G α i2, G α i3 and G α o G proteins: evidence for agonist regulation of G protein selectivity. *Br J Pharmacol*, 138 (2003), pp. 775-786.
- 39 D. Karpinsky-Semper, C.H. Volmar, S.P. Brothers, V.Z. Slepak. Differential effects of the Gbeta5-RGS7 complex on muscarinic M3 receptor-induced Ca²⁺ influx and release. *Mol Pharmacol*, 85 (2014), pp. 758-768.
- 40 Y. Lin, A.V. Smrcka. Understanding molecular recognition by G protein betagamma subunits on the path to pharmacological targeting. *Mol Pharmacol*, 80 (2011), pp. 551-557.
- 41 G. Pineyro. Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cell Signal*, 21 (2009), pp. 179-185.
- 42 V.O. Nikolaev, C. Hoffmann, M. Bunemann, M.J. Lohse, J.P. Vilaradaga. Molecular basis of partial agonism at the neurotransmitter alpha2 A-adrenergic receptor and Gi-protein heterotrimer. *J Biol Chem*, 281 (2006), pp. 24506-24511.
- 43 C. Gales, R.V. Rebois, M. Hogue, P. Trieu, A. Breit, T.E. Hebert, M. Bouvier. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2 (2005), pp. 177-184.
- 44 N. Audet, C. Gales, E. Archer-Lahlou, M. Vallieres, P.W. Schiller, M. Bouvier, G. Pineyro. Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem*, 283 (2008), pp. 15078-15088.
- 45 M. Richard-Lalonde, K. Nagi, N. Audet, R. Sleno, M. Amraei, M. Hogue, G. Balboni, P.W. Schiller, M. Bouvier, T.E. Hebert, et al. Conformational dynamics of Kir3.1/Kir3.2 channel activation via delta-opioid receptors. *Mol Pharmacol*, 83 (2013), pp. 416-428.
- 46 I. Riven, S. Iwanir, E. Reuveny. GIRK channel activation involves a local rearrangement of a preformed G protein channel complex. *Neuron*, 51 (2006), pp. 561-573.
- 47 B. Zimmerman, A. Beautrait, B. Aguila, R. Charles, E. Escher, A. Claing, M. Bouvier, S.A. Laporte. Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal*, 5 (2012), p. Ra33.
- 48 H.C. Ko, B.D. Gelb. Concise review: drug discovery in the age of the induced pluripotent stem cell. *Stem Cells Transl Med*, 3 (2014), pp. 500-509.
- 49 W. Stallaert, J.F. Dorn, E. Van der Westhuizen, M. Audet, M. Bouvier. Impedance responses reveal beta(2)-adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles. *PLoS ONE*, 7 (2012), p. E29420.
- 50 M. Morse, H. Sun, E. Tran, R. Levenson, Y. Fang. Label-free integrative pharmacology on-target of opioid ligands at the opioid receptor family. *BMC Pharmacol Toxicol*, 14 (2013), p. 17.

2.11 Figures

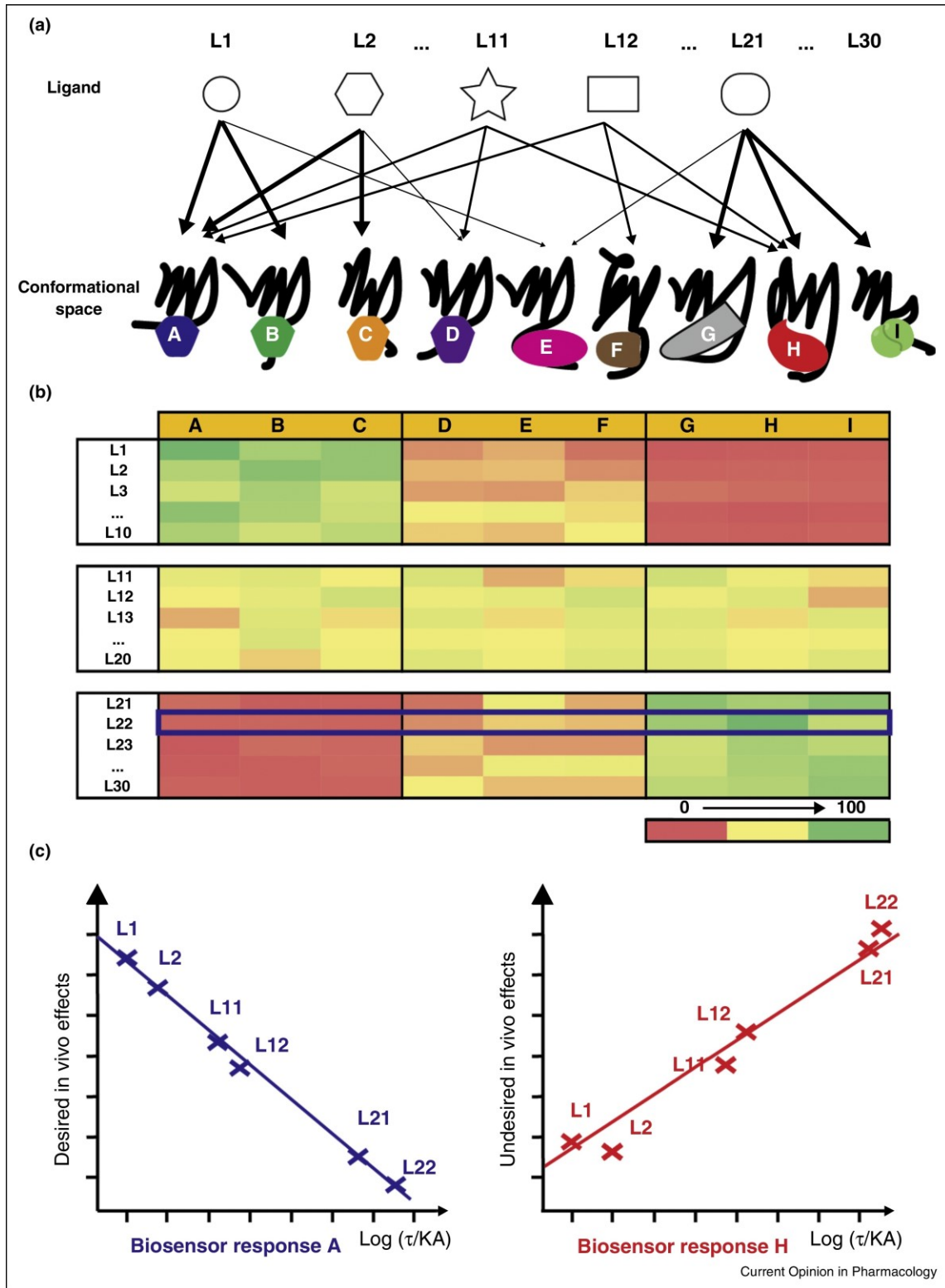


Figure 14. Comprehensive ‘signaling profiles’ define ‘signaling phenotypes’ with predictive value over *in vivo* responses.

Interaction partners define a conformational space for the receptor which support textured signaling by each ligand. **(b)** Ligand-induced responses at each of these interaction points can be quantified and combined to produce a *signaling profile* for each ligand. An example of one of such profiles is enclosed within the small blue rectangle. Profiles can be stratified to define clusters of ligands with similar signaling profiles to define a *signaling phenotype* (each of the large three rectangles). **(c)** Representatives of each phenotype may be tested *in vivo* to associate desired/undesired responses to *in vitro* signaling.

3 Chapitre 3 : Hypothèses et objectifs

Que ce soit pour le traitement de douleurs aiguës ou chroniques, l'utilisation d'analgésiques efficaces pour gérer la douleur est essentielle afin d'assurer une bonne qualité de vie des patients et une bonne convalescence sans complications ultérieures. L'innocuité des analgésiques administrés est également un enjeu crucial. C'est pourquoi il est important d'amener le plus rapidement possible au marché de nouveaux analgésiques, qu'ils soient opioïdes ou cannabinoïdes, qui répondent à ces critères. Pour ce faire, une bonne caractérisation préclinique des propriétés pharmacodynamiques des candidats-médicaments est essentielle. L'objectif principal de cette thèse était donc de caractériser des propriétés signalétiques des agonistes opioïdes permettant d'identifier des candidats avec un profil d'effets indésirables réduit, ainsi que de caractériser les propriétés analgésiques des phytocannabinoïdes et les cibles pharmacodynamiques impliquées dans cette réponse. Ces deux études sont reliées par le fait que l'étude sur les phytocannabinoïdes est une étape préalable à l'application des mêmes méthodes et objectifs que ceux utilisés dans l'étude sur les opioïdes mais dans un système pharmacologique analgésique différent (le système endocannabinoïde).

3.1 Classification pharmacodynamique des ligands des récepteurs opioïdes pour inférer leurs effets indésirables potentiels

Une des méthodes qui a été fortement étudiée pour la découverte d'analgésiques plus sécuritaires est le développement d'agonistes biaisés du récepteur MOR envers la voie des protéines G vs celle de la β -arrestine. Or, comme décrit dans la section précédente (article I) et ailleurs (301, 521), de nombreuses limitations sont associées au calcul des facteurs de biais. Nous avons donc tenté de proposer une méthode alternative à la mesure du biais.

L'hypothèse du premier article de cette thèse était que des ligands de RCPG qui ont des propriétés signalétiques similaires à travers une multitude de voies auraient également des potentiels similaires à induire des effets thérapeutiques et indésirables en clinique. Nous pensons donc qu'en classifiant des ligands du MOR selon leurs similarités de paramètres pharmacodynamiques mesurés *in vitro*, nous pourrions générer des catégories de ligands du MOR qui auraient des profils d'effets indésirables cliniques similaires (Article II). Comme la réponse

pharmacodynamique d'un ligand est déterminée par des complexes signalétiques spécifiques formés par le ligand, le récepteur et les partenaires signalétiques, nous avons choisi d'utiliser la méthode de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) pour étudier les réponses des agonistes du MOR à travers 10 voies représentatives de β -arrestines et des protéines G. La méthode de BRET permet de monitorer les changements conformationnels entre les différents partenaires signalétiques et a pour avantage d'être moins susceptible d'être influencée par des paramètres propres au contexte cellulaire. De plus, nous avons utilisé des effecteurs proximaux afin d'éviter autant que possible les facteurs confusionnels qui peuvent résulter d'interactions (cross-talk) entre les différentes voies de signalisation (462, 463). Afin de quantifier et de décrire de façon optimale l'agonisme des différents agonistes opioïdes testés, nous avons utilisé les paramètres de réponse maximale E_{max} , de puissance EC_{50} ainsi que les paramètres du modèle opérationnel τ et $\text{Log}(\tau/K_A)$.

3.2 Les contenus en THC et en CBD des médicaments à base de cannabis sont-ils de bons descripteurs de leurs potentiels analgésiques ?

Malgré un potentiel prometteur dans les modèles précliniques, il existe présentement peu de médicaments à base de cannabis approuvés sur le marché pour le soulagement des douleurs chroniques neuropathiques. La régulation de ces derniers est basée sur leurs contenus de THC et sur des ratios THC:CBD standardisés. Cette pratique est fondée sur la supposition que les contenus en THC et en CBD sont représentatifs des effets biologiques des cannabinoïdes. Or, les extraits de cannabis contiennent une multitude d'autres composants qui peuvent interagir entre eux et aboutir à différents effets cliniques. Notre hypothèse du deuxième article de cette thèse était donc que les contenus en THC et en CBD ne seraient pas forcément de bons descripteurs des effets biologiques des cannabinoïdes, et en particulier de leurs effets analgésiques (Article III). Nous avons alors comparé les réponses analgésiques de traitements cannabinoïdes qui avaient des compositions chimiques différentes, mais qui avaient des contenus équivalents de THC et (ou) de CBD dans un modèle de neuropathie diabétique chez des rats. Nous avons choisi ce modèle de douleur chronique neuropathique, car la douleur chronique est l'une des conditions pour lesquelles le cannabis médical est le plus consommé (369-373) et, car la neuropathie diabétique est la forme de neuropathie la plus répandue dans la population (45-47). De plus, c'est un modèle que nous avons optimisé dans le laboratoire et qui nous a permis de distinguer les propriétés analgésiques de

différents agonistes du DOR (522). Il est connu que les récepteurs CB1, CB2 et des canaux TRPV1 sont des cibles majeures du système endocannabinoïde qui sont surexprimées dans les conditions neuropathiques (499, 519). Néanmoins, peu de données existent sur la façon dont différentes compositions de cannabinoïdes engagent ces cibles pour induire leurs réponses analgésiques. Nous avons donc testé la possibilité que différents traitements cannabinoïdes puissent recruter de façon distincte ces cibles thérapeutiques.

4 Chapitre 4 : Classification pharmacodynamique des ligands opioïdes et association avec leurs effets indésirables (Article II)

Bien que l'agonisme biaisé soit un concept éloquent en théorie, lorsque des agonistes du MOR biaisés vers la protéine G par rapport à la β -arrestine furent testés *in vivo* et en clinique, ils n'ont pas pu répondre aux attentes initiales d'une absence d'effets indésirables (ils avaient toutefois une fenêtre thérapeutique légèrement améliorée par rapport à la morphine et au fentanyl) (236, 314, 316, 317). Parmi les raisons expliquant ces échecs sont les défis qui se posent avec la quantification du biais. En effet, la méthode actuellement utilisée pour investiguer le biais repose sur l'utilisation des coefficients de transduction normalisés $\Delta \log (\tau/K_A)$ pour calculer des facteurs de biais. Cette méthode permet de comparer seulement deux voies de signalisation entre elles et ne permet pas de représenter la complexité de signalisation des récepteurs MOR ainsi que les préférences d'un ligand à travers toutes ces voies.

Nous avons vu dans l'article I que des facteurs confusionnels temporels et liés au contexte cellulaire pouvaient influencer la magnitude et la directionnalité du biais (463). De plus, d'après une étude menée par Onaran et al., la valeur du facteur de biais estimé varie selon la méthode de calcul utilisé (301), différentes méthodes peuvent donc aboutir à différentes préférences signalétiques. Il était donc important de développer une meilleure stratégie d'évaluation des candidats-médicaments afin d'identifier de nouveaux analgésiques opioïdes avec un meilleur profil thérapeutique. C'est ce que nous avons voulu faire dans l'article qui suit où nous avons développé une méthode qui permet de classer les agonistes du MOR et d'autres RCPG selon leurs similarités en termes d'activation d'une multitude de voies de signalisation. Nous avons démontré que ces clusters qui regroupent des ligands avec des similitudes signalétiques pouvaient être associés à des fréquences de rapports des effets respiratoires, gastro-intestinaux et de somnolence pour différents opioïdes utilisés en clinique. La principale différence entre les clusters était l'efficacité des agonistes. Nous avons également trouvé que les effets indésirables des opioïdes étaient associés aussi bien à des signaux d'activation des protéines G que ceux de recrutement des β -arrestines. Nous étions alors, à notre connaissance, les premiers à suggérer que le profil légèrement amélioré des agonistes du MOR dit « biaisés » était dû à leur faible efficacité intrinsèque à activer le MOR et non à un agonisme biaisé vers les protéines G par rapport à la β -arrestine.

Contributions des auteurs

Besma Benredjem : Conception et coordination du projet ; exécution des expériences de BRET reliées à l'activation des récepteurs opioïdes; conception des profils des composés virtuels, analyse de l'ensemble des données (à l'exception des analyses de clustering effectuées par Jonathan Gallion et Paul Dallaire) ; création et édition des figures, tableaux, figures supplémentaires et tableaux supplémentaires (sauf les figures et figures supplémentaires reliées au clustering qui étaient effectuées par Jonathan Gallion et Paul Dallaire) ; écriture, révision et soumission du manuscrit.

Jonathan Gallion : Conception du projet ; analyses bio-informatiques de clustering reliée aux récepteurs opioïdes, au récepteur β 2-adrenergique et aux données structurales ; comparaison des matrices de similarité et écriture du manuscrit.

Paul Dallaire : Analyses bio-informatiques de simulation et de clustering des composés virtuels et écriture du manuscrit.

Johanie Charbonneau, Karim Nagi et Viktoryia Lukashova : Exécution des expériences de BRET reliées à l'activation des récepteurs opioïdes.

Dennis Pelletier, Mark Gosink et Christopher Somps : Compilation des scores gamma standardisés pour les effets indésirables des opioïdes fréquemment rapportés à la FDA.

Stephen Jenkinson et Yong Ren : Expérience d'inhibition de contractilité de l'iléon de cochon d'inde.

Brigitte Murat et Emma Van Der Westhuizen : Exécution des expériences de BRET reliées à l'activation du récepteur β 2-adrenergique.

Christian Le Guill : conception des biosenseurs pour les expériences de BRET sauf le Kir3.2-GFP10.

Darren Cawkill : Conception du projet.

Anne Schmid, et Olivier Lichtarge : Conception et supervision du projet.

Michel Bouvier : Conception, supervision du projet et révision du manuscrit.

Graciela Pineyro : Conception, coordination et supervision du projet et écriture du manuscrit.

*Besma Benredjem et Jonathan Gallion sont co-premiers auteurs.

Publié dans la revue « Nature Communications » le 9 septembre 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>

Exploring use of unsupervised clustering to associate signaling profiles of GPCR ligands to clinical response

Besma Benredjem^{1,2,11}, Jonathan Gallion^{3,11}, Dennis Pelletier⁴, Paul Dallaire^{1,2}, Johanie Charbonneau², Darren Cawkill^{4,7}, Karim Nagi⁵, Mark Gosink⁴, Viktoryia Lukashova⁶, Stephen Jenkinson^{4,8}, Yong Ren^{4,9}, Christopher Somps⁴, Brigitte Murat⁶, Emma Van Der Westhuizen^{6,10}, Christian Le Gouill⁶, Olivier Lichtarge³, Anne Schmidt⁴, Michel Bouvier^{6**} & Graciela Pineyro^{1,2*}.

Affiliations:

1 Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada.

2 CHU Sainte-Justine research center, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

3 Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA.

594 Pfizer Inc, Groton, CT 06340, USA.

594 College of Medicine, Member of QU Health, Qatar University, Doha, Qatar.

594 Institute for Research in Immunology and Cancer, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada.

7 Present address: Apollo Therapeutics LLP, Stevenage Bioscience Catalyst, Gunnels Wood Road, Stevenage, SG1 2FX, UK.

8 Present address: Pfizer Inc, La Jolla, CA 92121, USA.

9 Present address: Decibel Therapeutics, 1325 Boylston Street, Boston, MA 02215, USA.

10 Present address: Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Parkville, VIC 3052, Australia.

11 These authors contributed equally

* Corresponding author: graciela.pineyro.filpo@umontreal.ca

** Co-corresponding author: michel.bouvier@umontreal.ca

4.1 Abstract

Signaling diversity of G protein-coupled (GPCR) ligands provides novel opportunities to develop more effective, better-tolerated therapeutics. Taking advantage of these opportunities requires identifying which effectors should be specifically activated or avoided so as to promote desired clinical responses and avoid side effects. However, identifying signaling profiles that support desired clinical outcomes remains challenging. This study describes signaling diversity of mu opioid receptor (MOR) ligands in terms of logistic and operational parameters for ten different in vitro readouts. It then uses unsupervised clustering of curve parameters to: classify MOR ligands according to similarities in type and magnitude of response, associate resulting ligand categories with frequency of undesired events reported to the pharmacovigilance program of the Food and Drug Administration and associate signals to side effects. The ability of the classification method to associate specific in vitro signaling profiles to clinically relevant responses was corroborated using β 2-adrenergic receptor ligands.

4.2 Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) modulate practically every aspect of human physiology and are the target of ~30% of FDA-approved medicines¹. When activated these receptors undergo conformational changes^{2,3} that determine the type and the magnitude of signals triggered within the cell⁴. This signaling configuration supports ligand-specific activation of the different pathways⁴, and provides a theoretical opportunity for directing pharmacological stimulus toward pathways that underlie desired therapeutic responses and away from those responsible for undesired side effects^{5,6}. However, in spite of this promise⁵ development of therapeutic biased ligands has yet to translate into more effective and/or better-tolerated medicines^{7,8,9,10,11}.

Different challenges have hindered the development of clinically effective biased ligands. Except for limited examples^{12,13,14}, we ignore the signals underlying desired and undesired clinical responses of GPCR ligands. To access this knowledge and apply it to drug discovery, it is necessary to identify signaling preferences and to associate distinct signaling profiles to desired/undesired clinical outcomes^{15,16}. The way in which signaling preferences are currently identified in drug discovery efforts involves calculation of “bias factors”, an approach that uses consolidated ($\text{Log}(\tau/\text{KA})$) transduction coefficients to measure the extent to which a ligand preferentially activates one pathway over another^{17,18,19}. This type of evaluation compares signals in a pairwise manner, a dichotomous approach that provides a fragmented view of a ligand’s signaling preferences across the multiplicity of pathways. Perhaps more troubling for the use of “bias factors” as descriptors of potential clinical responses is the fact that their estimated magnitudes vary with the calculation method used to produce them¹⁵. Finally, the same “bias factor” may describe drugs with very different efficacies at the pathways of interest²⁰ further questioning the value of these measures as predictors of desired/undesired in vivo responses. In an effort to circumvent at least some of these limitations, we sought an alternative way to identify signaling preferences and classify GPCR ligands.

One of the most studied examples of how biased signaling may support development of more effective and/or better-tolerated therapeutic agents is that of opioid analgesics. Preclinical models have indicated that β -arrestin2 (β arr2) knockout mitigates constipation and respiratory depression induced by morphine²¹, pointing to the possibility that mu opioid receptor (MOR) agonists that preferentially activate G protein signaling over β arr2 recruitment could induce less of

these side effects^{12,13,14}. Here, we use this prototypical example to establish that clustering MOR ligands according to similarities in pharmacodynamic parameters for multiple responses, captures their signaling differences and preferences. We show that ligands with similar G protein/ β arr responses cluster together, and provide evidence that ligands within different categories display distinct frequencies of gastrointestinal and respiratory events reported to the FDA pharmacovigilance program. Moreover, when ligands are clustered according to either G protein or β arr responses both signals directly associate to side effects. The practical value of the classification method proposed is further illustrated by the fact that ligand categories defined by similarity of G protein responses at β 2-adrenergic receptor (β 2AR) correlate with sympatholytic cardiovascular (CV) events and bronchoconstriction.

4.3 Results

4.3.1 Clustering ligands according to pharmacodynamic similarities

We sought a method to identify and group together ligands with overall similarities in a multiplicity of signaling pathways while simultaneously discerning those with overall differences in features, such as efficacy, potency, and signaling preferences. To test the ability of the method to accomplish this task independent of idiosyncrasies in experimental data sets, we generated a set of 320 virtual compounds as variations of 16 prototypical profiles characterized by a combination of pharmacodynamic features across six different readouts (see the Methods section). Profiles are shown in Supplementary Fig. 1. Criteria to classify ligands according to pharmacodynamic similarities were empirically established by generating matrices, in which each ligand was represented by individual logistic (E_{\max} , pEC50) or operational ($\text{Log}(\tau)$, pKA, $\text{Log}(\tau/\text{KA})$) parameters, as well as their combinations. Matrices were then subject to nonnegative matrix factorization (NNMF)²² to identify essential, nonredundant features, and k-means clustering was subsequently used to classify ligands according to these features²³. Iterations were used to incorporate the error associated with each mean parameter value, ensuring its propagation throughout the clustering procedure (see the Methods and Supplementary Fig. 2). The result of this procedure was a ligand \times ligand similarity matrix that quantifies how frequently any two compounds clustered together over the iterations. Final similarity matrices were submitted to

hierarchical clustering to establish row and column ordering according to similarity, and visualized as heatmaps. Figure 1 shows heatmaps for the progressive associations of parameters leading to identification of $\text{Log}(\tau)$, E_{max} , and $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ as a combination faithfully recreating the 16 profiles initially defined. Operational efficacy (τ) by itself was not sufficient to fully distinguish ligands with different profiles (Fig. 1a, d). Introducing measures of signaling capacity (E_{max}) improved the classification (Fig. 1, e), but discrimination was not optimal unless values for transduction coefficient $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ were also included (Fig. 1c, f). Unlike $\text{Log}(\tau)$ and E_{max} values, transduction coefficients incorporate potency information^{24,25} and thus provide a different dimension on which ligands can be distinguished. In effect, $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ coefficients were correlated with logistic potency estimates (pEC50) (Supplementary Fig. 3a), so the classification afforded by $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} -pEC50 (Supplementary Fig. 3b, c) was quite similar to the one produced with $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} - $\text{Log}(\tau/\text{KA})$. Profiles recreated by classifying ligands according to $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} - $\text{Log}(\tau/\text{KA})$, are shown in Supplementary Fig. 4, revealing a minimal number of displaced compounds.

We then applied the proposed classification strategy on experimental data. Multidimensional signaling profiles for this analysis were generated using ten different BRET-based biosensors that monitor β arr recruitment and G protein signaling. G-protein signaling was monitored through conformational rearrangements within $\text{G}\alpha_{i1-2}/\text{oA}\beta_1\gamma_2$ heterotrimers²⁶, at the interface of $\text{G}\beta_1\gamma_2/\text{Kir}3$ channel subunits²⁷, or as changes in cAMP levels^{28,29}. β arr recruitment to the receptor was assessed for β arr1, β arr2, and β arr2 in presence of GRK2, GRK5, or GRK6 to account for possible impact of expression differences between the screening system (HEK 293) and target neurons where GRK levels are higher³⁰. Net BRET values obtained in cells co-expressing human MORs (hMOR) and different biosensors in presence/absence of the endogenous ligand Met-Enkephalin (Met-ENK) are shown for reference in Supplementary Fig. 5. Concentration response curves (CRCs) for 10 known opioids (Fig. 2), and 15 novel compounds (Supplementary Fig. 6) identified in the context of a screening campaign at Pfizer Inc.³¹, were then generated and analyzed with the logistic equation and the operational³² model. Each ligand was phenotypically described by corresponding τ , E_{MAX} , and $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ values (\pm SEM) derived from 5 G protein- and 5 β arr-related responses (Supplementary Data 1). These were analyzed with NNMF/k-means clustering as above and represented as heat maps for ligands (Fig. 3a) and for parameters (Fig. 3b).

4.3.2 Ligands within the same cluster share quality and magnitude of response

An essential pharmacological question is to identify the pathways and pharmacodynamic properties primarily responsible for ligand clustering. The overall resemblance among relative magnitudes of operational and logistic parameters from different functional readouts is shown in Fig. 3b delineating three clusters of parameters. To further characterize differences among ligand categories, we investigated whether the magnitude of parameters describing ligand response in each assay was different across the three clusters of ligands. To do so, we used a Kolmogorov–Smirnov test to compare the distribution of parameter values in each cluster to that of the overall population (detailed in Supplementary Fig. 7). Only certain parameters in each cluster contributed to ligand discrimination, and they did so to different extents (Fig. 3c). Those in cluster A had the most weight, as 29.9% of comparisons identified at least one distribution of parameters significantly different from that of the whole population. Overall, 14.9% of comparisons in cluster B and 3.5% in cluster C also significantly contributed to ligand discrimination. Alternatively, ordering parameters by type (Fig. 3d) revealed that efficacy-related parameters (E_{\max} and τ) had the most weight in the classification (52.0% and 36.0% of the comparisons, respectively, identified distributions different from the whole population) while $\text{Log}(\tau/K_A)$ played a smaller role separating primary compound clusters (11.0%). Finally, Supplementary Table 1 shows assay parameters significantly contributing to ligand clustering. The diversity of signals determining cluster assignment distinguishes this multidimensional classification from dichotomous comparisons underlying bias magnitudes.

Importantly, despite independence from bias magnitudes, the proposed classification strategy still allows to evaluate relative contributions of β arr and G protein signaling to ligand assignment to clusters. To access this information, drugs were re-clustered using subsets of the data corresponding exclusively to G protein (Supplementary Fig. 8a) or to β arr (Supplementary Fig. 8b) assays, and the resulting similarity matrix produced with each partial data set was compared with the matrix generated using the complete set of values. Differences between matrices were quantified as described in the Methods section and Supplementary Fig. 9, and expressed as the proportion of changes in ligand distances that were compatible with a switch in clusters between the two compared matrices. Clusters generated with β arr data differed by only 11.5% from clusters produced with the complete data set (Fig. 3e), underscoring the similarity of drug classes defined by β arr signaling patterns and complete signaling profiles. The partial data set for G protein

responses differed by 27.2% (Fig. 3e) from the complete ligand similarity matrix. Thus, although clusters generated with β arr or with G protein data sets resembled clusters produced with the complete data set more than did clusters generated with the corresponding randomized values, initial ligand clustering was more faithfully recreated by β arr responses (Fig. 3e), indicating that that this signal was the one primarily driving classification in the complete matrix. Profiles graphically representing E_{\max} and $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ values for G protein and β arr readouts further highlight how the analysis clustered ligands according to type and magnitude of responses elicited (Fig. 4). Ligands in cluster #3 were full, reasonably balanced agonists characterized by maximal effects at β arr and G protein readouts. Ligands in cluster #2 were partial agonists for G protein-mediated responses with measurable β arr recruitment only in presence of overexpressed GRKs, while ligands in cluster #1 displayed minimal or no β arr recruitment and G protein responses were overall smaller than in cluster #2.

While it may be feasible to monitor ten different signaling outcomes for a small group of ligands, it is unlikely that this could be done in high-throughput screening or structure–activity profiling. Hence, once we had identified the signals that contributed the most to drug classification, we determined whether a reduced number of assays could convey similar diversity. To this end, β arr2 + GRK2, β arr2 + GRK6, $G\alpha i2$, and cAMP were chosen as respective prototypes of β arr- and G protein responses. Similarity matrices generated from these individual signals or from their combinations were compared with the complete similarity matrix. As above, we compared each partial data set to the complete set of hMOR parameters, and then established if the proportion of ligands switching clusters was less than that observed for the corresponding randomized data set. For cAMP, the proportion of changes were larger than the expected random value (Fig. 3f), indicating minimal contribution of this signal to ligand classification. In contrast, for clusters generated with the other data subsets, the proportion of ligands switching clusters was significantly smaller than the random expectation (Fig. 3f), indicating that each of these signals significantly supported ligand discrimination in the complete data set, albeit to different extents.

The combination of β arr2 + GRK2 and β arr2 + GRK6 data was the best at reproducing clustering obtained with the complete hMOR similarity matrix (91.4%; Fig. 3f). In comparison, the $G\alpha i2$ data set either combined with cAMP or in isolation moderately recreated the clusters of the complete matrix ($G\alpha i2 = 74.4\%$, $G\alpha i2 + \text{cAMP} = 69.0\%$ differences). Combining all four assays added little extra precision as compared with β arr2 + GRK2 with β arr2 + GRK6 (Fig. 3f). Thus,

taken together, these data indicate that it is possible to first identify the signals that primarily contribute to signaling diversity of a group of compounds at a given receptor, and then use these signals as surrogate readout for screening campaigns over large collections of compounds.

4.3.3 Ligand clusters are informative of possible side effects

Preclinical studies suggest that signaling diversity of MOR agonists provides a means of improving tolerability of opioid analgesics^{12,13,14}. Therefore, it was of interest to determine if the pharmacodynamic clusters just defined could inform us about clinical side effects of ligands in each category. To address this issue, we first used standardized gamma (SD gamma) scores³³ to identify adverse events most frequently reported for opioids in the Food and Drug Administration's pharmacovigilance data base (Adverse Effects Report System (AERS)), and then calculated the scores of these events for each of the prescription opioids used in the study. These measures of side effect prevalence were associated to ligands in the different clusters by using the Euclidian distance between ligands in the similarity matrix. Tramadol was set as the arbitrary origin, and distances separating the rest of prescription opioids from tramadol in the $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} - $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ matrix were consigned as measures of ligand similarity. These measures were then correlated to the SD gamma scores for each ligand's side effects. A complete list of the 80 events considered along with r^2 and p -values for each correlation is provided in Supplementary Data 2. Correlations that were significant ($p \leq 0.05$) and/or explained at least 60% of the variance ($r^2 \geq 0.60$) were considered. Applying these criteria, ligand position in the $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} - $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ matrix was correlated to 6 out of a total of 80 associations considered (7.5%), including gastrointestinal (GI) events, respiratory depression, and somnolence (Table 1), all typically associated to opioid therapy^{34,35}. These correlations confirm that signaling categories defined by unsupervised clustering can be associated to distinct frequency of report of undesired effects of opioid ligands.

$\text{Log}(\tau)$ and E_{max} were the main determinants of ligand position in the matrix constituting 89.0% of parameters effectively grouping ligands into clusters (Fig. 3d). Not surprisingly, if ligands were classified exclusively using these efficacy-related parameters, all side effects previously associated with ligand position in the $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} - $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ matrix remained correlated with their positions in this efficacy-only matrix (Table 1). Actually, categories driven by efficacy measures associated with more side effects than clusters established by including

$\text{Log}(\tau/\text{KA})$ as an additional classification criterion (Table 1). Thus, even if functional affinity information within transduction coefficient affords better discrimination of ligands, it also acts as a confounder for cluster association to side effects.

4.3.4 Associating side effects to specific signals

Preclinical studies have suggested that MOR agonists that preferentially engage G protein over β arr responses could display less gastrointestinal and respiratory side effects in the clinic^{12,13,14}. Hence, we were interested to find out whether AERS reports for opioids would distinctively correlate with ligand categories defined either by G protein or β arr signaling. There has been considerable debate as to whether biased signaling is best identified using $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ transduction coefficients^{17,24,25} or efficacy-related measures^{36,37}. Hence, partial matrices in which drugs were classified according to G protein or β arr responses were generated using either $\text{Log}(\tau)-E_{\text{max}}$ or $\text{Log}(\tau)-E_{\text{max}}-\text{Log}(\tau/\text{KA})$ as classification criteria. Supplementary Fig. 10 shows how frequency of faecaloma report correlates to similarity scores in these four partial matrices. Considering the classification based exclusively on $\text{Log}(\tau)-E_{\text{max}}$ values, categories defined by β arr and G protein responses were both correlated to faecaloma report (Supplementary Fig. 10a), implying no differential association of these signals to the undesired event. In contrast, when $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ coefficients were additionally considered, faecaloma report correlated to β arr, but not G protein responses (Supplementary Fig. 10b). However, it is worth considering how inclusion of $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ values breaks the correlation previously established with efficacy-based categories. BUP has a high transduction coefficient that cannot be distinguished from those of fentanyl (FEN) or loperamide (LOP), causing the partial agonist to move closer to these efficacious ligands in the matrix. Yet BUP's transduction coefficient is driven by its high affinity^{38,39}, and regardless of its position among efficacious agonists its side effects profile remains determined by its partial efficacy, disrupting the correlation.

Opioid modulation of acute ileum contractility is G protein-driven by effectors that hyperpolarize myenteric neurons and inhibit neurotransmitter release by vagal terminals^{40,41,42}. We used this G protein-mediated response to ascertain that failure to correlate faecaloma report to categories partly defined by $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ was not due to the method itself. In effect, as shown in

Supplementary Fig. 10c–e, frequency of faecaloma report correlated with $\text{Log}(\tau)$ but not $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ values describing ligand inhibition of ileum contraction.

4.3.5 Signaling and structural clusters convey complementary information about side effects

Structural criteria are used to classify, compare, and infer possible commonalities of in vivo responses for drug candidates ⁴³. We therefore compared categories of ligands defined by pharmacodynamic and structural criteria. Ligand structure was described using Tanimoto values⁴⁴ derived from standard fingerprint representations (Supplementary Data 3–5), and these values were then clustered using the same NNMF/k-means method as previously applied on signaling profiles. The resulting clusters are shown in Supplementary Fig. 11a, and representatives of each structural group are provided in Supplementary Fig. 12. Structural and pharmacodynamic similarity matrices were then compared, indicating that 36.0% of changes in ligand distance were compatible with a switch in cluster when the two different criteria were applied. This value was significantly lower when compared with 43.5% switches observed using randomized structural data ($z\text{-score} = -2.803$; $p < 0.01$), denoting some degree of statistical similarity between signaling and structural categories (Source data provided). However, the degree of similarity was low as schematically represented in Supplementary Fig. 11b. In keeping with this notion, clusters based on chemical structures were correlated with a different set of reported events than those associated with the pharmacodynamic clusters (Table 1). In particular, ligand distances in the matrix generated with chemical structures correlated with 12.5% of reported events, including pruritus, a typical opioid associated complaint ⁴⁵, as well as with reports of withdrawal and fluctuations in response and drug levels (Supplementary Data 6). Since structure determines pharmacokinetic properties, it is not surprising that structural categories associate with fluctuations in drug effects and even withdrawal symptoms ⁴⁶. On the other hand, and in spite of pharmacodynamic properties also being determined by structure, categories based on structural fingerprint representations failed to identify any of the events that associated with signaling categories, emphasizing the value of complementing structural information with a signal-based classification.

4.3.6 Ligand clusters generated with different GPCRs

We next examined whether clustering analysis could reveal pharmacodynamic similarities and differences among ligand responses generated at different opioid receptor subtypes. To do so, we used the same set of biosensors as for hMORs to monitor ligand activity at rat MORs (rMORs), human delta opioid receptor (hDORs) and rat DORs (rDORs). Corresponding input matrices containing logistic and operational parameters for each receptor (Supplementary Data 7–9) were analyzed as before to yield individual similarity matrices and associated heatmaps (Fig. 5a–c). Differences in clustering across receptor subtypes and species were evaluated by comparing similarity matrices for each receptor and are summarized in Fig. 5d. These comparisons revealed that the pattern of signaling diversity of this group of opioid ligands was reasonably conserved within the same receptor from different species. Indeed, in comparisons between rat and human MORs or rat and human DORs, the proportion of changes in ligand distances that were compatible with a switch in cluster was significantly less for actual as compared with randomized data sets (Fig. 5e), confirming congruent patterns across species.

In contrast, when clusters generated with data sets from MORs and DORs within the same species were compared, their differences were statistically indistinguishable from those obtained by comparing corresponding sets of randomized data (Fig. 5f), indicating that the analysis discerned the distinct pharmacological profiles of the two receptor subtypes. To identify the source of these differences, we compared the relative contribution of β arr and G protein responses in driving ligand clustering this time according to hDOR responses. Clusters generated with each partial data set bore statistical similarity to clustering done using the complete data set, and no statistical difference was revealed between clusters produced with β arr and G protein parameters (Fig. 5g). To more precisely establish the weight of β arr and G protein responses to clustering of ligands according to hDOR signaling, we investigated how every value in the similarity matrix changed when considering hDOR clusters produced with the complete data set, and clusters generated with pathway-specific data sets. As shown in Fig. 5h, the variations between the complete and the G protein similarity matrices paralleled the differences between the complete and the β arr similarity matrices, indicating the two types of signals similarly contributed to the classification of ligands according to responses generated at hDORs. In contrast, and consistent with the fact that β arr recruitment was the main determinant in hMOR clustering, the differences between G protein and complete matrices were more frequent and larger than those for the

corresponding β arr comparison (Fig. 5i). A graphical representation of hDOR clusters is given in Supplementary Fig. 13.

Finally, we assessed whether clustering according to signaling profiles could be extended to GPCRs that couple to effectors different than those activated by opioid receptors. For this purpose, we considered published⁴⁷ and novel data generated with β 2-adrenergic receptor (β 2AR) ligands including: (a) G protein-dependent responses (*Gas* activation, cAMP production, Ca^{2+} mobilization)⁴⁸, (b) β arr-mediated responses (β arr2 recruitment and receptor internalization), and (c) ERK signaling, a multifaceted response involving both G proteins and β arrs⁴⁹. Parameters describing concentration response curves for each of the readouts (Supplementary Data 10) were analyzed by NNMF and k-means to reveal four different drug categories (Fig. 6a). Cluster #1, including isoproterenol (ISO) and norepinephrine (NE), was characterized by measurable agonist efficacy at all readouts. Salbutamol (SALB) and salmeterol (SALM) in cluster #2 could be distinguished from the first category because of their minimal responses at β arr-dependent readouts. Carvedilol (CARV) and propranolol (PRO) behaved as agonists only in the ERK pathway (Cluster #3), while IC118,555 and metoprolol (MET) had no efficacy except for inverse agonism at *Gas* and cAMP assays (cluster #4). The complete signaling profiles for ligands in different clusters are provided in Supplementary Fig. 14.

As shown in Fig. 6b, partial data sets for *Gas*/cAMP/ Ca^{2+} and for β arr-recruitment/endocytosis recreated original clusters better than their corresponding randomized controls, indicating significant contribution of these signals to ligand clustering. To establish whether these categories were also relevant to human pharmacology, we evaluated their association to pharmacovigilance data. For this purpose, undesired cardiovascular and respiratory events most frequently reported for β 2AR agonists and antagonists were first identified, and SD gamma scores representing the frequency with which these events were reported for the prescription ligands used in the study was correlated to their signaling similarity (measured as Euclidian distances in the full matrix) (Supplementary Data 11). We found that increasing distance from the agonist ISO was significantly correlated ($p < 0.05$) with increasing frequency of reports for hypotension, decrease in blood pressure, sinus bradycardia, atrioventricular block, sinus arrest, and need for inhalation therapy (Table 2). Interestingly, the first four events in this list typically correspond to reduced sympathetic tone on cardiovascular function⁵⁰. Hence, their more frequent association with ligands that clustered furthest apart from ISO is entirely consistent with gradual loss of efficacy at β 2AR.

Moreover, these four events were also negatively correlated with ligand efficacy to induce $G_{\alpha s}$, cAMP, and Ca^{2+} signaling (Table 2), an overlap that is consistent both with the well-documented role of these signals in maintaining heart chrono-, and inotropism⁵¹ and with the fact that G protein-dependent signals significantly drove ligand clustering. $G_{\alpha s}$, cAMP, and Ca^{2+} signaling categories also showed increasing reports of deleterious effects on respiratory function, some of them such as asthma, asthmatic crisis, status asthmaticus consistent with bronchoconstriction, as distance from ISO and $\beta 2AR$ antagonism increased. Thus, pharmacodynamic categories defined by as few as eight ligands were sufficiently robust to reveal a well-known association between sympatholytic CV events or manifestations of bronchoconstriction and modulation of G protein activity by $\beta 2AR$ ligands. The observation reinforces the notion that unsupervised clustering of multidimensional signaling profiles allows the association of signals generated in simple cellular models to possible clinical effects of GPCR ligands.

4.4 Discussion

This study introduced a stepwise analysis in which GPCR ligands were organized into pharmacodynamic categories that could be then associated with clinically relevant responses. Pharmacodynamic parameters that best supported classification of ligands ($(\text{Log}(\tau)-E_{\text{max}}-\text{Log}(\tau/K_A))$) were empirically chosen by consecutively applying NNMF and k-means clustering to different combinations of parameters informative of efficacies and functional affinities. The procedure was successfully applied to classify groups of ligands ranging from 8–320 in number, and representative of a multiplicity of signaling profiles.

Ligand categories generated with $(\text{Log}(\tau)-E_{\text{max}}-\text{Log}(\tau/K_A))$ values from hMOR data were primarily driven by ligand diversity in β arr signaling efficacy, but G protein responses also contributed to the classification. Measured similarity among signaling profiles of prescription opioids present in the different categories was correlated with their corresponding frequencies of AERS reports for typical opioid side effects, indicating that the categories established by applying this exploratory method may allow to establish meaningful associations between in vitro signals and clinically relevant drug actions. This notion was further supported by observations that pharmacodynamic categories defined for $\beta 2AR$ ligands were essentially driven by G protein responses and associated to G protein-driven sympatholytic effects^{52,53}. Hence, by unveiling these well-documented associations, we established that clustering analysis of concentration–response

parameters allows to associate multidimensional in vitro signaling profiles to clinical responses. Such use of curve parameters should prove beneficial for identifying signals that support specific responses of interest and for which mechanistic information is unavailable. Pharmacodynamic categories defined by efficacy-related parameters ($\text{Log}(\tau)\text{-}E_{\text{max}}$) had stronger and more frequent correlations to side effects than those defined by additional inclusion of affinity information provided by transduction coefficients. On the other hand, ligand differentiation was optimal when transduction coefficients were taken into account, calling for a discretionary decision on which parameters to use depending on the goal of the classification.

By classifying opioid ligands according to pathway-specific responses, it was possible to explore whether specific signals were driving typical side effects of opioids. We found that association of faecaloma report to categories defined by G protein responses was influenced by the parameters used in ligand classification. In $\text{Log}(\tau)\text{-}E_{\text{max}}$ matrices, G protein and β arr categories were both directly correlated with reports for this side effect, implying that weaker agonists were associated with lower frequency of reports. In contrast, the correlation with G protein responses was disrupted if $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ values were also considered, suggesting a scenario where G protein signaling would not associate to side effects. This divergence as compared with $\text{Log}(\tau)\text{-}E_{\text{max}}$ matrices is linked to the fact that despite its partial efficacy and a side effects profile consistent with partial agonism, $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ coefficients could not distinguish this low-efficacy–high-affinity ligand from much more efficacious agonists, such as morphine or oxycodone. In contrast to G proteins, β arr categories correlated to faecaloma report independent of the parameters used for classification, as transduction coefficients for β arr responses were consistent with BUP's low efficacy. $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ transduction coefficients are largely used to identify biased ligands^{17,25}, so a word of caution is warranted for bias measures driven by functional affinity since only efficacy parameters are predictive of the magnitude of in vivo responses⁵⁴.

It is also of interest that maximal responses for β arr and G proteins decreased in parallel across the different clusters, albeit not to the same extent. Indeed, β arr signals gradually disappeared while those of G proteins grew progressively smaller without completely vanishing. Such systematic imbalance between the two types of signals has been previously reported⁵⁵, and is akin to system bias²⁵ where β arr responses are less well coupled to the receptor than G protein signals. Within this context, absence of β arr responses may simply indicate partial agonism and not signaling bias. As a matter of fact, all novel biased hMOR ligands presented herein as well as

those published to date (i.e.: TRV130¹²; PZM21¹³ and Scripps compounds¹⁴) are partial agonists at G protein responses. This raises the possibility that currently available biased ligands could simply produce less side effects because they are partially effective at stimulating the receptor, and not necessarily because of greater efficacy for activating the G protein over β arr. A misinterpretation of bias might be a problem for future clinical applications since a partial agonist may also produce a submaximal analgesic response. In this sense, it is of interest that β arr-G protein signaling profiles of the latest hMOR ligands¹⁴ resemble those obtained in this study for BUP, a partially effective analgesic⁵⁶. It is also worth considering that the clinical profile of TRV130, a partial hMOR agonist which was clinically tested as the first biased agonist for MORs, did not significantly differ from morphine's profile at doses with equivalent analgesic effects¹⁰. Finally, when PZM21 was independently tested after its initial description as biased agonist, it was shown to behave as a partial agonist in β arr and G protein readouts, and to produce respiratory depression commensurate with partial signaling¹⁰.

Structural similarity is another means for inferring common in vivo responses of therapeutic drug candidates early in the discovery process⁴³. Here, when clusters established on the bases of signaling and structural resemblance were compared, they displayed nonrandom but marginal similarity. Different reasons could explain the low degree of similarity between categories established with structural and pharmacodynamic criteria, including incomplete representation of structural diversity of opioid ligands within the sample used, or different discriminatory power of signaling profiles and current descriptors of structural properties. Consistent with their low degree of similarity, structural, and pharmacodynamic categories were associated with different types of undesired events. Indeed, structural similarities were more frequently associated with fluctuations in therapeutic response, which are typically associated with pharmacokinetic properties⁴². On the other hand, signaling categories specifically correlated with on-target side effects, pointing to the complementarity of both approaches when characterizing a limited number of compounds of interest.

In conclusion, we presented an unsupervised classification method that incorporates distinct and complementary data sources to comprehensively describe signaling diversity of GPCR ligands. The procedure identifies signaling imbalance independent of whether bias in the response co-varies with efficacy, it was applied to a large diversity of signaling profiles and distinguishes subtle differences in signaling preferences.

4.5 Methods

Materials and reagents

Standard opioids were purchased from Cedarlane (Burlington, Canada) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fifteen novel compounds were provided by Pfizer Inc. (Worldwide Research and Development). (-)-Isoproterenol hydrochloride, (-)-norepinephrine, DL-propranolol hydrochloride, (\pm) metoprolol (+)-tartrate salt, carvedilol, and salmeterol xinafoate were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). ICI 118,551 and salbutamol hemisulfate were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Coelenterazine 400a was purchased from Biotium.

Plasmids and DNA constructs

A cleavable signal sequence of influenza hemagglutinin (MKTIIALSYIFCLVFA) and a Flag tag (MDYKDDDDA) were added to the human MOR1, rat MOR1, human DOR, and rat DOR and, their coding sequence optimized and synthesized as Strings DNA Fragments at GeneART (ThermoFisher Scientific). The DNA Strings were subcloned by Gibson assembly (New England Biolabs Canada) in pLVX-IRES-Puro (Clontech Laboratories, Inc). Untagged versions of the receptors were made by an internal NcoI deletion, removing the coding sequence of the Flag tag. Constructs encoding for GFP10-tagged receptors were made by PCR overlap; the coding sequence of each signal-peptide Flag-receptors was PCR-amplified to remove the stop codon and assembled by PCR overlap with the coding sequence of GFP10. The resulting PCR products were subcloned by Gibson assembly in pLVX-IRES-Puro. Constructs encoding the Epac-based cAMP sensor (GFP10-Epac-RlucII), RlucII-tagged $G\alpha$ ($\alpha 1$, $\alpha 2$, αoA , αs), GFP10-G $\gamma 1$, GFP10-G $\gamma 2$, β -arrestin1-RlucII, β -arrestin2-RlucII, RlucII-G $\gamma 2$, human $\beta 2$ -adrenergic receptor (h $\beta 2$ AR), and cmyc-h $\beta 2$ AR-GFP10 were previously described (PMID: 15782186, PMID: 22534132, PMID: 23175530, PMID: 24309376, PMID: 19584306, PMID: 26658454, PMID: 16901982, PMID: 15155738). pCDNA3.1 (+) G $\beta 1$ was bought at Missouri University of Science and Technology (cdna.org). Plasmids encoding for the following proteins were generously provided as follows: GRK6 and GRK2 by Dr Antonio De Blasi (Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli, Italy), GRK5 by Dr Robert Lefkowitz (Duke University, Durham, NC). Kir3.2-GFP10 by Dr Terry

Hebert (McGill University, Montréal, Canada). Kir3.1 subunit by Dr. Deborah J. Nelson (University of Chicago, Chicago, IL).

Cell culture and transfection

HEK293 cells were a kind gift of Dr. Laporte, McGill University⁵⁷. They were cultured in 100 mm Petri dishes (Sarstedt, Germany) at 37 °C and 5% CO₂ in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 100 unit mL⁻¹ penicillin-streptomycin.

Transient transfections of vectors encoding BRET biosensors in combination with complementary signaling partners were performed in 100 mm Petri dishes (3×10^6 cells) for G protein and Kir3.2 channel activation assays and in 96-wells culture plates coated with polyD-lysine (PerkinElmer, MA, USA) for β arr recruitment assays (32,000 cells/well), using the polyethylenimine transfection reagent (Polysciences, PA, USA) at a PEI/DNA ratio of 3:1⁵⁸. For cAMP production assays, stable cell lines expressing the GFP10-Epac-RlucBRET2-cAMP biosensor⁵⁹ were plated in six-wells plates (Greiner bio-one, Austria) and stably transfected with 1 μ g of either MORs or DORs (human or rat) biosensor using PEI. They were selected respectively using hygromycin (100 μ g mL⁻¹) and puromycin (10 mg mL⁻¹).

BRET assays

Ligand preparation: Agonists were dissolved in DMSO and spotted on 96-well white bottom microplates (Greiner bio-one) using the HP D300 Digital Dispenser (Tecan Life Sciences). DMSO concentration was normalized for each point at 0.334%.

G α i and G α o-activation assay: HEK 293 were co-transfected with DOR or MOR (human or rat), either of the BRET biosensors pairs: γ 2-GFP10/G α oA-99-RlucII (Ratio Receptor/GFP/RlucII: 1:0.6:0.12), γ 2-GFP10/G α i1-91-RlucII (Ratio Receptor/GFP/RlucII: 1:0.6:0.12), or γ 2-GFP10/G α i2-99-RlucII (Ratio Receptor/GFP/RlucII: 1:0.72:0.12) together with untagged G β 1(Ratio 1: 0.6)²⁶. Forty-eight hours after the transfection, the media was removed and the cells were washed with phosphat-buffered solution (PBS) then re-suspended in PBS + MgCl₂ (0.429 mM) at a protein concentration ≥ 0.6 μ g μ L⁻¹. Coelenterazine 400a was added to the cells to a final concentration of 5 μ M for 3 min, and 100 μ L per well of this mix were

subsequently distributed into the 96-well-printed plates. Plates were read 5 min after on the Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), 3 s per well, at 37 °C, with filters set at 400 nm (RlucII) and 515 nm (GFP10); BRET ratios were calculated as GFP10/RlucII emissions. Net BRET values were calculated by subtracting background BRET ratio observed in cells expressing donor G biosensors alone.

Gs activation assay: HEK293 cells stably expressing β 2AR were transiently transfected with 200 ng G α s-67-RlucII, 100 ng G β 1, and 100 ng GFP10-G γ 1. The day of the experiment, cells were washed with Hank's balanced salt solution (HBSS) (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM NaHPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 4.2 mM NaHCO₃, pH 7.4) supplemented with 0.1% glucose and 0.1% BSA. Coelenterazine 400a (Coel-400a, Biotium) was added for 5 min to the wells (2.5 μ M), then β -adrenergic compounds were added for 4.5 min. BRET was measured and calculated as described above.

Kir 3.2 channel activation assay: HEK 293 were plated onto 100 mm Petri dish and transfected with DOR or MOR (human or rat), the Kir3.2-GFP10/ γ 2-LucII BRET biosensor pair together with untagged Kir3 channel and G protein subunits²⁷ at a ratio of 1:1:0.075:1:0.5, respectively. The BRET assay was performed as described above.

B-arrestin recruitment: HEK 293 cells were co-transfected with sp-FLAG-DOR-GFP10 or sp-FLAG -MOR-GFP10 (human or rat) and β arr1/2-RlucII for β -arrestin1/2 recruitment at a ratio receptor/construct of 1:0.06. Recruitment of β arr2-RlucII was also tested in the presence of, GRK2, GRK5, GRK6 (Ratio receptor/GRK DNA: 1:0.1). Forty-eight hours after transfection, cells were washed with PBS then incubated in Tyrode's solution (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 5.6 mM D-glucose, 0.49 mM MgCl₂, 0.37 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES, pH 7.4) for 30–60 min at 37 °C. Indicated concentrations of agonists, diluted in Tyrode buffer, were added to the wells for 10 min, then cells were incubated for 5 min with Coelenterazine 400a (2.5 μ M). BRET2 readings were taken at 37 °C as detailed above. For β 2AR β -arrestin2 recruitment, HEK cells were transiently transfected with 50 ng β arr2-RLucII and 300 ng β 2AR-GFP10. The day of the experiment, cells were washed with HBSS supplemented with 0.1% glucose and 0.1% BSA. B-adrenergic compounds were added to the wells for 10 min, then coelenterazine 400a was added for 5 min to the wells (2.5 μ M). BRET was measured and calculated as described above.

cAMP production assay: Stably-transfected cells expressing the GFP10-Epac-RlucBRET2-cAMP biosensor⁵⁹ and either MORs or DORs were seeded at a density of 30,000 cells/well in a high glucose medium supplemented with 10% newborn calf serum, and grown on 96-well polylysine-coated plates for 48 h. Cells were later transferred to Tyrode buffer and incubated for 15 min at 37 °C. Coelenterazine 400a was then added to a final concentration of 5 μ M. Five min later, forskolin (Bioshop, Canada) was introduced (final concentration: 10 μ M for rMOR, 15 μ M for rDOR, and 25 μ M for hMOR and hDOR) followed, 3.5 min later, by increasing concentrations of ligands. BRET2 readings were taken 5 min after ligands were introduced²⁸.

Guinea pig ileum assays

Male Hartley guinea pigs were anesthetized using isoflurane followed by exsanguination. The myenteric plexus of the ileum was dissected according to the method described by Cowie & al.⁴¹. Briefly, a portion of the ileum was removed (10 cm distal to the cecum) into which a glass rod was inserted. The myenteric plexus was removed from the circular longitudinal muscle via gentle scraping with a moist cotton swab and separated from the muscle using forceps. The resulting myenteric tissue was cut into 2.5 mm strips and placed in oxygenated Krebs buffer (37 °C, gassed with 95% O₂/5% CO₂) and tensioned to a baseline tension of 2000 mg. The tissues were washed, equilibrated for 30 min, and subsequently tested for viability with a maximal concentration of Carbachol (300 nM, three times with 10 min of washing, and 10 min of equilibrating in between additions). The final prime was followed by a 20 min wash period followed by a 20 min equilibration period before the start of the experiment. Tissues were continually stimulated with 0.1 Hertz for 1 ms at 20 volts (producing a stimulation equivalent to 80% of the maximal contractile response). Following a 10 min baseline stimulation period, the kappa opioid antagonist nor-binaltorphimine was added (5 nM final) and incubated for 10 min. Finally, cumulative concentration–response curves were generated to each test ligand or vehicle control (DMSO). Isometric tension data (in mg) were collected.

All procedures performed on these animals were in accordance with regulations and established guidelines and were reviewed and approved by Pfizer Institutional Animal Care and Use Committee.

Curve fitting

Concentration response curves describing ligand responses by different receptors (hMOR, hDOR, rMOR, rDOR, and hb2ADR) were analyzed with Graphpad Prism6, using built-in 3 or 4 parameter logistic equations to obtain independent pEC50 and E_{\max} values for each receptor–biosensor pair:

$$y = a + (b-a)/(1 + 10^{(\log EC_{50}-x)*c}) \quad (1)$$

($y \rightarrow$ measured response; $a \rightarrow$ minimal asymptote, $b \rightarrow$ maximal asymptote; $b-a \rightarrow E_{\max}$; $c \rightarrow$ slope).

Concentration response curves were additionally analyzed with the operational model of Black and Leff³². As above, curves representing responses elicited by the same receptor at each of the 10 different biosensors were fit independently. Fitting was done using Graphpad Prism6 after introducing a set of equations kindly provided by Dr Christopoulos:

$$A=10^x$$

$$\text{operate1} = ((1+A/(1)))/((10^{\text{LogR}}*A))^n \text{ (used to fit full agonists)} \quad (2)$$

$$\text{operate2} = ((1+A/(10^{\text{LogKA}})))/((10^{\text{LogR}}*A))^n \text{ (used to fit partial agonists)} \quad (3)$$

$$\text{Full agonist} = \text{basal} + (E_{\max} - \text{basal}) / (1 + \text{operate1}) \quad (4)$$

$$\text{Partial agonist} = \text{basal} + (E_{\max} - \text{basal}) / (1 + \text{operate2}) \quad (5)$$

basal \rightarrow response observed in the absence of agonist

E_{max} \rightarrow maximal response of the system

n \rightarrow slope of the function which links occupancy to response

KA \rightarrow functional affinity (partial agonists)

LogI \rightarrow $\text{Log}(\tau/\text{KA})$

When using the logistic model, the fits for three and four parameter curves were compared and the best fit taken. If no fitting was possible without constraints, the minimal asymptote was fixed to zero; if this was unsuccessful, the Hill coefficient was additionally fixed to one (i.e., only the three parameter fit was considered). If both these constraints proved unsuccessful, and in curves

with no inflection point for maximal effect, the highest experimental value was considered E_{\max} . The latter procedure forced the maximal response of very weak partial agonists within the range of experimental data avoiding aberrant predictions due to extrapolation. If no fitting was possible following these constraints, no fitting (NF) status was consigned. If fitting was possible, we made sure that all curves had a Span > 3x SEM, otherwise they were considered as no response (NR).

As used in this study, the operational model does not yield Log(τ) or pKA values for full agonists²⁵, which were consigned as not available (NA). In these circumstances, E_{\max} values were used to differentiate these compounds from partial agonists, and differences among full agonists were established through their consolidated Log(τ /KA) coefficients. It should also be noted that by independently fitting curves for different biosensors, the model does not contemplate interconversion among distinct receptor states stabilized by different effectors.

Feature reduction, and ligand clustering

594) Each receptor was represented by a matrix composed of 25 ligands (21 for DORs) x 30 parameters (E_{\max} , Log(τ) and Log(τ /KA) for 10 assays). This matrix was created by sampling from the normal distribution around each parameter using the mean and standard deviation thereby incorporating the variance associated with each data point and propagating it through the clustering method. In order to correct for scale differences between parameters we standardized each column to range between 0 and 1 according to:

$$\text{Standardized Value} = (X_{ij} - \text{minimum}_j) / (\text{maximum}_j - \text{minimum}_j) \quad (6)$$

for every ligand I and every parameter j .

2) Process 1) was repeated 1000 times to create 1000 data matrices each independently put through the following procedure (Supplementary Fig. 2).

3) Non-negative matrix factorization (NNMF) was used to reduce dimensionality of the data and create the W (ligand * k) and H (k * parameter) basis vectors thereby removing noise and redundancy. We used sparse NNMF to ignore missing data (“NA”, “NF” and “NR” curves).

Difference between the original matrix V and the product of $W * H$ was minimized to less than $1e-7$.

4) K-Means clustering was performed on the W basis vector, where the number of clusters equals the number of basis vectors from NNMF ($K=k$), to assign each compound into a cluster. Note: the phenotypic parameter clusters were obtained using the H vector instead of the W one.

5) Steps 3 and 4 were repeated 250 times to quantify the fraction of times each compound clustered together resulting in a ligand * ligand frequency matrix ranging from 1 (always clustered together) to 0 (never clustered together). This iterative process quantifies both global and local minima/maxima arising from small variances in clustering resulting from the randomized starting vectors for NNMF and k-means.

6) *a)* The entire process including feature reduction and clustering (3-5) was repeated for different values of k ($k=2$ to $k=7$), providing a frequency matrix for each k . *b)* These 6 frequency matrices were averaged together to quantify ligand similarity independent of the number of features used as each K may extract unique patterns that may be complementary or orthogonal to results from different K 's.

7) Steps 3-6 were independently performed on each of the 1000 sampled data matrices providing 1000 composite similarity matrices.

8) These 1000 matrices were averaged to create a final frequency matrix quantifying how often ligands clustered together and representing total ligand similarity across all concentration response curves.

9) We visualized the similarity matrix using a dendrogram and a heat map using Orange, created from the distance between each compound in the similarity matrix using a Pearson Correlation.

Simulation of virtual compounds

We built 16 profiles showing bias and various potencies/efficacies by selecting ranges of KA- τ pairs across six imaginary biosensors. So that our virtual compounds respect these ranges, we invented them by sampling random values of KA and τ within the bounds associated to the imaginary biosensors specified per profile. We used this procedure 20 times for each profile yielding 320 virtual ligands.

As for curve fitting, simulations were conducted under the assumption of independence across biosensors. Using the operational model equation, we generated corresponding concentration response curves (CRC) to which we added 10% noise using the flat distribution. Noisy CRCs were then fitted to both the logistic equation and the operational model equation using the Bayesian inference engine STAN⁶⁰ to yield values of E_{\max} , pEC50, τ , and KA and their associated distributions (from which we computed a standard error of the mean to use in the NNMF pipeline) (values in Supplementary Data 12). The best estimate for τ /KA ratio and its distribution of draws were also computed directly within the fitting process as a transformed parameter.

Selections of subsets of parameter estimations and associated SEM were used in NNMF/k-means clustering. The resulting matrices of frequency of co-occurrences were used to compute distance metrics, hierarchical clustering trees, and tSNE plots whose leaves and data points were colored by profile (Fig. 1, Supplementary Fig. 3, Supplementary Fig. 4).

Clustering of pharmacological parameters

The 25 (1 per ligand) values for each parameter array (P) were distributed into 4 smaller arrays corresponding the ligand clusters. We then utilized a two-sample Kolmogorov-Smirnov test

to compare each sub-array to the original array (P) to measure if these were randomly sampled from the original array. This provides 4 p-values for each parameter. A significant p value indicates ligands in that cluster are biased towards a specific response for that parameter. This process was repeated for each of the 30 parameters. These p-values were then sorted according to: i) the type of parameter considered (e.g. pEC50, Emax, or Log(τ /KA)) or ii) measurement similarity acquired from the similarity matrix obtained by the NNMF/k-means method detailed above using the H basis vector instead of the W. The procedure is summarized in Supplementary Fig. 7.

Comparing clusters among complete data sets

To compare clustering similarity between two different datasets we implemented two approaches: a) Directly comparing the two similarity matrices using pairwise differences and b) quantifying the overall difference between the two matrices using random simulation to obtain a difference threshold and to establish significance.

Direct comparison.- We calculated the difference between every paired value in similarity matrix A and B (representing the similarity between compounds I and j):

$$\text{Difference} = A_{ij} - B_{ij} \quad (7)$$

The resulting difference matrix is of equal dimensionality to A and B, ranging from 1 (compounds I and j are always clustered together in A but never in B) to -1 (always in B but never in A).

Thresholding and random simulation.- We compared the difference in Euclidian distance for every pair of ligands I and j between similarity matrices for dataset A and B:

$$\text{Difference} = ||L_{iA}-L_{jA}|| - ||L_{iB}-L_{jB}|| \quad (8)$$

Where L_{iA} and L_{jA} are row vectors representing the similarity of L_i and L_j to all other ligands in matrix A. We then used random clustering replicates (detailed below) to identify a cut-off value to determine which Difference values corresponded to a significant variation between A and B. The final comparison between dataset A and B was represented as a proportion:

$$\text{Fraction change} = (\# \text{ significant differences} / \text{Total \# of comparisons}) \quad (9)$$

Only ligands tested in both datasets were used (e.g. comparing hMOR to hDOR only used the 21 shared ligands).

Random Clustering.- For each dataset we created 50 random input data matrices by permuting all mean-standard deviation pairs of data points within the original data matrix. Each random matrix was therefore specific to and equal in size and shape to the original data (e.g. hMOR: (25 * 30); hMOR- β arr: (25 * 15)). We then repeated the entire NNMF/k-means clustering method on each data-shuffled random matrix resulting in 50 random clustering frequency matrices for each data type.

To determine a cut-off value representing significant variation between any two datasets (Difference threshold), we calculated the Euclidian Distance between pairs of compounds in the same cluster and compounds in different clusters for each of the 50 trials. The threshold is the mean value of the overlap between the “same cluster” distribution and the “different cluster” distribution (see Supplementary Fig. 9). Threshold values range between 0.95 and 1.5. Using these thresholds, it was possible to calculate the proportion of significant variation between two matrices. To quantify if this change was significant, we calculated the fraction of significant changes (using thresholds) between the clustering from the 50 randomized datasets (e.g. 50 random hDOR) compared to reference cluster (e.g. hMOR). The resulting distribution of 50 values represented the

proportion of random changes from the reference. This distribution was used to calculate a z-score for the difference value of the actual data (hMOR vs hDOR):

$$\text{Z-score} = ((\text{Fraction Change in actual data}) - (\text{Mean random Change})) / (\text{STD random Changes})$$

(10)

Comparing clusters generated with complete data and subsets

In order to calculate whether clustering from data subset I (e.g. hMOR-Barr) changed more than data subset J (e.g. hMOR-G protein) compared to the complete dataset clusters (e.g. hMOR), we compared the 50 random similarity matrices to the reference (e.g. hMOR) and calculated the fraction of significant changes using the method detailed above. As a result, we obtained an array of 50 values representing the random change from reference. This array was created for both subsets (e.g. hMOR-βarr and hMOR-G protein). We then iteratively, with replacement, randomly sampled 1 value from each of these arrays and calculated the difference to create a distribution of 1000 values indicating the random expected difference between these two subsets of data. We then calculated a z-score using the mean and standard deviation of this distribution and the actual observed difference.

Clustering ligands according to structural similarities

Each ligand was represented using three standard fingerprint representations: (ECFP-6) Extended-Connectivity Fingerprints (ECFPs) (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-pipeline-pilot/>), Functional-Class Fingerprints (FCFPs) and MDL MACCS keys. A similarity matrices for each different fingerprint was generated for the 25 ligands in the dataset, where each value in the matrix ($S_{i,j}$) corresponds to the Tanimoto similarity value between compound *I* and compound *j* and ranges from a value 0 -1 (1 being most similar). We combined

these three matrices into a single matrix of dimensions (25 compounds x 75 comparisons), and repeated the NMF/k-means clustering algorithm on the data to yield a structural similarity matrix.

Correlating signaling data to side effect report frequency

A list of all MOR-active compounds was created by searching DrugBank for all approved drugs which activate MOR. The resulting list was intersected with the list of drugs in the FDA's Adverse Event Reporting System data for which a standardized gamma (SD gamma) score could be generated at the preferred term (PT) level according to the method of Johnson *et al*³³. Briefly, SD gamma scoring is a statistical approach to identify disproportionately high, or low, numbers of drug-event occurrences by normalizing for number of drugs and number of event reports. SD gamma scores for each event were averaged for all resulting MOR compounds, and PT events were sorted by average score to produce a listing of high-scoring events most clinically relevant to opioid therapy (80 highest scores were considered). A similar procedure was completed to find the 80 side effects associated with β 2ADR-active compounds.

Individual drug SD gamma scores for frequently reported events were then correlated to Euclidian distances separating prescription opioids (tramadol, buprenorphine, oxycodone, morphine, fentanyl, loperamide) in hMOR and structural similarity matrices. SD gamma scores were additionally correlated to transduction coefficients for BRET or guinea pig contractility responses respectively normalized to Met-ENK ($\Delta\text{Log}(\tau/\text{KA})_{\text{MET}}$) or loperamide ($\Delta\text{Log}(\tau/\text{KA})_{\text{LOP}}$). Note that LOP and Met-ENK are balanced ligands that co-cluster in every dataset such that differences due to normalization are simply scalar. Individual drug SD gamma scores clinically prescribed β 2ADR-ligands used in the study (isoproterenol, norepinephrine, salbutamol, salmeterol, pindolol, carvedilol, metoprolol) were similarly correlated to Euclidian

distances separating these ligands in the β 2ADR similarity matrix or to transduction coefficients for BRET responses where isoproterenol was the standard.

Statistical analysis

Correlation analysis. – GraphPad Prism6 was used to evaluate correlation between drug distance in cluster and the frequency of reports of adverse events.

All statistical comparisons were two-sided except when contrasting partial and whole similarity matrices.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

4.6 Data availability

All data generated or analyzed in this study are included in the article and supplementary materials or provided as source data files.

4.7 Code availability

All clustering and cluster comparisons were conducted using Python 2.7.6. Complete source code is available for download at <http://github.com/JonathanGallion/Benredjem-Gallion>.

4.8 References and Notes

1. Lafferty-Whyte K, Mormeneo D, Del Fresno Marimon M. Trial watch: Opportunities and challenges of the 2016 target landscape. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 10-11 (2017).
2. Lohse MJ, Nuber S, Hoffmann C. Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev* **64**, 299-336 (2012).
3. Huang W, *et al.* Structural insights into micro-opioid receptor activation. *Nature* **524**, 315-321 (2015).
4. Kenakin T, Miller LJ. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* **62**, 265-304 (2010).
5. Kenakin T. Signaling bias in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **12**, 321-333 (2017).
6. Wacker D, Stevens RC, Roth BL. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **170**, 414-427 (2017).
7. Luttrell LM, Maudsley S, Gesty-Palmer D. Translating in vitro ligand bias into in vivo efficacy. *Cell Signal* **41**, 46-55 (2018).
8. Costa-Neto CM, Parreiras ESLT, Bouvier M. A Pluridimensional View of Biased Agonism. *Mol Pharmacol* **90**, 587-595 (2016).
9. Pang PS, *et al.* Biased ligand of the angiotensin II type 1 receptor in patients with acute heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIB, dose ranging trial (BLAST-AHF). *Eur Heart J* **38**, 2364-2373 (2017).
10. Hill R, *et al.* The novel mu-opioid receptor agonist PZM21 depresses respiration and induces tolerance to antinociception. *Br J Pharmacol* **175**, 2653-2661 (2018).
11. Singla N. *et al.* A randomized, Phase IIb study investigating oliceridine (TRV130), a novel μ -receptor G-protein pathway selective (μ -GPS) modulator, for the management of moderate to severe acute pain following abdominoplasty. *J Pain Res.* **10**, 2413–2424 <https://doi.org/10.2147/JPR.S137952> (2017).
12. DeWire SM, *et al.* A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther* **344**, 708-717 (2013).
13. Manglik A, *et al.* Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* **537**, 185-190 (2016).
14. Schmid CL, *et al.* Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics. *Cell* **171**, 1165-1175 e1113 (2017).
15. Onaran HO, *et al.* Systematic errors in detecting biased agonism: Analysis of current methods and development of a new model-free approach. *Sci Rep* **7**, 44247 (2017).

16. Benredjem B, Dallaire P, Pineyro G. Analyzing biased responses of GPCR ligands. *Curr Opin Pharmacol* **32**, 71-76 (2017).
17. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci* **3**, 193-203 (2012).
18. Rajagopal S, *et al.* Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol* **80**, 367-377 (2011).
19. Lane JR, May LT, Parton RG, Sexton PM, Christopoulos A. A kinetic view of GPCR allosterity and biased agonism. *Nat Chem Biol* **13**, 929-937 (2017).
20. Kenakin T. Quantifying biological activity in chemical terms: a pharmacology primer to describe drug effect. *ACS Chem Biol* **4**, 249-260 (2009).
21. Raehal KM, Walker JK, Bohn LM. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1195-1201 (2005).
22. Lee DD, Seung HS. Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. *Nature* **401**, 788-791 (1999).
23. Forgy, Edward W. Cluster analysis of multivariate data: efficiency versus interpretability of classifications. *Biometrics*. **21**, 768-769 (1965). JSTOR 2528559.
24. Kenakin T, Christopoulos A. Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 483 (2013).
25. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 205-216 (2013).
26. Gales C, *et al.* Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 778-786 (2006).
27. Richard-Lalonde M, *et al.* Conformational dynamics of Kir3.1/Kir3.2 channel activation via delta-opioid receptors. *Mol Pharmacol* **83**, 416-428 (2013).
28. Tudashki HB, Robertson DN, Schiller PW, Pineyro G. Endocytic profiles of delta-opioid receptor ligands determine the duration of rapid but not sustained cAMP responses. *Mol Pharmacol* **85**, 148-161 (2014).
29. Salahpour A, Espinoza S, Masri B, Lam V, Barak LS, Gainetdinov RR. BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**, 105 (2012).
30. Charfi I, *et al.* Ligand- and cell-dependent determinants of internalization and cAMP modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cell Mol Life Sci* **71**, 1529-1546 (2014).
31. Winpenny D, Clark M, Cawkill D. Biased ligand quantification in drug discovery: from theory to high throughput screening to identify new biased mu opioid receptor agonists. *Br J Pharmacol* **173**, 1393-1403 (2016).

32. Black JW, Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **220**, 141-162 (1983).
33. Johnson K, Guo C, Gosink M, Wang V, Hauben M. Multinomial modeling and an evaluation of common data-mining algorithms for identifying signals of disproportionate reporting in pharmacovigilance databases. *Bioinformatics* **28**, 3123-3130 (2012).
34. Kalso E, Edwards JE, Moore RA, McQuay HJ. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain* **112**, 372-380 (2004).
35. Ballantyne JC. Opioid analgesia: perspectives on right use and utility. *Pain Physician* **10**, 479-491 (2007).
36. Rajagopal S. Quantifying biased agonism: understanding the links between affinity and efficacy. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 483 (2013).
37. Onaran HO, Rajagopal S, Costa T. What is biased efficacy? Defining the relationship between intrinsic efficacy and free energy coupling. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 639-647 (2014).
38. Villiger JW. Binding of buprenorphine to opiate receptors. Regulation by guanyl nucleotides and metal ions. *Neuropharmacology* **23**, 373-375 (1984).
39. Brown SM, Holtzman M, Kim T, Kharasch ED. Buprenorphine metabolites, buprenorphine-3-glucuronide and norbuprenorphine-3-glucuronide, are biologically active. *Anesthesiology* **115**, 1251-1260 (2011).
40. Galligan JJ, Sternini C. Insights into the Role of Opioid Receptors in the GI Tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance. *Handb Exp Pharmacol* **239**, 363-378 (2017).
41. Cowie AL, Kosterlitz HW, Lydon RJ, Waterfield AA. The effects of morphine-like substances and their antagonists on transmission at the neuro-effector junction of the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* **38**, 465P-466P (1970).
42. Kosterlitz HW, Waterfield AA. In vitro models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Annu Rev Pharmacol* **15**, 29-47 (1975).
43. Yamanishi Y, Pauwels E, Kotera M. Drug side-effect prediction based on the integration of chemical and biological spaces. *J Chem Inf Model* **52**, 3284-3292 (2012).
44. Willett P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discov Today*. **11**, 1046–1053 (2006)
45. Els C, *et al.* Adverse events associated with medium- and long-term use of opioids for chronic non-cancer pain: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev* **10**, CD012509 (2017).
46. Cumming JG, Davis AM, Muresan S, Haerberlein M, Chen H. Chemical predictive modelling to improve compound quality. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 948-962 (2013).

47. van der Westhuizen ET, Breton B, Christopoulos A, Bouvier M. Quantification of ligand bias for clinically relevant beta2-adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. *Mol Pharmacol* **85**, 492-509 (2014).
48. Woo AY, Xiao RP. beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin* **33**, 335-341 (2012).
49. Luttrell LM, Miller WE. Arrestins as regulators of kinases and phosphatases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **118**, 115-147 (2013).
50. Charkoudian N, Rabbitts JA. Sympathetic neural mechanisms in human cardiovascular health and disease. *Mayo Clin Proc* **84**, 822-830 (2009).
51. Hove-Madsen L, Mery PF, Jurevicius J, Skeberdis AV, Fischmeister R. Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. *Basic Res Cardiol* **91 Suppl 2**, 1-8 (1996).
52. Finney PA, *et al.* Albuterol-induced downregulation of Gsalpha accounts for pulmonary beta(2)-adrenoceptor desensitization in vivo. *J Clin Invest* **106**, 125-135 (2000).
53. Sebastian S, *et al.* The in vivo regulation of heart rate in the murine sinoatrial node by stimulatory and inhibitory heterotrimeric G proteins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **305**, R435-R442 (2013).
54. Kenakin T. *Agonists: The Measurement of Affinity and Efficacy in Functional Assays. A Pharmacology Primer 4th Edition (pp. 85-117).* Elsevier (2014).
55. Molinari P, *et al.* Morphine-like Opiates Selectively Antagonize Receptor-Arrestin Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 12522-12535 (2010).
56. Raffa RB, *et al.* The clinical analgesic efficacy of buprenorphine. *J Clin Pharm Ther* **39**, 577-583 (2014).
57. Robertson DN, Sleno R, Nagi K, Petrin D, Hebert TE, Pineyro G. Design and construction of conformational biosensors to monitor ion channel activation: A prototype FIAsh/BRET-approach to Kir3 channels. *Methods* **92**, 19-35 (2016).
58. Boussif O, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301 (1995).
59. Audet N, *et al.* Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *J Neurosci* **32**, 4827-4840 (2012).
60. Carpenter B, *et al.* Stan: A Probabilistic Programming Language. *2017* **76**, 32 (2017).

4.9 Acknowledgements

This research was supported by a research contract from Pfizer Inc. and grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant 311997 to G.P.) and the Canadian Institutes of Health Research MOP 324876 (to G.P.), MOP 102630 (to M.B. and O.L.) and Foundation grant (FDN-148431) to MB. MB holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. Dr Lichtarge's research was supported by National Institutes of Health (NIH 2R01 GM066099; NIH 5R01 GM079656). B.B. was supported by a studentship from Fonds de Recherche en Santé du Québec. P.D. was supported by a MITACS fellowship. This study was supported by the Quebec Consortium on Adverse effects of pain medications, an initiative funded by the Quebec Pain Research Network (QPRN) of the Fonds de recherche du Québec Santé.

4.10 Author contributions

G.P., M.B., B.B., J.G., A.S., D.C., C.L., P.D., and O.L. conceived the study. B.B., J.G., G.P., M.B., P.D., and M.G. wrote the paper. B.B., J.C., J.G., K.N., M.G., C.L., S.J., V.L., C.S., D.P., B.M., Y.R., P.D., and E.V.W. performed experiments and/or data analysis.

4.11 Competing interests :

M.B., C.L., and G.P. have a patent on BRET biosensors licensed to Domain Therapeutics North America and Pfizer Inc. The remaining authors declare no competing interests.

4.12 Tables

Table 1. Pharmacodynamic and structural categories associate with frequency of report of undesired events for clinically available hMOR ligands[#]

Undesired events associated with	Type of side effect	Preferred term	R square	<i>p</i> value	
Functional categories defined by Log(t)-Emax-Log(t)/KA	Gastrointestinal / nutrition	Cachexia	0.66	0.05	
		Faecaloma	0.86	0.01	
		Gastrointestinal motility disorder	0.81	0.01	
	Respiratory events	Respiratory depression	0.62	0.11	
		Respiratory rate decreased	0.60	0.13	
	Sleep disorder	Somnolence	0.60	0.12	
	Functional categories defined by Log(t)-Emax	Gastrointestinal / nutrition	Cachexia	0.66	0.05
			Faecaloma	0.92	0.00
			Gastrointestinal motility disorder	0.62	0.06
		Respiratory events	Hypoventilation	0.68	0.08
Oxygen saturation decreased			0.61	0.12	
Respiratory depression			0.78	0.05	
Respiratory rate decreased			0.69	0.08	
Sleep disorder		Somnolence	0.75	0.06	

Structural categories	Respiratory events	Hypopnoea	0.65	0.10
		Yawning	0.79	0.04
	Neuropsychiatric	Withdrawal syndrome	0.74	0.06
	Change in drug response	Analgesic drug level increased	0.70	0.08
		Drug effect decreased	0.64	0.10
		Drug effect increased	0.90	0.01
		Therapeutic response increased	0.89	0.02
		Therapeutic response decreased	0.74	0.06
	Pain	Breakthrough pain	0.69	0.08
		Complex regional pain syndrome	0.64	0.11
	Itching	Pruritus generalised	0.86	0.02
	Others	Therapy cessation	0.76	0.05

#Only significant correlations, and correlations that explained 60% or more of the variance were considered; full information in Supplementary Data 2. Similarity and SD gamma scores for Buprenorphine, Fentanyl, Morphine, Oxycodone, and Tramadol were used to establish correlations. Loperamide was additionally included in correlations for gastrointestinal reports. Source data provided in Supplementary Data 2 and source data files.

Table 2. Pharmacodynamic categories associate with frequency of report of undesired cardiovascular and respiratory events for clinically available β_2 ADR ligands[#]

Correlations between SD gamma scores for prescription β_2 ADR ligands* and	Type of side effect	Preferred term	R square	<i>p value</i>
Functional categories	CV	Hypotension	0.60	0.04
		Sinus bradycardia	0.58	0.05
		Blood pressure decreased	0.64	0.03
		Atrioventricular block	0.62	0.04
		Sinus arrest	0.68	0.02
	Respiratory	Inhalation therapy	0.60	0.04
Gs/cAMP/Ca ²⁺ partial matrix	CV	Hypotension	0.80	0.01
		Sinus bradycardia	0.66	0.03
		Blood pressure decreased	0.81	0.01
		Atrioventricular block	0.72	0.02
		Blood pressure systolic decreased	0.64	0.03
		Sinus arrest	0.82	0.00
		Ejection fraction decreased	0.82	0.01
	Heart rate decreased	0.67	0.05	
Respiratory	Asthma	0.64	0.03	

Inhalation therapy	0.59	0.05
Asthmatic crisis	0.74	0.01
Status asthmaticus	0.89	0.00
Throat irritation	0.69	0.02
Choking	0.64	0.03

#Only significant correlations were considered, full information in Supplementary Data 11. Similarity and SD gamma scores for Isoproterenol, norepinephrine, salbutamol, salmeterol, propranolol, carvedilol, and metoprolol were used to establish correlations. Source data provided in Supplementary Data 11 and source data files

4.13 Figures

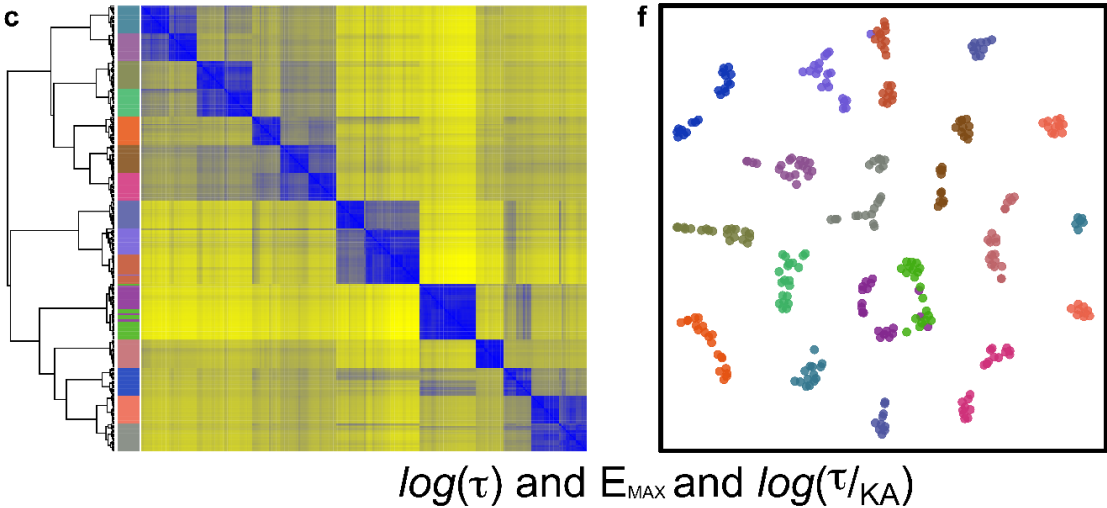
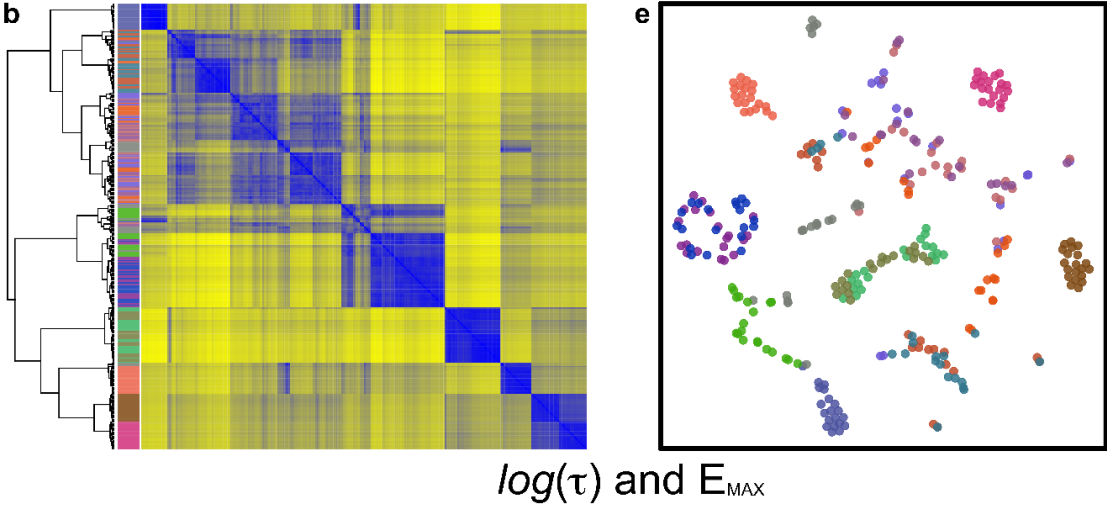
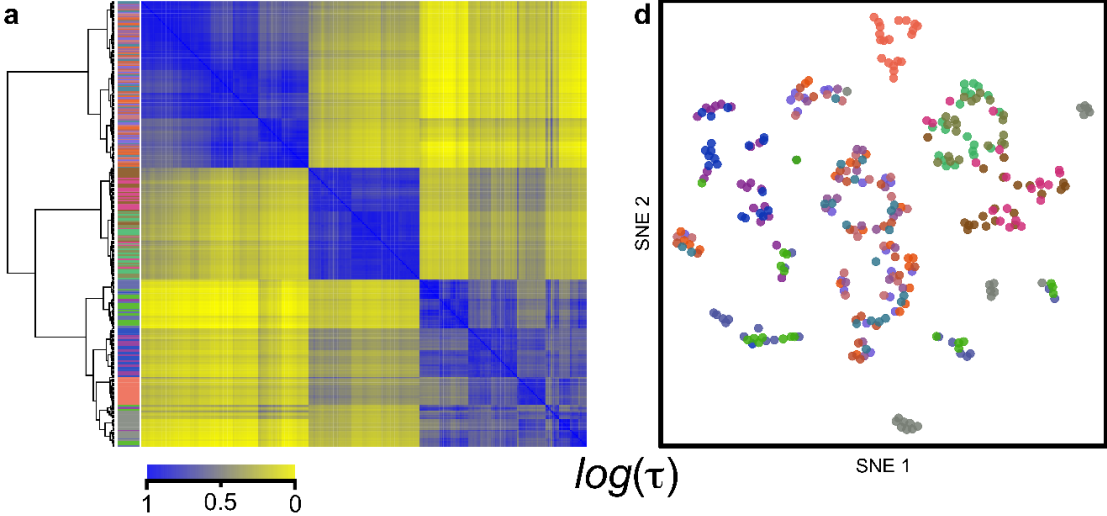


Figure 1. Ligands are classified according to similarities in multidimensional signaling profiles using pharmacodynamic parameters.

320 virtual compounds were defined by logistic and operational parameters to represent 16 distinct signaling profiles describing response at six different readouts. Indicated parameters were then subject to NNMF followed by k-means clustering, to produce corresponding similarity matrices that were represented as heatmaps and hierarchical clustering trees (using the R heatmap function with the metric:ward.D2) (a–c) or t-SNE plots (using the R package tsne with default parameters) (d–f). Ligands were color-coded to highlight how different combinations of parameters differentiated compounds originating from the different profiles originally defined.

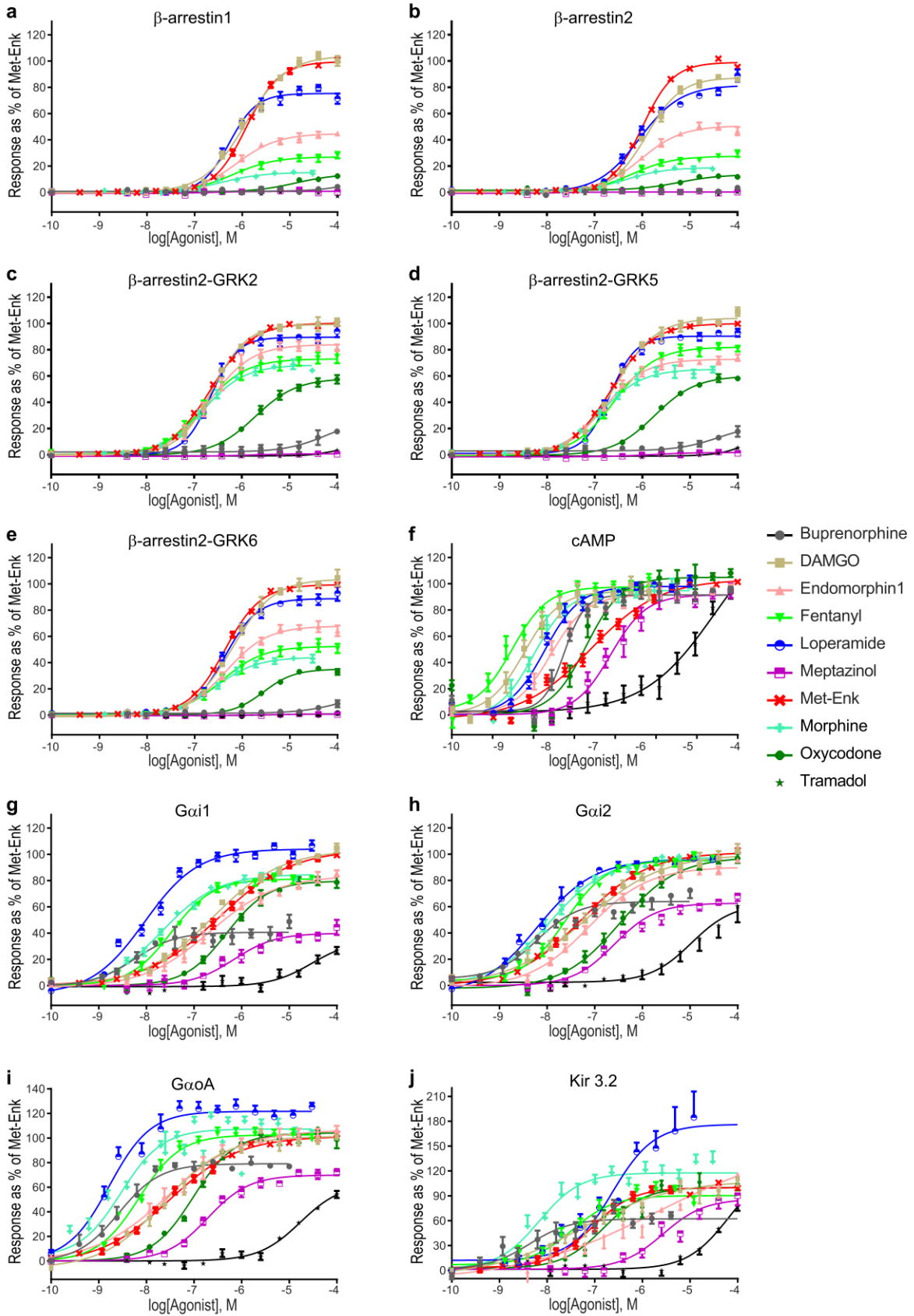


Figure 2. Barr recruitment and G-protein responses generated by opioid ligands.

Responses for prescription opioids and known hMOR ligands were monitored using BRET-based biosensors. The results correspond to mean \pm SEM of at least three independent experiments, normalized to the maximal effect of Met-ENK, which was tested in all experimental runs ($n = 16$ – 29). Curves were fit with the operational model and the logistic equation (the results from the logistic fit are shown). **(a)** β arr1 recruitment, **(b)** β arr2 recruitment, **(c)** β arr2 recruitment in presence of GRK2, **(d)** β arr2 recruitment in presence of GRK5, **(e)** β arr2 recruitment in presence of GRK6, **(f)** cAMP, **(g)** G α i1 activation, **(h)** G α i2 activation, **(i)** G α oA activation, and **(j)** Kir3.1/3.2 activation. Net BRET values for Met-ENK are shown in Supplementary Fig. 5 and dose–response curves for all novel compounds appear in Supplementary Fig. 6. Operational and logistic parameters provided in Supplementary Data 1. Source data are provided as a source data file.

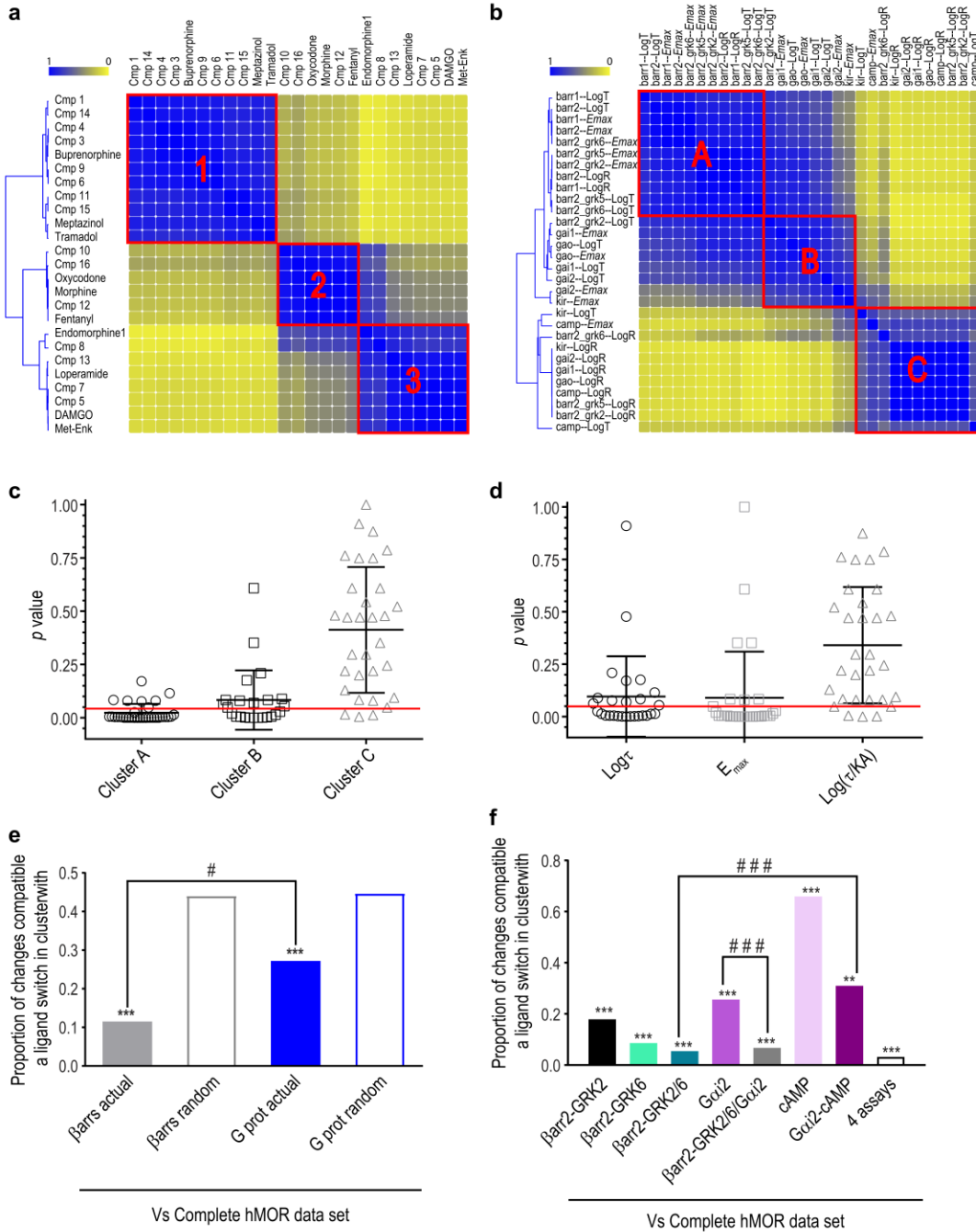


Figure 3. Assignment of hMOR ligands into clusters is primarily driven by β arr responses.

Ligand (a) and parameter (b) similarity heatmaps for the complete hMOR data set. Yellow and blue, respectively indicate ligands/parameters that never or always cluster together. Distribution of parameters describing ligands within clusters shown in (a) was compared to their distribution in the whole population using a two-sample Kolmogorov–Smirnov test. Resulting p -values were plotted according to clusters shown in (b) (c) or to parameter type (d), mean \pm SD are also shown. Red line: $p = 0.05$. Similarity matrices corresponding to partial data sets for β arr- or G-protein-mediated responses were compared with the complete, reference hMOR data set. Filled bars: proportion of ligands changing clusters when comparing actual β arr and G-protein data sets to the reference; empty bars: proportions observed by comparing simulations of random clustering to the reference data set. *** $p < 0.001$; -zscore β arr: -5.375 ; z-score G protein: -6.092 . # $p < 0.05$; z-score difference: -2.22 . I. Similarity matrices generated for indicated partial responses were compared with the hMOR reference matrix. The results for actual data matrices are shown while results for random simulations were omitted. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparing partial data sets to their randomized controls; z-scores for comparisons between actual and randomized data: β arr2-GRK2: -12.724 ; β arr2-GRK6: -10.583 ; β arr2-GRK2/GRK6: -8.835 ; Gai2: -7.315 ; cAMP: 6.297 ; Gai2-cAMP: -2.351 ; four assays -8.541 ; β arr2-GKR2/6/Gai2: -7.391 . #### $p < 0.001$; z-score difference: β arr2-GRK2/6 vs. Gai2/cAMP: -3.308 ; z-score difference: Gai2 vs β arr2-GRK2/6-Gai2: 3.754 (f). Source data provided in Supplementary Data 1 and as a source data file

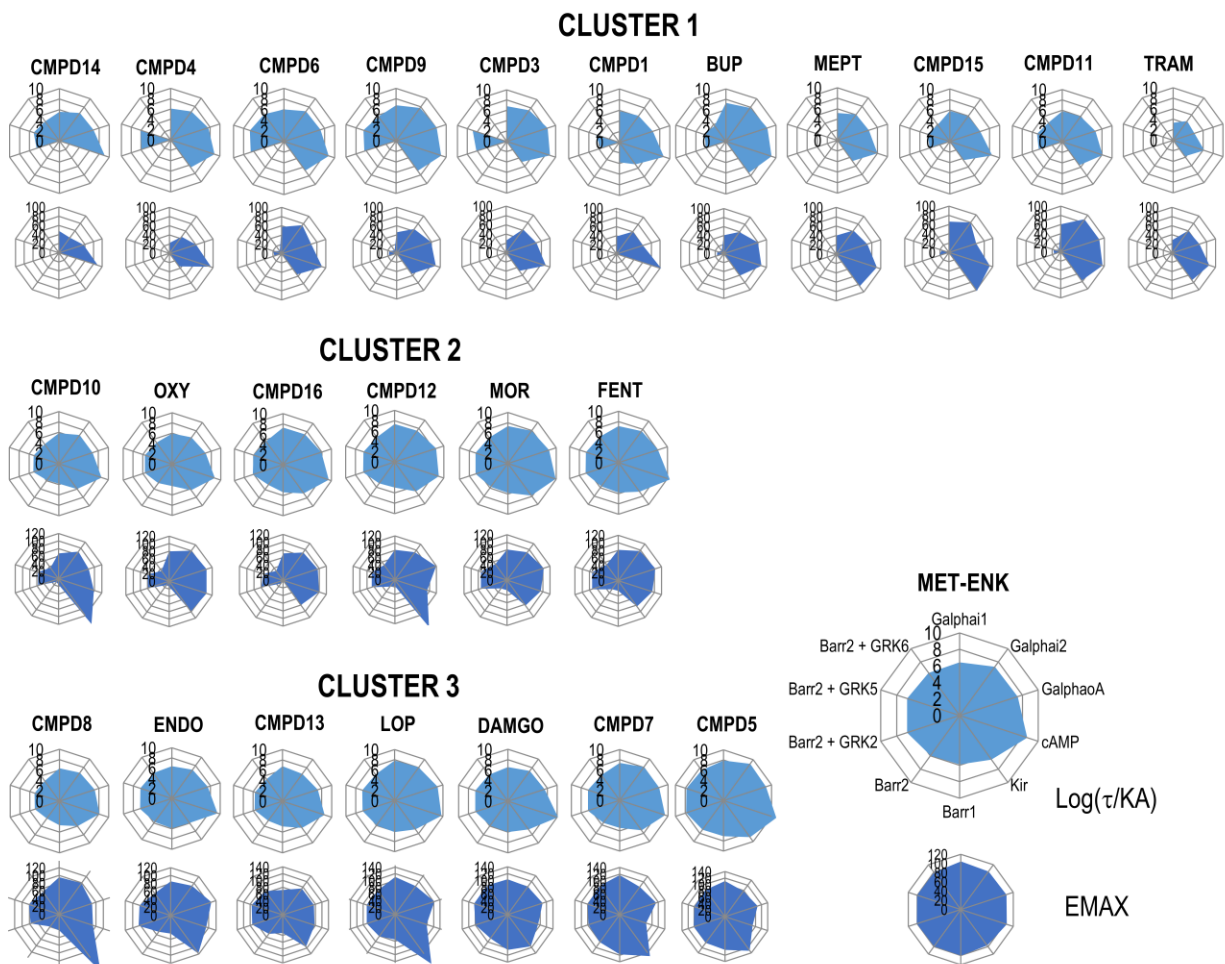


Figure 4. Graphic representation of operational and logistic parameters for hMOR ligands populating different clusters.

Operational transduction coefficients ($\text{Log}(\tau/\text{KA})$) and logistic E_{max} values derived from concentration response curves generated by hMORs at ten different biosensors were represented as radial graphs. Each radius corresponds to the magnitude of $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ or E_{max} values. Transduction coefficients are in logarithmic scale, E_{max} values were normalized to maximal Met-ENK response and are presented on linear scale. Source data provided in Supplementary Data 1.

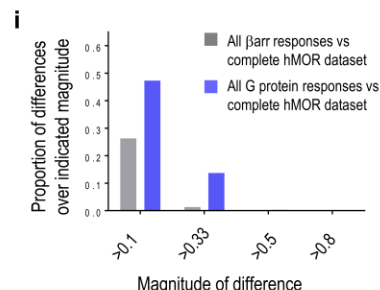
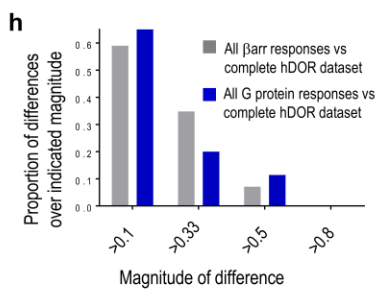
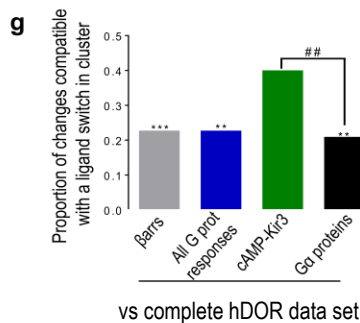
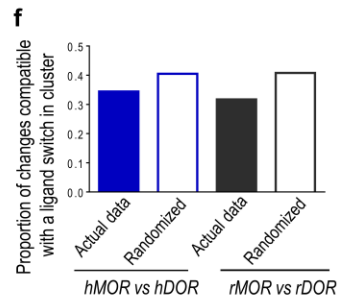
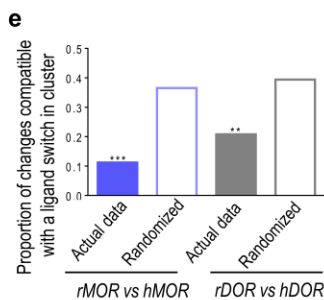
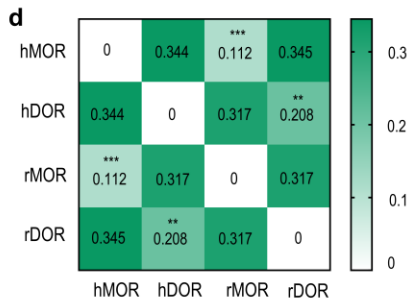
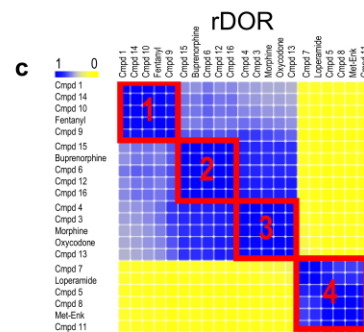
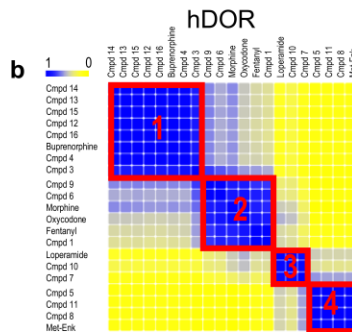
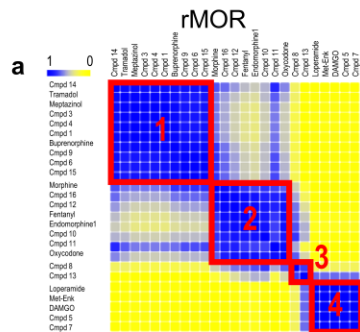


Figure 5. Signaling profiles of opioid receptor ligands are conserved across species but not receptor subtypes.

Ligand similarity heatmaps for rat MOR (a), human DOR (b), and rat DOR (c) data sets. Yellow and blue, respectively, indicate ligands/parameters that never or always cluster together. Proportion of ligands changing cluster for indicated comparisons; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ comparing actual to randomized data sets as in Fig. 3 (d). Similarity matrices for the same receptor compared across species. Filled and empty bars: proportion of ligands changing clusters when, respectively, comparing actual data and random clustering simulations to the reference matrix; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; z-score MOR subtypes: -7.153 ; z-score DOR subtypes: -2.742 I. Similarity matrices for receptor subtypes within species compared as in I. Actual and randomized data sets did not differ: z-score hMOR vs. hDOR: -1.502 ; z-score rMOR vs. rDOR subtypes: -1.567 (f). Similarity matrices for β arr- or G protein-partial data sets were compared with the complete hDOR matrix as in I; only comparisons for actual data are shown; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; z-scores versus corresponding randomized data: β arr: -3.309 ; G protein: -2.644 ; cAMP-Kir3.2: -0.309 , $G\alpha$ proteins: -3.286 . $^{##}p < 0.01$; z-score difference: cAMP-Kir3.2 vs. $G\alpha$ proteins: 2.515 . $p = 0.256$; z-score difference β arrs vs. All G prot responses: -0.656 (g). A difference was calculated between every value_{ij} in the complete hDOR matrix and corresponding value_{ij} in indicated partial data sets. Histogram shows the fraction of differences with absolute value above indicated thresholds (h). Calculations described in (h) were repeated for the complete hMOR matrix and partial data sets for β arr or G protein (i). Source data provided in Supplementary Data 7, 8, and 9 and source data files.

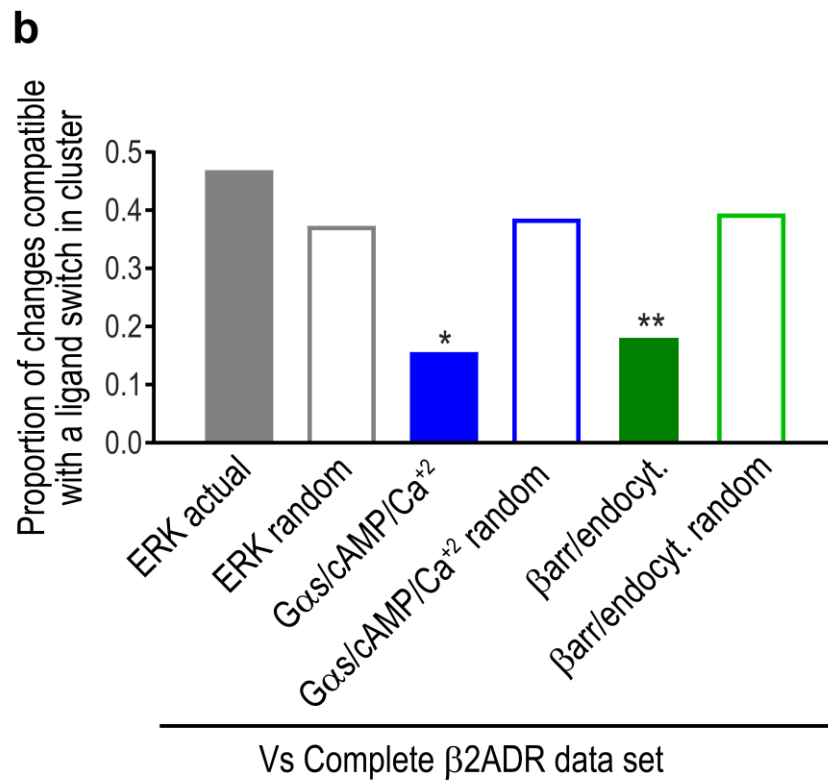
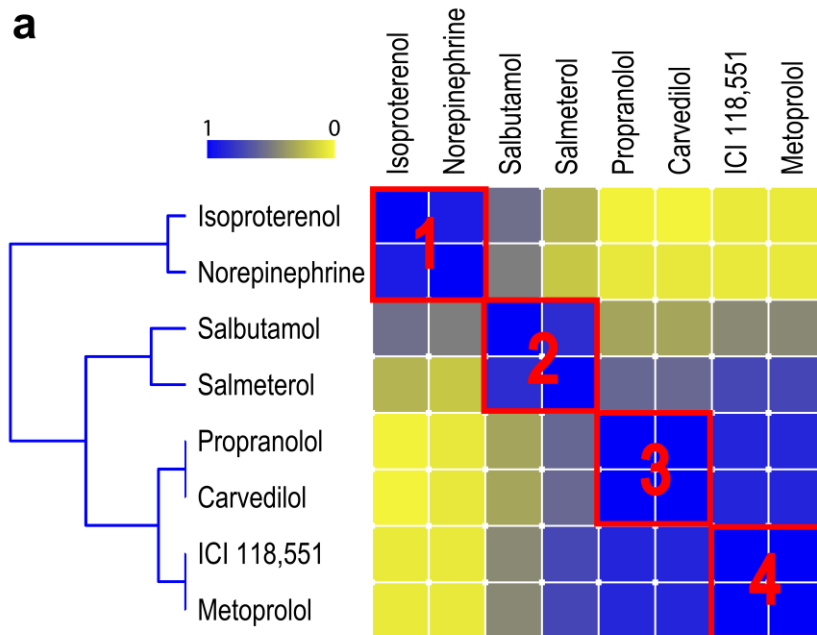
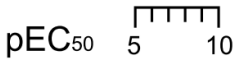
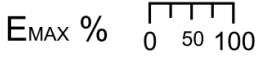
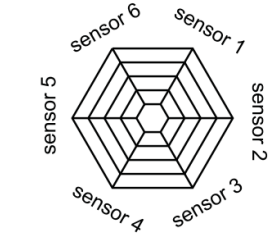
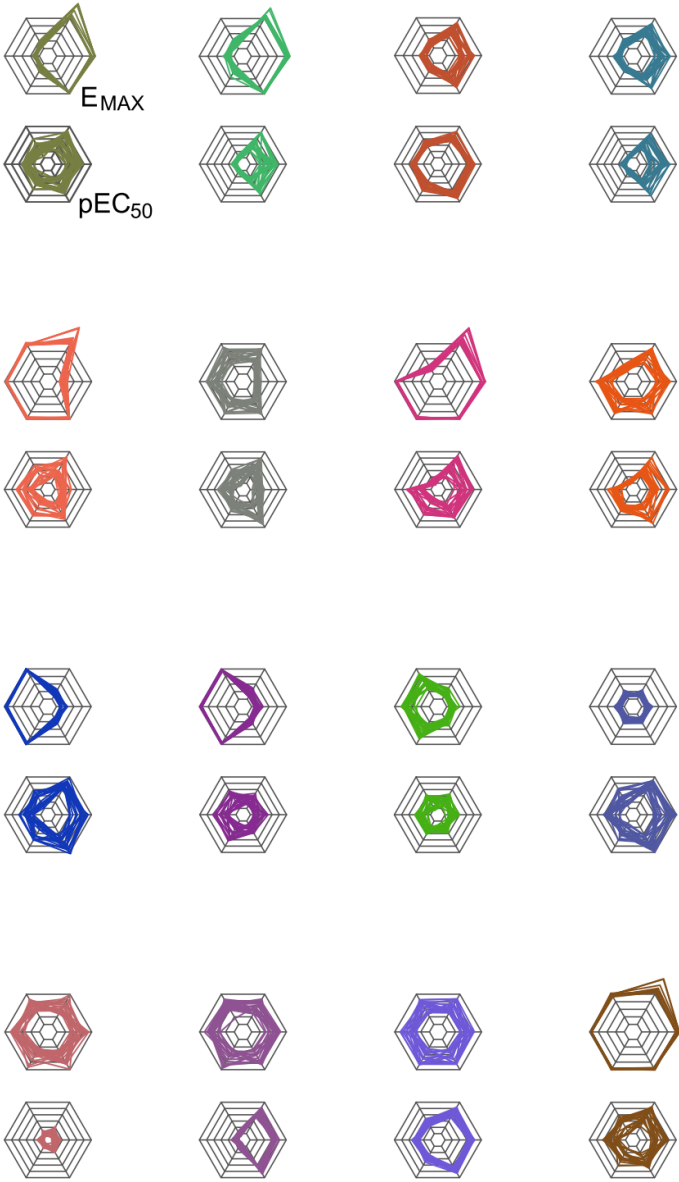


Figure 6. B2_{ADR} ligands cluster according to similarity in G protein and β arr-mediated responses.

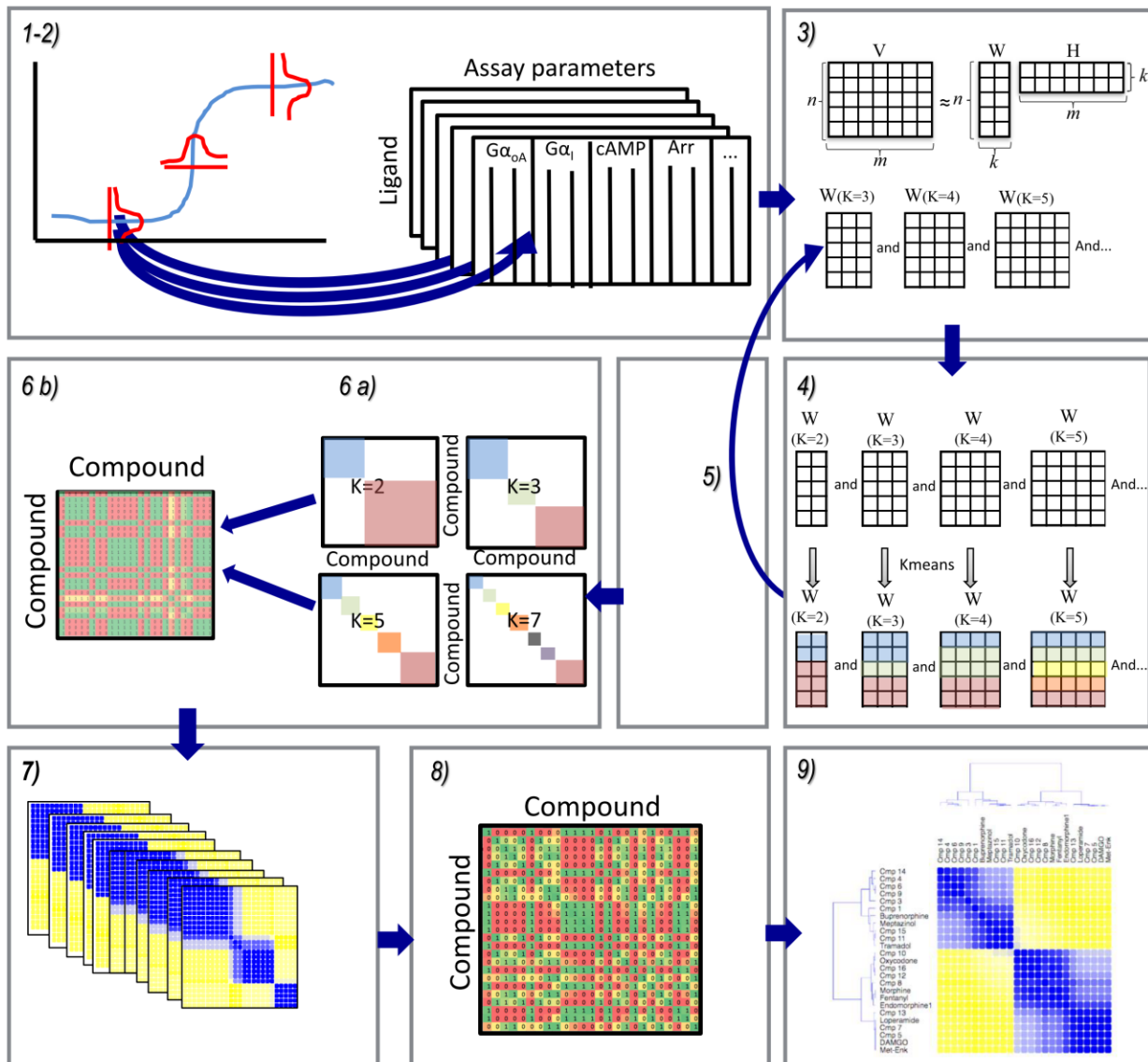
Ligand similarity heatmaps for h β 2_{ADRS}. Yellow and blue, respectively, indicate ligands/parameters that never or always cluster together. **(a)**. Similarity matrices for partial data sets corresponding to ERK, G protein- (G α s, cAMP, Ca⁺²), and β arr2- (recruitment, endocytosis) mediated responses were compared with the reference h β 2_{ADRS} data set. Filled bars: proportion of ligands changing clusters when comparing actual ERK, G protein, and β arr2 data sets to the reference; empty bars: proportions observed comparing the reference data set to corresponding simulations of random clustering for partial matrices. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; z-score ERK: 1.523; z-score G protein: -2.446 and z-score β arr: -2.636 **(b)**. Source data provided in Supplementary Data [10](#) and source data files

4.14 Supplementary Figures



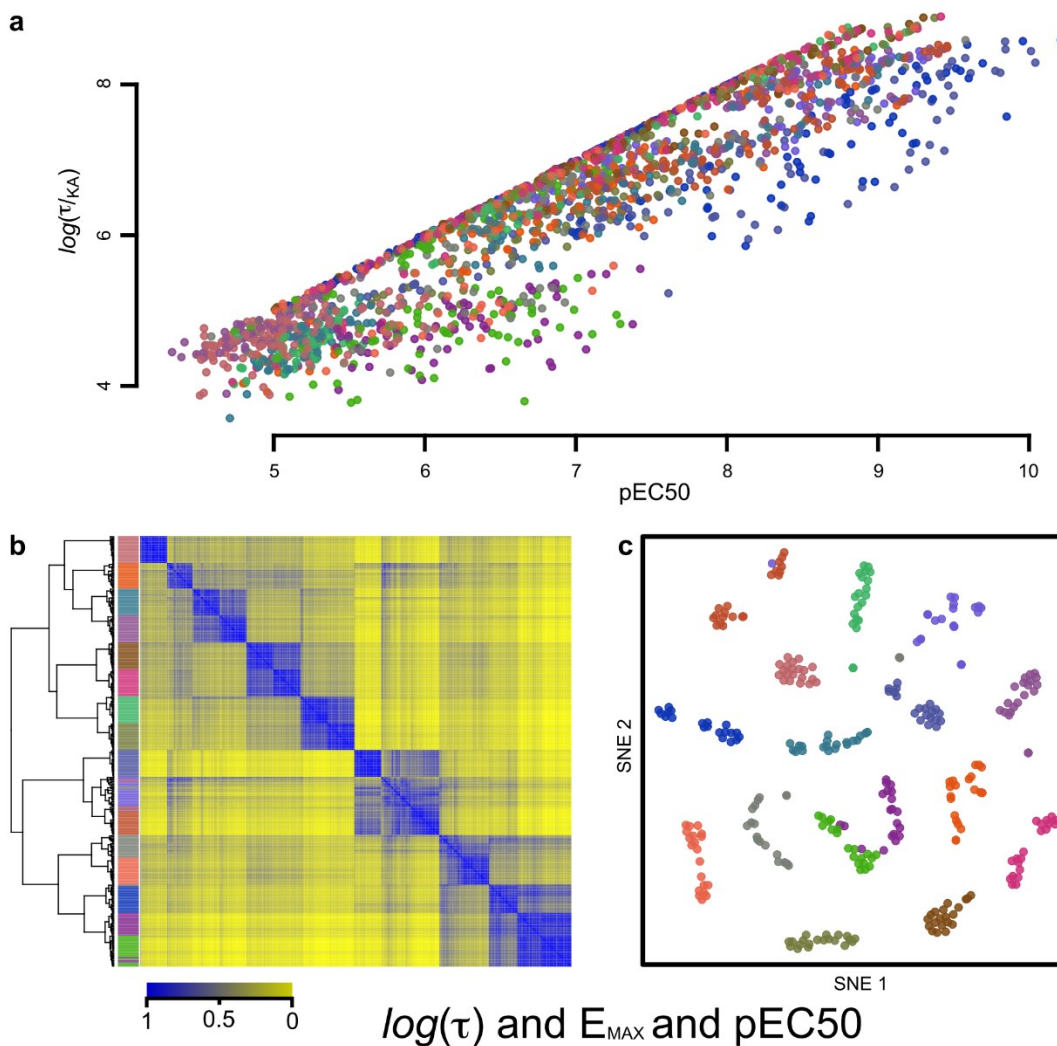
Supplementary Figure 1. Profiles of virtual compounds classed by Emax average distance.

Each profile is shown as a pair of stacked radar plots giving Emax (top) and pEC50 (bottom) for 6 readouts (sensors 1 to 6). Emax and pEC50 radar plot overlays of the 20 compounds in each profile (see materials and methods) arranged in a 4 x 4 array and loosely grouped as per inter-profile average Euclidian distance of Emax (normalized sensor-wise).



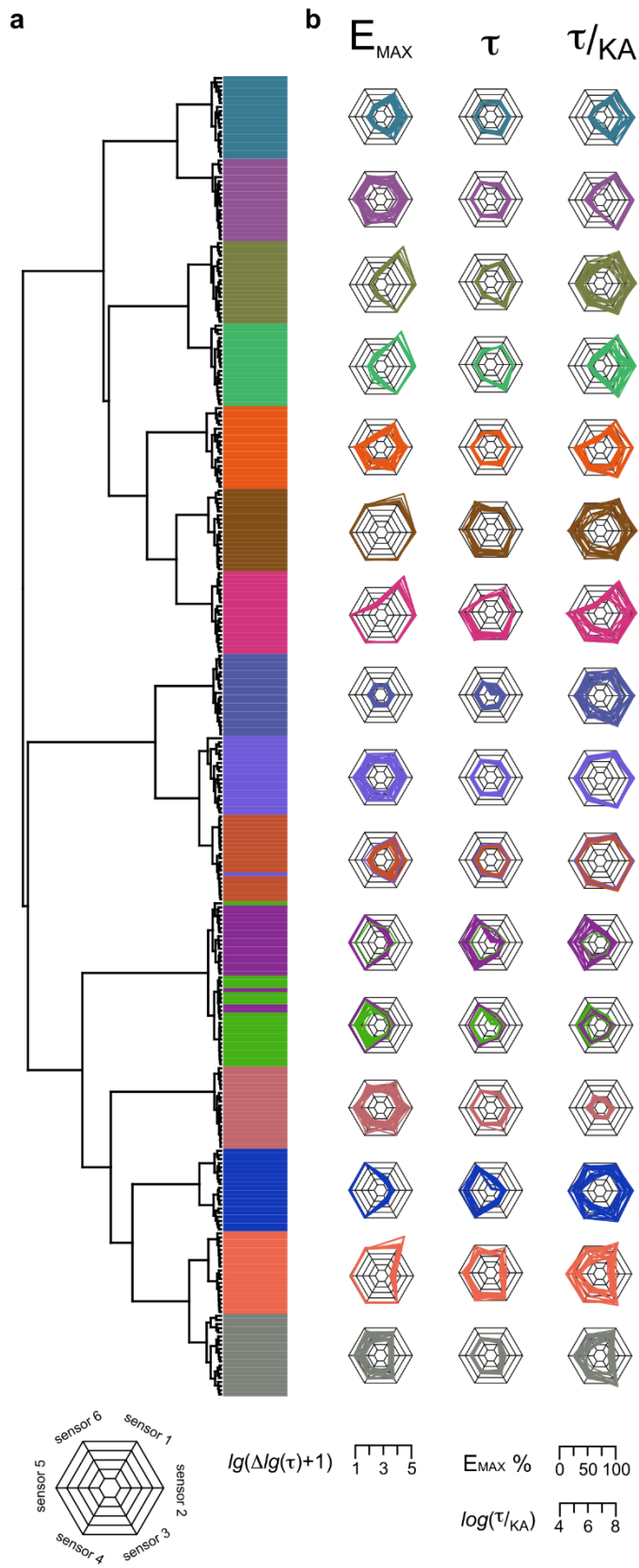
Supplementary Figure 2. Stepwise method used to cluster hMOR ligands according to pharmacodynamic parameters.

1-2) To incorporate the variance associated with the value of each parameter ($p\text{Log}(\tau)$, E_{max} , $\text{Log}(\tau/\text{KA})$) describing the mean concentration response curve for each ligand at distinct biosensors we iteratively sampled from the normal distribution centered at the parameter's mean and dispersed according to its standard deviation, to produce 1000 sampled data matrices. This procedure thereby propagates the variation associated with each mean parameter value. **3)** NMF is independently performed on each sampled matrix to reduce the dimensionality of the data prior to clustering, yielding W (ligand) and H (parameter) basis vectors (*upper panel*); NMF is repeated for ($k=2$ to $k=7$) (*lower panel*). **4)** Each individual basis vector ($K=2-7$) is then clustered by K-means. **5)** The NMF and K-means process is repeated 250 times for each value of K and **6)** *a)* For each K (2-7), a ligand similarity matrix is derived, indicating co-clustering frequency of ligands I and j in the 250 repeats; *b)* Frequency matrices $k=2$ through $k=7$ are averaged into a 'composite similarity matrix' such that each of the 1000 original data samples generates a matrix combining information obtained through 2-7 dimensions, and therefore independent of k. **7)** The 'composite similarity matrix' produced from each of the 1000 samples are averaged to create **8)** a final ligand similarity matrix quantifying clustering frequency over all 1000 iterations **9)** which is then represented as a heat map and a dendrogram.



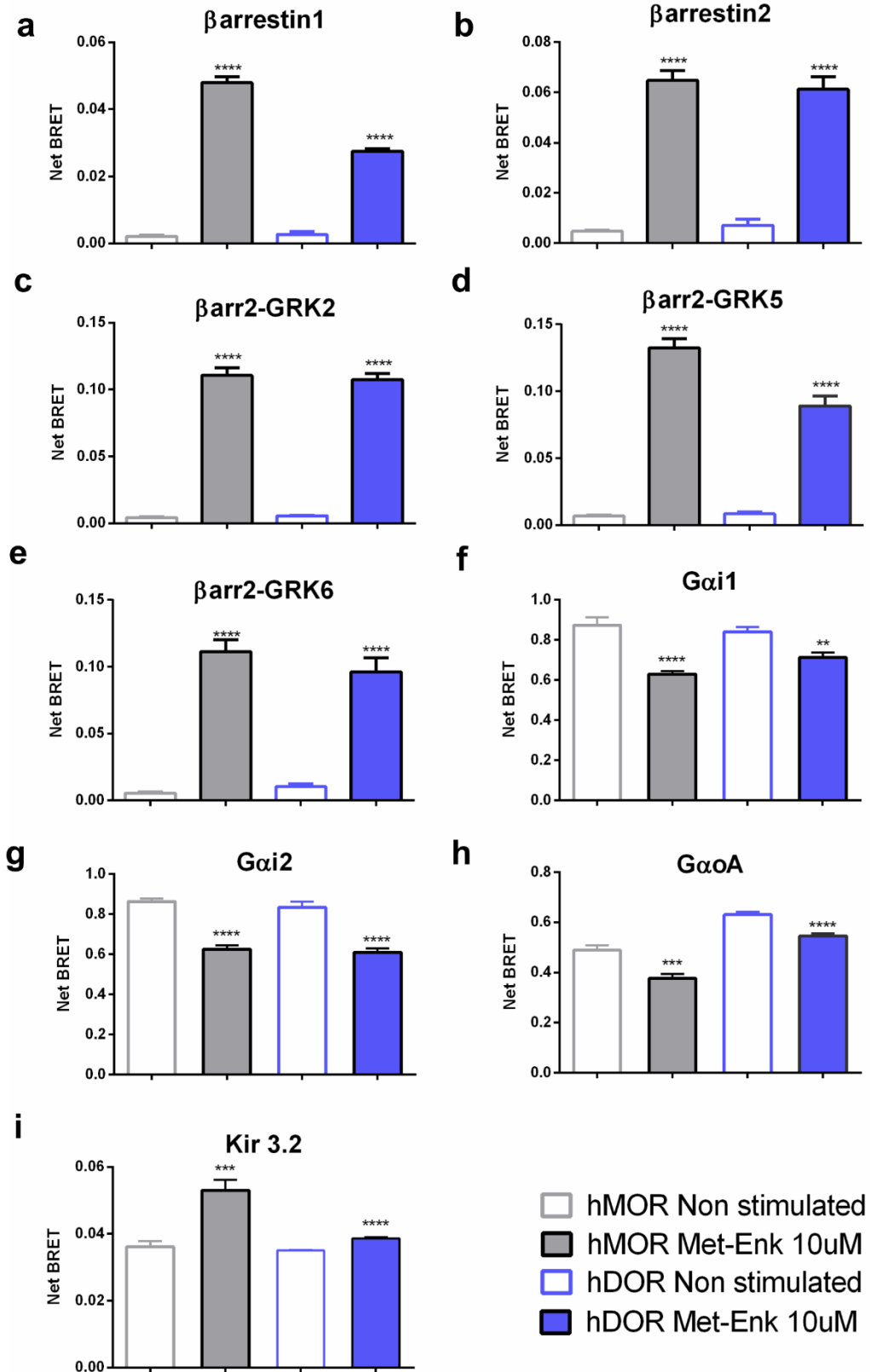
Supplementary Figure 3. $\log(\tau/KA)$ and pEC50 values are correlated but not congruent.

Correlation between $\log(\tau/KA)$ and pEC50 values generated for the 320 virtual compounds across the 6 readouts ($r^2=0.84$) **(a)**. Indicated parameters were subject to NNMF followed by k-means clustering to produce similarity matrices represented as a heat map/dendrogram pair **(b)** and a t-SNE plot (both computed as described in Fig. 1 **(c)**). Ligands were colour-coded according to their profile.



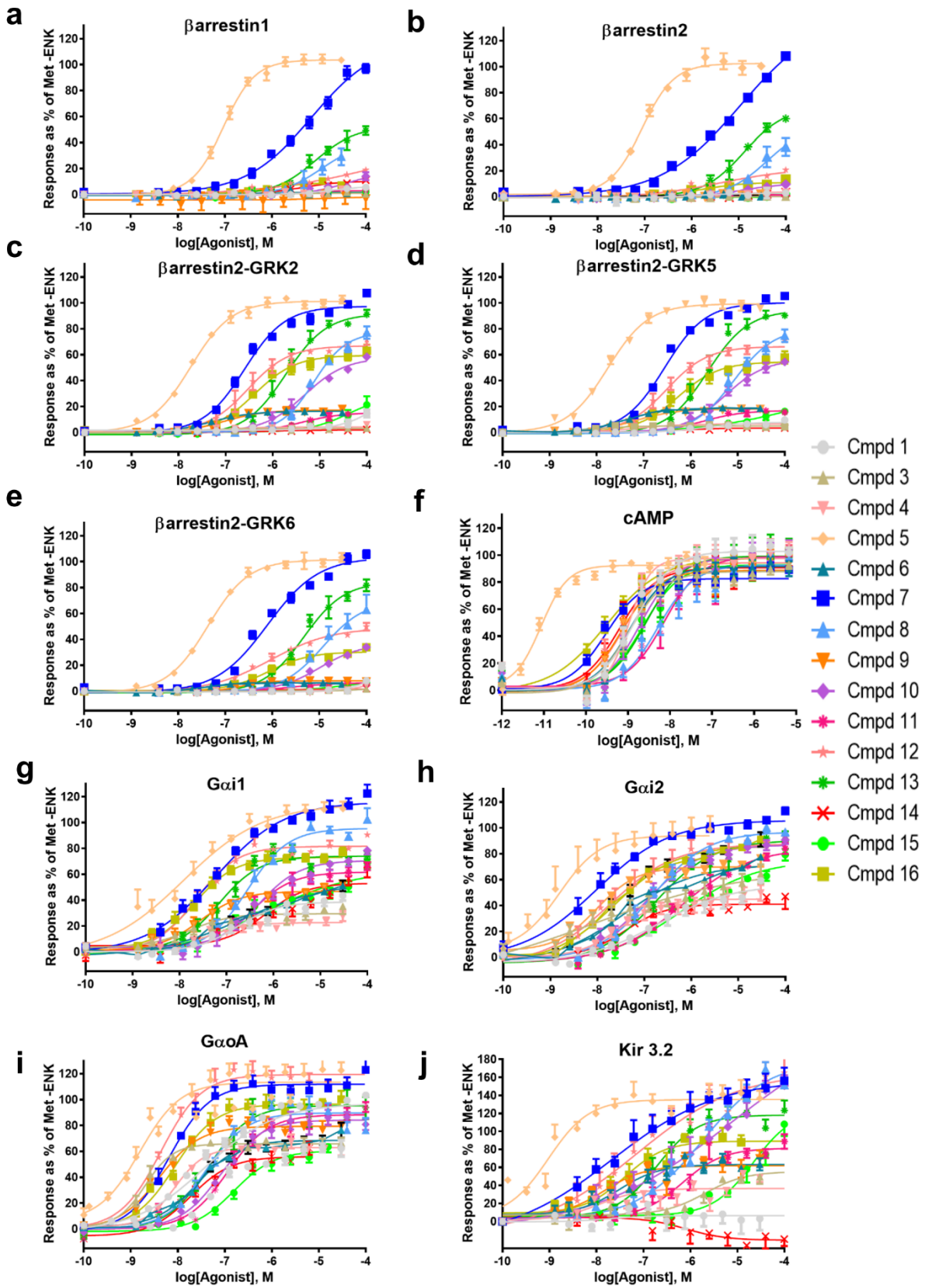
Supplementary Figure 4. Graphic representation of parameters defining virtual compounds clustered according to similarities in $\text{Log}(\tau)$, E_{max} and $\text{Log}(\tau/\text{KA})$.

Hierarchical clustering tree (function `hclust` in R using the `ward.D2` metric) with leaf coloured by profile shows the separation of virtual ligands from different profiles (materials and methods). Cuts in the tree essentially coincide with the profiles **(a)**. Radar graphs were computed for each cluster and each parameter considered in the NNMF/k-means clustering showing that group assignment sometimes depends on subtle variations in any of the selected parameters. Radar plot axes are chosen as to best represent the variation in parameter values. E_{max} has linear axes. We capture the large dynamic range in τ while still emphasising variation at the pivot value of 1.0, as \log_2 fold changes relative to the minimum observed value. On this scale, τ values of 0.1, 1 and 10 are about 2.1, 2.9 and 3.4 respectively (the change between successive grid levels in τ value is $2^{2^i} / 2^{2^{(i-1)}}$, or: 2x, 4x, 16x, 256x, 65536x. These are the multipliers of their previous grid level's value; ie: grid level 3 represents a τ value that is 16 times as large as that represented at grid level 2. τ/KA values are expressed as \log_{10} **(b)**.



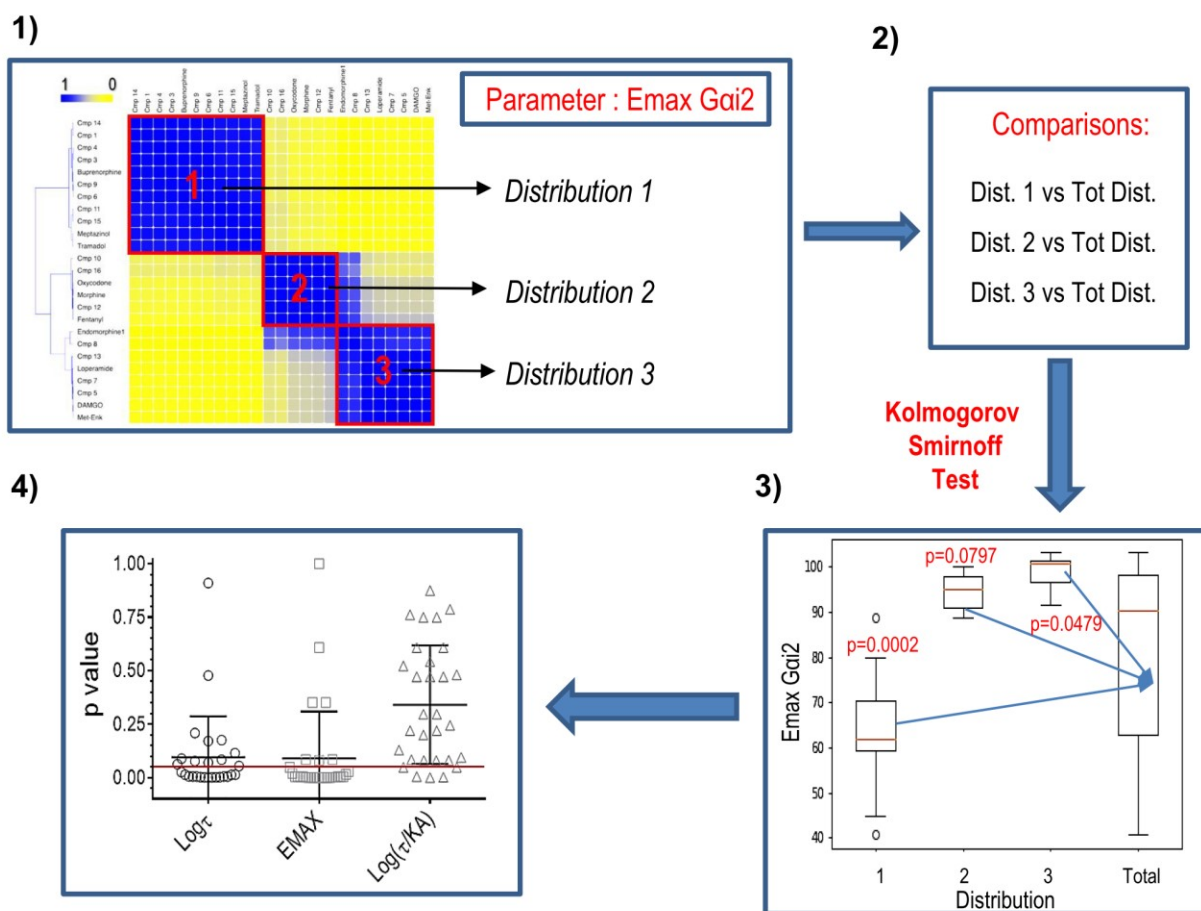
Supplementary Figure 5. Net BRET values of hMOR and hDOR responses obtained with different biosensors.

Net BRET values obtained in single point BRET assays monitoring hMOR (green) and hDOR (blue) responses across indicated bi-molecular biosensors are represented as bar graphs for: **(a)** β arr1 recruitment, **(b)** β arr2 recruitment, **(c)** β arr2 recruitment in presence of GRK2, **(d)** β arr2 recruitment in presence of GRK5, **(e)** β arr2 recruitment in presence of GRK6, **(f)** G α i1 activation, **(g)** G α i2 activation, **(h)** G α oA activation and **(i)** Kir3.1/3.2 activation. Each response was tested in the presence (10 μ M; *filled bar*) or absence (*empty bar*) of Met-Enkephalin (Met-ENK) and corresponds to mean \pm SEM of 9-12 independent experiments. Results were analyzed using non-paired t-test. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.



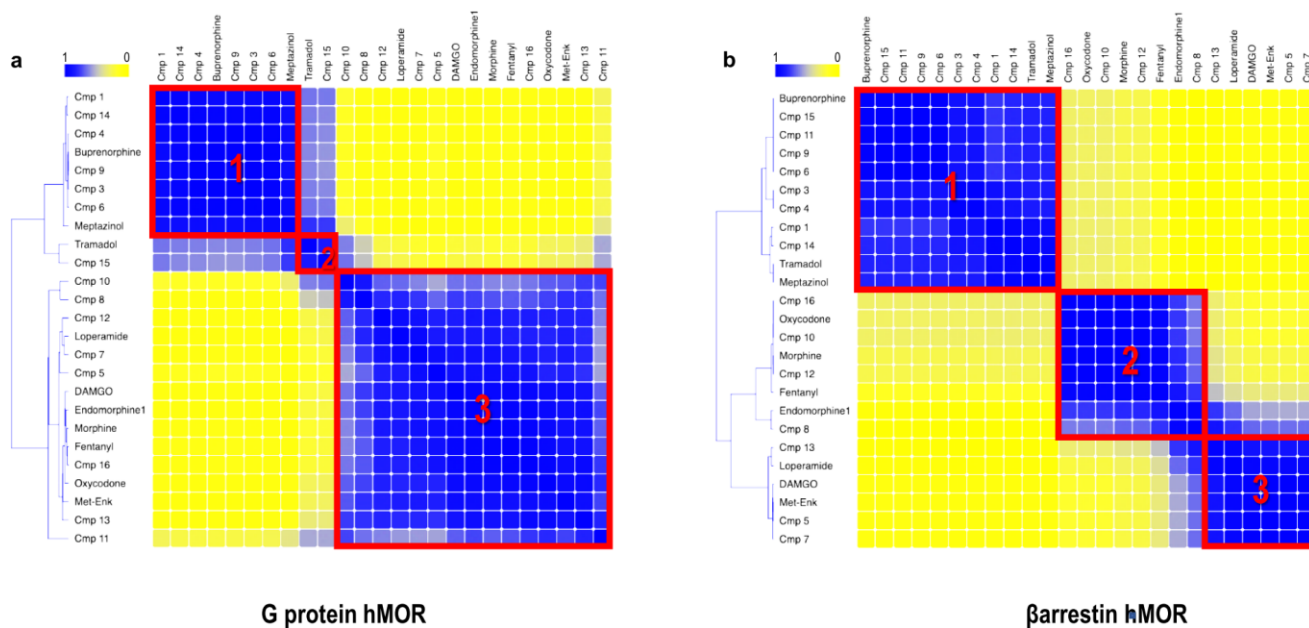
Supplementary Figure 6. β arr recruitment and G protein responses by novel opioid ligands were monitored using BRET-based biosensors.

Novel hMOR ligands were identified in a screening campaign carried out at Pfizer Inc. to identify MOR agonists with poor or no β arr recruitment. A sample of those identified were tested using BRET-based biosensors to monitor response for : **(a)** β arr1 recruitment, **(b)** β arr2 recruitment, **(c)** β arr2 recruitment in presence of GRK2, **(d)** β arr2 recruitment in presence of GRK5, **(e)** β arr2 recruitment in presence of GRK6, **(f)** cAMP, **(g)** $G\alpha_{i1}$ activation, **(h)** $G\alpha_{i2}$ activation, **(i)** $G\alpha_oA$ activation and **(j)** Kir3.1/3.2 activation. Results correspond to mean \pm SEM of 3-12 independent experiments. Curves were normalized to the maximal effect produced by Met-ENK, which was tested in all experimental runs (n = 16-29). Curves were fit with operational model and logistic equations (curves shown were fit with the logistic model; parameters from both fits provided in Supplementary Data 1).



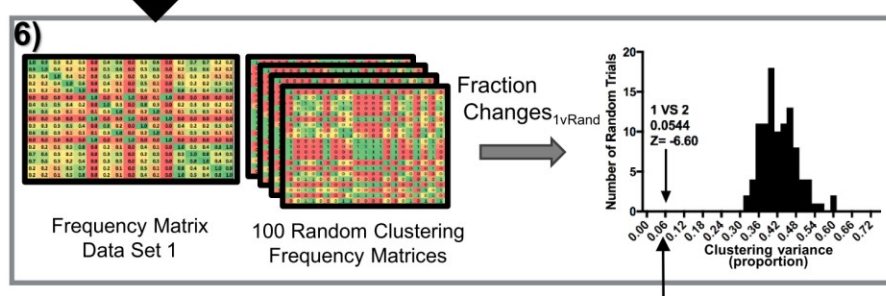
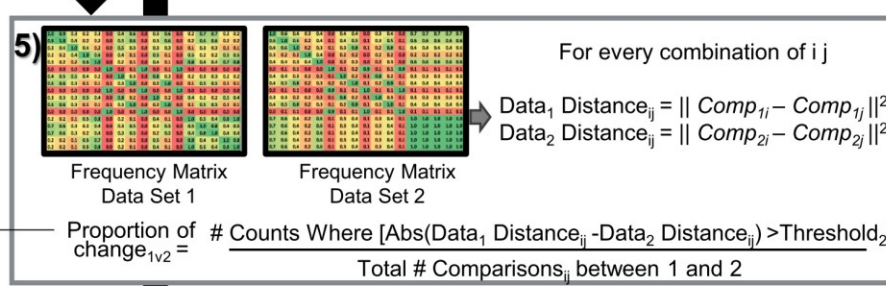
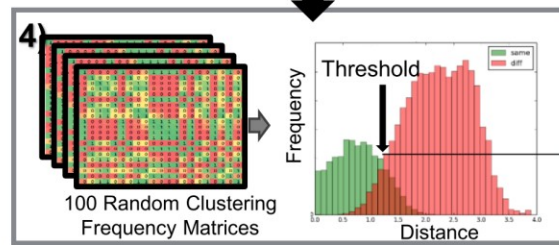
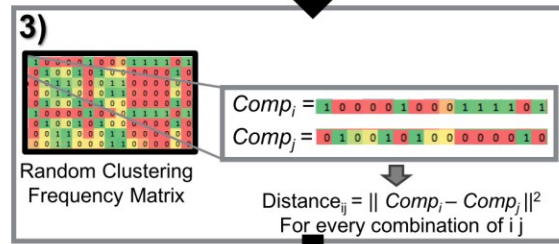
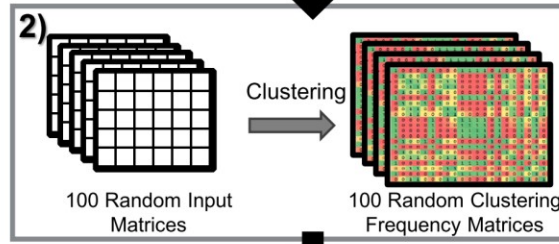
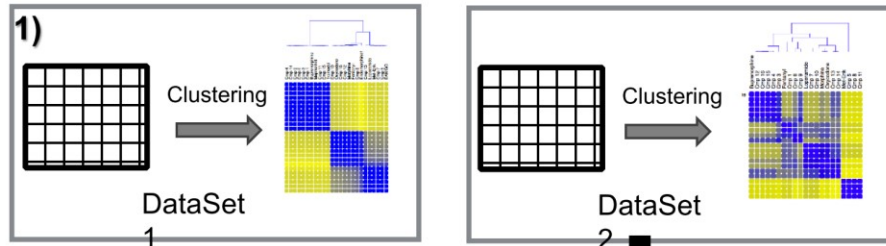
Supplementary Figure 7. Stepwise method used to determine parameter contribution to ligand segregation into functional clusters.

594) We measured how well each of the 30 parameters considered individually differentiated the three ligand clusters. This was calculated by identifying which of the parameters (e.g. Gai2 Emax) showed statistical difference across the compound clusters. Practically, we grouped the Gai2 Emax values for compounds in each cluster (1, 2, and 3) and **2)** measured if they represented biased selections from the total distribution (all values for 25 ligands combined) using a Kolmogorov Smirnov. **3)** Comparisons for each parameter provides a group of 3 p values. **4)** The procedure is repeated for each of the 30 parameters to generate corresponding p values that are then plotted according to parameter type or according to similarity in relative magnitudes (shown in figure 3c-d).



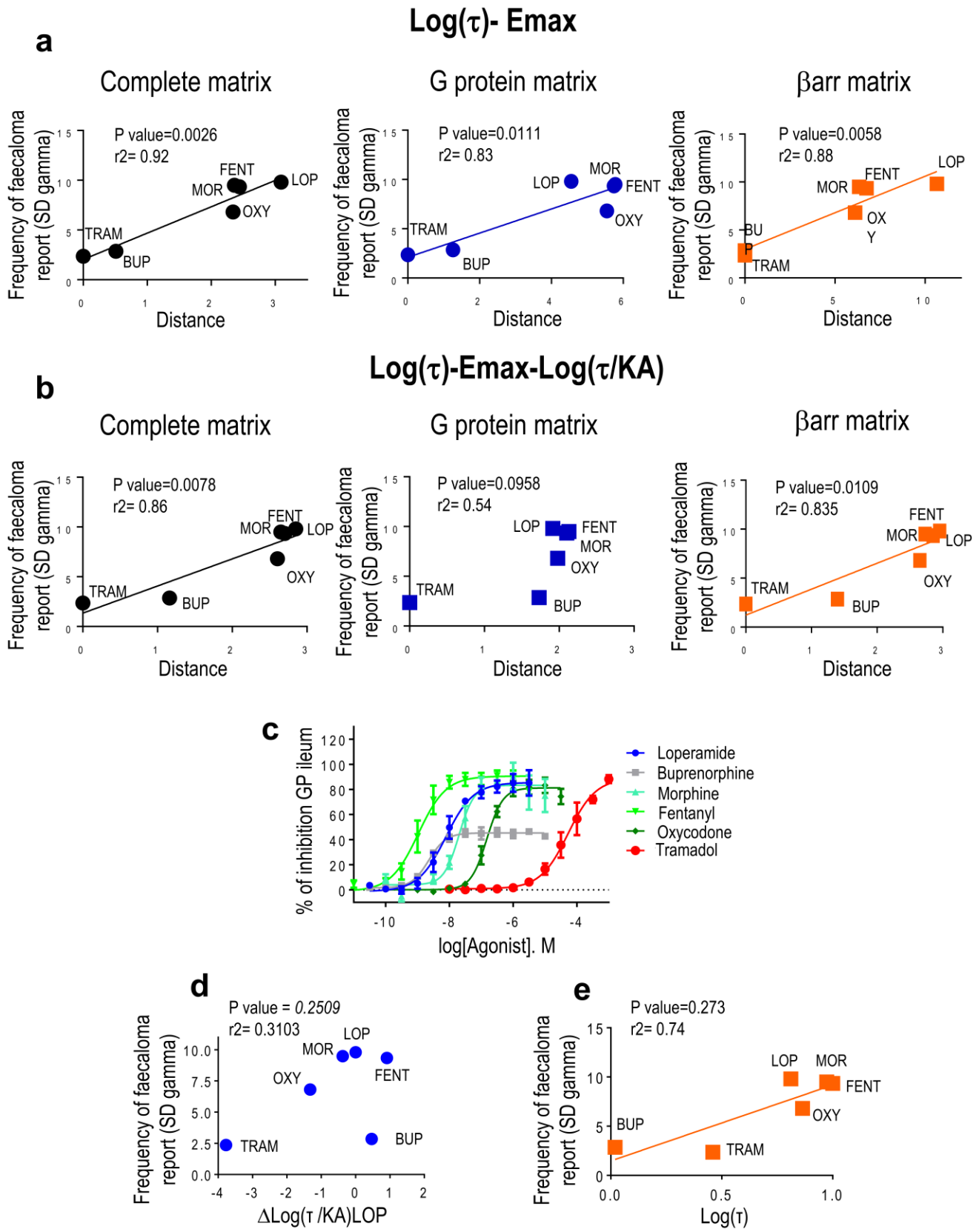
Supplementary Figure 8. Heat maps and cluster 170nti-inflam obtained using partial hMOR datasets for β arr or G protein parameters.

Shown are heat maps and clusters generated by NMF and k-means analysis of partial datasets for all G protein mediated-responses **(a)** and all β arr recruitment readouts monitored by BRET **(b)**. Blue (1) and yellow (0) respectively indicate consistent assignment of pairs of ligands to the same or different clusters.



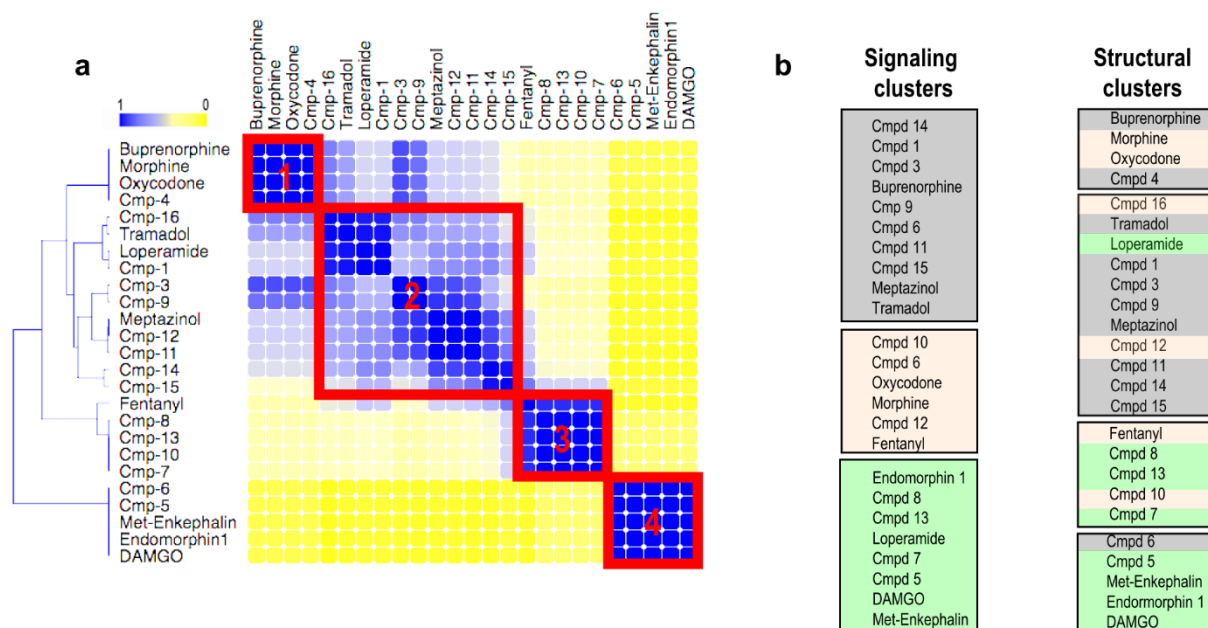
Supplementary Figure 9. Stepwise comparison of clusters produced with different datasets.

594) Use clustering methodology to obtain frequency matrix and cluster 172nti-inflam for both data sets of interest; e.g. set of parameters for all responses tested for hMOR (dataset 1) vs partial dataset for parameters describing β arr responses at the receptor (dataset 2). **2)** Create 100 randomized matrices of dataset 2 by permuting the input values to create a matrix of equal size but shuffled values. Then perform NNMF/k-means analysis on each shuffled matrix resulting in 100 random frequency matrices. **3)** For each of the 100 frequency matrices of randomized data, calculate the Euclidian distance between $Comp_i$ and $Comp_j$. Sort distance values based on whether the compounds (I and j) are in the same cluster or different clusters to produce a distribution of distances as shown in next step. **4)** Determine a threshold value separating the distribution of distances between compounds in the same cluster and the distances between compounds in different clusters. **5)** Calculate and compare the $distance_{ij}$ for dataset 1 vs the $distance_{ij}$ for dataset 2. The proportion of differences between the two matrices greater than the threshold value represents variance in clustering. **6)** Finally, measure the clustering similarity of data set 1 vs the 100 random matrices of dataset 2 to obtain a distribution of proportions greater than the threshold distance; this proportion describes random variance. Use z-score to quantify if the proportion of differences describing variance between dataset 1 and the actual dataset 2 is statistically different from the proportion describing random variance.



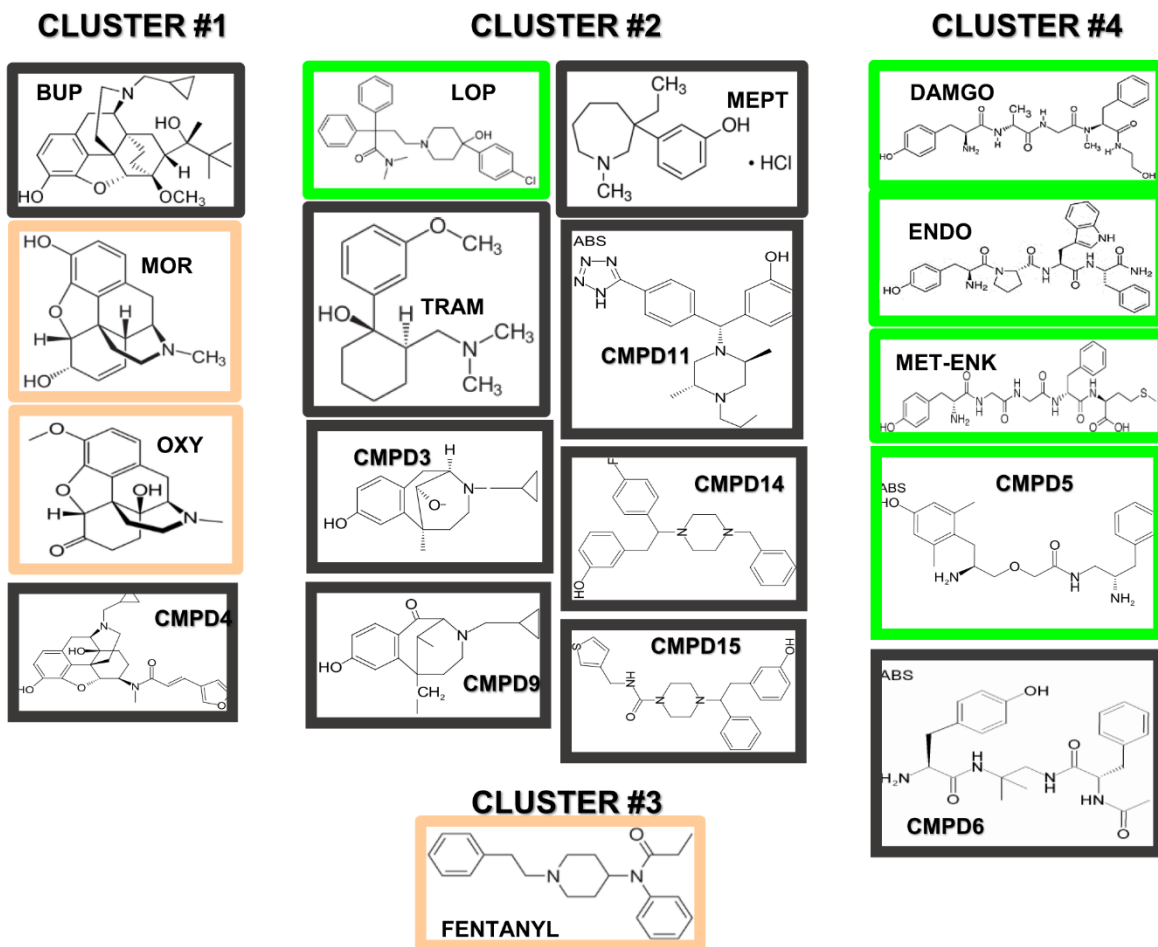
Supplementary Figure 10. Correlating specific signals to reported opioid side effects.

Partial matrices in which drugs were classified according to G protein or β arr responses were generated using either $\text{Log}(\tau)$ - Emax (**a**) or $\text{Log}(\tau)$ - Emax - $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ (**b**) as classification criteria. Distances separating ligands in partial and complete matrices were consigned, and correlated to frequency of faecaloma report as indicated in the figure. Inhibitory effect of standard opioid ligands on contractility of guinea pig ileum were assessed (**c**) Normalized transduction coefficients ($\Delta\text{Log}(\tau/\text{KA})_{\text{LOP}}$) (**d**) and operational efficacy ($\text{Log}(\tau)$) values **I** were correlated to corresponding SD gamma scores for faecaloma report.



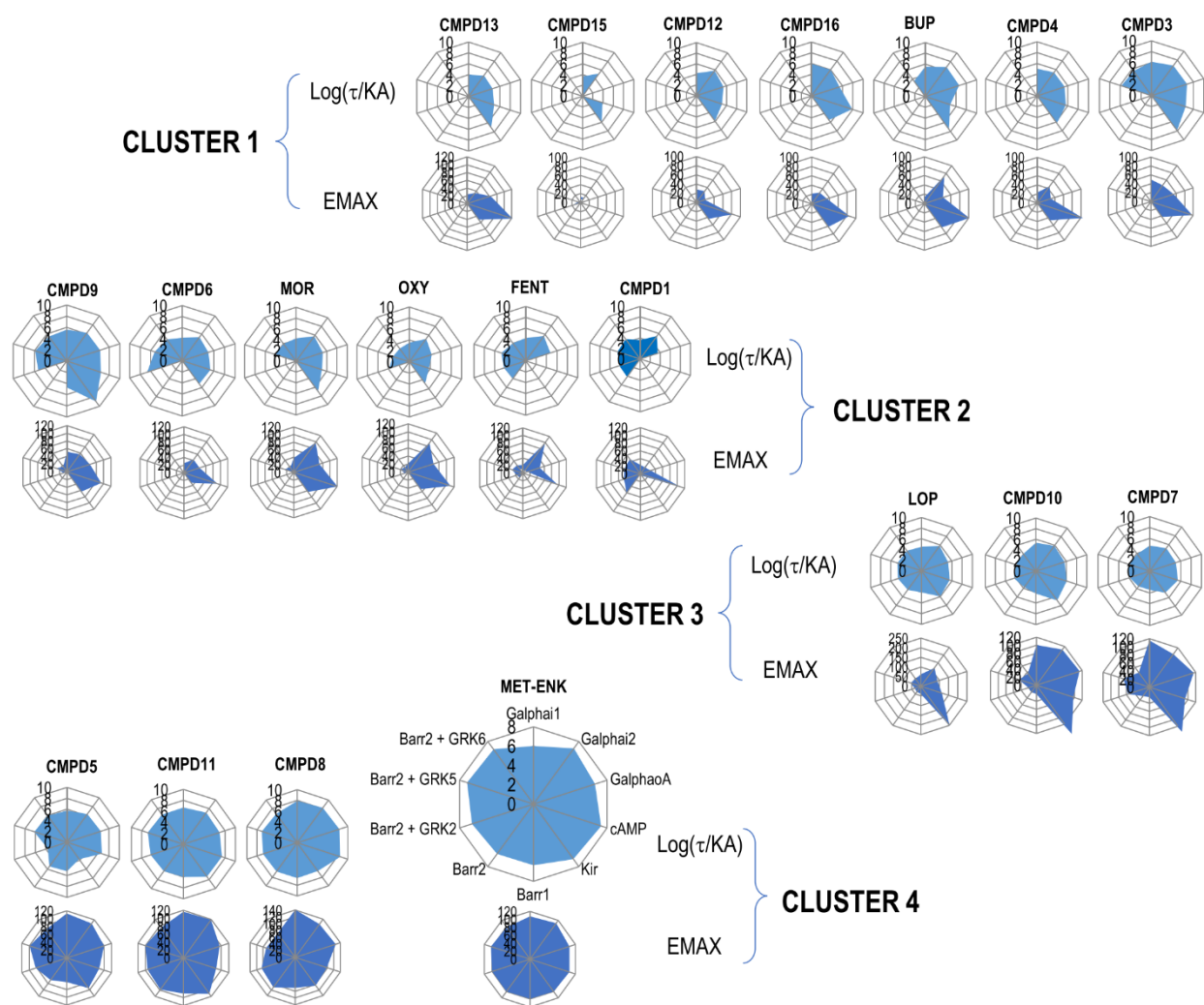
Supplementary Figure 11. Structural and signaling clusters display non-random similarity.

Shown is the similarity heat map and clusters generated by NNMF and k-means analysis of 75 Tanimoto similarity values describing opioid ligand resemblance according to three different structural footprints (ECFP-6; FCFP-6; MDL MACCS). Yellow and blue respectively indicate ligands that never or always cluster together (*a*). Graphical comparison of cluster composition in functional and structural matrices. Colours show how ligands in the three signaling clusters redistribute when classified using structural criteria (*b*).



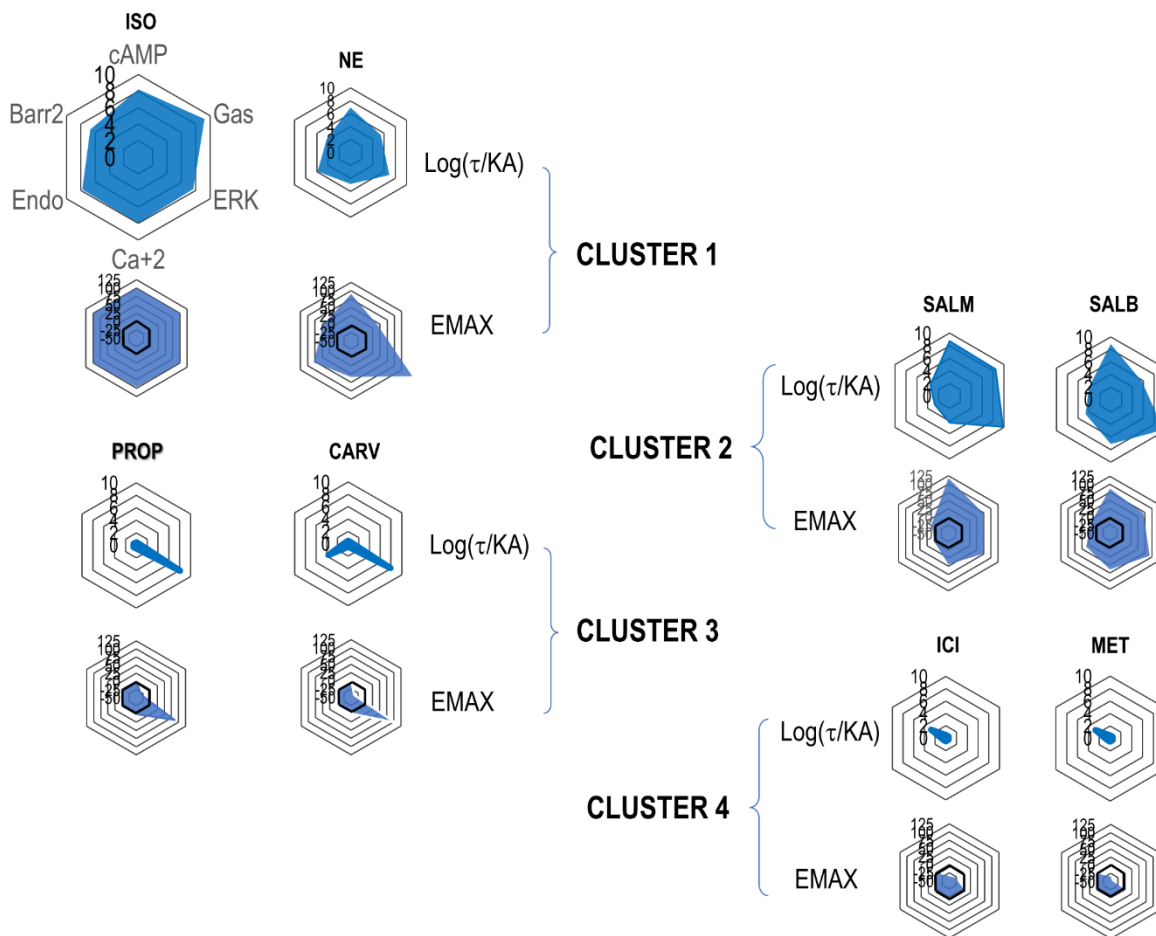
Supplementary Figure 12. Chemical structures for standard and novel opioid ligands.

Ligand structures are ordered according to the categories established by clustering Tanimoto similarity values. Either novel compounds, standard ligands or both are provided as representatives of each category. Frames for the different structures are color coded to represent their standing in functional clusters as follows: cluster #1 gray; cluster #2 peach; cluster #3 light green.



Supplementary Figure 13. Graphic representation of pharmacodynamic parameters of hDOR ligands in different clusters.

Radial graphs were used to represent operational transduction coefficients ($\text{Log}(\tau/\text{KA})$) and logistic Emax values. Each radius corresponds to the magnitude of $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ or Emax values. Transduction coefficients are in logarithmic scale, Emax values were normalized to maximal Met-ENK response, and are presented on linear scale. The key specified only for Met-ENK applies to all radial graphs and shows the order in which information for each biosensor is provided.



Supplementary Figure 14. Graphic representation of pharmacodynamic parameters of $\beta_{2\text{ADR}}$ ligands included in different clusters.

Radial graphs were used to represent operational transduction coefficients ($\text{Log}(\tau/\text{KA})$) and logistic Emax values. Each radius corresponds to the magnitude of $\text{Log}(\tau/\text{KA})$ or Emax values. Transduction coefficients are in logarithmic scale, Emax values were normalized to maximal ISO response, and are presented on linear scale. The key specified only for ISO applies to all radial graphs and shows the order in which information for each biosensor is provided.

Supplementary Table 1: Operational and logistic parameters driving ligand segregation into clusters for hMOR responses.

Pathway	Cluster A	Cluster B	Cluster C
GaoA		Log(τ) E _{max}	
Gai1		Log(τ) E _{max}	
Gai2		Log(τ) E _{max}	
cAMP			E _{max}
Kir		E _{max}	Log(τ)
β arr 1	Log τ E _{max} Log(τ /KA)		
β arr 2	Log τ E _{max} Log(τ /KA)		
β arr 2-GRK2	E _{max}	Log(τ)	
β arr 2-GRK5	Log(τ) E _{max}		
β arr 2-GRK6	Log(τ) E _{max}		Log(τ /KA)

4.15 Description of Additional Supplementary Files

Supplementary Data 1. Operational and logistic parameters obtained monitoring hMOR responses with BRET-based biosensors

Footnote:

NR: no response

NF: no fitting

MV : missing value : Fits were ambiguous

FA : Full agonist

◦ Min asymptote fixed to 0

Δ When there was no inflection point within the range of experimental values the Max asymptote in the logistic model was fixed to highest experimental value observed*

* Details of curve fitting in materials and methods

Supplementary Data 2. R2 and p values describing the correlation between frequency of report of undesired events for prescription opioids (standardized gamma scores) and Euclidian distances separating these ligands in the hMOR functional matrix.

Footnote :

Significant correlations, and correlations that explain more than 60% of the variance are highlighted.

$R^2 \geq 0.60$ and $p < 0.05$

$R^2 \geq 0.60$

SD gamma scores for loperamide were only included in correlations for gastrointestinal reports.

* Correlation driven by TRAM, which is also active at NE AND 5-HT transporters. When TRAM was removed correlation was not maintained.

Supplementary Data 3. Ligand * ligand matrix corresponding to Tanimoto similarity values for opioid ligands derived using Extended-Connectivity Fingerprints (ECFP-6).

Footnote:

Each value in the matrix is $S_{i,j}$ { $S_{i,j}$ similarity value between compound I and compound j 1= identity 0= no similarity.

Supplementary Data 4. Ligand * ligand matrix corresponding to Tanimoto similarity values for opioid ligands derived using Functional-Class Fingerprints (FCFP-6).

Footnote:

Similar considerations as for Supplementary Data 3.

Supplementary Data 5. Ligand * ligand matrix corresponding to Tanimoto similarity values for opioid ligands derived using MDL MACCS keys (MDL keys).

Footnote:

Similar considerations as for Supplementary Data 3.

Supplementary Data 6. R² and p values describing the correlation between frequency of report of undesired events for prescription opioids (standardized gamma scores) and Euclidian distances separating these ligands in the structural similarity matrix.

Footnote:

Significant correlations, and correlations that explain more than 60% of the variance are highlighted.

$$R^2 \geq 0.60 \text{ and } p < 0.05$$

$$R^2 \geq 0.60$$

Supplementary Data 7. Operational and logistic parameters obtained monitoring rMOR responses with BRET-based biosensors.

Footnote:

Considerations for curve fitting as in Supplementary Data 1.

Supplementary Data 8. Operational and logistic parameters obtained monitoring hDOR responses with BRET-based biosensors.

Footnote:

Considerations for curve fitting as in Supplementary Data 1.

Supplementary Data 9. Operational and logistic parameters obtained monitoring rDOR responses with BRET-based biosensors

Footnote:

Considerations for curve fitting as in Supplementary Data 1.

Supplementary Data 10. Operational and logistic parameters obtained monitoring BRET and cellular responses elicited by β 2ADRs.

Footnote:

Considerations for curve fitting as in Supplementary Data 1.

*Analysis based on *Mol Pharmacol* **85**, 492-509 (2014).

Supplementary Data 11. R² and p values describing the correlation between frequency of report of undesired cardiovascular and respiratory events for prescription β 2ADR ligands (standardized gamma scores) and Euclidian distances separating these ligands in the functional matrix.

Footnote:

Significant correlations are highlighted.

$$R^2 \geq 0.60 \text{ and } p < 0.05$$

$$p < 0.05$$

Supplementary Data 12. Fitted parameter values for the logistic equation and the operational model. (Compound number are X.Y.Z. X is the profile number. Y is a variation number that can be neglected. And Z is added to compose a unique number.)

4.16 Supplementary Data

- Supplementary Data 1 : <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 2: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 3: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 4: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 5: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 6: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 7: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 8: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 9: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 10: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 11: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>
- Supplementary Data 12: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>

4.17 Source data

Source Data: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>

4.18 Reporting Summary

Reporting summary: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>

5 Chapitre 5 : Caractérisation du potentiel analgésique des phytocannabinoïdes dans un modèle de neuropathie diabétique (Article III)

Bien que les agonistes du MOR soient la première ligne de traitement pour les douleurs aiguës sévères, l'efficacité et l'innocuité de leur utilisation pour le soulagement des douleurs chroniques non cancéreuses, telles que les douleurs neuropathiques, sont des sujets controversés (112). D'un autre côté, des observations précliniques et cliniques semblent suggérer un potentiel aux médicaments à base de cannabis pour soulager ce type de douleurs (66-68, 382, 439, 440, 523).

Le THC est un phytocannabinoïde qui a des effets analgésiques démontrés dans plusieurs études précliniques (385, 386, 439, 440, 524-528). Il est néanmoins le principal responsable des effets psychoactifs du cannabis (159, 161, 386, 472). À l'inverse, le phytocannabinoïde CBD ne produit pas ces effets psychoactifs et est associé à des effets analgésiques, anti-inflammatoires et anxiolytiques (379, 384, 411). De plus, CBD pourrait contrecarrer les effets psychoactifs du THC (378-380, 412). C'est pourquoi, les recommandations et les lois actuelles régulant la prescription et la commercialisation du cannabis médical sont basées sur la présomption que le contenu en THC et les ratios THC:CBD de ces produits naturels permettraient de prédire leur activité biologique (445, 446). Or, les extraits commerciaux peuvent contenir jusqu'à 23 phytocannabinoïdes et de nombreux autres composés chimiques. Décrire les médicaments à base de cannabis uniquement selon leurs contenus en THC et en CBD ne permet donc pas de prendre en compte les interactions potentielles qui peuvent arriver entre ces autres composants de la plante, et qui peuvent aboutir à des effets cliniques différents (378). Nous nous sommes donc intéressés dans l'article qui suit à évaluer s'il y avait réellement une équivalence entre l'activité biologique d'un extrait de cannabis et sa composition en THC et en CBD. Nous avons alors comparé l'efficacité analgésique du THC, du CBD, de leur combinaison THC:CBD et d'un extrait de cannabis dans un modèle préclinique de douleur neuropathique. Nous avons trouvé que les contenus relatifs en THC et en CBD n'étaient pas de bons descripteurs de l'activité analgésique d'un extrait de cannabis et que les différents cannabinoïdes testés engageaient différemment les cibles moléculaires. Nous sommes à notre connaissance les premiers à avoir ainsi caractériser de façon exhaustive le profil analgésique des différents traitements phytocannabinoïdes testés dans un modèle de douleur neuropathique.

Contributions des auteurs

Besma Benredjem : Conception du projet ; exécution de l'ensemble des expériences ; analyse des données ; création des figures, tableaux, figures supplémentaires, tableaux supplémentaires et écriture du manuscrit.

Graciela Pineyro : Conception et supervision du projet, révision du manuscrit.

Manuscrit prêt à être soumis pour publication.

Assessing the value of THC and CBD content as descriptors of the analgesic potential of cannabis extracts and mixes

Authors: Besma Benredjem ^{1,2}, Graciela Pineyro ^{1,2}

Author affiliations :

1. Département de pharmacologie, Université de Montréal, Quebec, Canada.
2. CHU Sainte-Justine research center, Quebec, Canada.

Acknowledgements

This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant No. MOP 324876, MOP 79432 and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (311997). B.B. was supported by a studentship from Fonds de Recherche en Santé du Québec. The authors thank Dr. Réjean Couture (Université de Montréal) for granting access to animal testing facilities.

Author Contributions

B.B and G.P designed the experiments. B.B performed the experiments, analyzed the data, made the figures and wrote the manuscript with critical input provided from G.P. G.P supervised the project and edited the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the BJP guidelines for Design & Analysis, and Animal Experimentation, and as recommended by funding agencies, publisher and other organisations engaged with supporting research.

5.1 Abstract

Background and purpose: Cannabis extracts are increasingly being used to mitigate chronic pain. This and other medicinal applications of cannabinoids currently rely on information such as extract content in Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) to guide prescription. Here we wanted to determine the extent to which THC content and THC:CBD ratios can be considered reliable descriptors of cannabinoid extracts' and mixes' potential to produce a desired outcome such as analgesia.

Experimental approach: To address the question we used a rat model of diabetic neuropathy and compared anti-allodynic responses elicited by intrathecal injection of pure THC, a 1:1 mix of THC:CBD and a balanced chemotype II cannabis extract. Selective antagonists for the CB1 receptor (AM251), for the CB2 receptor (AM630) and the TRPV1 channel (capsazepine) were used to identify main endocannabinoid targets mediating analgesic actions of the different treatments.

Key results: Analgesic responses induced by an equivalent amount of THC administered in its pure form, as a THC:CBD mixture or as balanced cannabis extract were distinct, as was the engagement of CB1, CB2 receptors and TRPV1 channels by each treatment. Moreover, there was considerable mismatch in the analgesic profile and the endocannabinoid targets mediating analgesic actions of the 1:1 THC:CBD mixture and the balanced extract.

Conclusion and implications: The analgesic profile and the pharmacodynamic targets engaged by a cannabis extract or a THC:CBD mix cannot be simply inferred from THC and CBD contents. Evaluation of their biological activity at major endocannabinoid targets should prove more informative for guiding prescription.

Keywords: Cannabinoids, Pain, Analgesia, CB1R, CB2R, TRPV1

5.2 Abbreviations

CB1R : Cannabinoid 1 receptor subtype

CB2R : Cannabinoid 2 receptor subtype

TRPV1 : Transient receptor potential vanilloid 1

TRP : Transient Receptor Potential

THC : Δ^9 -tetrahydrocannabinol

CBD: Cannabidiol

CBN: Cannabinol

CBC: Cannabichromene

CBG: Cannabigerol

CPZ: Capsazepine

STZ: Streptozotocin

AUC: Area under the curve

Δ AUC: Delta area under the curve

nmoles : nanomoles

5.3 Introduction

Cannabis extracts have been used for centuries to treat diverse medical conditions (1). They contain a complex mixture of more than 400 chemical compounds with ~120 phytocannabinoids and over 100 aromatic terpenes and flavonoids (2), that are thought to interact synergistically in producing the pharmacological effects of these products (3). Amongst the major phytocannabinoids, Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) are the most exhaustively studied and have been shown to have therapeutic effects (4, 5). THC is also the major psychotropic component in cannabis responsible for the “high” effects of marijuana whereas CBD does not have these effects and has even been shown to mitigate some of THC’s psychoactive actions (6, 7). Because of these distinct psychoactive profiles, cannabis strains have been divided in three main chemotype groups on the basis of their relative content of THC and CBD: Type I (high THC, low CBD), Type II (high contents of THC and CBD) and Type III (low THC, high CBD) (8). Laws and guidelines that constitute the foundations for prescription, regulation, and commercialization of medical cannabis worldwide, are currently based on chemotype classification (9, 10). The tacit assumption underlying this practice is that the quantity of THC and the THC:CBD ratios in a Cannabis extract are reliable descriptors of the potential of plant products to induce desired and undesired effects. Given the extensive use of this practice, we were interested in finding out the extent to which THC content and THC:CBD ratios could be used to infer the analgesic effects of an extract or a THC:CBD mix with balanced ratios.

Indeed, the most frequently reported use of medical cannabis is for chronic pain relief (11). More specifically, synthetic and natural phytocannabinoids have both been associated with neuropathic pain relief in patients (12, 13). These observations place phytocannabinoids as therapeutic alternatives to current pain relief interventions, which have proven ineffective in almost 50% of patients (14).

Emerging data suggest that cannabinoids can activate multiple endogenous targets to elicit their analgesic actions including G-protein coupled receptors and transient receptor potential channels (15, 16). In particular, the cannabinoid 1 and 2 receptors (CB1R and CB2R) and the TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) channel are not only the main targets for endocannabinoids (15, 17) but are also among the most studied signaling targets for pain relief (16, 18). Moreover, preclinical studies have shown that these three targets are upregulated in

neuropathic pain conditions (5, 19, 20). Amongst such conditions, diabetic neuropathy is one of the most common presentations of neuropathic pain in the population and is associated with the development of hyperalgesia, hypoalgesia and allodynia (21, 22). Streptozotocin-induced diabetic animal models not only display these algetic manifestations, but have also been associated with an upregulation of CB1R, CB2R and TRPV1 expression in the DRG and dorsal horn (23, 24). Modulation of these targets by the administration of cannabinoids can restore mechanical thresholds in diabetic rats (23-25). We therefore used an animal model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy to assess and compare analgesia induced by pure Δ^9 -THC and CBD, a mixture of both pure compounds in a 1:1 ratio and a balanced Type II extract. We further sought to identify the main targets mediating the responses of these products. We found that THC content and the THC:CBD ratios are not accurate descriptors of the analgesic responses of the cannabis extract. We also established that the different treatments distinctively engaged CB1R, CB2R and TRPV1 targets to produce their analgesic effects.

5.4 Methods

5.4.1 Materials

WIN 55,212-2, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), the cannabinoid 2 receptor antagonist AM630 (6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl](4-methoxyphenyl)methanone), the cannabinoid 1 receptor antagonist AM251 (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide) and the TRPV1 antagonist capsazepine were purchased from Cayman Chemicals (Burlington, Canada). Stock solutions of the drugs were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) for WIN 55,212-2 (25mM); in ethanol 100% for CBD (100mM), THC (100mM), AM251 (18mM) and capsazepine (26mM); and in dimethylformamide (DMF) for AM630 (20mM). The cannabis extract that was used in the study was a kind gift of Canopy Growth (Smiths Falls, Ontario, Canada) and was provided in a stock solution of 100% ethanol containing THC at a 230 mM concentration. The cannabinoid content of the extract was quantified by HPLC (High-performance liquid chromatography). The percent w/w content of THC and CBD was of 38% and 55% respectively (1:1.45 ratio), corresponding to a chemotaxonomy type II profile where THC and CBD are considered balanced

(8). The extract also contained small amounts of cannabiol (CBN), cannabichromene (CBC) and cannabigerol (CBG) with w/w contents of 1.50, 3.27 and 1.24% respectively. The extract used did not contain volatile terpenes or flavonoids. Streptozotocin (STZ) was purchased from Cayman Chemical (Burlington, Canada) and dissolved in citrate buffer (10mM, pH 4.5).

Preparation of treatment solutions

WIN 55,212-2, THC, CBD, AM630, AM251 and capsazepine were diluted in corresponding vehicles and injected via intrathecal (i.t.) route. Supplementary Table1 shows vehicles and injection volumes used for agonist treatments and Supplementary Table2 shows vehicles and injection volumes used for injection of antagonists. When the cannabis extract was injected, it was administered to deliver equivalent amounts of THC as when this cannabinoid was administered in its pure form. For the THC:CBD combination, CBD and THC were dissolved together into a single solution at a 1:1 ratio and administered by a single injection. The THC in the 1:1 mixture was dissolved in equivalent amounts as when this cannabinoid was administered in its pure form. Control animals were injected with matching vehicle for corresponding treatment and dose as indicated in Supplementary Table1.

5.4.2 Animals

Adult male Sprague Dawley (SD) rats, weighing 235-250 g, were purchased from Charles River laboratories and housed in a controlled environment on a 12-hour light/dark cycle with free access to food and water. All experimental methods and animal care procedures were approved by the Animal Care Committee of University of Montreal (CDEA protocol 19-108 and 20-092), in accordance with the guiding principles as enunciated by the Canadian Council on Animal Care. Following experimentation, all rats were euthanized by CO₂ asphyxiation and decapitation. Sexual dimorphism in the analgesic response to cannabinoids is a well-known fact (26). The focus on male animals was determined as an effort to control budget and number of animals used.

5.4.3 Intrathecal (i.t.) injections

Injections were carried out as previously described (27). Briefly, rats were put under light anesthesia using 4% isoflurane inhalation in a 1:1 mixture of oxygen and air until a loss of the righting reflex was observed (about 3 minutes). The rat was then shaved on the lower back to help visualize the lumbar region and placed in a nose cone for continued isoflurane administration during the procedure. A 27G \times $\frac{1}{2}$ needle attached to a 50 μ L Hamilton syringe was inserted at mid-lumbar level into the subarachnoid space. A quick movement of the tail indicated that the needle entered the subarachnoid space and the solution was slowly injected (30 μ L for agonists and 20 μ L for antagonists). The animals were allowed to recover for 15 minutes before mechanical thresholds were determined. Threshold measures were obtained every 15 minutes until the analgesic response disappeared or until 150 minutes after injection elapsed.

5.4.4 Mechanical allodynia

Induction of diabetic neuropathic pain

Type I diabetes was induced by systemic injection of streptozotocin (STZ, 60 mg·kg⁻¹, i.p.) according to a standardized methodology, which allows development of persistent diabetic neuropathy after the first week of treatment (27, 28). One week after STZ injection, diabetes was confirmed by determining blood glucose levels in blood samples taken from tail veins, using a glucometer (Accu-Chek Aviva; Roche Diagnostics). Rats with blood glucose levels between 20 and 28 mmol/L were considered diabetic and included into the study (29, 30). Supplementary Figure 1 shows increases in glycemia after injection of STZ and a marked reduction in the rate of body weight compared to vehicle citrate buffer (10mM) treatment, consistent with STZ-induced diabetes (31). STZ-induced diabetes also displays clear sensory abnormalities mimicking human neuropathy such as mechanical allodynia (30). Moreover, the model that has been successfully applied for characterizing pharmacodynamic determinants of spinal analgesia by opioid receptor ligands (25, 27) and was shown to respond to cannabinoids (24, 25, 32).

Assessment of mechanical allodynia

In the second week following the injection of STZ, mechanical allodynia was evaluated using Von Frey filaments as previously described (27, 33). Briefly, rats were accustomed for 15 min on a metal mesh floor under an inverted plastic box (20 × 10 × 10 cm) in a quiet room. After habituation, the plantar surface of the right and left hind legs was alternately touched (6-8 seconds) by applying calibrated filaments from underneath the cage through openings in the mesh floor to the hind paw. A series of von Frey filaments of progressively wider diameter (4, 6, 8, 10, 15 and 26g) were used to find the threshold of pressure required to produce withdrawal. Brisk withdrawal or paw flinching was considered a positive response. In the absence of a response at a pressure of 26 g, animals were assigned to this cutoff value. The mechanical threshold response was obtained by consigning the pressure in grams that would result in withdrawal of the paw in 50% of 10 trials. A normal rat responds to tactile pressures of 12-15 g whereas neuropathic rats respond to pressures Of 4-6 g (34).

5.4.5 Pharmacological treatments

Rats were randomized to their treatment groups at the beginning of each week, and treatments were codified so that the experimenter was blinded to treatment conditions during behavioural testing. Each group of rats received only one ligand and a single dose per day. Animals that received more than one treatment were allowed to recover for 7 days before an injection was repeated. Sample sizes were n = 5-8 rats per group. Size was chosen from similar studies in the literature (27, 35, 36). An exception to the latter were antagonism experiments in which a second dose of antagonist was tested with the same agonist to corroborate observations. In such cases sample size was n=3-4 and no statistics were carried out on these observations.

In a first series of experiments, we examined dose-dependence of analgesia induced by WIN 55,212-2, THC, CBD, THC:CBD (1:1) mixture and the cannabis extract. This was done by monitoring anti-allodynic responses prior to treatment and responses elicited by intrathecal (i.t.) injection of increasing doses for each treatment, adjusting vehicle as required. Data presented in Table1 highlights the fact that all treatments were injected in concentration ranges where the vehicle was without effect of its own.

In a second series of experiments either a CB1R antagonist (AM 251, 10-20 nmoles), CB2R antagonist (AM 630, 10-20 nmoles) or a TRPV1 channel blocker (capsazepine, 12.5-50 nmoles) were administered i.t. 30 min prior to the delivery of the agonists. Von Frey tests were taken prior to agonist injection and then every 15 min after the administration of active cannabinoids for the next 150 min. Doses of the CB1R, CB2R and TRPV1 antagonists that were used in the study were based on the literature (37-39), and chosen in a pilot study where we ensured that they did not modify basal withdrawal thresholds in neuropathic animals. Supplementary Figure 2 shows that, at the doses used, the different antagonists did not modify withdrawal thresholds.

5.4.6 Data analysis

Following acquisition of the time course of withdrawal thresholds the response was integrated from the time of the first measure until analgesic effect disappeared or after 150 min elapsed. Analgesia by different treatments and different doses had distinct time courses and the integration of the response over time allowed for comparison across treatments. Time courses are also shown and noteworthy differences are highlighted in the results section. The values of the analgesic response over time were consigned as area under the curve (AUC). Moreover, in order to fully isolate the analgesic effect of each treatment from any possible influence of vehicle, the AUC of the corresponding vehicle group was subtracted from the AUC value of each treatment to obtain delta AUC (Δ AUC) values. The standard error of mean for Δ AUC values at each dose were computed as the square root of the sum of the squares of the two SEMs:

$$\text{SEM } \Delta \text{ AUC} = \sqrt{(\text{SEM treatment})^2 + (\text{SEM vehicle})^2}$$

Data analysis was performed using GraphPad 7 (GraphPad Software). Significance for all statistical tests was set at $P < 0.05$. Statistics are specified in text or corresponding Figures.

5.5 Results

5.5.1 STZ-induced mechanical allodynia

The current framework guiding prescription, regulation, and commercialization of medical cannabis products is based on quantification of THC contents and ratios of THC:CBD present in these products (9, 10). Here we wanted to determine whether the adoption of such practice in the context of therapeutic applications is supported by pharmacodynamic evidence. To start addressing the question we compared anti-allodynic responses and targets mediating analgesic actions of pure THC, pure CBD, a 1:1 mix of these compounds and a balanced chemotype II extract. To do so we used a diabetic neuropathy pain model that has previously allowed us to identify pharmacodynamic mediators of opioid analgesic response and tolerance (27). In this model, neuropathic pain is induced by a single injection of streptozotocin (STZ). Hence, in a first series of experiments, we verified whether administration of STZ modified the basal paw withdrawal threshold.

As shown in Table 1A and consistent with previous studies by our laboratory and others (27, 40), a single injection of STZ induced mechanical hindpaw hypersensitivity. Indeed, one-way ANOVA followed by Sidaks's post-hoc test showed that STZ injection significantly reduced the paw withdrawal threshold compared to naïve animals ($p < 0.05$). In contrast, citrate buffer, the vehicle in which STZ was dissolved, was without effect ($p > 0.05$). These observations indicate that STZ administration induced mechanical allodynia, a frequent manifestation of neuropathic pain (41).

5.5.2 Effect of WIN 55, 212-2, THC and CBD on STZ-induced mechanical sensitivity

In a second series of experiments, we sought to assess how pure THC and pure CBD modified allodynic responses that had developed in STZ-treated rats. Their effects were compared to those of the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 (42). Because our focus is on the pharmacodynamic aspects of the response, we wanted to avoid pharmacokinetic confounders associated with systemic administration. Thus, treatments were administered via an intrathecal route and we focused on spinal analgesia.

For each of the treatments of interest, corresponding vehicles were first tested to determine if any of them significantly modified STZ-induced hypersensitivity. One-way ANOVA comparison between non-injected STZ rats and STZ rats injected with vehicle indicated that none of the vehicles used had a significant effect on basal withdrawal thresholds (Table 1B). Actually, the time course of withdrawal thresholds obtained in STZ rats that were injected with vehicles for WIN 55,212-2 (5% DMSO), THC (24 and 31.7% ethanol) and CBD (24 and 31.7% ethanol) all revealed as a flat line indicating no effect of vehicle over the time course of the experiment (Supplementary Figure 3A).

We next assessed the analgesic effects of the different agonists. Panels A, C and E in Figure 1 show the integrated analgesic response elicited by WIN 55,212-2, THC and CBD corrected for vehicle effect (i.e.: Δ AUC values that were calculated as described in methods). Delta AUC values were plotted as a function of the dose administered and significance of the effect of each dose as compared to withdrawal thresholds obtained in the absence of treatment was established by one-way ANOVA. This test indicated a significant effect for the three treatment groups ($p \leq 0.0001$) and subsequent comparisons using Dunnett's test revealed that each dose of WIN 55, 212-2 induced significant analgesia until reaching a plateau at ~ 20 nmoles (Figure 1A). Significant analgesic responses for THC started at higher doses than WIN 55, 212-2, producing a biphasic dose-related attenuation of STZ-induced mechanical sensitivity (Figure 1C). Finally, CBD's analgesic response was only evident at higher doses than both WIN 55, 212-2 and THC (Figure 1E).

Figure 1, panels B, D and F show the time courses of mitigation of mechanical allodynia by WIN 55, 212-2, THC and CBD in the STZ-rats. As described above, all three ligands produced a dose-dependent increase in the pressure that was necessary to evoke mechanical allodynia but there were differences in the duration and the time to attain maximal response. To better investigate time course of response, we examined the time to get to the peak response for each dose of WIN 55, 212-2 or THC that produced a significant analgesic response (Supplementary Figure 4). For WIN 55, 212-2, the graph shows that the time to peak response was dose dependent reaching its maximum ~ 30 min after injection (Supplementary Figure 4A). In the case of THC, the response was biphasic with lower concentrations (250 nmoles) eliciting an early peak at 45 min and higher concentrations (≥ 750 nmoles) attaining their maximum 60 min after injection (Supplementary Figure 4B). Finally, only the higher doses of CBD had significant analgesic actions but a time to peak could not be clearly defined (Figure 1F).

5.5.3 Effects of THC:CBD (1:1) mixture and balanced type II cannabis extract on STZ-induced mechanical sensitivity

In a third series of experiments, we sought to assess how THC:CBD mixed in a 1:1 ratio and a cannabis extract characterized by a “balanced” THC:CBD ratio modified allodynic responses in STZ-treated rats.

Again, corresponding vehicles were first tested to determine if any of them significantly modified STZ-induced hypersensitivity. One-way ANOVA showed that none of the vehicles used had a significant effect on withdrawal thresholds of STZ-rats (Table 1B). Furthermore, the time course of withdrawal thresholds obtained in STZ rats that were injected with vehicles for the mixture and the cannabis extract all revealed as a flat line, indicating no effect of vehicle over the time course of the experiment (see Supplementary Figure 3A).

Then, using the same procedure as above, we used time course of anti-allodynic responses to calculate Δ AUC values and plotted them as a function of the dose tested (Figure 2A and C). To facilitate the interpretation and comparison of data, withdrawal thresholds for the THC:CBD mixture and for the extract were plotted as a function of the quantity of THC (nmoles) administered with each of these treatments.

One-way ANOVA analysis of the dose response curve for THC:CBD indicated a significant effect of treatment ($p \leq 0.0001$), and Dunnett’s multiple comparisons test showed that antiallodynic actions became significant at 480 and 725 nmoles of THC equivalent doses (Figure 2A). For the cannabis extract, one-way ANOVA ($p \leq 0.0001$) followed by Dunnett’s test indicated that significant analgesia started at doses as low as 95 nmoles and remained so across all higher concentrations tested (Figure 2C). This overall response was more reminiscent of that of THC than the response of the THC:CBD mixture.

Figure 2, panels B and D show the time course of mitigation of mechanical allodynia by the THC:CBD mixture and by the cannabis extract in the STZ-rats. Despite their very distinct pattern of response at low concentrations, at the highest doses tested, the mixture and the cannabis extract both produced a peak analgesic response that were achieved 45-60 minutes after treatment administration.

5.5.4 Comparative assessment of analgesic responses elicited by THC, CBD, their 1:1 mixture and a “balanced” cannabis extract

Medicinal applications of cannabis products currently rely on quantification of THC contents and THC:CBD ratios to guide prescription (9, 10). We were therefore interested to find out the extent to which THC content is a good descriptor of analgesic response under the different forms it was administered, namely: pure THC, THC in a 1:1 mix with CBD and THC in the form of a balanced chemotype II extract. We additionally examined similarities and differences in the analgesic response elicited by the mixture of pure THC:CBD and the chemotype II extract. To do so we compared analgesia elicited by the different treatments at the doses where differences amongst them were the most evident.

Panels A-C of Figure 3 show Δ AUC values calculated for THC, CBD and their mix at doses of 250, 480 and 725 nmoles. Treatment effects were analyzed by two-way ANOVA, which revealed an effect of treatment ($p \leq 0.0001$), an effect of dose ($p \leq 0.0001$) and an interaction ($p \leq 0.0001$). Tukey's post-hoc test was then used to compare treatment effects at each of the doses selected. At the lowest dose considered (250 nmoles), the analgesic response elicited by THC was significantly higher than that of an equivalent amount of THC administered in the form of the mix and of a similar dose of CBD (Figure 3A), neither of which produced a measurable response at this concentration (Figures 1C and 2A). Interestingly, the response elicited by 250 nmoles THC was comparable to that induced by the synthetic CB1R/CB2R agonist WIN 55,212-2 when it reached its maximal response at 20 nmoles (Compare panels A and C in Figure 1).

At a concentration of 480 nmoles THC and THC:CBD both produced significant analgesia (Figure 1C and Figure 2A). Their responses were not different from each other but were significantly higher than the response of CBD (Figure 3B), which was with no effect at this particular dose (Figure 1E). At the highest concentration considered (725 nmoles), all treatments produced significant responses (Figure 1C, 1E and 2A), although the mixture was more effective than THC or CBD by themselves, which in turn did not differ from one another (Figure 3C). It is of interest to note that at this highest concentration, the effects of THC and CBD seemed additive as indicated by the fact that the summation of their Δ AUCs is similar to Δ AUCs values obtained for the mixture: Δ AUC mixture = 506.73 ± 29.11 and Δ AUC THC + Δ AUC CBD = 562.63 ± 35.17 (Δ AUC THC = 314.30 ± 29.17 ; Δ AUC CBD = 248.33 ± 21.65).

Finally, we were interested in finding out if there was an equivalence in analgesic responses elicited by the 1:1 THC:CBD mixture and the balanced chemotype II cannabis extract. We used the afore-mentioned doses to compare the analgesic efficacy of the extract to that of the mixture and of an equivalent amount of pure THC (Figure 3D-F). Statistical significance of agonist-induced changes in mechanical allodynia was part of the two-way ANOVA described above. Tukey's post-hoc comparisons showed noticeable differences between treatments at specific doses. At 250 nmoles, the measured analgesic response of the extract was significantly higher than that of the mixture but lower than that of pure THC (Figure 3D). At higher concentrations all three treatments produced effective analgesia (Figure 1C, 2A and 2C) although some differences were evident depending on the dose. At 480 nmoles, analgesia by all three treatments was similar (Figure 3E) while at 725 nmoles, the extract was more efficacious than either the mixture or pure THC (Figure 3F).

5.5.5 Contributions of the CB1 and CB2 receptors and TRPV1 channels to analgesia induced by different cannabinoids

CB1R, CB2R and TRPV1 channels are primary targets for endocannabinoids and multiple studies show their upregulation in spinal cord and DRGs in neuropathic pain models (5, 19, 20), including diabetic neuropathy (23, 24). There is also considerable evidence linking these targets to analgesic effects of different types of cannabinoids (24, 43, 44). Hence, in this final set of experiments, we sought to assess if and how the different treatments engaged the CB1 or CB2 receptors as well as TRPV1 channels. To this end, CB1R antagonist AM251, CB2R antagonist AM630, TRPV1 antagonist capsazepine (37-39) or corresponding vehicles were intrathecally injected 30 minutes before active treatments and mechanical allodynia was measured as described before.

Since antagonists were injected to determine if they prevented the effect of different agonists, for each pair of antagonist/agonist of interest we tested whether the successive injection of their vehicles (Vehicle antagonist + Vehicle agonist) significantly modified STZ-induced hypersensitivity. One-way ANOVA comparisons between non-injected STZ-rats and rats injected with different vehicle combinations indicated that none of them had a significant effect on basal

withdrawal thresholds (Supplementary Table 3). Moreover, the time course of withdrawal thresholds obtained in STZ rats that were injected with these combinations all revealed as a flat line, indicating no effect of vehicle treatments over the time course of the experiment (Supplementary Figure 3B). Finally, it is also worth noting that at the doses used none of the three antagonists by themselves had a significant effect on basal paw withdrawal threshold of STZ-rats (Supplementary Figure 2).

Targets mediating anti-allodynic effects of WIN 55,212-2

Since WIN 55,212-2 has been described as a CB1R/CB2R mixed agonist (42), we started by testing the implication of these targets in the anti-allodynic response of this synthetic cannabinoid. The maximal analgesic effect of WIN 55,212-2 was already evident following administration of 20 nmoles (Figure 1A), so this dose was used to evaluate engagement of the different targets.

Hence, in this initial series of experiments, STZ-rats that were pre-injected with specific CB1R, CB2R or TRPV1 antagonist or vehicle were subsequently administered the chosen dose of WIN 55,212-2. The time course of anti-allodynic responses was then consigned for each group. Using the same procedure as above, time course data was used to calculate Δ AUC values for WIN 55,212-2 responses. Δ AUC values obtained in presence of antagonists were then normalized to the effect induced by WIN 55,212-2 in the absence of pre-treatment (Figure 4), to be able to compare relative effects of the different blockers on the agonist's response. Significance of the effect of each antagonist on WIN 55,212-2 responses was established by one-way ANOVA. This test indicated a significant effect of antagonist treatments ($p \leq 0.0001$) and subsequent comparisons using Dunnett's test revealed that pretreatment with either the selective CB1 receptor antagonist AM251 (10 nmoles) or the selective CB2 receptor antagonist AM630 (10 nmoles) blocked the antinociceptive effect of WIN 55,212-2 on STZ-induced mechanical allodynia by 97% or more. On the other hand, pretreatment with the TRPV1 antagonist capsazepine (CPZ) at the highest dose tested (50 nmoles) did not significantly affect WIN 55,212-2 analgesia.

Targets mediating anti-allodynic effects of THC

For THC, we tested the implication of the afore-mentioned targets at a dose of 250 nmoles which produced a peak response by this treatment (Figure 1C), and at 480 nmoles, an intermediate dose corresponding to a range where analgesic actions of this cannabinoid seemed to remain stable.

At 250 nmoles, statistical analysis with one-way ANOVA indicated a significant effect of antagonist treatments on THC analgesia ($p \leq 0.0001$) and subsequent comparisons using Dunnett's test revealed that both cannabinoid receptor antagonists AM251 (10 nmoles) and AM630 (10 nmoles) significantly blocked the antinociceptive effect of THC on STZ-induced mechanical allodynia by ~90% (Figure 5A). Pretreatment with 12.5 nmoles of the TRPV1 antagonist CPZ on the other hand did not have a significant effect, while doubling of the CPZ dose to 25 nmoles produced a partial 35% decrease in THC anti-allodynic actions.

Figure 5B shows that despite increasing the THC dose to 480 nmoles, pretreatment with 10 nmoles AM630 still blocked its analgesic response, although at this higher dose of THC inhibition by AM630 only amounted to ~60%, with no apparent greater effect achieved by increasing the dose of antagonist to 20 nmoles. Observations were somewhat different for CB1R-mediated response where 10 nmoles of AM251 did not significantly modify THC analgesia at this higher dose and only 20 nmoles of this CB1R antagonist seemed to reduce the effect of THC. Finally, 25 nmoles of the TRPV1 antagonist CPZ blocked 76% of the antiallodynic effects of this higher dose of THC. Statistical comparison using a Student's t-test revealed that antagonism of 480 nmoles of THC by 25 nmoles of CPZ was significantly more effective than antagonism produced by the same dose of CPZ on 250 nmoles of THC (Figure 5B).

Targets mediating anti-allodynic effects of CBD

For CBD, the different antagonists were tested at the most effective dose assessed, namely 725 nmoles (Figure 6). One-way ANOVA analysis indicated a significant effect of antagonist treatments ($p \leq 0.0001$), and Dunnett's multiple comparisons revealed an effect of CB2R and TRPV1 but not of CB1R blockers. In particular, while a dose of 20 nmoles of the CB1R antagonist AM251 was without effect on CBD analgesia, 20 nmoles of the CB2R antagonist AM630 enhanced the anti-allodynic effects of CBD analgesia by 77%. On the other hand, 25 nmoles of the TRPV1 antagonist CPZ blocked 60% of CBD analgesia and 50 nmoles of this antagonist abolished this response.

Targets mediating anti-allodynic effects of the THC:CBD mixture

The analgesic targets involved in analgesia induced by the 1:1 THC:CBD mixture were evaluated at its lowest effective dose, namely 480 nmoles THC equivalent (see Figure 2A). One-way ANOVA analysis indicated a significant effect of antagonist treatments ($p \leq 0.0001$) and Dunnett's multiple comparisons test showed that the CB2R antagonist AM630 (10 nmoles) significantly decreased by ~60% the analgesic response of the mixture (Figure 7). In contrast, a similar dose of the CB1R antagonist AM251 was without effect. These observations are comparable to those previously obtained with 480 nmoles THC (compare Figure 7 and Figure 5B). However, while doubling of the dose of CB1R antagonist AM251 seemed to reduce THC's analgesic actions, 20 nmoles of AM251 appeared without effect on the THC:CBD mixture. Finally, the anti-allodynic response of the THC:CBD mixture was unaffected by pretreatment with 25 nmoles of the TRPV1 antagonist CPZ but was abolished by doubling its dose to 50 nmoles (Figure 7). This behavior is in contrast with that observed for a similar dose (480 nmoles) of pure THC, where 25 nmoles of CPZ had significantly blocked analgesia by 76% (Figure 5B).

Targets mediating anti-allodynic effects of chemotype II Cannabis extract

Like THC, the cannabis extract produced effective analgesia at a lower concentration range than CBD and the THC:CBD mixture. Hence, targets mediating anti-allodynic responses of the extract were first assessed at 250 nmoles equivalent THC (Figure 8A). One-way ANOVA analysis indicated a significant effect of antagonist treatments ($p \leq 0.0001$) and Dunnett's multiple comparisons revealed a profile of antagonists' effects that was similar to that for THC at this same concentration. Indeed, pretreatment with CB1R or CB2R antagonists AM251 (10 nmoles) and AM630 (10 nmoles), significantly decreased the anti-allodynic effect of low doses of the cannabis extract by 66 and 88% respectively. Interestingly, while 10 nmoles of CB1R (91% decrease) and CB2R (88% decrease) antagonists similarly abolished analgesia by 250 nmoles pure THC (Figure 5A), only the CB2R antagonist blocked the analgesic effect of the extract (88% decrease). On the other hand, the CB1R antagonist only partially interfered (66% decrease) with the extract's analgesia (Figure 8A). Finally, pretreatment with 12.5 nmoles of the TRPV1 antagonist CPZ did not have a significant effect on the extract's response, and doubling of the CPZ dose to 25 nmoles was needed to produce a 60% decrease of its allodynic effect. This pattern of response is also reminiscent of that of 250 nmoles THC (Figure 5A).

At 480 nmoles THC equivalent, the anti-allodynic effect of the extract was significantly reduced by pretreatment with 10 nmoles of the CB2R antagonist AM630 (53% reduction), but not with 10 nmoles of AM251. However, doubling the dose of the CB1R antagonist allowed to reduce the extract's response (Figure 8B). As above, the pattern of response modification by CBR antagonists is reminiscent of that seen at with a similar dose of pure THC (Figure 5B). On the other hand, the pattern of antagonism of the extract's responses by CPZ was more reminiscent of the 1:1 THC:CBD mixture than that of pure THC. In effect, pretreatment with 25 nmoles of this TRPV1 antagonist did not have a significant effect of the extract's response, and only doubling the dose to 50 nmoles of CPZ effectively decreased its analgesic actions (compare Figure 7 and Figure 8B).

5.6 Discussion

In the present study, we sought to determine the extent to which THC content and THC:CBD ratios are reliable descriptors of the potential of cannabinoids to induce analgesia. To answer this question, we compared the analgesic effects of an equivalent amount of THC that was administered either in its pure form, as part of a 1:1 THC:CBD mixture or as part of a balanced chemotype II extract. We found that the analgesic effects produced by the same amount of THC delivered via these different formulations were not the same. We further established that despite producing their analgesic effects via endocannabinoid targets like CB1R, CB2R and TRPV1 channels, these targets were distinctively engaged by the three treatments. In particular, lower concentrations of THC and the extract were more effective at engaging CB1/CB2 receptors than the THC:CBD mixture, which in fact lacked analgesic actions within the lower dose range. On the other hand, higher concentrations of the mixture and the extract were similarly susceptible to the TRPV1 channel blocker capsazepine but differed from pure THC in this respect. Taken together these observations indicate that describing cannabis products in terms of THC content and THC:CBD ratios as currently done (9, 10) does not accurately describe their potential to produce biological responses such as analgesia.

In a first series of experiments, we compared analgesia induced by pure THC and CBD, by the THC:CBD mixture and by the cannabis extract. The synthetic cannabinoid WIN 55, 212-2, whose analgesic response via CBRs is well documented (32, 36, 45) was used as a reference.

Differences in the analgesic profiles of the different cannabinoids were remarkable in terms of the doses at which analgesia was induced and, in some cases, the time course of response was also distinct for the different treatments evaluated. Starting with the mixed CB1R/CB2R agonist WIN 55,212-2 its anti-allodynic response appeared at very low doses (2 nmoles) and reached a plateau at concentrations as low as 20 nmoles. In contrast, analgesia by pure THC appeared at much higher doses (180 nmoles) than those producing maximal effect by WIN 55,212-2. Such differences in the doses that were required to produce analgesia by the two treatments is consistent with the distinct signaling properties of THC and WIN 55,212-2 at CB1R and CB2R. Indeed, while WIN 55,212-2 was shown to behave as a potent full agonist in G-protein activation by these receptors, THC behaves as a low potency partial agonist (46, 47). Consistent with its signaling profile (46, 47), analgesia by CB1R/CB2R agonist WIN 55,212-2 was blocked by both the CB1R antagonist AM251 and the CB2R antagonist AM630, but was unaffected by capsazepine. With respect to THC, all three targets assessed were engaged in its analgesic actions, but in a differential way depending on the dose used.

At lower doses (250 nmoles), similar to WIN 55,212-2, THC analgesia was practically abolished by 10 nmoles of CB1R or CB2R antagonists, pointing to a considerable contribution by these receptors. Nonetheless, a small proportion of the low dose response (35%) was also sensitive to 25 nmoles of TRPV1 antagonist capsazepine.

At the higher dose of 480 nmoles, GPCRs remained involved in THC analgesia. In particular, almost two-thirds (60%) of the THC response was still susceptible to the lowest dose of AM630 (10 nmoles). On the other hand, the CB1R response was susceptible to 20 but not 10 nmoles of AM251, also pointing to the involvement of this receptor. Finally, the engagement of TRPV1 channels was more pronounced than for the lower dose of THC since 25 nmoles of capsazepine blocked as much as 76% of the 480 nmoles analgesic effect, while it only reduced low dose analgesia by 35%. Analgesic effects of cannabinoids at TRPV channels have been attributed to channel desensitization (48-50). In the case of CBD this desensitization takes place after channel activation (48, 51, 52); in the case of cannabichromene and tetrahydrocannabinolic acid, desensitization does not require activation of the channel (48). *In vitro* studies carried out with human and rat TRPV1 channels expressed in HEK293 indicate that THC does not produce TRPV1 activation (48, 53). Together these observations are consistent with a scenario where the portion of THC analgesia that was blocked by TRPV1-selective capsazepine doses of 25 nmoles (54-56)

could be mediated via direct desensitization of the channel. Alternatively, TRPV1 activation and desensitization mechanisms may differ between neurons and HEK cells, explaining why THC produces TRPV1-dependent analgesia *in vivo* while it fails to activate the channel *in vitro*.

Interestingly, the dose response to THC was quite atypical with a peak at 250 nmoles followed by a plateau that preceded a second increase in analgesia at a much higher dose. The time course of mitigation of mechanical allodynia by THC also pointed to its biphasic effect. Biphasic effects of cannabinoids and even triphasic effects of THC have been reported in other animal models (57-60). The specific mechanism(s) underlying these multiphasic effects need to be further examined, but one possible explanation could be the progressive involvement of different effectors such as GPCRs and TRPV channels (16).

The analgesic response of pure CBD (725 nmoles) appeared at a higher dose than that of THC and its time course showed an extended response with no clearly discernable peaks. This response was greatly reduced by 25 nmoles of capsazepine (70% reduction), which is consistent with our knowledge that CBD desensitizes TRPV1 channels (17, 49). On the other hand, although 50 nmoles of this antagonist abolished CBD analgesia, the use of this higher dose does not allow us to rule out contribution of other TRP channels (61, 62). Our results further indicate that CBD also had a pro-algetic effect that was revealed by the administration of the CB2R antagonist AM630. The presence of a CB2R-dependent pain response in rats treated with CBD suggests possible inverse efficacy of the cannabinoid at this target, a type of pharmacodynamic response that has been previously described for CBD at CB2Rs (63, 64). Finally, CB1Rs had no apparent contribution to CBD's response, an observation that is also consistent with previous reports (43, 57).

The analgesic responses of pure THC and pure CBD were different from those elicited by their 1:1 combination. Particularly, and similar to CBD, the mixture lacked the antiallodynic effect elicited by pure THC within the 180-250 nmole dose range, suggesting CBD may interfere with THC analgesia at these lower concentrations. In contrast, at the highest doses tested (725 nmoles THC equivalent), the analgesic effect of the mixture was greater than that of either pure compound. Comparison of analgesic responses integrated over time (Δ AUC) pointed to an additive effect of THC and CBD at this concentration. The latter observation differs from previous reports showing synergistic interactions when THC and CBD were combined for mitigation of pain (57, 58). Two

main factors may explain the differences between studies: the type of chronic pain model and the route of administration that were used in the different studies. Indeed, pathophysiological mechanisms and changes to endocannabinoid targets may differ between the model of diabetic neuropathy that was used in this study and chemotherapy and CCI pain models used in previous reports. As for the route of administration, herein the drugs were locally administered into the subarachnoid space whereas previous reports used systemic administration. In the latter case, interactions between THC and CBD may have happened at supraspinal level or may have involved pharmacokinetic aspects that were not at play in the present study.

Finally, at 480 nmoles THC equivalent the effect of the THC:CBD mixture was mediated via both TRPV1 channels and CB2R. In particular, at this concentration the effects of pure THC and the mixture were similarly blocked by AM630 at 10 and 20 nmoles, pointing to comparable engagement of this effector by both treatments. In contrast, and unlike pure THC or CBD, 25 nmoles of capsaizepine were ineffective in blocking the mixture's response, which required doubling of the blocker's dose to prevent analgesia by THC:CBD. This observation is consistent with an additive effect of CBD and THC at the level of the TRPV1 channel analgesia, although contribution of other TRP channels cannot be excluded at 50 nmoles of capsaizepine that were required to produce antagonism (61, 62). Similar to CBD and contrary to THC, we saw no contribution of CB1R to the analgesic effects of the mixture.

Pure cannabinoids and the THC:CBD mixture were then compared to the cannabis extract where dose dependent differences in analgesic actions and in the targets engaged were also revealed. At the lower doses assessed (95 – 250 nmoles THC equivalent), the chemotype II extract effectively elicited analgesia where the 1:1 THC:CBD mixture failed to do so. Moreover, the analgesic effect of the extract became evident at lower concentrations than pure THC as indicated by the fact that only the extract had antiallodynic effects when tested at 95 nmoles THC equivalent. On the other hand, pure THC had a peak response at 250 nmoles that was not present for the extract. Finally, at the highest dose tested (725 nmoles THC equivalent) the extract was more efficacious than pure THC as well as the THC:CBD mixture, suggesting an effect at play that is not provided through CBD, THC or their interaction. Taken together, these observations suggest that analgesic effects of low and high doses of the tested chemotype II extract are not completely described by its balanced content in THC and CBD. Incongruence between the analgesic response induced by an extract and a mixture of similar THC:CBD ratio have also been described for chemotype III extract

(65), but this was not the case for a chemotype I extract and pure THC (66). Another line of evidence in support of the notion that the extract and the THC:CBD mixture tested herein do not have equivalent biological responses is given by the distinct pattern of analgesic effectors they engaged. At lower doses (250 nmoles THC equivalent), the extract engaged the CB1R and CB2R targets similar to THC, whereas at higher doses (480 nmoles THC equivalent) it engaged the TRPV1 channels in a similar manner as the THC:CBD mixture. However, a major distinction between the extract and the mixture was that CB1R had no contribution to the mixture's response while this same target was effectively engaged by the extract. Differences between the extract and the mixture can be reasonably attributed to an 'entourage effect' provided by minor cannabinoids present in the extract but absent from the mixture. The concept of entourage suggests that the multiple components of the cannabis extract interact synergistically to produce more than additive actions (3). The chemotype II extract used in our study has a THC:CBD ratio of approximately 1:1 but also contains other constituents such as CBN, CBC and CBG (see methods for details). These three minor phytocannabinoids have been described to have analgesic efficacy in rodent models of pain through similar targets as THC and CBD (67-71). Hence, it is plausible that THC, CBD and minor cannabinoids may interact to distinctively modify target activation, thus explaining the differences in analgesic responses between the extract and the THC:CBD mixture.

In summary, the study provides evidence that the analgesic profile and the pharmacodynamic targets engaged by a cannabis extract and mixes of cannabinoids cannot be simply inferred from their THC and CBD contents. Although medicinal use of cannabis products currently relies on knowledge of composition for therapeutic applications, evaluation of biological activity at major endocannabinoid targets should prove more informative for guiding and validating the use of phytocannabinoids in pain treatment.

5.7 References:

1. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*. 2007;4(8):1614-48.
2. Rock EM, Parker LA. Constituents of Cannabis Sativa. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1264:1-13.
3. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011;163(7):1344-64.
4. Manzanares J, Julian M, Carrascosa A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol*. 2006;4(3):239-57.
5. Vuckovic S, Srebro D, Vujovic KS, Vucetic C, Prostran M. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Front Pharmacol*. 2018;9:1259.
6. Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e94.
7. Hudson R, Renard J, Norris C, Rushlow WJ, Laviolette SR. Cannabidiol Counteracts the Psychotropic Side-Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in the Ventral Hippocampus through Bidirectional Control of ERK1-2 Phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2019;39(44):8762-77.
8. Small E, Beckstead HD. Letter: Cannabinoid phenotypes in Cannabis sativa. *Nature*. 1973;245(5421):147-8.
9. The Minister of Justice C. Cannabis Regulations 2018 [Available from: <https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/sor-2018-144/FullText.html>].
10. Food and Drug Administration U. FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products, Including Cannabidiol (CBD) 2021 [Available from: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd#approved>].
11. Reiman A, Welty M, Solomon P. Cannabis as a Substitute for Opioid-Based Pain Medication: Patient Self-Report. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017 ;2(1) :160-6.
12. Ware MA, Wang T, Shapiro S, Robinson A, Ducruet T, Huynh T, et al. Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *CMAJ*. 2010;182(14):E694-701.
13. Pascual D, Sanchez-Robles EM, Garcia MM, Goicoechea C. Chronic pain and cannabinoids. Great expectations or a 208nti-infl carol. *Biochem Pharmacol*. 2018;157:33-42.
14. Mu A, Weinberg E, Moulin DE, Clarke H. Pharmacologic management of chronic neuropathic pain: Review of the Canadian Pain Society consensus statement. *Can Fam Physician*. 2017;63(11):844-52.
15. Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod*. 2017;103:103-31.

16. Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
17. Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:487.
18. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(1):9-29.
19. Lim G, Sung B, Ji RR, Mao J. Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain.* 2003;105(1-2):275-83.
20. Hsieh GC, Pai M, Chandran P, Hooker BA, Zhu CZ, Salyers AK, et al. Central and peripheral sites of action for CB(2) receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Br J Pharmacol.* 2011;162(2):428-40.
21. Vinik A, Casellini C, Nevoret ML. Diabetic Neuropathies. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA)2000.
22. Aring AM, Jones DE, Falko JM. Evaluation and prevention of diabetic neuropathy. *Am Fam Physician.* 2005;71(11):2123-8.
23. Hong S, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(1):618-27.
24. Ikeda H, Ikegami M, Kai M, Ohsawa M, Kamei J. Activation of spinal cannabinoid CB2 receptors inhibits neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic mice. *Neuroscience.* 2013;250:446-54.
25. Goncalves MR, da Conceicao MS, Jesus CHA, Gasparin AT, Rosa ES, da Cunha JM. Spinal cannabinoid CB1 or CB2 receptors activation attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Behav Pharmacol.* 2020.
26. Loyd DR, Murphy AZ. The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Exp Neurol.* 2014;259:57-63.
27. Bagheri Tudashki H, Haddad Y, Charfi I, Couture R, Pineyro G. Ligand-specific recycling profiles determine distinct potential for chronic analgesic tolerance of delta-opioid receptor (DOPr) agonists. *J Cell Mol Med.* 2020;24(10):5718-30.
28. Talbot S, Chahmi E, Dias JP, Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation.* 2010;7(1):36.
29. Othman R, Vaucher E, Couture R. Bradykinin Type 1 Receptor – Inducible Nitric Oxide Synthase: A New Axis Implicated in Diabetic Retinopathy. *Front Pharmacol.* 2019;10:300.
30. Talbot S, Couture R. Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. *Exp Neurol.* 2012;234(2):373-81.
31. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70:5.47.1-5..20.

32. Vera G, Lopez-Miranda V, Herradon E, Martin MI, Abalo R. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;102(2):335-43.
33. Charfi I, Abdallah K, Gendron L, Pineyro G. Delta opioid receptors recycle to the membrane after sorting to the degradation path. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(12):2257-71.
34. Alles SRA, Smith PA. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol Rev.* 2018 ;70(2) :315-47.
35. Huang YK, Lu YG, Zhao X, Zhang JB, Zhang FM, Chen Y, et al. Cytokine activin C ameliorates chronic neuropathic pain in peripheral nerve injury rodents by modulating the TRPV1 channel. *Br J Pharmacol.* 2020;177(24):5642-57.
36. Cui JH, Kim WM, Lee HG, Kim YO, Kim CM, Yoon MH. Antinociceptive effect of intrathecal cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in a rat bone tumor pain model. *Neurosci Lett.* 2011;493(3):67-71.
37. Kanai Y, Hara T, Imai A. Participation of the spinal TRPV1 receptors in formalin-evoked pain transduction: a study using a selective TRPV1 antagonist, iodo-resiniferatoxin. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(4):489-93.
38. Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology.* 2007;106(4):787-94.
39. Ueda M, Iwasaki H, Wang S, Murata E, Poon KY, Mao J, et al. Cannabinoid receptor type 1 antagonist, AM251, attenuates mechanical allodynia and thermal hyperalgesia after burn injury. *Anesthesiology.* 2014;121(6):1311-9.
40. Jesus CHA, Redivo DDB, Gasparin AT, Sotomaior BB, de Carvalho MC, Genaro K, et al. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. *Brain Res.* 2019;1715:156-64.
41. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol.* 2014;13(9):924-35.
42. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *1995;48(3):443-50.*
43. Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol.* 2004 ;143(2) :247-50.
44. Milligan AL, Szabo-Pardi TA, Burton MD. Cannabinoid Receptor Type 1 and Its Role as an Analgesic: An Opioid Alternative? *J Dual Diagn.* 2020;16(1):106-19.
45. Zhu CZ, Mikusa JP, Fan Y, Hollingsworth PR, Pai M, Chandran P, et al. Peripheral and central sites of action for the non-selective cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in a rat model of post-operative pain. *Br J Pharmacol.* 2009;157(4):645-55.

46. An D, Peigneur S, Tytgat J. WIN55,212-2, a Dual Modulator of Cannabinoid Receptors and G Protein-Coupled Inward Rectifier Potassium Channels. *Biomedicines*. 2021;9(5).
47. Soethoudt M, Grether U, Fingerle J, Grim TW, Fezza F, de Petrocellis L, et al. Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nat Commun*. 2017 ;8 :13958.
48. De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, Bisogno T, Petrosino S, et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*. 2011;163(7):1479-94.
49. Anand U, Jones B, Korchev Y, Bloom SR, Pacchetti B, Anand P, et al. CBD Effects on TRPV1 Signaling Pathways in Cultured DRG Neurons. *J Pain Res*. 2020;13:2269-78.
50. Wong GY, Gavva NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):267-77.
51. Starkus J, Jansen C, Shimoda LMN, Stokes AJ, Small-Howard AL, Turner H. Diverse TRPV1 responses to cannabinoids. *Channels (Austin)*. 2019;13(1):172-91.
52. Iannotti FA, Hill CL, Leo A, Alhusaini A, Soubrane C, Mazzeella E, et al. Nonpsychotropic plant cannabinoids, 21 Inti-inflammato (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(11):1131-41.
53. Qin N, Neepser MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(24):6231-8.
54. Cun-Jin S, Jian-Hao X, Xu L, Feng-Lun Z, Jie P, Ai-Ming S, et al. X-ray induces mechanical and heat allodynia in mouse via TRPA1 and TRPV1 activation. *Mol Pain*. 2019;15:1744806919849201.
55. Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G. The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *PAIN*. 2008;134(3):277-84.
56. Talbot S, Dias JP, Lahjouji K, Bogo MR, Campos MM, Gaudreau P, et al. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B1 receptor in rat spinal cord microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9(1):16.
57. Casey SL, Atwal N, Vaughan CW. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model. *Pain*. 2017;158(12):2452-60.
58. King KM, Myers AM, Soroka-Monzo AJ, Tuma RF, Tallarida RJ, Walker EA, et al. Single and combined effects of Delta(9) -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Br J Pharmacol*. 2017;174(17):2832-41.
59. Grisham MG, Ferraro DP. Biphasic effects of 9 -tetrahydrocannabinol on variable interval schedule performance in rats. *Psychopharmacologia*. 1972;27(2):163-9.
60. Kwiatkowska M, Parker LA, Burton P, Mechoulam R. A comparative analysis of the potential of cannabinoids and ondansetron to suppress cisplatin-induced emesis in the *Suncus murinus* (house musk shrew). *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;174(2):254-9.

61. Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British journal of pharmacology*. 2004;141(4):737-45.
62. Kistner K, Siklosi N, Babes A, Khalil M, Selescu T, Zimmermann K, et al. Systemic desensitization through TRPA1 channels by capsazepine and mustard oil – a novel strategy against inflammation and pain. *Scientific Reports*. 2016;6(1):28621.
63. Finlay DB, Sircombe KJ, Nimick M, Jones C, Glass M. Terpenoids From Cannabis Do Not Mediate an Entourage Effect by Acting at Cannabinoid Receptors. *Front Pharmacol*. 2020;11:359.
64. Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*. 2007;150(5):613-23.
65. Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. Antihyperalgesic effect of a Cannabis sativa extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phytother Res*. 2008;22(8):1017-24.
66. Harris HM, Rousseau MA, Wanas AS, Radwan MM, Caldwell S, Sufka KJ, et al. Role of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis-Mediated Analgesia in Rats. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2019;4(3):177-82.
67. Davis WM, Hatoum NS. Neurobehavioral actions of cannabichromene and interactions with delta 9-tetrahydrocannabinol. *Gen Pharmacol*. 1983;14(2):247-52.
68. Formukong EA, Evans AT, Evans FJ. Analgesic and anti-inflammatory activity of constituents of Cannabis sativa L. *Inflammation*. 1988;12(4):361-71.
69. Evans FJ. Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Med*. 1991;57(7):S60-7.
70. Maione S, Piscitelli F, Gatta L, Vita D, De Petrocellis L, Palazzo E, et al. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br J Pharmacol*. 2011;162(3):584-96.
71. Wong H, Cairns BE. Cannabidiol, cannabinol and their combinations act as peripheral analgesics in a rat model of myofascial pain. *Arch Oral Biol*. 2019;104:33-9.

5.8 Tableaux

Table1. Effect of citrate buffer, STZ and vehicle treatments on mechanical sensitivity in neuropathic (STZ) rats.

A.

Treatments	Paw Withdrawal Threshold (g)		Comparison vs naive	
	Mean	SEM	Significance	p value
Naive (n=6)	15.75	3.73		
Citrate buffer (n=6)	17.62	3.77	ns	0.48
Streptozotocin (n=7)	3.41	0.14	*	0.014

B.

Treatments	Paw Withdrawal Threshold (g)		Comparison vs STZ	
	Mean	SEM	Significance	p value
Streptozotocin (n=6)	3.37	0.15		
Vehicle (5% DMSO / 5% Cremophor) (n=5)	3.66	0.26	ns p=0.60	
Vehicle (11.6% Ethanol / 7.5% Cremophor) (n=5)	3.26	0.11		
Vehicle (24% Ethanol / 7.5% Cremophor) (n=6)	3.33	0.14		
Vehicle (31.7% Ethanol / 7.5% Cremophor) (n=5)	3.26	0.11		
Vehicle (48% Ethanol / 7.5% Cremophor) (n=5)	3.40	0.17		

Baseline measurement of mechanical sensitivity was assessed in naïve Sprague Dawley rats (n=6), rats that were administered Citrate buffer (n=6) or STZ (50.0 mg·kg⁻¹ per rat, n=7). Mechanical sensitivity was measured again 1 week following injection of different treatments. Statistical significance of changes in mechanical allodynia induced by STZ or citrate buffer as compared to I rats was evaluated by One-way ANOVA (p<0.01) followed by Dunnett's multiple comparison test, which showed an effect of the STZ treatment (*p<0.05). B) Baseline measurement of mechanical sensitivity was obtained in STZ-treated rats 15 to 75 minutes after the injection of indicated vehicle treatment groups. The mean withdrawal threshold value (± SEM) between 15 and 75 minutes was

calculated for each vehicle and compared to the mean value obtained in STZ-treated rats. Statistical significance of vehicle induced changes in mechanical allodynia was evaluated by one-way ANOVA ($p=0.60$) which showed no effect of vehicle on STZ thresholds after post hoc analysis using Dunnett's multiple comparisons test. P values for the different comparisons are given in the table.

5.9 Figures

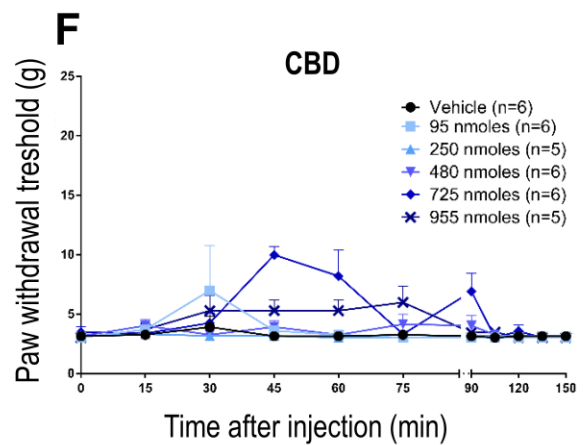
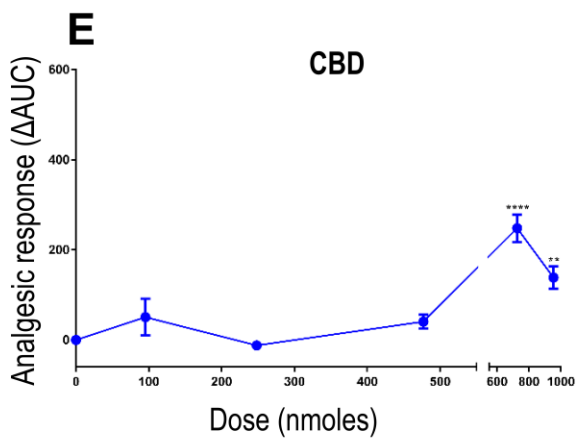
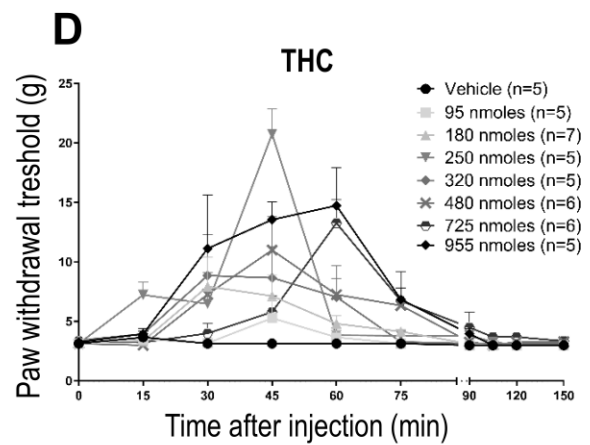
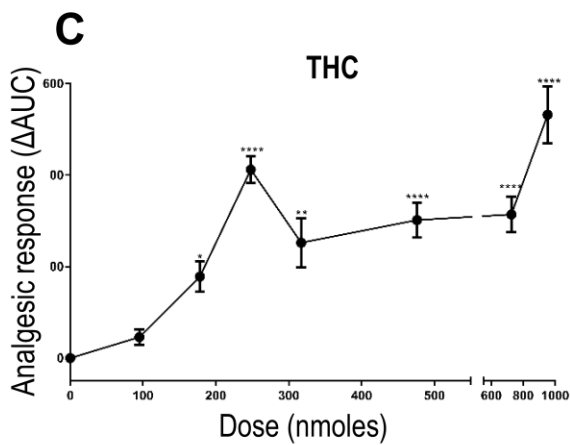
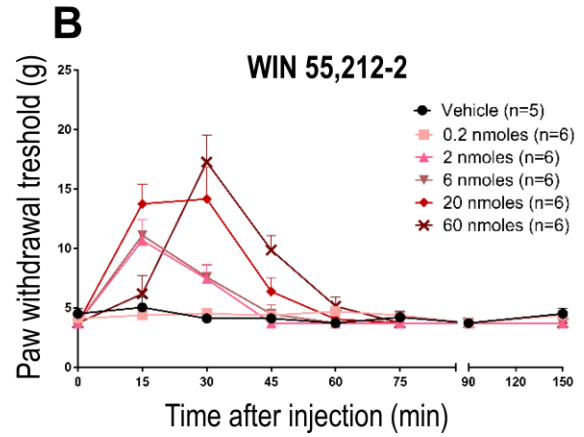
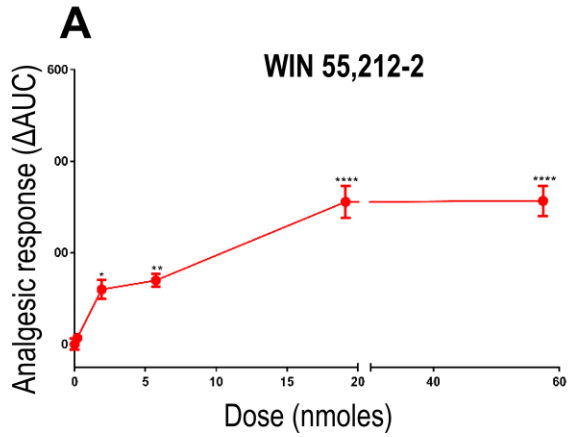


Figure 1. Time course and dose-dependent anti-allodynic effects of WIN 55, 212-2, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in STZ rats.

One week after STZ administration, rats received i.t. injections of (A, B) WIN 55, 212-2, (C, D) THC or (E, F) CBD at the indicated doses. Mechanical thresholds were assessed prior to treatment administration and then every 15 min after injection until return to baseline. Results in A, C and E correspond to Δ AUC values (mean \pm SEM) that were plotted as a function of dose (nmoles). Δ AUC values were calculated by subtracting AUC values for the vehicle in which agonist was dissolved from AUC values of the corresponding treatment series. Doses that induced a significant analgesic response as compared to no treatment administration are indicated in the figure and were established using one-way ANOVA followed by Dunnett's test multiple comparison test (details in text). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$. Time course of paw withdrawal thresholds (grams) following injection of (B) WIN 55, 212-2, (D) THC and (F) CBD are shown. Results correspond mean \pm SEM of 5-7 rats per concentration point as indicated in the figure.

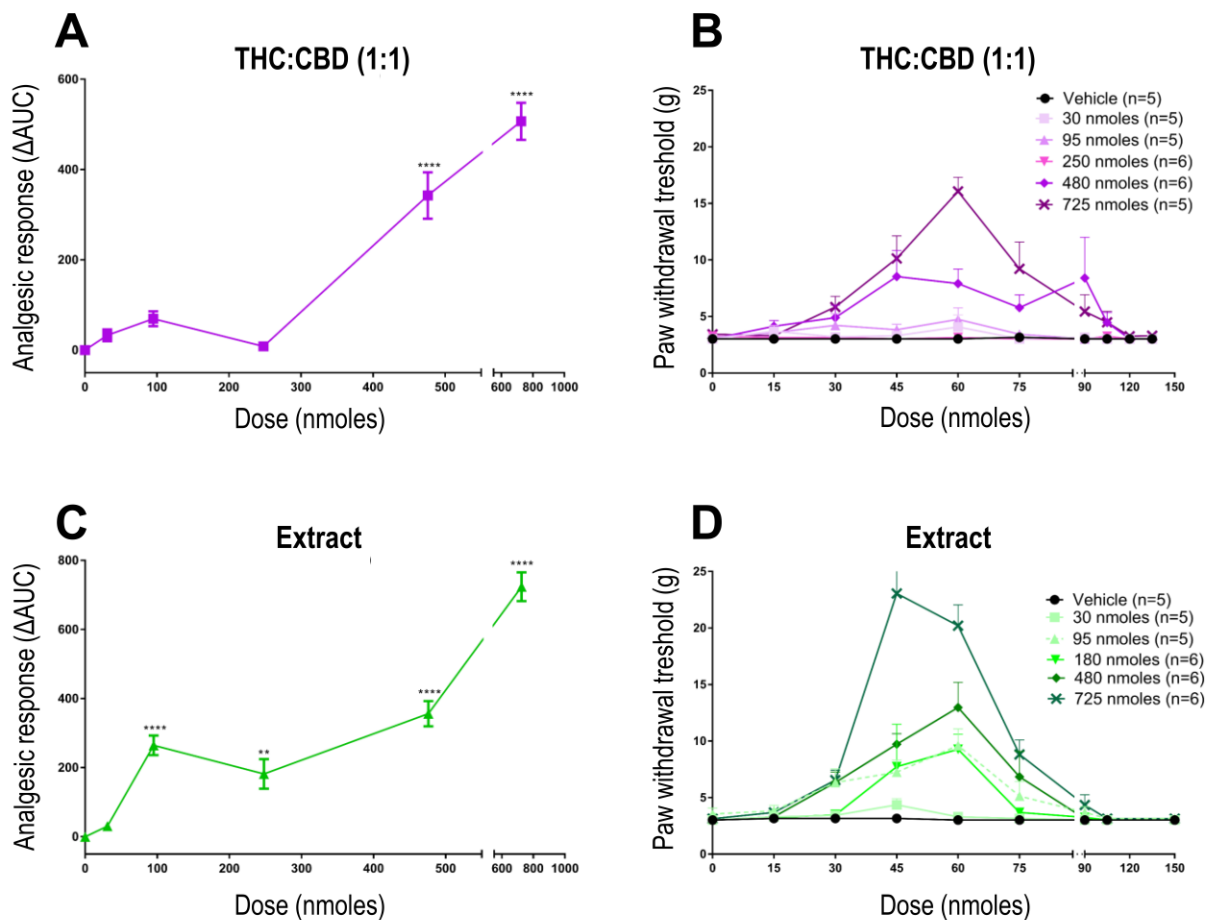


Figure 2. Time course and dose-dependent anti-allodynic effects of the THC:CBD (1:1) mixture and of the extract in STZ rats.

One week after STZ administration, rats received i.t. injections of (A, B) the THC:CBD (1:1) mixture or (C, D) the cannabis extract at the indicated doses. Mechanical thresholds were assessed prior to treatment administration and then every 15 min after injection until return to baseline. Results in A and C correspond to Δ AUC values (mean \pm SEM) that were plotted as a function of dose (nmoles). Δ AUC values were calculated by subtracting AUC values for the vehicle in which treatments were dissolved from AUC values obtained in each treatment series. Doses that induced a significant analgesic response as compared to no treatment administration are indicated in the figure and were established using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$. Time courses of paw withdrawal thresholds following injection of (B) the THC:CBD (1:1) mixture and (D) the cannabis extract are shown. Results correspond to mean \pm SEM of 5-6 rats per concentration point as indicated in the figure.

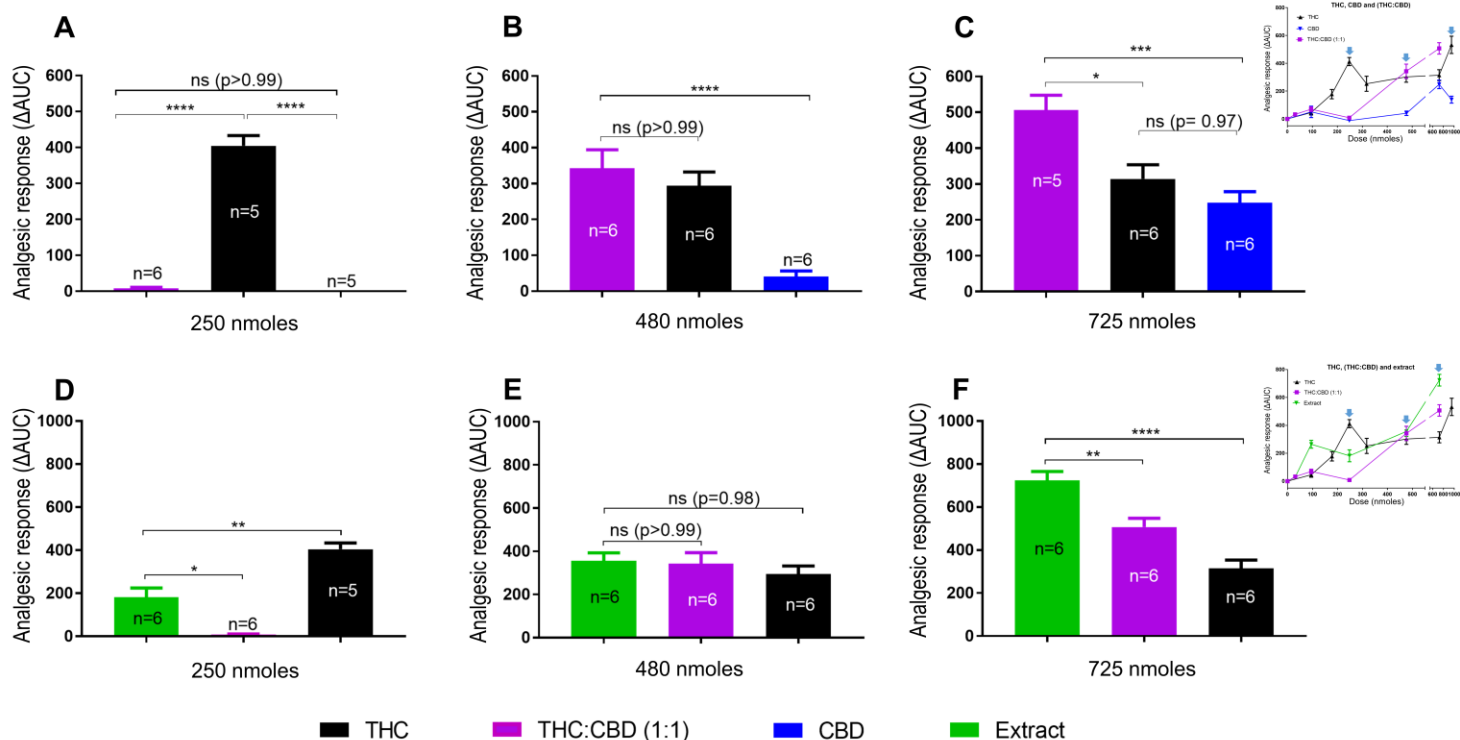


Figure 3. Comparison of the anti-allodynic effects of THC, CBD, THC: CBD (1:1) mixture and extract in STZ rats.

(A-C) Δ AUC values derived from the time course of anti-allodynic responses elicited by pure THC and pure CBD are compared to Δ AUC values generated with the THC:CBD (1:1) mixture. (D-F) Δ AUC values derived from the time course of analgesic responses elicited by pure THC and the THC:CBD mixture are compared to Δ AUC values obtained with the cannabis extract. Doses for the (THC:CBD) mixture and the extract are given as the quantity (nmoles) of THC administered with each of these treatments. The number of animals per treatment and dose appear within corresponding histogram bars. Statistical significance of the comparisons was evaluated by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (details in text). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

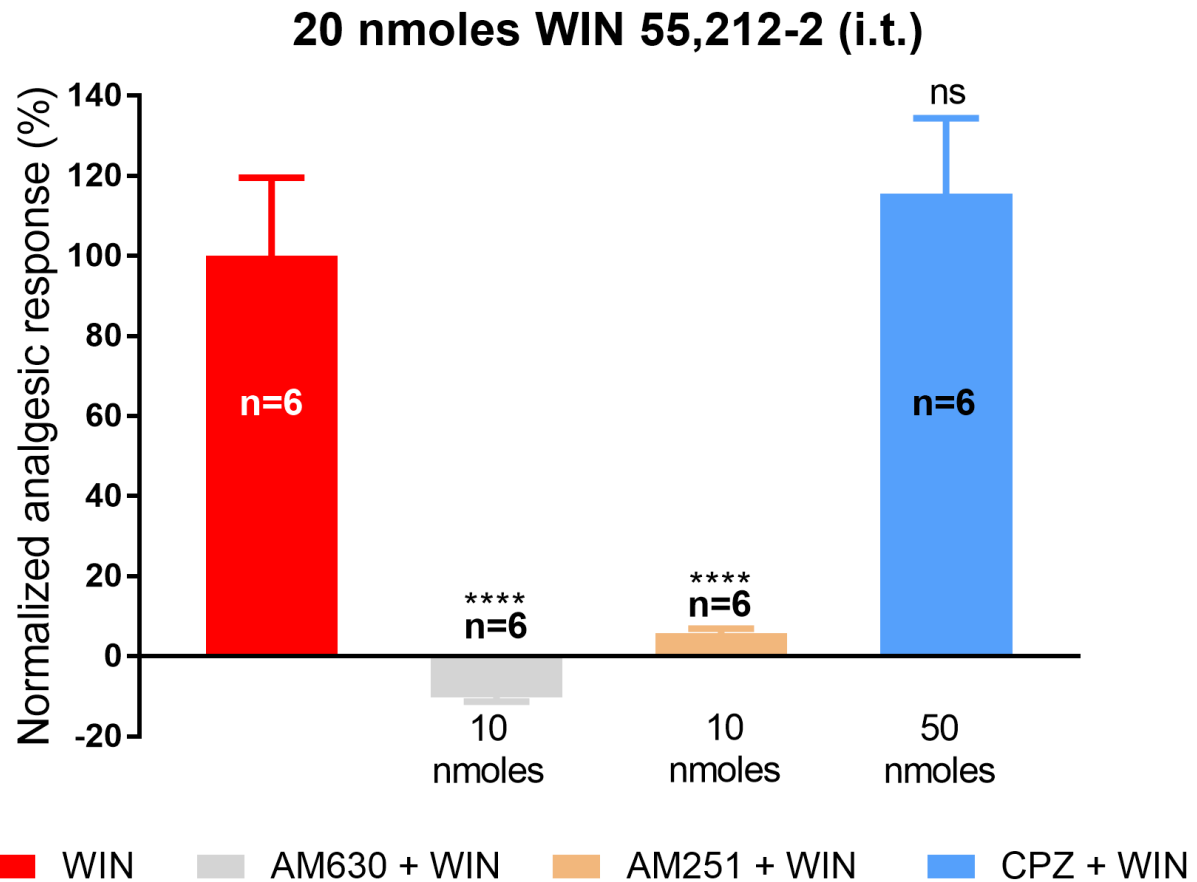
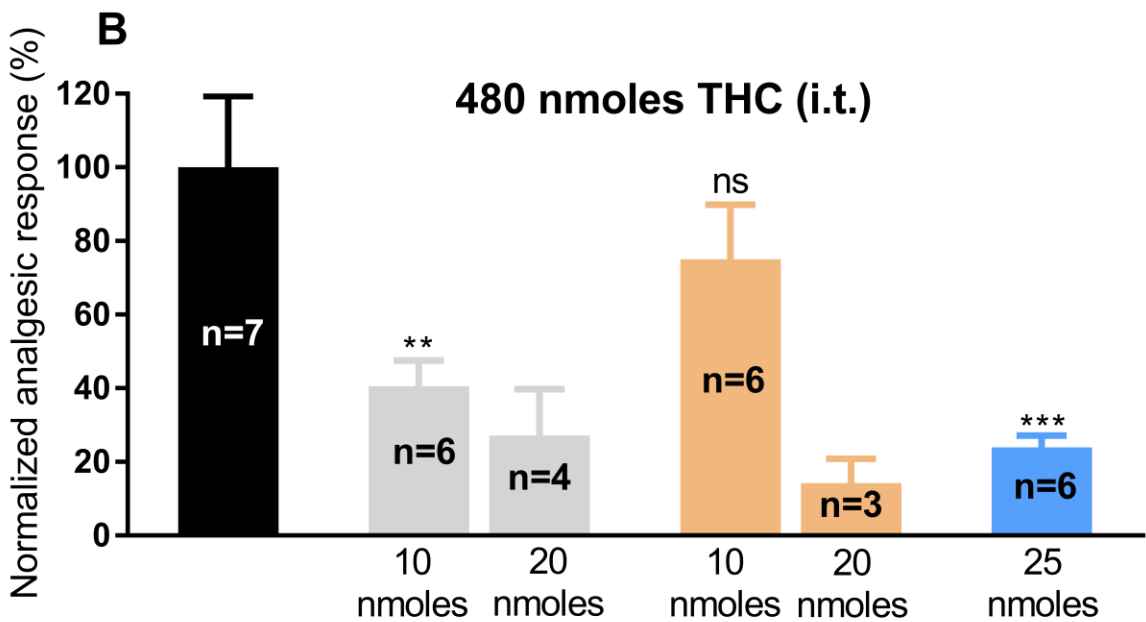
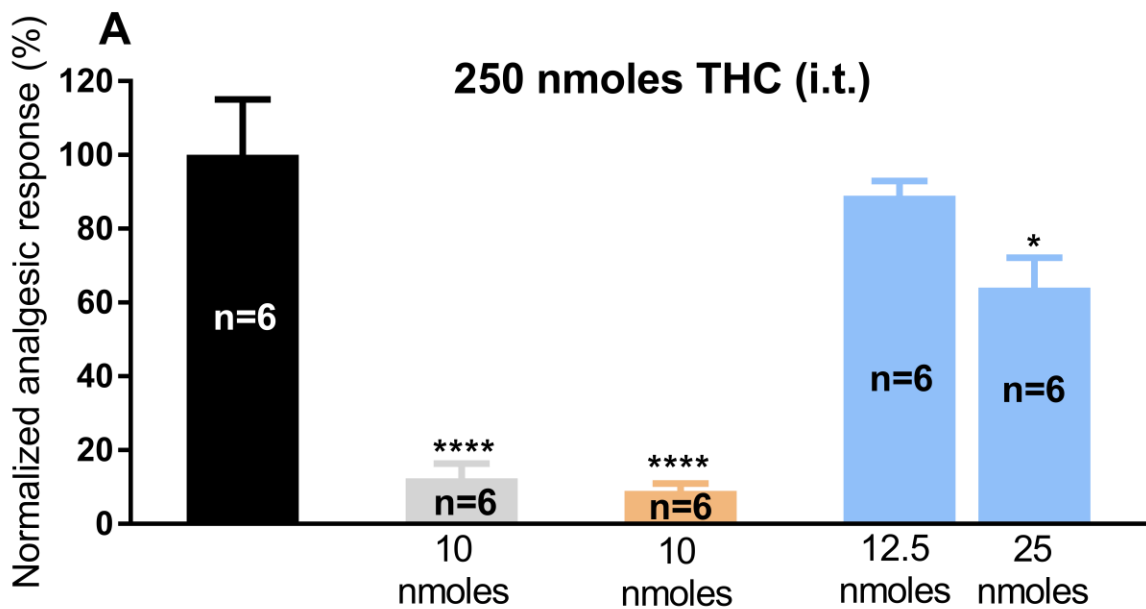


Figure 4. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of WIN 55,212-2.

One week after STZ administration and 30 min before i.t. administration of WIN 55,212-2 (20 nmoles, red bar), rats were pre-injected (i.t.) with the selective CB1R antagonist AM251 (gray bar), the selective CB2R antagonist AM630 (orange bar) or the selective TRPV1 channel blocker capsazepine (sky blue bar), at doses indicated in the figure. Results correspond to integrated anti-allodynic responses (Δ AUC values, mean \pm SEM) normalized to WIN 55,212-2 response in the absence of antagonist pre-treatment. Statistical comparisons were carried out using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$ comparing antagonist vs no antagonist pretreatments. The number of animals tested per treatment is indicated in the figure.



THC
 AM630 + THC
 AM251 + THC
 CPZ + THC

Figure 5. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of THC.

One week after STZ administration and 30 min before i.t. administration of (A) 250 nmoles or (B) 480 nmoles THC (black bars), rats were pre-injected (i.t.) with the selective CB1R antagonist AM251 (gray bar), the selective CB2R antagonist AM630 (orange bar) or the selective TRPV1 channel blocker capsazepine (sky blue bar), at doses indicated in the figure. Results correspond to integrated anti-allodynic responses (Δ AUC values, mean \pm SEM) normalized to THC response in the absence of antagonist pre-treatment. Statistical comparisons were carried out using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ comparing antagonist vs no antagonist pretreatments. Statistical comparisons between the effect of 25 nmoles CPZ in animals receiving 250 nmoles and 480 nmoles THC were carried out using Student's t-test. # $p < 0.01$. The number of animals tested per treatment is indicated in the figure.

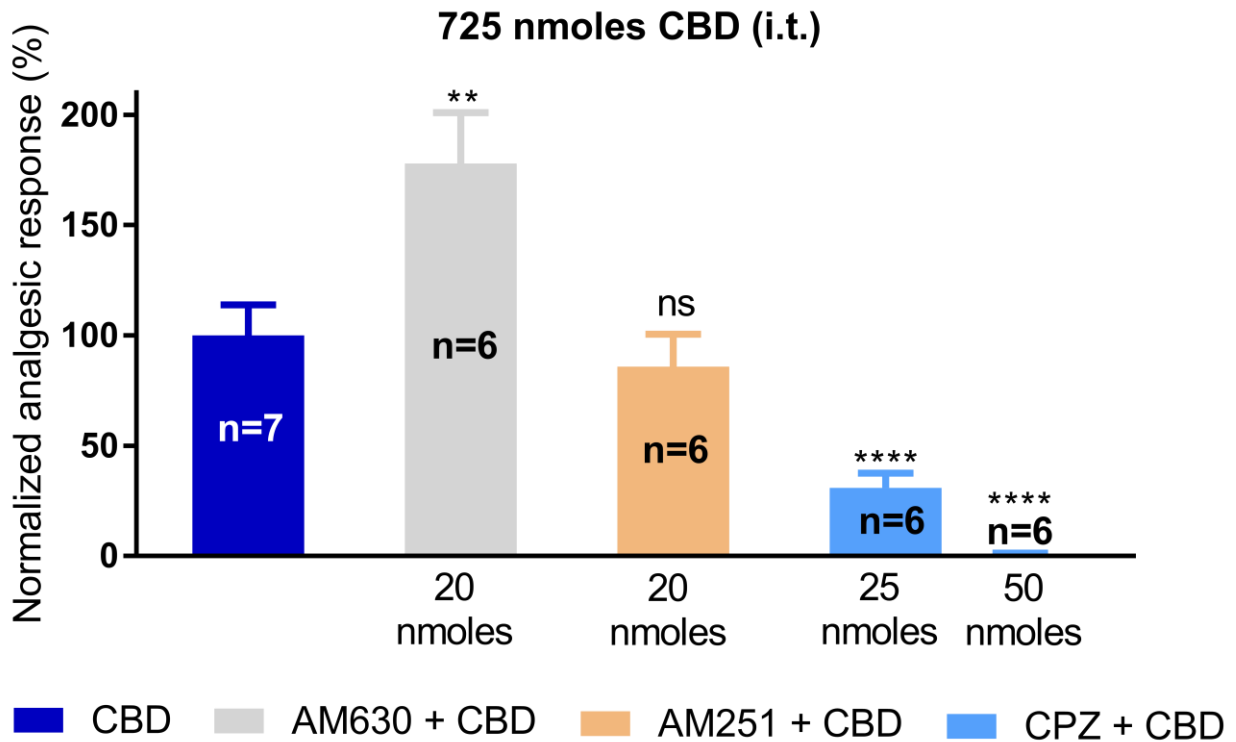


Figure 6. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of CBD.

One week after STZ administration and 30 min before i.t. administration of CBD (725 nmoles, dark blue bar), rats were pre-injected (i.t.) with the selective CB1R antagonist AM251 (gray bar), the selective CB2R antagonist AM630 (orange bar) or the selective TRPV1 channel blocker capsazepine (sky blue bar), at doses indicated in the figure. Results correspond to integrated anti-allodynic responses (Δ AUC values, mean \pm SEM) normalized to CBD response in the absence of antagonist pre-treatment. Statistical comparisons were carried out using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$ comparing antagonist vs no antagonist pretreatments. The number of animals tested per treatment is indicated in the figure.

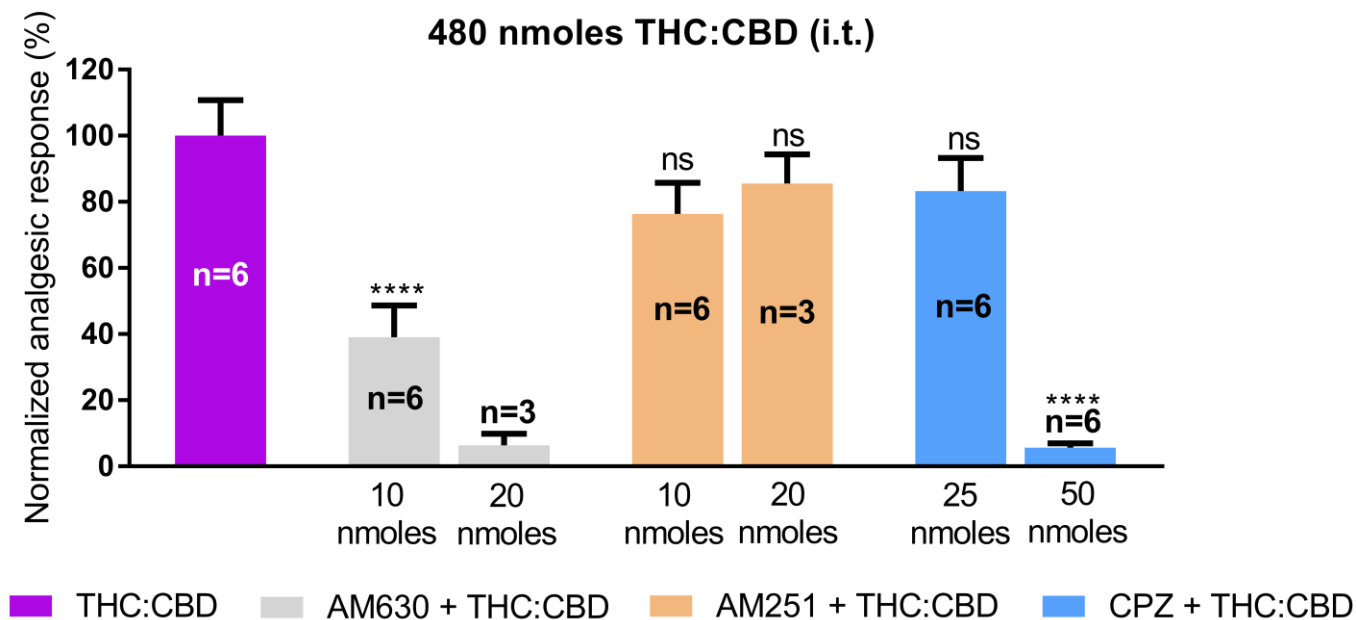
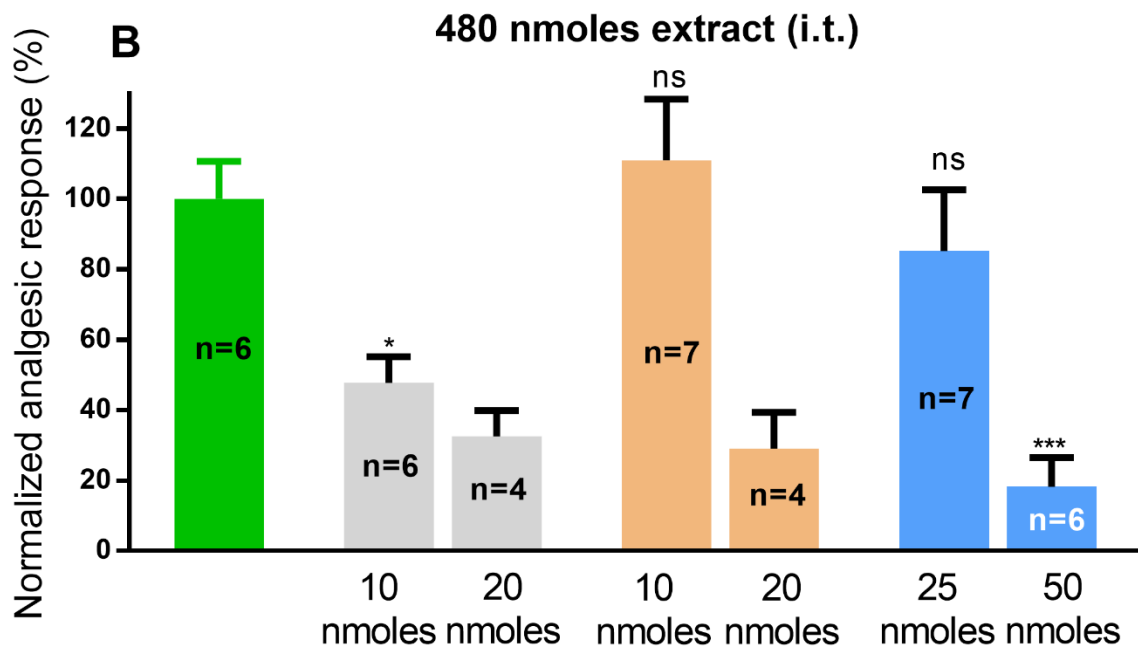
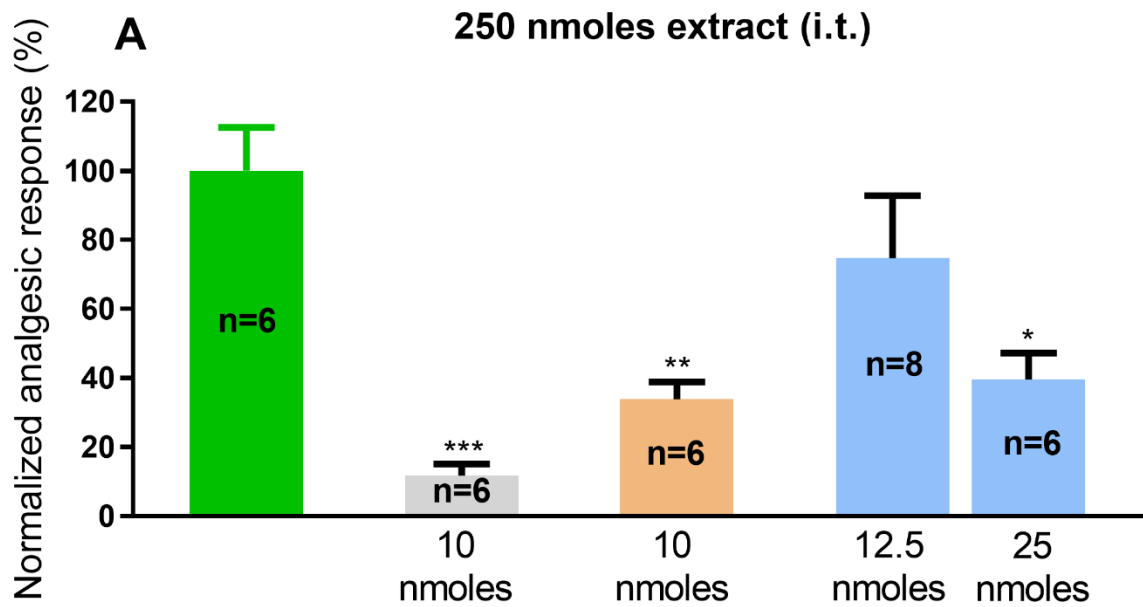


Figure 7. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of the THC:CBD (1:1) mixture.

One week after STZ administration and 30 min before i.t. administration of the (THC:CBD) mixture at 480 nmoles THC equivalent (purple bar), rats were pre-injected (i.t.) with the selective CB1R antagonist AM251 (gray bar), the selective CB2R antagonist AM630 (orange bar) or the selective TRPV1 channel blocker capsazepine (sky blue bar), at doses indicated in the figure. Results correspond to integrated anti-allodynic responses (Δ AUC values, mean \pm SEM) normalized to the response of the mixture in the absence of antagonist pre-treatment. Statistical comparisons were carried out using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$ comparing antagonist vs no antagonist pretreatments. The number of animals tested per treatment is indicated in the figure.

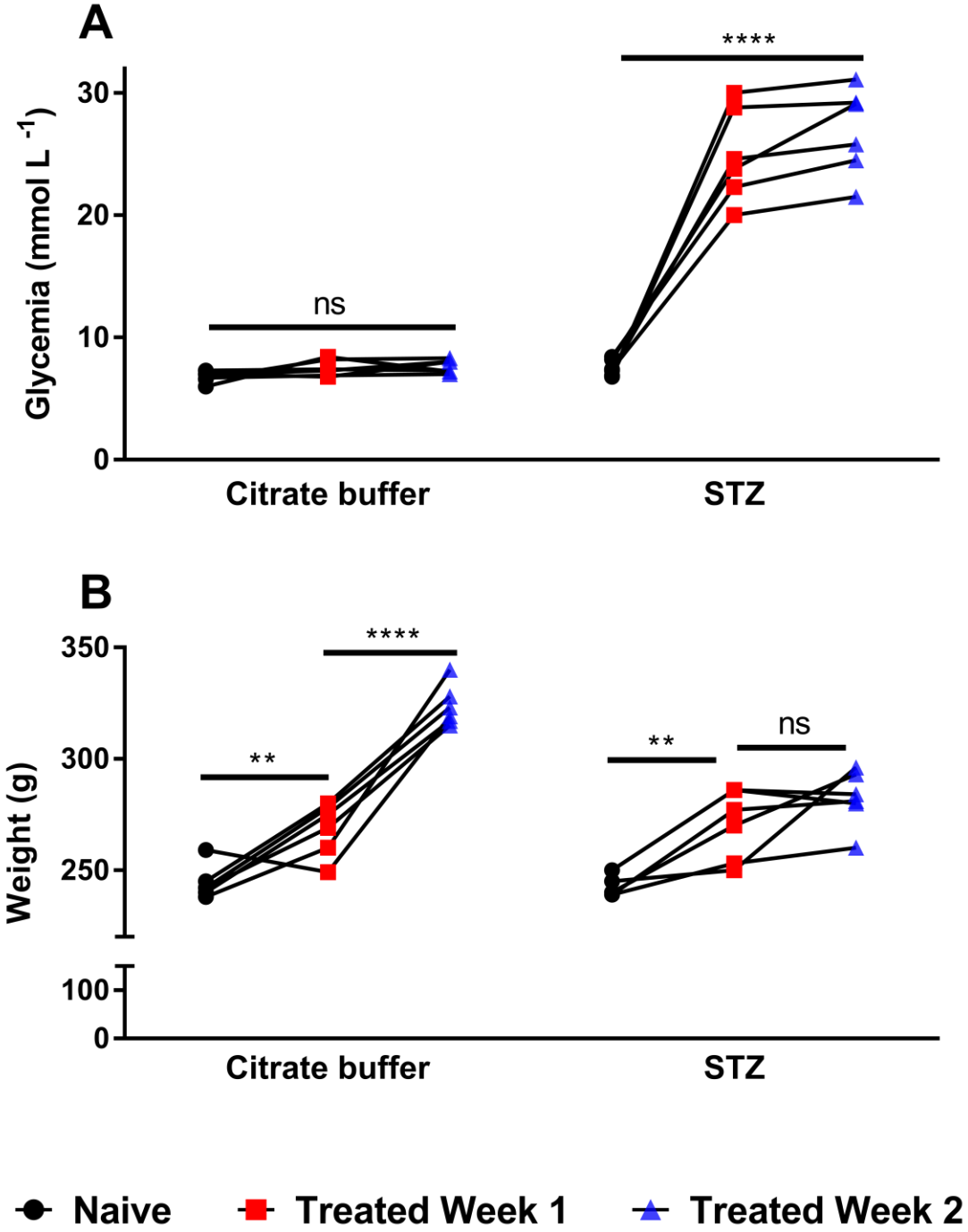


■ Extract
 ■ AM630 + Extract
 ■ AM251 + Extract
 ■ CPZ + Extract

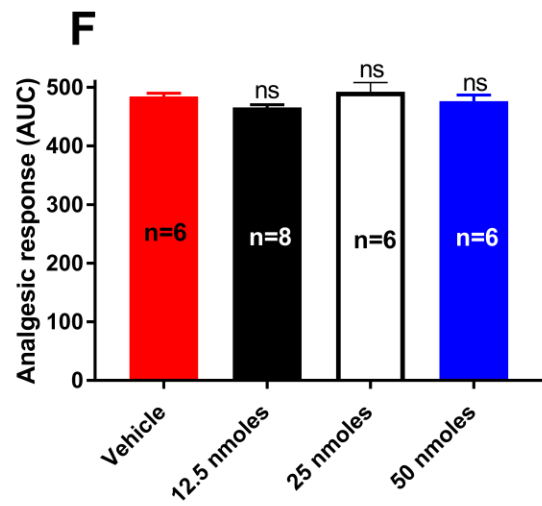
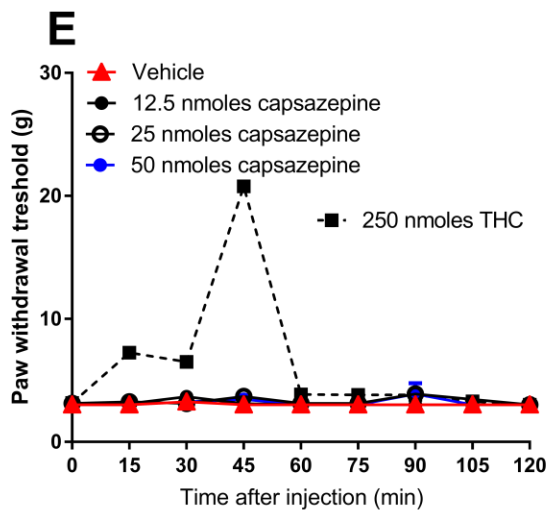
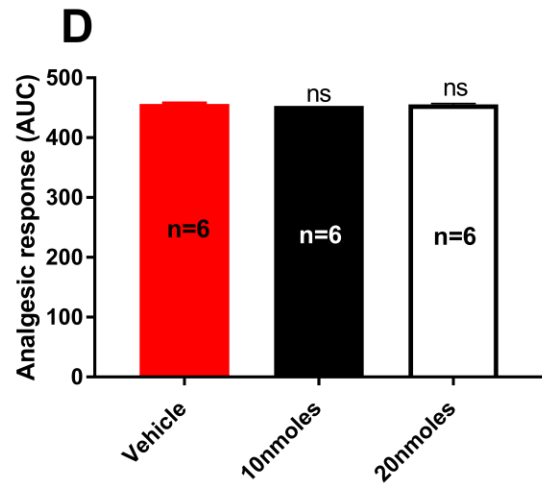
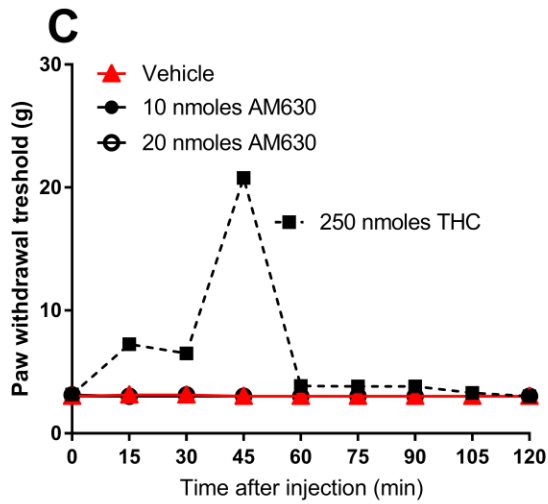
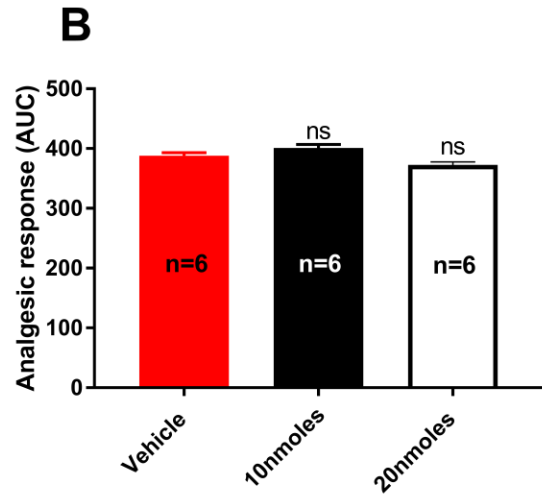
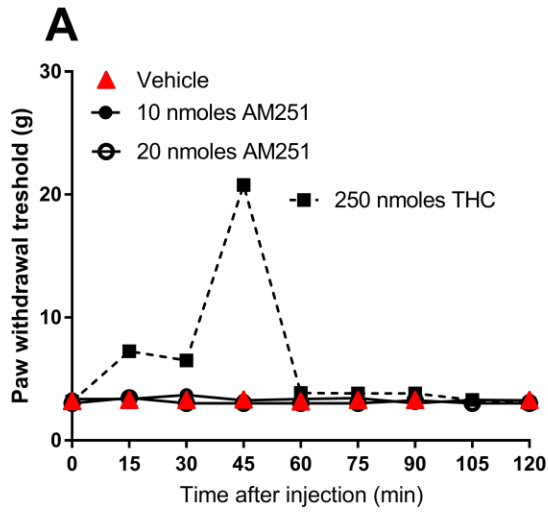
Figure 8. Contributions of CB1R, CB2R and TRPV1 channels to the anti-allodynic effect of chemotype II cannabis extract.

One week after STZ administration and 30 min before i.t. administration of the cannabis extract at (A) 250 nmoles or (B) 480 nmoles THC equivalent (green bars), rats were pre-injected (i.t.) with the selective CB1R antagonist AM251 (gray bar), the selective CB2R antagonist AM630 (orange bar) or the selective TRPV1 channel blocker capsazepine (sky blue bar), at doses indicated in the figure. Results correspond to integrated anti-allodynic responses (Δ AUC values, mean \pm SEM) normalized to extract response in the absence of antagonist pre-treatment. Statistical comparisons were carried out using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ comparing antagonist vs no antagonist pretreatments. The number of animals tested per treatment is indicated in the figure.

5.10 Supplementary information

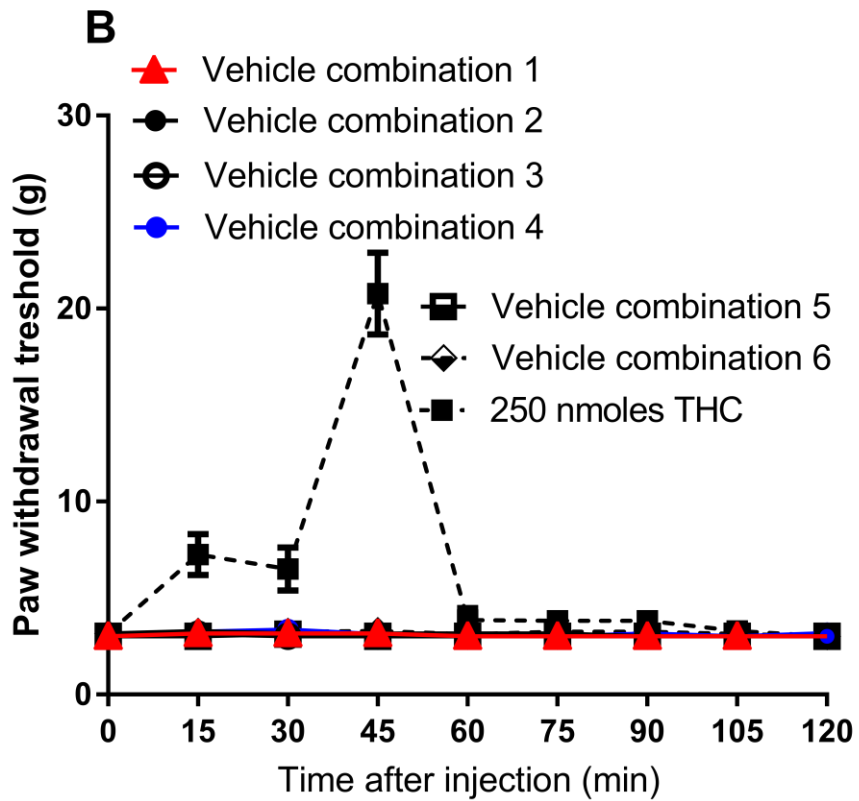
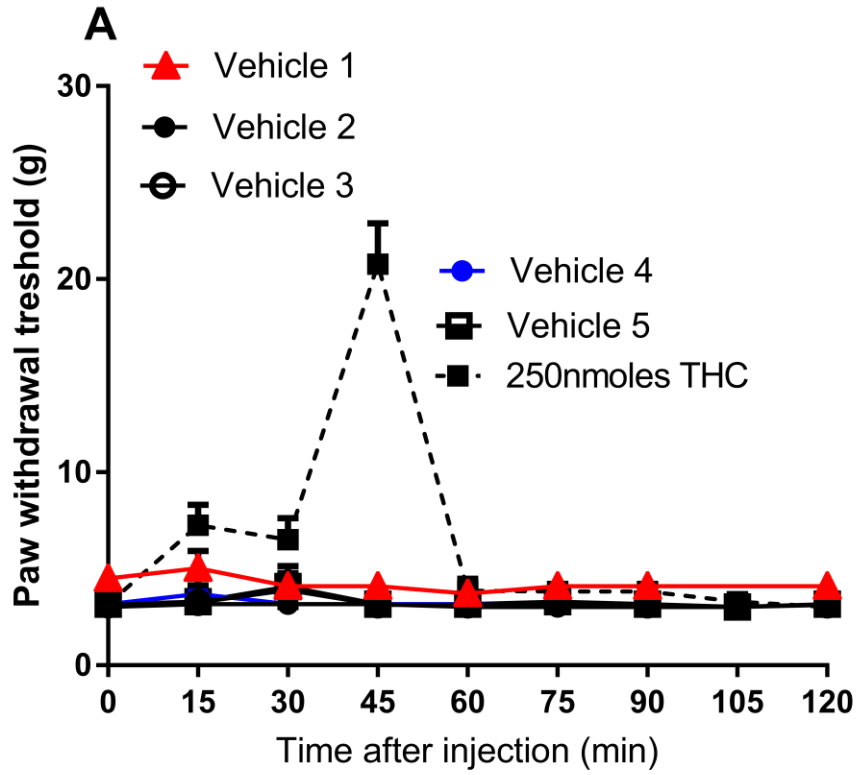


Supplementary Figure 1. Evolution of non-fasting glycemia and body weight in type 1 diabetic rats. (A) Non-fasting glycemia was measured before (black circles, n=6), 1 week (red squares, n=6) and 2 weeks (blue triangles, n=6) after the injection of vehicle (Citrate buffer) or Streptozotocin (STZ), as indicated. Statistical significance of STZ-induced changes in blood glucose levels was evaluated by two-way ANOVA, which showed an effect of treatment ($p<0.0001$), an effect of time ($p<0.0001$) and an interaction ($p<0.0001$). Sidaks's post-hoc test showed a significant increase in glucose levels following STZ injection ($p<0.0001$). (B) Body weight was evaluated before (black circles, n=6), 1 week (red squares, n=6) and 2 weeks (blue triangles, n=6) after vehicle (Citrate buffer) or Streptozotocin (STZ) treatments, as indicated. Statistical significance of STZ-induced changes in body weight was evaluated by two-way ANOVA, which showed an effect of treatment ($p=0.001$), an effect of time ($p<0.0001$) and an interaction ($p<0.0001$). Sidaks's post-hoc test showed a significant increase in body weight following injection of both citrate buffer ($p<0.01$) and STZ ($p<0.01$) 1 week following the treatment. At week 2, the citrate buffer treatment group ($p<0.0001$) continued to show a significant increase in body weight compared to week 1, but this was not the case for the STZ treatment group ($p=0.65$).



Supplementary Figure 2. Time course and effect of antagonist treatment on mechanical sensitivity in neuropathic (STZ) rats.

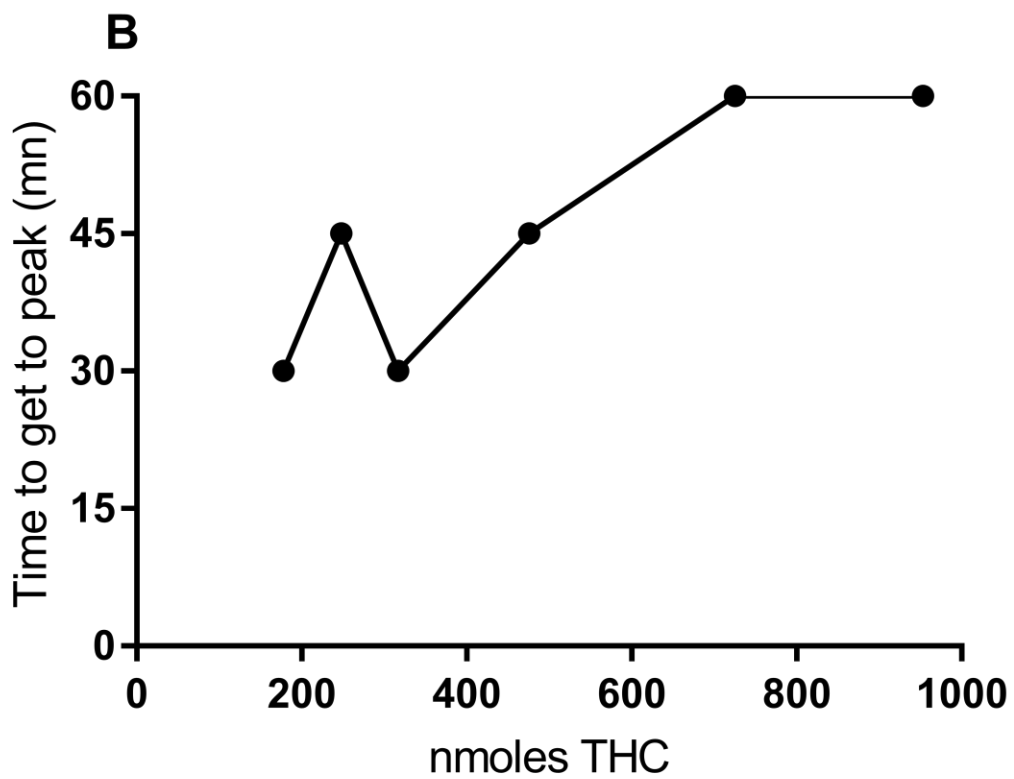
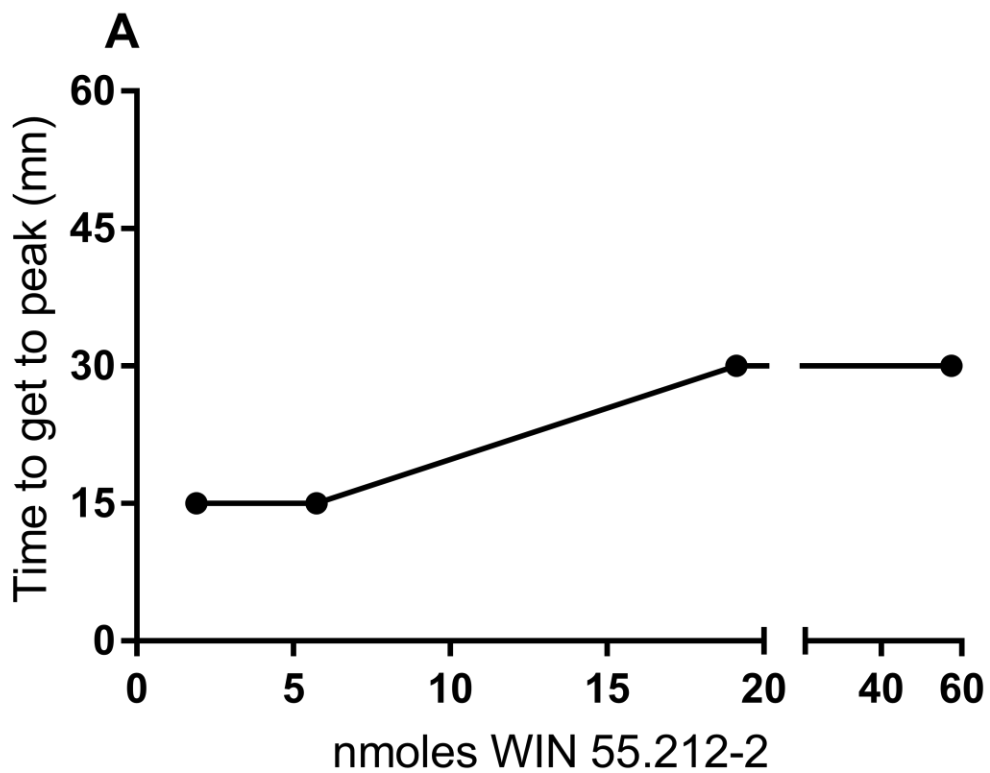
One week after STZ administration, rats received i.t. injections of indicated doses of (A, B) CB1R antagonist AM251, (C, D) CB2R antagonist AM630, (E, F) TRPV1 antagonist capsazepine or corresponding vehicles. Mechanical thresholds were assessed prior to treatment and then every 15 min after injection of vehicle or antagonist. Time course of AM251, AM630 and capsazepine analgesic are respectively shown in A, C and E. The response to 250 nmoles of THC is provided for comparison. Results correspond to paw withdrawal threshold (mean \pm SEM). Withdrawal threshold shown in A, C and E were integrated over time to generate AUC values (mean \pm SEM) respectively shown in B, D and F. One-way ANOVA was used to compare AUC values generated in vehicle-injected rats to AUC values obtained in rats that received AM251 ($p=0.006$), AM630 ($p=0.18$) and capsazepine ($p=0.24$). Post-hoc comparisons using Dunnett's test corroborated no significant effect of AM251 at either of the doses tested ($p=0.19$ for 10 nmoles; $p=0.09$ for 20 nmoles). The number of animals per condition is provided in corresponding histograms.



Supplementary Figure 3. Time course of the hind paw withdrawal response to von Frey filaments after intrathecal administration of vehicles for cannabinoids and antagonists used in the study.

(A) One week after STZ administration, rats received i.t. injections of the following vehicles in which active cannabinoid treatments were dissolved: Vehicle 1 (5% DMSO / 5% Cremophor) n=5; Vehicle 2 (11.6% Ethanol / 7.5% Cremophor) n=5; Vehicle 3 (24% Ethanol / 7.5% Cremophor) n=6; Vehicle 4 (31.7% Ethanol / 7.5% Cremophor) n=5 or Vehicle 5 (50% Ethanol / 7.5% Cremophor) n=5. (Matches between active treatments and their corresponding vehicles are provided in Supplementary Table 1). Mechanical thresholds were assessed prior to and then every 15 min after vehicle injection. Results correspond to paw withdrawal threshold (mean \pm SEM). The response to 250 nmoles of THC is provided for visual comparison. Statistical comparisons between vehicle and non-injected STZ rats are provided in Table 1.

(B) One week after STZ administration, rats received i.t. injections of vehicles that were used for administration of specific antagonists (V_{hAntag}) and 30 min later they received a second i.t. injection corresponding to the vehicle of the active treatment (V_{hTreat}) for which antagonism was intended. Six different combinations of $V_{hAntag} + V_{hTreat}$ were used in the study. *Vehicle combination 1:* ((V_{hAntag} (2.5% DMF/ 5% Cremophor) + V_{hTreat} (5% DMSO / 5% Cremophor)) n=5; *Vehicle combination 2:* ((V_{hAntag} (5% Ethanol / 5% Cremophor) + V_{hTreat} (5% DMSO/ 5% Cremophor)) n=5; *Vehicle combination 3:* ((V_{hAntag} 5% DMF / 5% Cremophor) + V_{hTreat} (24 % Ethanol / 7.5% Cremophor)) n=6; *Vehicle combination 4:* ((V_{hAntag} 5% Ethanol / 5% Cremophor) + V_{hTreat} (24 % Ethanol/ 7.5% Cremophor)) n=6; *Vehicle combination 5:* (V_{hAntag} (5% DMF/ 5% Cremophor) + V_{hTreat} (31.7 % Ethanol/ 7.5% Cremophor)) n=6 or *Vehicle combination 6:* (V_{hAntag} (5% Ethanol/ 5% Cremophor) + V_{hTreat} (31.7 % Ethanol/ 7.5% Cremophor)) n=6. Mechanical thresholds were assessed every 15 min after V_{hTreat} administration. Results correspond to paw withdrawal threshold (mean \pm SEM). The response to 250 nmoles of THC is provided for comparison. Statistical comparisons between vehicle and non-injected STZ rats are provided in supplementary Table 3. Matches between active treatments and their corresponding vehicles are provided in Supplementary Table 1. Matches between antagonist treatments and their corresponding vehicles are provided in Supplementary Table 2.



Supplementary Figure 4. Time necessary to get to the peak analgesic response. The time (min) to reach maximal analgesic response was plotted as a function of dose (nmoles) for (A) WIN 55,212-2 or (THC). Only the doses that induced a significant response as compared to vehicles were considered (see Figure 1).

Supplementary Table 1. Summary of agonist treatment groups for experimental procedures.

Doses, compositions and volumes of the injected treatments are indicated in the table.

Part I. Agonist experiments			
Agonists	Dose (nmoles)	% DMSO/ethanol and Cremophor	Volume per rat (μL, i.t.)
WIN 55, 212-2	0.2- 60	5% DMSO, 5% Cremophor	30
Δ ⁹ -tetrahydrocannabinol (THC)	95-480	15% ethanol, 7.5% Cremophor	30
	725	24% ethanol, 7.5% Cremophor	30
	955	31.7 % ethanol, 7.5% Cremophor	30
Cannabidiol (CBD)	95-480	15% ethanol, 7.5% Cremophor	30
	725	24% ethanol, 7.5% Cremophor	30
	955	31.7 % ethanol, 7.5% Cremophor	30
THC:CBD mixture (1 :1)	95-480 (nmoles of THC)	31.3 % ethanol, 7.5% Cremophor	30
	725 (nmoles of THC)	48 % ethanol, 7.5% Cremophor	30
Cannabis extract (1 :1.45)	30-250 (nmoles of THC)	11.6 % ethanol, 7.5% Cremophor	30
	480-725 (nmoles of THC)	27 % ethanol, 7.5% Cremophor	30

Supplementary Table 2. Summary of antagonist treatment groups for experimental procedures.

Doses, compositions and volumes of the injected treatments are indicated in the table.

Part II. Antagonist experiments			
Antagonists	Dose (nmoles)	% DMF/ethanol and Cremophor	Volume per rat (μL, i.t.)
Capsazepine	12.5	1.25% ethanol, 5% Cremophor	20
	25	2.5 % ethanol, 5% Cremophor	20
	50	5 % ethanol, 5% Cremophor	20
AM630	10	2.5% DMF, 5% Cremophor	20
	20	5 % DMF, 5% Cremophor	20
AM251	10	2.5% ethanol, 5% Cremophor	20
	20	5% ethanol, 5% Cremophor	20

Supplementary Table 3. Effect of vehicle treatments used in antagonism experiments on mechanical paw withdrawal thresholds in STZ rats.

Treatments	Paw Withdrawal Threshold (g)	
	Mean	SEM
STZ (n=6)	3.14 °	0.12
Vh _{Ant} (2.5% DMF) + Vh _{Treat} (5% DMSO) (n=5)	3.10	0.03
Vh _{Ant} (5% Ethanol) + Vh _{Treat} (5% DMSO) (n=5)	3.19	0.03
Vh _{Ant} (5% DMF) + Vh _{Treat} (24 % Ethanol) (n=6)	3.04	0.02
Vh _{Ant} (5% Ethanol) + Vh _{Treat} (24 % Ethanol) (n=6)	3.18	0.06
Vh _{Ant} (5% DMF) + Vh _{Treat} (31.7 % Ethanol) (n=6)	3.04	0.02
Vh _{Ant} (5% Ethanol) + Vh _{Treat} (31.7 % Ethanol) (n=6)	3.24	0.03

° p=0.13, One-way anova STZ vs vehicles

Baseline measurement of mechanical sensitivity were taken 1 week following the injection of Streptozotocin (STZ, 50 mg·kg⁻¹ per injection, n=6). Rats then received i.t. injections of vehicle for different antagonists (Vh_{Ant}) and 30 min later the vehicle for different active treatments (Vh_{Treat}). Mechanical thresholds were assessed every 15 min after Vh_{Treat} administration. The mean withdrawal threshold value (± SEM) was calculated for each vehicle pair and compared to the mean value of STZ rats. Statistical significance of vehicle induced changes in mechanical allodynia as compared to non-injected STZ rats was evaluated by one-way ANOVA, which showed no effect of treatment.

6 Chapitre 6 : Discussion

Les travaux inclus dans cette thèse avaient comme but, d'une part, de mieux comprendre la relation entre les profils signalétiques des agonistes opioïdes et leurs effets indésirables observés en clinique et, d'autre part, de caractériser les propriétés analgésiques des phytocannabinoïdes et les cibles pharmacodynamiques impliquées dans cette réponse.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons dans un premier temps développé une méthode basée sur l'utilisation de l'apprentissage non supervisé par clustering qui permet de classifier les ligands du récepteur MOR humain en des catégories pharmacodynamiques qui contemplent une panoplie de signaux. Cette classification s'est faite à l'aide des paramètres $\text{Log}(\tau)$ - Emax - $\text{Log}(\tau/K_A)$. Nous avons par la suite pu associer ces différentes catégories pharmacodynamiques avec différentes fréquences de rapport d'effets indésirables d'opioïdes cliniques au programme de pharmacovigilance de la FDA. Nous avons par ailleurs appliqué l'analyse de clustering à d'autres types et sous-types de RCPG afin de démontrer, dans un premier temps, que cet outil pouvait permettre de comparer les profils signalétiques entre différents sous-types de récepteurs (MOR et DOR de rat et d'humain) ; et, dans un second temps, qu'il était possible d'associer les catégories pharmacodynamiques à des effets indésirables d'un autre type de RCPG que le MOR (récepteur β_2 -adrénergique qui est couplé à la protéine $G\alpha_s$). Nous avons ainsi pu corréler les catégories pharmacodynamiques des agonistes du β_2 -adrénergique avec des effets sympatholytiques rapportés pour ces derniers (il n'existe pas d'agonistes du DOR en clinique et nous n'avons donc pas pu faire de corrélations pour ce récepteur).

Dans un second temps, nous avons démontré que des agonistes cannabinoïdes avaient des effets anti-allodyniques dans un modèle de neuropathie diabétique chez les rats. Les effets analgésiques du THC étaient différents entre son administration sous forme pure, sous forme d'un mélange THC:CBD (1 :1) ou sous forme d'un extrait de cannabis de chémotype II. De plus, ces différents traitements engageaient les cibles CB1R, CB2R et TRPV1 de façon distincte selon les cannabinoïdes et les doses et testés.

Ensemble ces travaux apportent des éléments pertinents pour le processus de criblage de nouveaux opioïdes avec un profil d'effets secondaires plus tolérable, et pour la caractérisation plus efficace d'analgésiques cannabinoïdes pour le traitement des douleurs chroniques.

6.1 La sélectivité fonctionnelle des agonistes du MOR

Dans notre première étude (article II), nous avons caractérisé les réponses de 25 agonistes du MOR à travers 10 voies de signalisation qui monitorent l'activation des protéines G ($G\alpha_{i1}$ $G\alpha_{i2}$, $G_{\alpha o}$, Kir3 et AMPc) et le recrutement de β -arrestines (β -arrestine 1, β -arrestine 2 en présence ou absence de GRK2, 5 et 6) par méthode de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*). Nous avons ensuite analysé les courbes dose-réponse générées afin d'extraire les paramètres logistiques E_{max} , EC_{50} et les paramètres opérationnels $\text{Log}(\tau)$ et $\text{Log}(\tau/K_A)$. En utilisant la combinaison de paramètres E_{max} - $\text{Log}(\tau)$ - $\text{Log}(\tau/K_A)$, nous avons appliqué une méthode d'apprentissage non supervisée de clustering par *k-means* afin de générer trois clusters qui permettent de distinguer les différents ligands selon leurs similarités de signalisation pour les 10 voies testées. Nous avons trouvé que la classification des agonistes du MOR était principalement médiée par une diversité dans les réponses de β -arrestines, mais que les réponses médiées par les protéines G avaient également contribué à la classification. Les paramètres d'efficacité E_{max} et τ avaient le plus de poids dans la ségrégation des agonistes comparativement au $\text{Log}(\tau/K_A)$. La méthode de clustering décrite dans nos recherches est donc basée non seulement sur le type, mais également sur la magnitude des réponses. Elle permet ainsi d'apprécier les préférences signalétiques des agonistes du MOR de façon multidimensionnelle.

6.1.1 Les clusters pharmacodynamiques peuvent être corrélés avec les effets indésirables des opioïdes

Des études initiales de souris KO de β -arrestines 2 ont observé que ces souris avaient une analgésie augmentée après injection de morphine et présentaient des effets de dépression respiratoire et de constipation grandement diminués (247, 262). Ces observations ont mené à l'hypothèse que les mécanismes dépendants de la β -arrestine 2 seraient responsables des effets indésirables des opioïdes. Exploitant la sélectivité fonctionnelle des agonistes du MOR, des recherches poussées furent menées afin de développer des agonistes dits « biaisés » qui ne recruteraient pas ou très faiblement la β -arrestines 2 et qui activeraient préférentiellement les protéines G. L'olicéridine (TRV 130), PZM21 (PZM) et SR-17018 (SR) représentent les exemples les plus notables de ligands opioïdes avec un biais rapporté pour les protéines G (239, 308, 311).

Étant donné que, dans notre étude, les clusters pharmacodynamiques des agonistes du MOR dépendent de leur diversité de signalisation à travers les réponses médiées par les protéines G et par les β -arrestines, nous nous sommes intéressés à voir si ces clusters pouvaient nous informer sur les potentiels effets indésirables cliniques des opioïdes. En particulier, nous nous sommes intéressés aux 6 opioïdes de prescription : morphine, oxycodone, fentanyl, buprénorphine, lopéramide et tramadol. Nous avons ainsi trouvé une association entre la position de ces derniers dans la matrice de similarité signalétique $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} - $\text{Log}(\tau/K_A)$ et les fréquences de rapport d'effets GI, de dépression respiratoire et de somnolence, tous des effets indésirables typiques de la thérapie aux opioïdes. Comme les paramètres E_{max} et $\text{Log}(\tau)$ jouaient un rôle plus important dans le clustering des agonistes, nous nous sommes ensuite demandé si des clusters générés seulement avec ces paramètres pouvaient également être associés à des effets indésirables. De façon intéressante, nous avons trouvé que non seulement les corrélations précédemment obtenues avec les paramètres $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} - $\text{Log}(\tau/K_A)$ étaient conservées, mais qu'il y avait en plus davantage d'associations avec d'autres effets indésirables. Ceci suggère que même si l'affinité fonctionnelle apportée par le coefficient de transduction $\text{Log}(\tau/K_A)$ permet une meilleure distinction entre les agonistes, cette dernière agit comme un facteur confusionnel lorsqu'on essaye de corrélérer les clusters avec les effets indésirables. Un autre argument en faveur de cette conclusion est que lorsque les paramètres $\text{Log}(\tau)$ - E_{max} sont utilisés pour générer des clusters définis uniquement par des réponses β -arrestines ou uniquement par des réponses protéines G, les deux types de réponses étaient corrélées avec la fréquence de rapport de fécalome; à l'inverse, lorsque le paramètre $\text{Log}(\tau/K_A)$ était introduit, la corrélation entre les réponses protéines G et le fécalome était perdue. Cette perte d'association était due au fait que la buprénorphine, un agoniste du MOR avec une efficacité très partielle à activer les réponses des protéines G et une fréquence de rapports de fécalome basse, avait un coefficient $\text{Log}(\tau/K_A)$ similaire à celui d'agonistes hautement efficaces tels que le fentanyl qui, eux, avaient une fréquence de rapports de fécalome élevée. La buprénorphine a une très forte affinité pour le MOR (529) et le coefficient de transduction $\text{Log}(\tau/K_A)$ n'a donc pas pu distinguer entre cet agoniste à basse efficacité-haute affinité et des agonistes plus efficaces. Nous avons d'ailleurs trouvé que les valeurs de $\text{Log}(\tau/K_A)$ des agonistes du MOR corrélaient fortement avec celles des valeurs de puissance (EC_{50}), ce qui expliquerait la confusion entre ces agonistes avec des efficacités de signalisation aussi différentes. Ceci était également le cas pour les effets respiratoires et de somnolence (données non publiées, voir Annexe I). De façon similaire,

lorsque nous avons utilisé l'essai d'inhibition aiguë de la contractilité de l'iléon (une réponse qui est médiée par une signalisation dépendante des protéines G des MOR du plexus digestif, voir section 1.2.3.2.2), les fréquences de rapports de fécalome ont de nouveau pu être corrélées avec les $\text{Log}(\tau)$, mais pas avec les $\text{Log}(\tau/K_A)$ de l'inhibition de contractilité de l'iléon.

Ces observations démontrent donc que l'utilisation du $\text{Log}(\tau/K_A)$ tel que proposé par les Dr. Kenakin et Christopoulos est un facteur confusionnel qui diminue le pouvoir prédictif de notre modèle. Ce paramètre consolide à la fois l'information reliée à l'efficacité des agonistes (τ) et celle associée à l'affinité (K_A). Or, K_A est une mesure d'affinité conditionnelle calculée à partir de l'ajustement des courbes dose-réponse et ne tient pas en compte de l'affinité de liaison du ligand au récepteur. Cette utilisation du modèle opérationnel avec K_A est controversée et a également été remise en question par d'autres auteurs tels que les Dr. Rajagopal, Costa et Onaran (304). Ces derniers proposent plutôt de dériver les valeurs de K_A en utilisant les valeurs de K_i déterminées pour chaque ligand par des expériences de radio-liaison (300, 304, 305). Néanmoins, lorsque nous avons essayé d'utiliser les données d'affinité K_i pour nos différents ligands, nous n'avons pas obtenu un ajustement adéquat des courbes dose-réponse des agonistes. Il y avait un décalage entre les courbes ajustées en fixant les valeurs de K_A à celles de K_i et les données expérimentales réelles (Données non publiées, voir Annexe II). C'est pourquoi nous avons décidé de ne pas utiliser le modèle opérationnel tel que proposé par les Dr. Rajagopal, Costa et Onaran (304) mais plutôt celui proposé par les Dr. Kenakin et Christopoulos qui permettait de mieux caractériser l'ensemble des données expérimentales de l'étude. Il est toutefois important de garder en tête les limitations d'un point de vue pharmacologique de ce modèle : avoir un paramètre $\text{Log}(\tau/K_A)$ qui décrit un agoniste sans pouvoir discriminer entre son efficacité et son affinité est un paramètre limité. Cette faiblesse devient évidente dans le cas des agonistes à basse efficacité-haute affinité, telle que la buprénorphine, pour lesquels le $\text{Log}(\tau/K_A)$ devient un paramètre confusionnel qui ne permet pas de distinguer entre les agonistes à basse efficacité-haute affinité et les agonistes à haute efficacité, tel que discuté plus haut.

6.1.1.1 Les coefficients de transduction $\text{Log}(\tau/K_A)$ ne sont pas des outils fiables pour la quantification du biais et la prédiction des effets indésirables des agonistes du MOR

Comme discuté ci-dessus, nous avons démontré que l'utilisation des facteurs de transduction $\text{Log}(\tau/K_A)$ était un facteur confusionnel pour une bonne corrélation des clusters avec les effets indésirables des opioïdes. Or la méthode la plus acceptée et la plus couramment utilisée pour la détection et la quantification du biais pour le MOR repose sur le calcul de $\Delta\Delta\text{Log}(\tau/K_A)$ (303) (voir section 1.2.4.2). L'avantage proposé de ce modèle est la possibilité de contrecarrer les effets qui dépendent du système biologique utilisé (tels que la quantité de récepteurs, d'effecteurs ou de protéines de régulations qui peuvent différer d'un système cellulaire à l'autre) en normalisant les $\text{Log}(\tau/K_A)$ des différents agonistes relativement à un agoniste de référence (299, 303). Cette méthode n'est cependant pas très pratique en présence de facteurs confusionnels tels que différentes cinétiques de liaison du ligand (530) (comme pour la buprénorphine) ou lorsqu'il existe des différences d'amplification entre les deux systèmes mesurés (317, 461). Ceci est particulièrement vrai dans les analyses de biais des agonistes du MOR qui comparent des essais d'activation de protéines G à ceux de recrutement de β -arrestines, et où l'on compare un système hautement amplifié avec un système faiblement amplifié.

Un facteur confusionnel fréquent qui empêche la mesure adéquate des efficacités pour les voies amplifiées telles que les protéines G est la présence de récepteurs de réserve (531). Des agonistes vont alors produire une réponse complète alors que seulement une fraction des récepteurs disponibles sont occupés. Ceci est dû au fait que le système de protéine G soit un système amplifié où un seul récepteur activé peut catalyser l'activation de protéines G menant à la modulation en aval de plusieurs effecteurs et seconds messagers pour induire l'effet désiré (461). À ceci se rajoute le fait que le réservoir d'effecteurs est plus limité que celui des récepteurs (surtout dans des systèmes de surexpression des récepteurs) ce qui entraîne une saturation de l'effet (461). Dû à cette haute expression des récepteurs et à une amplification du système de signalisation, il y aura une apparition d'un « effet plafond » où la plupart des agonistes atteignent la même réponse maximale quelles que soient leurs efficacités intrinsèques réelles (461, 521, 531). Dans ces conditions, il devient impossible de connaître les efficacités relatives des agonistes. Ceci expliquerait pourquoi dans notre étude, les réponses d'accumulation d'AMPC n'ont pas significativement contribué à la ségrégation des agonistes du MOR en contraste avec les réponses β -arrestines qui étaient capables

de distinguer les différentes efficacités des agonistes. Par ailleurs, même si les agonistes n'ont pas encore complètement atteint l'effet maximal du système, des petites erreurs dans l'ajustement des courbes doses-réponse peuvent produire de grandes erreurs dans l'estimation des efficacités opérationnelles et mener à des estimations de biais faussées (461, 462). Or il est à noter que dans toutes les études décrivant les principaux agonistes présumés biaisés du MOR (239, 308, 311), les essais d'accumulation d'AMPc et de liaison de GTP γ S (guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate) étaient utilisés pour décrire et quantifier les réponses reliées à l'activation des protéines G. Ces deux essais présentent des effets plafonds (532) et ne sont donc pas de bons outils pour quantifier l'agonisme biaisé. Une solution pour corriger cette haute amplification de système est de diminuer le nombre de récepteurs réserves par leur inactivation irréversible à l'aide d'antagonistes irréversibles. Ceci va réduire l'effet maximal des agonistes au-dessous de l'effet plafond de l'essai et permettra la distinction et la quantification des efficacités intrinsèques réelles des agonistes (531, 532). Par ailleurs, le développement récent de nanocorps sélectifs (31) et de protéines G solubles miniatures (533) a démontré qu'il était possible d'étudier l'activation et le recrutement des protéines G avec des niveaux d'amplification similaires à ceux des essais de β -arrestines (317).

Pour ce qui est des réponses médiées par les β -arrestines, il n'y a pas d'étape d'amplification entre le récepteur et l'effet quantifié puisque l'effet désiré est la formation du complexe récepteur- β -arrestine. De plus, les essais de β -arrestines peuvent avoir un seuil de détection dynamique limité ce qui aboutit à un « effet plancher » voulant dire que des agonistes qui ont des efficacités au-dessous d'un certain seuil ne donneront pas de réponses détectables (461, 521). De ce fait, des agonistes de basse efficacité vont produire des réponses très petites ce qui rend la quantification de l'effet difficile et l'exactitude de l'ajustement des courbes dose-réponse diminue rapidement. Or, les estimations du modèle opérationnel dépendent entièrement des processus d'ajustement de courbes ; il faut donc faire preuve de prudence lorsqu'on génère des estimés d'agonisme biaisé avec des réponses aussi basses (301, 461, 521). Une façon de contourner ces limitations consiste à augmenter l'amplification du signal, comme nous l'avons fait dans notre étude, en surexprimant les GRK afin de permettre à la plupart des agonistes de produire des réponses quantifiables. Ceci permet aussi de tenir en compte le fait que les cellules HEK293 (qui sont souvent utilisées pour quantifier les réponses signalétiques des agonistes du MOR) ont des niveaux d'expression de GRK endogènes plus bas que ceux des neurones (534). Ceci pourrait entraîner une sous-estimation du recrutement réel de β -arrestines engendré par les agonistes du MOR dans les neurones sensoriels.

À titre d'exemple, les agonistes du cluster 2 dans notre étude étaient des agonistes partiels au niveau des protéines G et avaient des réponses mesurables pour les β -arrestines seulement lorsqu'on surexprimait les GRK. Ceci suggère qu'une absence observée de réponses β -arrestines pourrait être due à une faible efficacité des agonistes à activer le récepteur et non à une signalisation biaisée. À ce propos, dans des essais où les facteurs confusionnels d'amplifications ont été corrigés (par exemple par l'utilisation de mini protéines G, l'inactivation des récepteurs ou la surexpression des GRK), les composés PZM, olicéridine et SR n'étaient pas significativement biaisés vers la signalisation des protéines G par rapport à la β -arrestine (316, 317, 535). De façon intéressante, lorsque le biais était calculé en utilisant seulement les GRK endogènes du système cellulaire (HEK293), les profils de biais étaient différents. Bien que non significatifs, maintenant l'olicéridine et PZM présentaient une tendance de biais vers les voies d'activation de la protéine G. Ceci démontre que l'identification précédente d'un agonisme biaisé pour les agonistes du MOR était fortement influencée par des paramètres du système et n'était pas due à de nouvelles caractéristiques des ligands.

6.1.1.2 Les facteurs de biais ne corréleront pas avec l'incidence des effets indésirables

Nous avons calculé les $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ entre différentes combinaisons des voies de protéines G vs β -arrestines (données non publiées, voir Excel « matériel complémentaire ») et nous n'avons pas pu établir d'associations entre ces derniers et les fréquences de rapports des effets respiratoires, gastro-intestinaux et de somnolence que nous avons précédemment pu établir avec la matrice signalétique. Ces données suggèrent que le biais tel que mesuré par les facteurs de biais ($10^{\Delta\Delta\log(\tau/K_A)}$) n'est pas indicatif des effets indésirables des opioïdes. Dans le même ordre d'idées, les agonistes présumés « biaisés » vers la protéine G par rapport à la β -arrestine induisaient tout de même des effets indésirables (252, 536). En effet, dans les modèles précliniques, contrairement aux données initiales, l'administration d'olicéridine et de PZM a été associée à des effets de constipation, de dépression respiratoire, de tolérance analgésique, de dépendance physique et d'effets de renforcement (252, 316, 317). En clinique, l'olicéridine induisait de la constipation et de la dépression respiratoire, bien qu'elle eût une fenêtre thérapeutique légèrement améliorée comparativement à celle de la morphine (314, 537, 538).

Schmid et al. ont suggéré que la simple observation d'un biais n'était pas assez pour prédire la fenêtre thérapeutique d'un composé, mais que le degré du biais était aussi crucial (239). Ainsi, plus le facteur de biais est élevé pour la voie de la protéine G et plus la fenêtre thérapeutique serait grande. Ils ont généré une série de composés dérivés de la pipéridine dont le SR-17018 (SR) qui est le composé qui était décrit comme ayant le biais le plus élevé vers la protéine G. Les facteurs de biais du SR étaient associés à une fenêtre thérapeutique plus large que la morphine où le SR produisait très peu de dépression respiratoire. Une étude subséquente a néanmoins trouvé que ce dernier entraînait une dépression respiratoire significative (bien que l'effet fût moindre en comparaison à la morphine ou le fentanyl) et que les facteurs de biais n'étaient pas prédictifs de sa fenêtre thérapeutique (317). Ces données contradictoires sont dues aux défis associés avec la quantification des $\text{Log}(\tau/K_A)$ discutés plus haut (section 6.1.1.1) et qui n'ont pas été adressés par Schmid et al (239). En effet, ces derniers ont trouvé que le fentanyl, un agoniste du MOR responsable d'un grand nombre de surdoses létales par dépression respiratoire (539), était biaisé vers la β -arrestine 2 (par rapport à la protéine G) et que cela expliquerait sa tendance à induire des dépressions respiratoires sévères (239). Cependant, les modèles récents des souris KO en β -arrestines 2 et des souris knock-in des récepteurs MOR mutés, ont montré que le fentanyl induisait tout de même de la dépression respiratoire chez ces animaux (248, 249). De plus, nos données de BRET de cette présente étude (article II) démontrent que le fentanyl n'est pas un agoniste biaisé vers la β -arrestine 2. Une analyse plus minutieuse des données de Schmid et al. Montre que le fentanyl révélait un biais vers la β -arrestines 2 seulement lorsque le recrutement de β -arrestines était comparé avec l'essai de liaison au $\text{GTP}\gamma\text{S}$, mais pas lorsque l'inhibition de l'AMPc était utilisée comme signal d'activation de la protéine G. Ceci est contradictoire avec des études précédentes qui ont montré que le fentanyl n'avait pas de biais entre le recrutement de β -arrestines et la liaison au $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (540, 541). Une autre explication pour les données faussées de Schmid et al. Est que les essais de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ et de β -arrestine 2 étaient réalisés sur différents systèmes biologiques (membranes de cellules CHO vs cellules U2OS respectivement). Or, comme discuté dans l'article I, des variations importantes au niveau de la magnitude, mais également au niveau de la direction du biais sont observées entre différentes lignées cellulaires (463). Le degré de biais que Schmid et al. ont associé à la fenêtre thérapeutique des composés SR était donc probablement une conséquence des conditions expérimentales et du système biologique utilisé. Ceci souligne l'importance d'utiliser des méthodes rigoureuses pour la détermination de l'agonisme biaisé. À ce

propos, notre méthode de classification pharmacodynamique discutée dans cette thèse pourrait être une bonne alternative au calcul du biais puisqu'elle permet de prendre en compte les préférences signalétiques des agonistes de façon multidimensionnelle, contrairement aux comparaisons dichotomiques des facteurs de biais. Elle a aussi pour avantage d'être moins susceptible d'être influencée par des paramètres propres au contexte cellulaire puisqu'elle utilise des mesures de changements conformationnels entre les différents partenaires signalétiques (voir article I).

6.1.2 Les réponses médiées par les β -arrestines ne sont pas essentielles pour les effets indésirables des agonistes du MOR

Nos observations que les deux types de réponses médiées par les protéines G et par les β -arrestines sont associés à la fréquence de rapport des effets GI, respiratoires et de somnolence suggèrent qu'il n'y a pas de distinction entre les voies des protéines G et des β -arrestines dans l'association avec les effets indésirables des opioïdes. Ceci ne soutient pas l'hypothèse initiale que seulement la β -arrestine 2 serait responsable des effets indésirables des opioïdes (qui a été formulée après des observations de Raehal et. Al chez des souris KO en β -arrestine 2) (247). Conformément à nos résultats, cette hypothèse a aussi récemment été remise en question par des modèles génétiques qui démontrent que la constipation et la dépression respiratoire du fentanyl et de la morphine persistent chez des souris knock-in exprimant des récepteurs MOR dont tous les sites de phosphorylation du C-terminal étaient mutés en Alanine (et qui ne peuvent donc ni être phosphorylés, ni recruter de β -arrestine 2) (249). Par ailleurs, les résultats de Raehal et. Al (247) n'ont pas pu être reproduits par plusieurs laboratoires indépendants chez des souris KO en β -arrestine 2 (248, 252). De plus, il n'y a pas d'évidences physiologiques directes démontrant que la β -arrestine 2 est responsable des effets indésirables des opioïdes. Enfin, comme discuté dans la section 1.2.3.2, de nombreuses évidences démontrent un rôle primordial d'une signalisation dépendante des protéines G dans les mécanismes de dépression respiratoire et de constipation, parmi d'autres (236, 243-245, 251). Ensemble, ces données sèment un doute sur la plausibilité qu'un biais vers les protéines G par rapport à la β -arrestine soit une stratégie efficace pour le développement d'agonistes du MOR plus sécuritaires et tolérables.

6.1.3 La basse efficacité intrinsèque des agonistes du MOR et non l'agonisme biaisé est responsable de leur fenêtre thérapeutique améliorée

Dans notre clustering, la ségrégation des agonistes du MOR était principalement dépendante des paramètres d'efficacité. Ainsi, les représentations graphiques des profils des différents ligands ont montré que les réponses maximales reliées aux β -arrestines et aux protéines G diminuaient d'un cluster à l'autre, mais à des étendues différentes. Ainsi, alors que les réponses médiées par les β -arrestines ont graduellement disparu, celles des protéines G ont graduellement diminué, mais sans toutefois disparaître. Comme discuté plus haut, ces deux systèmes ont des niveaux d'amplification différents et une absence de réponses de β -arrestines peut simplement indiquer la présence d'un faible agonisme partiel et non pas celle d'un biais. Par ailleurs, des études utilisant des systèmes non amplifiés ont confirmé que, contrairement à ce qui était initialement décrit, les principaux agonistes « biaisés » olicéridine, PZM et SR étaient en réalité des agonistes partiels du MOR (31, 317, 535). Étant donné que nous avons trouvé que les effets indésirables des opioïdes corrélaient avec les paramètres d'efficacité, nous étions à notre connaissance les premiers à émettre l'hypothèse que les agonistes dits « biaisés » du MOR avaient un profil d'effets indésirables amélioré dû à une faible efficacité à stimuler le récepteur et non pas dû à la présence d'un biais vers les protéines G. Ceci a par la suite été confirmé par les travaux de Gillis et al (317).

Ainsi, dans leur récente étude, Gillis et al (317) ont trouvé que les efficacités intrinsèques de différents agonistes du MOR pour différents essais d'activation des protéines G et de régulation du récepteur (incluant le recrutement de β -arrestines) étaient fortement corrélées. En d'autres termes, les agonistes ne démontraient pas de biais entre les différentes réponses du récepteur testées. Ces agonistes incluaient les trois agonistes dits biaisés, PZM, SR et TRV qui avaient tous une activité similaire au niveau de l'activation des protéines G et du recrutement de β -arrestines 2. L'étude a été menée dans des conditions où les facteurs confusionnels d'amplification de système ont été corrigés comme discuté plus haut (section 6.1.1.1). Dans ces conditions, PZM, SR et TRV avaient des efficacités τ basses comparativement à celle de la morphine, qui était elle-même un agoniste partiel. L'ordre d'efficacité des différents agonistes était en accord avec nos données et était comme suit : DAMGO = fentanyl = méthadone > morphine = oxycodone > olicéridine = PZM21 \geq SR-17018 \geq buprénorphine. Les auteurs ont par la suite démontré qu'il y avait une relation inverse entre l'efficacité τ à activer la voie des protéines G et la fenêtre thérapeutique

observée *in vivo* chez des souris. Ainsi, les composés avec une grande efficacité tels que fentanyl avaient une très petite fenêtre thérapeutique; alors que la buprénorphine, l'agoniste qui avait l'efficacité la plus basse, avait une fenêtre thérapeutique beaucoup plus large. La morphine, qui est moins efficace que le fentanyl et plus efficace que la buprénorphine, avait un profil de sécurité intermédiaire. Ces observations sont en accord avec notre présente étude où nous avons trouvé une association entre une efficacité réduite des agonistes du MOR, dont la buprénorphine, et des fréquences de rapports d'effets indésirables plus petites. Les données d'études cliniques semblent également appuyer ces conclusions. En effet, la buprénorphine a un effet « plateau » de dépression respiratoire (elle n'induit pas d'effets additionnels au-delà des doses thérapeutiques (242)) et est impliquée dans moins de surdoses mortelles que celles des autres opioïdes (542). Cet effet « plateau » a été attribué à sa faible efficacité intrinsèque à activer le MOR. Cet agonisme partiel ne semble néanmoins pas affecter l'efficacité analgésique de la buprénorphine puisqu'une récente méta-analyse comparant 24 études cliniques a conclu que cette dernière induisait une analgésie équivalente ou supérieure à celle de la morphine, du fentanyl et de l'oxycodone dans 23 sur les 24 études considérées, incluant pour des douleurs sévères (543). Par ailleurs, le meptazinol, un autre agoniste à faible efficacité appartenant au même cluster que la buprénorphine dans notre étude, a été rapporté comme entraînant moins de dépression respiratoire (sauf, pour des raisons méconnues, lorsqu'il est utilisé chez des patients anesthésiés et en préopératoire), d'inhibition de la motilité gastro-intestinale et de potentiel d'abus que la morphine (209-211). Ce dernier n'a pas été pris en compte dans les corrélations avec les effets indésirables car ce n'est pas un médicament approuvé par la FDA (voir section 1.2.2.1.9), mais ceci vient encore une fois appuyer le fait que les clusters pharmacodynamiques basés sur les paramètres d'efficacité peuvent être de bons prédicteurs des effets indésirables des agonistes du MOR.

Enfin, Gillis et.al (317) ont rapporté que les agonistes du MOR « supposés biaisés » avaient des efficacités τ et des fenêtres thérapeutiques y associées qui se situaient entre celles de la morphine et de la buprénorphine. De plus, similairement à nos résultats (voir Excel « matériel complémentaire »), l'utilisation des facteurs de biais calculés entre les voies des protéines G et des β -arrestines 2 n'a pas pu prédire les fenêtres thérapeutiques d'aucun des agonistes utilisés. De ce fait, conformément à notre hypothèse énoncée plus haut, le profil amélioré d'effets indésirables des agonistes présumés « biaisés » serait donc bien dû à leur basse efficacité τ à activer le MOR et non à un biais vers les protéines G.

6.2 Les clusters signalétiques et structurels donnent des informations complémentaires sur les effets indésirables des agonistes du MOR

Les données structurelles sont souvent utilisées pour classifier les différents candidats-médicaments et pour essayer de prédire la réponse thérapeutique et les effets indésirables y associés (544). Des modifications dans la structure chimique d'un composé de référence permettent de changer les propriétés pharmacocinétiques de ce dernier et de moduler ses effets pharmacodynamiques (545). Par exemple, la molécule d'héroïne consiste en un ajout de deux groupements acétyles à la molécule initiale de morphine; ce changement permet à la molécule d'héroïne de pénétrer plus rapidement à travers la barrière hématoencéphalique et donc d'avoir un effet plus rapide que la morphine (546). Cela lui donne également un potentiel d'abus plus élevé (546). Dans notre étude, nous avons classifié les agonistes du MOR selon la similarité de leurs structures chimiques. Les clusters obtenus étaient assez différents de ceux obtenus avec la matrice de similarité signalétique. De façon similaire, les clusters structurels ont corrélé avec des effets indésirables différents de ceux obtenus avec les clusters pharmacodynamiques. Comme la pharmacocinétique des ligands est en partie déterminée par leur structure chimique, il n'est pas surprenant que les clusters structurels fussent principalement associés avec des fluctuations dans les effets du médicament et des symptômes de manque. De façon intéressante, nous avons également obtenu des corrélations entre l'effet indésirable de prurit, un effet commun de la thérapie aux opioïdes (547), et les clusters structurels (mais pas avec les clusters signalétiques). Ceci pourrait être dû à la contribution du récepteur aux opiacés atypique MRGPRX2 comme facteur confusionnel. En effet, il a été montré que ce récepteur, qui n'a pas été testé dans notre étude, pouvait être impliqué dans les effets de prurit de la morphine et des analgésiques avec une structure similaire (alors que les opioïdes n'ayant pas d'activité sur ce récepteur n'engendrent pas de prurit) (548, 549). Les informations de similarité de structures chimiques utilisées dans notre étude pourraient donc être en train de capturer l'affinité des ligands pour cette cible secondaire (*off target*). Ensemble, ces observations suggèrent que les structures chimiques et les profils signalétiques apportent des informations complémentaires. Il serait donc plus pertinent d'utiliser ces deux types de données afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble des potentiels effets indésirables d'un composé d'intérêt et de développer des outils prédictifs plus sensibles.

Dans le même ordre d'idée, il y a eu dans les dernières années une tendance à vouloir aller au-delà des simples informations structurelles et à les compléter avec les données des cibles moléculaires et des voies de signalisation impliquées dans les effets indésirables d'intérêt (550). Ces cibles et voies de signalisation peuvent être identifiées à partir de données expérimentales connues ou bien à partir de prédictions *in silico* (551-553). Ces nouvelles méthodologies de regroupement basées sur les réseaux d'interaction hors cible (*off target*) ont pour avantage de pouvoir révéler des potentielles associations insoupçonnées entre l'effet indésirable et différentes autres entités telles que des petites molécules, des protéines et des voies de signalisation (550). Elles peuvent alors permettre de générer des hypothèses mécanistiques pour ces effets d'intérêt. Par exemple, tel que mentionné dans la section 1.1.3.1.1.2, il existe également une signalisation indépendante des protéines G et des β -arrestines des récepteurs opioïdes et il serait intéressant d'appliquer ces méthodes afin de voir si des associations additionnelles peuvent être obtenues entre cette signalisation et les effets indésirables des opioïdes.

6.3 Le contenu en THC et les ratios THC:CBD ne décrivent pas l'activité biologique des cannabinoïdes dans un modèle de douleur chronique neuropathique

Bien qu'ils soient la première ligne de traitement pour les douleurs aiguës sévères, les effets indésirables des agonistes du MOR compliquent leur utilisation pour traiter les douleurs chroniques. De plus leur efficacité pour le soulagement des douleurs chroniques non cancéreuses, telles que les douleurs neuropathiques, fait face à des incertitudes considérables (112). C'est pourquoi, nous nous sommes également intéressés dans cette thèse à caractériser les effets analgésiques des agonistes cannabinoïdes qui seraient des candidats prometteurs pour le soulagement des douleurs chroniques, et en particulier des douleurs neuropathiques (61, 371, 373).

Le cannabis médical désigne des médicaments à base de *Cannabis Sativa* qui sont approuvés par les autorités régulatrices et qui ont des contenus de THC et des ratios THC:CBD standardisés. Des exemple types de ces médicaments sont le THC synthétique (nabilone), et le Sativex (nabiximols) qui est un extrait de cannabis dont les principaux constituants sont le THC et le CBD à ratio $\approx 1 : 1$ (441). Les lois régulant le cannabis médical sont basées sur la présomption

que les quantités de THC (considéré comme étant le principal composant analgésique de la plante) et les ratios THC:CBD permettraient de prédire l'activité biologique (les effets thérapeutiques et les effets indésirables) de ces produits naturels (445, 446) (voir section 1.3.3.3.1). Nous avons donc testé dans notre deuxième étude (article III) si la composition en THC et en ratio THC:CBD d'un extrait de cannabis était bien prédictive de son effet analgésique *in vivo*. Pour ce faire, nous avons caractérisé les effets analgésiques des cannabinoïdes purs THC et CBD, d'une combinaison THC:CBD à ratio (1 :1) et d'un extrait de cannabis de chémotype II (avec un ratio THC:CBD \approx 1 :1). Nous avons utilisé un modèle de douleur neuropathique chez des rats (la neuropathie diabétique étant la forme de neuropathie la plus répandue dans la population) et avons comparé l'efficacité des différents traitements à réduire l'allodynie mécanique induite. Il est à noter que la neuropathie diabétique chez les rats STZ peut également être associée à l'apparition d'hyperalgésie mécanique et thermique ainsi que d'allodynie thermique (554, 555). Nous avons choisi d'étudier l'allodynie mécanique car c'est un modèle que nous avons optimisé dans le laboratoire et qui nous a permis de distinguer les propriétés analgésiques de différents agonistes du DOR (522). De plus, de nombreuses évidences dans la littérature démontrent une implication des cibles cannabinoïdes d'intérêt de notre étude (à savoir : CB1, CB2 et TRPV1. Voir section 6.4 plus bas) pour le soulagement de l'allodynie mécanique en neuropathie diabétique (155, 156, 360, 419, 499).

Nous avons trouvé que tous les traitements soulageaient de façon significative la douleur, mais qu'ils différaient en termes de puissances, d'efficacités et de cinétiques temporelles. Ainsi, le THC avait une courbe dose-réponse biphasique avec un effet analgésique significatif à partir de 180 nmoles alors que l'effet du CBD était significatif à des doses quatre fois plus élevées. De même, l'effet anti-allodynique du mélange THC:CBD à ratio 1 :1 apparaît à des doses plus élevées que celles du THC seul, suggérant que l'ajout de CBD interfère avec l'analgésie du THC aux basses doses. A l'inverse, aux plus hautes doses testées, l'effet analgésique de la combinaison THC:CBD était supérieur à celui de THC ou du CBD seuls et suggérait une interaction additive entre les deux cannabinoïdes. Il a été montré que l'influence du CBD sur les effets comportementaux et analgésiques du THC varie selon l'effet en question et dépend de nombreux facteurs tels que l'espèce, le mode d'administration, la durée d'administration et les ratios de cannabinoïdes utilisés (379, 413, 436). La plupart des études précliniques ont été menées sur des modèles de douleur aiguë et ont démontré que des doses moyennes à élevées de CBD pouvaient augmenter le potentiel analgésique du THC, alors que des doses plus basses et inefficaces de CBD ne le faisaient pas (556-

558). Très peu d'études ont examiné l'interaction entre le THC et le CBD dans un modèle de douleur neuropathique (439, 440). Dans l'une de ces études, de basses doses de la combinaison THC:CBD entraînaient un effet anti-allodynique plus faible que le THC seul dans un modèle de CCI ; alors qu'à de hautes doses, la combinaison avait une réponse plus élevée que le THC seul (440). Notre étude semble donc confirmer les observations des modèles de douleurs aiguës et neuropathiques selon lesquelles de hautes doses de CBD interagiraient avec le THC pour augmenter son activité analgésique.

Nous avons également trouvé que l'extrait de cannabis de chémotype II induisait une réponse analgésique à des doses auxquelles le THC seul, le CBD seul et la combinaison THC:CBD (1 :1) n'avaient pas d'effets (95 nmoles). Il est à noter qu'il existe une légère différence de ratio THC:CBD entre l'extrait et la combinaison THC:CBD utilisés (1 :1.45 vs 1:1). Nous ne pensons toutefois pas que les résultats observés soient dus à cette différence de ratios. En effet, nous avons fait une étude pilote comparant les mélanges THC:CBD à ratios (1:1) et (1 :1.45) et les réponses analgésiques des deux traitements étaient superposables (Annexe III). Ensemble ces observations démontrent que l'effet de l'extrait provient de l'interaction de composants autres que le THC et le CBD. À ce propos, l'extrait contient les phytocannabinoïdes mineurs CBN, CBC et CBG. Ces derniers ont des activités variables au niveau des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, des canaux TRP et au niveau d'autres RCPG via lesquels ils ont tous démontré des activités analgésiques dans des modèles précliniques (voir section 1.3.3.2) (383, 408, 422, 425, 427). Par ailleurs, il a été observé que l'administration de CBC pouvait potentialiser la réponse analgésique du THC et que la puissance analgésique du CBG était supérieure à celle du THC (422, 427). CBN, CBC et CBG pourraient donc intervenir dans la réponse analgésique à basses doses de l'extrait que nous avons observée dans notre étude. Cette hypothèse est également appuyée par le fait qu'aux hautes concentrations testées, l'extrait de cannabis (ratio THC:CBD \approx 1 :1) était plus efficace que la combinaison THC:CBD (1 :1). Ceci confirme la possibilité d'une interaction entre THC, CBD et les cannabinoïdes mineurs dans l'effet analgésique de l'extrait, un effet communément appelé « d'entourage » (378). Des observations similaires ont été rapportées dans des modèles murins de douleur neuropathique (382, 523). Par exemple, à des doses équianalgésiques, un extrait de cannabis de chémotype III contenait 20% de moins de THC qu'un extrait de chémotype I (523). Comme ces deux types de chémotypes ont des ratios THC:CBD différents (Figure 13), cette

observation met en évidence l'importance d'autres constituants de la plante que ces deux phytocannabinoïdes dans la réponse analgésique équivalente de ces deux extraits de cannabis.

6.3.1 Une caractérisation plus exhaustive des extraits de cannabis est nécessaire afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique

Ensemble, les résultats discutés ci-dessus démontrent que les contenus en THC et les ratios THC:CBD ne peuvent pas adéquatement prédire les effets biologiques des extraits de cannabis puisque les réponses anti-allodyniques du THC pur, du mélange THC:CBD et de l'extrait ne sont pas équivalentes. Cette conclusion concorde avec des observations comportementales de la consommation de cannabis chez l'humain (67). Ainsi, les souches de *Cannabis Sativa* sont considérées comme étant euphoriques et énergisantes alors que celles du *Cannabis Indica* sont considérées comme étant relaxantes et sédatives. Ces effets distincts ne sont pas dus aux ratios THC:CBD puisque ces derniers ne sont pas significativement différents entre les deux souches de cannabis. Ils seraient donc probablement médiés par différents ratios d'autres phytocannabinoïdes, terpènes et (ou) composants chimiques de la plante (67). Dans le même ordre d'idées, les données cliniques démontrent des différences d'efficacité analgésique entre des traitements avec du THC pur ou avec l'extrait de cannabis Sativex. Ainsi, Sativex a des effets analgésiques démontrés dans le soulagement de certains types de douleurs neuropathiques et de douleurs cancéreuses réfractaires aux opioïdes, alors que l'administration du THC seul dans ces douleurs n'a pas d'effets significatifs ajoutés (61, 66, 68, 379, 442, 559). Ces différentes évidences mettent l'accent sur le fait qu'il soit plus adéquat d'étudier les propriétés pharmacodynamiques des extraits entiers de cannabis (et non pas seulement celles du THC et (ou) du CBD) afin de bien caractériser leurs effets analgésiques. Or, la plupart des études précliniques actuelles utilisent des combinaisons des phytocannabinoïdes THC et de CBD à des ratios définis pour essayer de modéliser les effets d'extraits de cannabis, en particulier celui du Sativex (439, 440). Une meilleure validation préclinique des cannabinoïdes est donc nécessaire afin de bien inférer leurs potentiels effets biologiques.

Par ailleurs, un problème de caractérisation des extraits de cannabis se pose également au niveau clinique. En effet, de nombreuses études cliniques ont montré des effets bénéfiques du cannabis fumé ou vaporisé dans différents types de douleurs chroniques, en particulier neuropathiques (64, 67). Cependant, la majorité de ces études rapportent seulement les pourcentages de THC contenus dans le cannabis administré et ne donnent pas d'informations quant

aux restes des composants de la plante. Ceci est aussi le cas de médicaments régulés et approuvés tels que Sativex dont les ratios THC:CBD sont standardisés ($\approx 1 : 1$), mais dont on ignore la liste et la concentration exacte des autres cannabinoïdes, terpènes et flavonoïdes de l'extrait (379). Ce manque d'information ne permet pas d'évaluer la contribution de ces autres composants aux effets analgésiques des extraits, et ne permet pas de caractériser l'influence de différentes compositions chimiques de l'extrait sur les effets du THC et du CBD pour un type de douleur donné. Ceci soulève la question de savoir si les conclusions des méta-analyses qui ne confèrent pas d'efficacité aux cannabinoïdes à soulager certains types de douleurs (476, 478, 479, 560) sont dues à une réelle inefficacité de ces derniers, ou bien si elles sont dues à une présomption erronée d'équivalence d'activité biologique entre le THC (et/ou le CBD) pur et le THC contenu dans les extraits de cannabis ? En effet, ces méta-analyses qui ne rapportent pas d'effets analgésiques significatifs comparent pour la plupart l'efficacité analgésique du THC et (ou) de ses dérivés et analogues synthétiques (ex : nabilone, dronabinol) et assument que les résultats obtenus reflèteraient le potentiel thérapeutique des médicaments à base de cannabis. À l'inverse, les revues qui ont pris en compte Sativex et des extraits de cannabis entiers ont conféré un effet analgésique à ces derniers (62, 67). De plus, comme discuté plus haut, des pourcentages similaires de THC et (ou) de CBD entre différents extraits de cannabis ne se traduisent pas forcément par des effets biologiques similaires puisque les compositions en autres constituants chimiques (tels que d'autres phytocannabinoïdes et terpènes) peuvent varier. Par exemple, un extrait de cannabis avec un pourcentage de THC donné pourrait ne pas avoir d'effet analgésique pour un type de douleur ; mais un autre extrait avec un chémotype similaire (ratio THC:CBD similaire) lui pourrait en avoir. Par ailleurs, comme discuté dans la section 1.3.4.1.1, des différences d'effets thérapeutiques peuvent apparaître selon le mode d'administration des cannabinoïdes. Pris ensemble, ces facteurs confusionnels peuvent expliquer les résultats mitigés d'efficacité analgésique rapportés pour les traitements cannabinoïdes.

6.4 Les cibles impliquées dans l'analgésie des cannabinoïdes sont recrutées de façon différentielle

Tel que vu dans la section 1.3.4.2.2.1, dans les douleurs neuropathiques, la sensibilisation des neurones afférents primaires et des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière entraîne

une régulation à la hausse des principales cibles du système cannabinoïdes (167-169, 185, 357-360, 495, 506, 512, 518). Les cannabinoïdes peuvent agir sur ces cibles afin de réduire ou supprimer la douleur induite par différentes atteintes au système somato-sensoriel (156, 157, 165, 166, 186, 384, 387, 499, 501, 506). En neuropathie diabétique, il y a une régulation à la hausse significative des récepteurs CB1, CB2 et du canal TRPV1 (499, 519). C'est pourquoi nous sommes intéressés à évaluer l'implication de ces cibles dans la réponse analgésique des différents traitements cannabinoïdes de notre étude suivant leur injection intrathécale. Similairement à ce que nous avons observé pour les effets analgésiques, des différences de recrutement des cibles étaient évidentes entre les différents cannabinoïdes, mais également entre les différentes doses testées.

La réponse analgésique du THC aux petites doses était principalement médiée par les récepteurs CB1 et CB2. À des doses plus élevées de THC, ces deux RCPG étaient encore impliqués, mais nous avons également observé qu'il y avait un ajout d'une composante analgésique importante médiée par le canal TRPV1, suggérant une désensibilisation de ce canal par le THC. Cette observation était surprenante étant donné que le THC n'active pas le canal *in vitro* (404, 561). Néanmoins, comme discuté dans l'article III, d'autres phytocannabinoïdes tels que le précurseur du THC (acide tétrahydrocannabinolique THCA) et le CBC sont capables de désensibiliser les canaux TRPV sans les activer (404). Par ailleurs, il se pourrait que la désensibilisation du TRPV1 par THC se fasse de façon hétérologue via l'activation de ce canal et sa désensibilisation subséquente par un autre récepteur qui, lui, serait modulé par THC. Le mécanisme derrière cette désensibilisation reste à être élucidé.

Le CBD, qui avait un effet seulement aux hautes doses testées, avait une réponse analgésique essentiellement médiée par les canaux TRPV1. Ceci concorde avec la forte capacité du CBD à désensibiliser le canal TRPV1 (404) et concorde avec d'autres études démontrant le rôle du TRPV1 dans l'analgésie du CBD (384, 387). De façon intéressante, lorsque le THC et le CBD étaient testés en combinaison THC:CBD (1 :1), il a fallu doubler la dose d'antagoniste de TRPV1 nécessaire pour bloquer l'effet analgésique du mélange comparativement à une dose équivalente de THC pur. Cette observation est en accord avec un effet additif du THC et du CBD aux hautes doses, comme discuté plus haut.

Enfin, l'extrait de cannabis aux basses doses engageait les récepteurs cannabinoïdes et le canal TRPV1 de façon similaire au THC pur alors qu'à des doses plus élevées il engageait le

TRPV1 de façon comparable au mélange THC:CBD. Néanmoins, l'extrait et le mélange engageaient différemment les réponses CB1. Ces différences démontrent encore une fois que le profil d'actions des extraits de cannabis ne peut pas être déduit à partir de sa composition en THC et en CBD.

L'Annexe IV résume de façon schématisée les différents résultats des prétraitements avec les antagonistes discutés plus haut. Dans l'ensemble, nos données suggèrent qu'il existe un recrutement progressif des cibles moléculaires par les cannabinoïdes. Dans notre modèle de neuropathie diabétique, les basses doses de cannabinoïdes engageraient principalement les RCPG (récepteurs CB1, CB2) alors que les hautes doses engageraient progressivement les canaux TRPV1. Une observation soutenant cette hypothèse est le fait qu'*in vitro*, de basses concentrations (nanomolaires) de l'agoniste mixte WIN activent les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, alors que de très hautes concentrations (micromolaires) de WIN sont capables de désensibiliser le canal TRPV1 (454, 455). Ces observations pourraient être dues à des cinétiques de liaison du ligand-récepteur différentes ; alors que le site de liaison au niveau des récepteurs CB1 et CB2 est extracellulaire et facilement accessible aux agonistes (562), il est possible que le site de liaison aux canaux TRP soit plus difficile d'accès. Par ailleurs, similairement à nos résultats, l'injection intrathécale du cannabinoïde endogène anandamide dans un modèle de CCI a eu des effets anti-allodyniques qui étaient médiés par le récepteur CB1 à basses doses alors qu'à des doses plus élevées, la réponse de l'anandamide était également sensible à l'antagoniste du TRPV1 (505).

Alors que de nombreuses études ont caractérisé de façon exhaustive les effets analgésiques des agonistes synthétiques du CB1 et CB2, très peu d'études précliniques ont étudié les effets dose-réponse des phytocannabinoïdes THC, THC:CBD ou des extraits dans des modèles de douleur neuropathique (439, 440, 563). Nous sommes, à notre connaissance, les premiers à avoir comparé l'implication des cibles moléculaires dans les effets analgésiques du THC et de l'extrait de cannabis à hautes et à basses doses. Ces informations sont importantes puisqu'elles permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action de différents phytocannabinoïdes et de leurs combinaisons. À titre d'exemple, le recrutement progressif des cibles RCPG puis TRPV que nous avons observé pourrait être une explication derrière les courbes dose-réponse biphasiques du THC obtenues dans notre étude et dans d'autres études précliniques (439, 564, 565).

De plus, les informations sur les cibles moléculaires impliquées permettraient de comparer les mécanismes derrière l'analgésie des cannabinoïdes entre différents modèles de douleur. À titre d'exemple, nous avons observé que le récepteur CB2 était fortement impliqué dans l'analgésie de la haute dose de THC ; alors qu'une étude par Casey et al. (440) a trouvé une implication du récepteur CB1, mais pas celle du CB2, dans un modèle de douleur neuropathique par CCI. Cette même étude a aussi rapporté qu'à des doses élevées d'une combinaison THC:CBD (1 :1), les récepteurs CB1 (mais pas CB2) étaient impliqués dans l'analgésie du mélange ; alors qu'à des petites doses de la combinaison, les récepteurs cannabinoïdes n'étaient pas engagés. Ces deux observations sont à l'inverse de ce que nous avons rapporté dans notre étude. Mise à part la différence du modèle de douleur utilisé entre les deux études (les cibles pourraient être modulées différemment entre les deux modèles, voir section 1.3.4.2.2.1), un autre facteur à tenir en compte est le fait que nous avons injecté nos agonistes de façon intrathécale et que l'analgésie que nous voyons est donc une analgésie qui est essentiellement au niveau spinal. Or il a été démontré que l'activation des microglies au niveau spinal joue un rôle essentiel dans le développement de l'allodynie mécanique en neuropathie diabétique et que les agonistes du récepteur CB2 sont capables de prévenir cette activation (51, 164, 187, 188, 566) (voir section 1.3.4.2.2.1). Nous pensons donc que la forte implication des récepteurs CB2 que nous observons dans notre étude pourrait s'interpréter par leur activation au niveau des microglies spinales et par l'inhibition conséquente de l'activation exacerbée de ces dernières. Dans le cas de l'étude de Casey et al. (440), les auteurs ont étudié l'effet d'une injection systémique des cannabinoïdes. Ce mode d'administration sollicite également l'intervention d'une analgésie au niveau supraspinal où le récepteur CB1 a une localisation prédominante (138, 141) (voir section 1.1.3.2.1.1). De plus, des études ont montré que l'injection systémique de CBD permet d'augmenter les taux de THC au cerveau et donc d'augmenter l'activation des récepteurs CB1 (436). Ceci pourrait expliquer l'implication unique du CB1 dans la réponse analgésique du THC et du THC:CBD dans l'étude de Casey et al. (440), mais pas dans la nôtre. Ensemble, ces données suggèrent qu'il y aurait des mécanismes divergents impliqués dans l'induction, la transmission ou la perception de la douleur entre ces différents modèles précliniques ; et qu'il existerait également des divergences dans les modes d'action des cannabinoïdes entre différents modèles de douleur. Les données cliniques vont dans le sens des observations. En effet, le Sativex est efficace à réduire les douleurs neuropathiques périphériques et les douleurs associées à la sclérose en plaques ; mais d'autres études montrent

qu'il est moins efficace à soulager les douleurs associées à des lésions du plexus brachial et les données pour le soulagement des douleurs cancéreuses sont mitigées (61, 67-69, 567). Ces résultats soulignent l'importance d'étudier les profils pharmacologiques des cannabinoïdes dans différents modèles en termes d'effets analgésiques et en termes de cibles recrutées. Ceci permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'actions des cannabinoïdes et les meilleures combinaisons à utiliser selon le type de douleur et le mode d'administration d'intérêts.

6.4.1 Corrélations entre profils signalétiques et effets *in vivo*

Malgré leurs bénéfices ajoutés en matière d'effets analgésiques et d'amélioration de la qualité de vie (67-69, 567), l'administration des extraits de cannabis en clinique est fréquemment associée à des effets indésirables de somnolence, de nausées et d'étourdissement (68, 442). De plus, les inquiétudes de survenue d'effets psychotropes majeurs reliés à l'activation du récepteur CB1 (71, 159, 161, 162, 386, 472, 475) limitent l'utilisation des cannabinoïdes en tant qu'analgésiques (voir section 1.3.4.1.2).

L'étude de Casey et al. (440) mentionnée plus haut a montré que les effets comportementaux indésirables engendrés par un mélange THC:CBD (1 :1) sont largement médiés par le THC et que la présence de CBD n'a pas d'effets sur ces derniers. Néanmoins, les basses et les hautes doses de la combinaison THC:CBD avaient des effets différents. Ainsi, les basses doses avaient une fenêtre thérapeutique améliorée, mais des effets anti-allodyniques plus bas que ceux du THC seul. À l'inverse, des doses plus élevées avaient une plus grande efficacité, mais une fenêtre thérapeutique plus réduite. Tel que discuté plus haut, dans leur étude, les cibles moléculaires engagées par la combinaison THC:CBD étaient différentes entre les basses et les hautes doses. Aux basses doses, des cibles autres que les récepteurs cannabinoïdes CB1 ou CB2 étaient recrutées (cibles non déterminées) alors qu'à des doses plus élevées, les récepteurs CB1 étaient recrutés. Il serait donc intéressant d'appliquer une approche similaire à celle que nous avons développée dans l'article II (568) et de décrire les cannabinoïdes et leurs combinaisons en termes de leurs effets *in vitro* sur différents effecteurs moléculaires afin de voir s'il serait possible de corrélérer ces réponses pharmacodynamiques avec leurs effets analgésiques et indésirables induits *in vivo*. Les effecteurs *in vitro* qui devront être caractérisés sont non seulement les récepteurs CB1 et CB2, mais également les autres cibles potentielles des différents cannabinoïdes, terpènes et autres constituants des extraits de cannabis. Ces autres cibles incluent les différents canaux TRP (TRPA1, TRPV1-

TRPV4, TRPM8) et d'autres RCPG tels que les récepteurs GPR55 et les récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A (voir sections 1.3.2.4 et 1.3.3.2).

Plusieurs lignes d'évidences dans notre étude suggèrent que des données d'activation de cibles *in vitro* sont représentatives du recrutement de ces cibles *in vivo*. Premièrement, la réponse analgésique du THC était apparue à des doses beaucoup plus élevées que celle de l'agoniste synthétique WIN 55,212-2. À ces doses, seulement les récepteurs CB1 et CB2 étaient fortement impliqués dans la réponse. Or, ces observations concordent avec le fait que le THC est un agoniste partiel CB1/CB2 avec une puissance faible *in vitro*; alors que le WIN est un puissant agoniste complet des récepteurs cannabinoïdes. Deuxièmement, le recrutement progressif des cibles moléculaires observé dans notre étude concorde avec les observations *in vitro* que les canaux TRP étaient activés à des doses plus grandes que celles nécessaires pour activer les RCPG (voir section 6.4). Enfin, nous avons observé que CBD avait un effet proalgésique qui était médié par le récepteur CB2. Ceci est en accord avec des études *in vitro* ayant démontré que le CBD est un agoniste inverse du récepteur CB2 (415, 456). Ensemble, ces données appuient la supposition que des profils signalétiques *in vitro* des cannabinoïdes pourraient nous aider à inférer leurs effets biologiques *in vivo*.

6.4.2 Effet d'épargne en opiacés

L'analyse des profils pharmacodynamiques des cannabinoïdes permettrait non seulement d'identifier des traitements cannabinoïdes plus sécuritaires pour le traitement des douleurs chroniques, mais elle permettrait aussi d'augmenter l'effet « d'épargne en opiacés ». En effet, une approche pour augmenter la fenêtre thérapeutique des opioïdes est de les combiner à basses doses avec un autre type d'analgésique tel que les cannabinoïdes. L'effet « d'épargne en opiacés » des cannabinoïdes a été évalué exhaustivement dans les études précliniques. Ces dernières ont montré qu'il y avait un effet analgésique synergique entre les opioïdes et les cannabinoïdes, dont le THC, ce qui résulte en une baisse de la dose d'opioïdes requise (569-574). Ainsi, le prétraitement avec une dose non-analgésique de THC a augmenté jusqu'à 22 fois les effets analgésiques de la morphine (402). Cette augmentation de l'analgésie des opioïdes par les cannabinoïdes a lieu suivant une administration orale, intrathécale ou systémique (ce qui est accord avec les mécanismes spinaux, supraspinaux et périphériques de ces derniers, voir sections 1.2.3.1 et 1.3.4.2).

L'interaction entre ces deux types d'analgésiques serait de nature pharmacodynamique et s'expliquerait par la co-localisation des récepteurs cannabinoïdes et des MOR au niveau de plusieurs régions du circuit de la douleur et par la convergence de leurs voies de signalisation (voir section 1.1.3). Toutefois, les méta-analyses d'études cliniques menées avec du THC oral et du Sativex ont obtenu des résultats mitigés (442, 569, 575-577); et bien que ces dernières semblent appuyer un effet « d'épargne en opiacés », des études de plus grande ampleur et de meilleure qualité nécessitent d'être menées. À ce propos, une étude préclinique par Maguire et al. (573) a démontré que des cannabinoïdes avec une haute efficacité à activer les récepteurs cannabinoïdes sont plus efficaces à augmenter l'« effet d'épargne des opiacés » que des cannabinoïdes qui ont une efficacité partielle à activer les récepteurs tels que le THC. Or, la majorité des essais cliniques qui étudient l'effet des combinaisons opioïdes/cannabinoïdes utilisent le THC ou ses analogues (575, 577); l'utilisation d'agonistes avec une plus grande efficacité pourrait donc être une avenue intéressante à explorer dans les études cliniques. Les auteurs Maguire et al. (573) ont également suggéré qu'une combinaison d'un opioïde (tel que la morphine) avec un agoniste cannabinoïde à haute efficacité pourrait produire moins de tolérance dû à une plus faible occupation des récepteurs. Une tolérance réduite serait particulièrement intéressante pour les traitements des douleurs chroniques qui requièrent une administration d'analgésiques de façon prolongée. Il serait donc intéressant de voir si des clusters pharmacodynamiques basés sur l'efficacité des cannabinoïdes à activer les récepteurs du système endocannabinoïde *in vitro* pourraient être prédictifs des effets indésirables de combinaisons cannabinoïdes/opioïdes tels que la tolérance ou les effets indésirables typiques des opioïdes.

Pour finir, dû à l'existence d'un effet d'entourage et d'une multitude de cibles moléculaires sur lesquelles les différents composants des extraits de cannabis peuvent agir, ces derniers sont des candidats intéressants à étudier en termes d'effets indésirables, d'effets analgésiques et d'effets « d'épargne en opiacés ». Or, un nombre faramineux d'extraits de cannabis avec différentes compositions chimiques sont disponibles. C'est pourquoi, une sélection préclinique des candidats avec le meilleur profil effets analgésiques/effets indésirables (tel que discuté plus haut) faciliterait et accélérerait grandement le processus d'essais cliniques.

7 Chapitre 7 : Perspectives

Dans notre première étude (article II), nous avons pu corrélérer différents clusters pharmacodynamiques d'agonistes du MOR avec la fréquence des effets indésirables rapportés à la FDA. Bien que le rôle des β -arrestines dans le développement de tolérance aux opioïdes ait été observé (249, 262, 309, 578) (section 1.2.3.2.5), nous n'avons pas pu corrélérer le recrutement de ces protéines régulatrices dans les cellules HEK293 avec les fréquences de tolérance rapportées. Ceci suggère que ce modèle cellulaire ne reproduit pas les processus qui mènent à une tolérance analgésique suivant l'interaction MOR- β -arrestines dans les neurones sensoriels. C'est pourquoi il serait intéressant de quantifier les réponses cellulaires des agonistes du MOR dans des modèles neuronaux (par exemple les neurones du DRG) et de voir si ce modèle cellulaire serait plus approprié pour prédire la tolérance rapportée. Nous n'avons également pas obtenu de corrélation avec la dépendance psychologique (section 1.2.3.2.8) et il serait pertinent de voir si les modèles neuronaux pourraient aider à prédire cet effet fortement indésirable. Il est toutefois important de ne pas oublier que les données sur les fréquences des effets indésirables sont basées sur des rapports par les patients et les professionnels de la santé au programme de pharmacovigilance de la FDA, et qu'il existe des biais de rapport et de détection du système AERS (voir section 1.2.3.2.9). Ainsi, des facteurs importants tels que la durée et la dose de traitement ne sont pas pris en compte par AERS. De plus, les effets de tolérance sont plus difficiles à mesurer en clinique et à différencier de la progression de la maladie, comparativement aux effets respiratoires (tels qu'une dépression respiratoire) ou GI (tels qu'un fécalome). Pour ce qui est de la dépendance psychologique, un sous-signallement de cet effet pourrait être en cause : il se pourrait que les patients touchés aient tendance à ne pas le rapporter dû à la stigmatisation dont ils font face. C'est pourquoi il serait également intéressant de voir si nous pouvons corrélérer des réponses signalétiques obtenues dans des neurones de cerveau ou de corne dorsale de rats, avec le développement de tolérance analgésique et de dépendance psychologique chez ces animaux. La tolérance analgésique sera mesurée après des injections répétées d'opioïdes (129, 522) et la dépendance psychologique sera modélisée à l'aide des tests d'auto-administration intermittente d'opioïdes et de préférence de place conditionnée (579-582).

Nous avons trouvé que le cluster 1 d'agonistes du MOR était associé avec la fréquence la plus basse d'effets indésirables. Ces agonistes, dont la buprénorphine, ont tous une faible efficacité à activer le MOR. Ceci n'empêche pas son efficacité analgésique d'être similaire ou supérieure à celle des opioïdes utilisés en cliniques tels que la morphine et le fentanyl (543), comme discuté plus haut (section 6.1.3). Néanmoins, malgré son profil plus sécuritaire et son potentiel analgésique, l'utilité thérapeutique de la buprénorphine est limitée par sa pauvre biodisponibilité et sa pharmacologie complexe (529, 583, 584). Nous pensons que les composés Pfizer appartenant au cluster 1 pourraient être des candidats alternatifs à la buprénorphine et pourraient présenter des avantages dans certains aspects négatifs de cette dernière. Selon les profils pharmacocinétiques fournis par la compagnie Pfizer, les composés 3, 4, 11 et 15 ont une bonne absorption et peuvent pénétrer à travers la barrière hématoencéphalique. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ces composés *in vivo* afin de valider que notre approche permet bien d'identifier de meilleurs analgésiques opioïdes avec moins d'effets indésirables, et ce, indépendamment des facteurs de biais.

Nous allons d'abord confirmer l'efficacité analgésique des composés Pfizer dans des modèles de douleur aiguë en comparaison à celle de la morphine et de l'olicéridine, le seul ligand « supposé biaisé » à avoir été testé en clinique (537, 538). Nous utiliserons pour ce faire, les essais de tail-flick et de la plaque chauffante qui permettent d'évaluer l'analgésie au niveau spinal et supraspinal respectivement (108-110). Nous allons ensuite évaluer le potentiel de ces nouveaux agonistes à induire de la constipation et de la dépression respiratoire. L'évaluation de la capacité respiratoire se fera par pléthysmographie qui permet de mesurer l'ensemble des volumes pulmonaires (248, 316, 317). L'évaluation de la motilité intestinale, quant à elle, sera mesurée par le poids cumulé du bol fécal suivant l'injection de l'opioïde (248, 252).

Il est à noter que les composés Pfizer avaient également différentes propriétés signalétiques au niveau du DOR (Annexe V). Comme discuté précédemment dans cette thèse, les agonistes du DOR sont des candidats prometteurs pour le soulagement de la douleur chronique et ont des propriétés analgésiques supérieures à celles des agonistes du MOR (122) (section 1.1.3.1.2). C'est pourquoi il serait intéressant de tester également l'efficacité analgésique des composés 3, 4, 11 et 15 à soulager ce type de douleur. Ceci pourrait être testé chez les souris en utilisant le même modèle de neuropathie diabétique utilisé dans l'article III et que notre laboratoire a également utilisé précédemment pour caractériser l'analgésie des agonistes du DOR chez des rats STZ (522). Le

modèle de souris diabétiques sera induit par une injection unique de STZ à une dose de 200 mg/kg (585) et ce dernier a déjà été utilisé pour documenter les propriétés analgésiques des opioïdes, dont celles des agonistes du DOR (586-589).

En se basant sur les magnitudes de réponses signalétiques des agonistes Pfizer au niveau du DOR (Annexe V), nous nous attendons à ce que le composé 11 qui a la plus grande efficacité à activer le DOR soit celui qui a le plus grand effet analgésique ; alors que le composé 15 qui a une efficacité négligeable à activer le DOR aurait très peu ou pas d'effet analgésique dans ce modèle de douleur neuropathique. Cependant, le composé 11 est aussi celui qui recrute le plus de β -arrestines vers le DOR ce qui pourrait engendrer une plus grande tolérance analgésique. De plus, il faut également tenir en compte le fait que l'activation des DOR peut augmenter le développement de la tolérance analgésique dépendante du MOR (590-592). Il serait donc important de mesurer le développement de cette tolérance chez des souris WT et chez des souris KO en DOR afin de déterminer si les composés ayant une activité mixte MOR/DOR (composés 3 et 4 et 11) induisent plus de tolérance que des composés n'ayant pas d'activité à ce récepteur (composé 15).

D'autres candidats prometteurs pour le soulagement de la douleur chronique et en particulier neuropathique sont les agonistes cannabinoïdes. Dans notre seconde étude (article III), nous avons démontré que les extraits de cannabis entiers avaient un profil analgésique différent de celui du THC seul ou d'une combinaison THC:CBD. Un point important à noter est que nous avons travaillé avec des extraits de cannabis dépourvus de terpènes. Or, une étude récente a démontré que les terpènes avaient une activité cannabimimétique et qu'ils pouvaient agir sur différentes cibles moléculaires dont des récepteurs autres que les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 (431). Ceci est en accord avec la notion d'«effet d'entourage» (378). Nous nous sommes donc demandé comment l'ajout de terpènes modifierait l'effet analgésique de l'extrait de cannabis utilisé dans notre étude. Nous avons commencé à effectuer des expériences avec β -caryophyllène (l'un des terpènes les plus répandus dans les souches de cannabis (section 1.3.3.2.6)) et avons observé une augmentation significative de l'effet analgésique de l'extrait en présence du terpène (Annexe VI). Des évidences précliniques rapportent que les effets analgésiques du β -caryophyllène sont principalement médiés par les récepteurs CB1 et CB2 (388, 431, 435). Il serait donc intéressant de voir comment l'ajout de ce terpène affecte les cibles moléculaires engagées par l'extrait. Nous allons ensuite étudier l'interaction de l'extrait de cannabis avec d'autres types de terpènes

fréquemment retrouvés dans la plante (tels que myrcène, α -pinène et limonène) (67), et caractériser les cibles moléculaires impliquées.

Conformément à ce qui a été discuté dans la section 6.4.1, il serait intéressant de décrire les profils signalétiques des différents traitements cannabinoïdes *in vitro* et d'essayer de les corrélés à des effets indésirables *in vivo*. Les effets *in vitro* seront mesurés à l'aide d'effecteurs BRET (comme dans l'article II) et les effets indésirables et comportementaux seront évalués avec les tests de la tétrade (catalepsie, hypothermie, activité locomotrice et antinociception) (163). Notre laboratoire a récemment utilisé la méthode de clustering présentée dans l'article II pour identifier les profils signalétiques qui sont le plus associés à une adaptation cellulaire responsable de la tolérance analgésique des agonistes du DOR (593). Ceci montre encore une fois que notre méthode a une capacité prédictive. Nous pourrions donc également l'appliquer pour les cannabinoïdes de l'article III afin d'associer leurs profils pharmacodynamiques à leurs profils d'effets indésirables.

Enfin, des modèles de douleur précliniques chez les rats ont rapporté un plus grand effet anti-nociceptif des cannabinoïdes chez les femelles comparativement aux mâles (526, 527, 594). Il serait donc intéressant d'étudier si les effets des différents traitements cannabinoïdes et l'engagement de leurs cibles moléculaires varient selon le sexe.

8 Chapitre 8 : Conclusions

Les données discutées dans cette thèse ne supportent pas l'hypothèse, datant de plus d'une décennie, que les agonistes du MOR biaisés vers la protéine G par rapport à la β -arrestine entraîneraient des profils d'effets indésirables grandement améliorés. Ceci renforce le besoin d'une meilleure stratégie pour identifier des opioïdes analgésiques mieux tolérés. La méthode de classification pharmacodynamique de ligands que nous avons développée pourrait être une alternative intéressante puisqu'elle ne dépend pas des facteurs de biais, mais résulte d'une analyse multidimensionnelle des différents paramètres décrivant les réponses signalétiques des agonistes. De plus, nous avons pu corrélérer les différents clusters pharmacodynamiques avec différentes intensités de rapport d'effets indésirables cliniques des opioïdes. Il serait donc possible d'appliquer notre méthode à de nouveaux agonistes du MOR d'intérêt et de déduire, selon le cluster auquel les composés appartiendraient, si ces derniers pourront être acheminés aux prochaines phases de développement du médicament ou non. Plus globalement, nos données démontrent que la similitude des profils signalétiques pourrait être un outil intéressant qui devrait aider à identifier les signaux qui sont derrière des effets cliniques d'intérêt d'autres RCPG et pour lesquels il n'y a pas encore de mécanismes connus.

Dans la seconde partie de la thèse, nous avons démontré qu'il ne faut pas présumer l'activité biologique des cannabinoïdes, et notamment des extraits de cannabis, uniquement à partir des contenus en THC et des ratios THC:CBD. De plus, nous avons trouvé que différents traitements cannabinoïdes engageaient les récepteurs du système endocannabinoïde CB1, CB2 et TRPV1 de façon différentielle. Il ne faudrait donc pas se concentrer uniquement sur la composition en THC et (ou) en CBD d'un extrait de cannabis, mais il faudrait plutôt étudier exhaustivement son profil pharmacologique au niveau de différentes cibles moléculaires et de différents types de douleurs. Ces informations pourraient également permettre de mieux comprendre la signalisation qui soutient l'effet analgésique de différents traitements cannabinoïdes et d'identifier des profils pharmacodynamiques d'intérêt pour mieux inférer leurs potentiels effets cliniques tels que l'efficacité analgésique ou l'effet d'« épargne en opiacés ».

9 Références bibliographiques

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
2. Bjarnadottir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schioth HB. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*. 2006;88(3):263-73.
3. Shoichet BK, Kobilka BK. Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*. 2012;33(5):268-72.
4. Lundstrom K. Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors. *Curr Protein Pept Sci*. 2006;7(5):465-70.
5. Sriram K, Insel PA. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular pharmacology*. 2018;93(4):251-8.
6. Kobilka B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(25):6380-8.
7. Gurevich VV, Gurevich EV. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front Pharmacol*. 2019;10:125.
8. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 3):455-65.
9. Oldham WM, Hamm HE. How do Receptors Activate G Proteins? *Advances in Protein Chemistry*. 74: Academic Press; 2007. p. 67-93.
10. Smith JS, Rajagopal S. The beta-Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(17):8969-77.
11. Ranjan R, Dwivedi H, Baidya M, Kumar M, Shukla AK. Novel Structural Insights into GPCR-beta-Arrestin Interaction and Signaling. *Trends Cell Biol*. 2017;27(11):851-62.
12. Wootten D, Christopoulos A, Marti-Solano M, Babu MM, Sexton PM. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(10):638-53.
13. Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther*. 2004;103(1):21-80.
14. Patel TB. Single transmembrane spanning heterotrimeric g protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol Rev*. 2004;56(3):371-85.
15. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002;296(5573):1636-9.
16. Burns DL, Hewlett EL, Moss J, Vaughan M. Pertussis toxin inhibits enkephalin stimulation of GTPase of NG108-15 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(3):1435-8.
17. Kurose H, Katada T, Amano T, Ui M. Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(8):4870-5.
18. Offermanns S, Schultz G, Rosenthal W. Evidence for opioid receptor-mediated activation of the G-proteins, Go and Gi2, in membranes of neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(6):3365-8.

19. Howlett AC, Fleming RM. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular pharmacology*. 1984;26(3):532-8.
20. Howlett AC. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular pharmacology*. 1985;27(4):429-36.
21. Howlett AC, Qualy JM, Khachatryan LL. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Molecular pharmacology*. 1986;29(3):307-13.
22. Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett*. 1995;375(1-2):143-7.
23. Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(9):457-69.
24. Cahill TJ, 3rd, Thomsen AR, Tarrasch JT, Plouffe B, Nguyen AH, Yang F, et al. Distinct conformations of GPCR-beta-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(10):2562-7.
25. Traub LM. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(9):583-96.
26. Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, et al. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*. 2001;410(6825):231-5.
27. Tian X, Kang DS, Benovic JL. β -arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;219:173-86.
28. Feinstein TN, Yui N, Webber MJ, Wehbi VL, Stevenson HP, King JD, Jr., et al. Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(39):27849-60.
29. Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*. 2013;495(7442):534-8.
30. Jimenez-Vargas NN, Gong J, Wisdom MJ, Jensen DD, Latorre R, Hegron A, et al. Endosomal signaling of delta opioid receptors is an endogenous mechanism and therapeutic target for relief from inflammatory pain. 2020;117(26):15281-92.
31. Stoeber M, Jullié D, Lobingier BT, Laeremans T, Steyaert J, Schiller PW, et al. A Genetically Encoded Biosensor Reveals Location Bias of Opioid Drug Action. *Neuron*. 2018;98(5):963-76.e5.
32. Bénard G, Massa F, Puente N, Lourenço J, Bellocchio L, Soria-Gómez E, et al. Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature neuroscience*. 2012;15(4):558-64.
33. Crilly SE, Puthenveedu MA. Compartmentalized GPCR Signaling from Intracellular Membranes. *The Journal of Membrane Biology*. 2021;254(3):259-71.
34. Mohammad Nezhady MA, Rivera JC, Chemtob S. Location Bias as Emerging Paradigm in GPCR Biology and Drug Discovery. *iScience*. 2020;23(10):101643.
35. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.
36. Marchand S. Neurophysiologie de la douleur. In: Beaulieu P, editor. *Pharmacologie de la douleur*: Les Presses de l'Université de Montréal; 2005. p. 3-37.

37. Beaulieu P. Les voies de la douleur. La douleur Guide pharmacologique et thérapeutique: Les presses de l'Université de Montréal; 2013. p. 15-22.
38. Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron*. 2014;82(3):522-36.
39. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(11):3779-87.
40. Grichnik KP, Ferrante FM. The difference between acute and chronic pain. *Mt Sinai J Med*. 1991;58(3):217-20.
41. Hylands-White N, Duarte RV, Raphael JH. An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatol Int*. 2017;37(1):29-42.
42. Hadi MA, McHugh GA, Closs SJ. Impact of Chronic Pain on Patients' Quality of Life: A Comparative Mixed-Methods Study. *J Patient Exp*. 2019;6(2):133-41.
43. Engel GL. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science*. 1977;196(4286):129-36.
44. Jacobson L, Mariano A. General considerations of chronic pain. *Bonica's Management of Pain*. 97: Philadelphia; 2002. p. 241-54.
45. Liu F, Yuan H. Role of glia in neuropathic pain. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:798-807.
46. Vinik A, Casellini C, Nevoret ML. Diabetic Neuropathies. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
47. Aring AM, Jones DE, Falko JM. Evaluation and prevention of diabetic neuropathy. *Am Fam Physician*. 2005;71(11):2123-8.
48. Rajchgot T, Thomas SC, Wang JC, Ahmadi M, Balood M, Crosson T, et al. Neurons and Microglia; A Sickly-Sweet Duo in Diabetic Pain Neuropathy. *Front Neurosci*. 2019;13:25.
49. Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *Bmj*. 2014;348:f7656.
50. Romero-Sandoval EA, Horvath RJ, DeLeo JA. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9(7):726-34.
51. Raghavendra V, DeLeo JA. The role of astrocytes and microglia in persistent pain. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 31: Elsevier; 2003. p. 951-66.
52. Zhang X, Xu Y, Wang J, Zhou Q, Pu S, Jiang W, et al. The effect of intrathecal administration of glial activation inhibitors on dorsal horn BDNF overexpression and hind paw mechanical allodynia in spinal nerve ligated rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 2012;119(3):329-36.
53. Cervero F. Spinal cord mechanisms of hyperalgesia and allodynia: role of peripheral input from nociceptors. *Prog Brain Res*. 1996;113:413-22.
54. Machelska H, Celik MÖ. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. *F1000Res*. 2016;5:2743-.
55. Alles SRA, Smith PA. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol Rev*. 2018;70(2):315-47.
56. Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol*. 2012;11(7):629-42.
57. Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiol Rev*. 2021;101(1):259-301.

58. Maldonado R. [The endogenous opioid system and drug addiction]. *Ann Pharm Fr.* 2010;68(1):3-11.
59. Ayache SS, Ahdab R, Chalah MA, Farhat WH, Mylius V, Goujon C, et al. Analgesic effects of navigated motor cortex rTMS in patients with chronic neuropathic pain. *Eur J Pain.* 2016;20(9):1413-22.
60. Dray A. Neuropathic pain: emerging treatments. *Br J Anaesth.* 2008;101(1):48-58.
61. Pascual D, Sanchez-Robles EM, Garcia MM, Goicoechea C. Chronic pain and cannabinoids. Great expectations or a christmas carol. *Biochem Pharmacol.* 2018;157:33-42.
62. Stockings E, Campbell G, Hall WD, Nielsen S, Zagic D, Rahman R, et al. Cannabis and cannabinoids for the treatment of people with chronic noncancer pain conditions: a systematic review and meta-analysis of controlled and observational studies. *Pain.* 2018;159(10):1932-54.
63. Manzanares J, Julian M, Carrascosa A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol.* 2006;4(3):239-57.
64. Vuckovic S, Srebro D, Vujovic KS, Vucetic C, Prostran M. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Front Pharmacol.* 2018;9:1259.
65. Casey SL, Vaughan CW. Plant-Based Cannabinoids for the Treatment of Chronic Neuropathic Pain. *Medicines (Basel).* 2018;5(3).
66. Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA. Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology.* 2005;65(6):812-9.
67. Baron EP. Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science. *Headache.* 2018;58(7):1139-86.
68. Überall MA. A Review of Scientific Evidence for THC:CBD Oromucosal Spray (Nabiximols) in the Management of Chronic Pain. *Journal of pain research.* 2020;13:399-410.
69. Pantoja-Ruiz C, Restrepo-Jimenez P, Castañeda-Cardona C, Ferreirós A, Rosselli D. Cannabis and pain: a scoping review. *Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition).* 2021.
70. Health Canada. Information for Health Care Professionals: Cannabis (marihuana, marijuana) and the cannabinoids 2018 [Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-medication/cannabis/information-medical-practitioners/information-health-care-professionals-cannabis-cannabinoids.html>].
71. Gage SH, Hickman M, Zammit S. Association Between Cannabis and Psychosis: Epidemiologic Evidence. *Biol Psychiatry.* 2016;79(7):549-56.
72. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:953-90.
73. Beaulieu P. Les opioïdes. *La douleur Guide pharmacologique et thérapeutique: Les presses de l'Université de Montréal;* 2013. p. 75-99.
74. Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H, Iwabe N, et al. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* 1994;343(1):42-6.
75. Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 1994;341(1):33-8.

76. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. 1995;377(6549):532-5.
77. Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*. 1995;270(5237):792-4.
78. Kieffer BL. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends in pharmacological sciences*. 1999;20(1):19-26.
79. Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Molecular pharmacology*. 1993;44(1):8-12.
80. Eppler CM, Hulmes JD, Wang JB, Johnson B, Corbett M, Luthin DR, et al. Purification and partial amino acid sequence of a mu opioid receptor from rat brain. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(35):26447-51.
81. Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron*. 1993;11(5):903-13.
82. Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR. mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(21):10230-4.
83. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011;115(6):1363-81.
84. Erbs E, Faget L, Scherrer G, Matifas A, Filliol D, Vonesch J-L, et al. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct*. 2015;220(2):677-702.
85. Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. mu-Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res*. 1994;643(1-2):245-65.
86. Besse D, Lombard MC, Besson JM. Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid binding sites in the superficial dorsal horn, over the rostrocaudal axis of the rat spinal cord. *Brain Res*. 1991;548(1-2):287-91.
87. Minami M, Onogi T, Toya T, Katao Y, Hosoi Y, Maekawa K, et al. Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat mu-opioid receptor. *Neurosci Res*. 1994;18(4):315-22.
88. Peng J, Sarkar S, Chang SL. Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend*. 2012;124(3):223-8.
89. Stander S, Gunzer M, Metze D, Luger T, Steinhoff M. Localization of mu-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. *Regul Pept*. 2002;110(1):75-83.
90. Ding YQ, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. Presynaptic localization of mu-opioid receptor-like immunoreactivity in retinal axon terminals within the terminal nuclei of the accessory optic tract: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett*. 1995;199(2):139-42.
91. Chuang TK, Killam KF, Jr., Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, et al. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;216(3):922-30.
92. Bagnol D, Mansour A, Akil H, Watson SJ. Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract. *Neuroscience*. 1997;81(2):579-91.
93. Benarroch EE. Endogenous opioid systems: current concepts and clinical correlations. *Neurology*. 2012;79(8):807-14.

94. Connor M, Christie MD. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(7):493-9.
95. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:971-1005.
96. Seseña E, Vega R, Soto E. Activation of μ -opioid receptors inhibits calcium-currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent mechanism. 2014;8(90).
97. Witkowski G, Szulczyk P. Opioid μ receptor activation inhibits sodium currents in prefrontal cortical neurons via a protein kinase A- and C-dependent mechanism. *Brain Research.* 2006;1094(1):92-106.
98. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 2010;90(1):291-366.
99. Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K. Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2005;25(14):3551-9.
100. Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bader S, Stoffel M, Jan LY, Basbaum AI. Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(1):271-6.
101. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev.* 2015;67(4):821-70.
102. Sesena E, Vega R, Soto E. Activation of mu-opioid receptors inhibits calcium-currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent mechanism. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:90.
103. Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, et al. G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1998;18(22):9163-70.
104. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55.
105. Wang D, Sadée W, Quillan JM. Calmodulin Binding to G Protein-coupling Domain of Opioid Receptors*. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(31):22081-8.
106. Georgoussi Z, Georganta EM, Milligan G. The other side of opioid receptor signalling: regulation by protein-protein interaction. *Curr Drug Targets.* 2012;13(1):80-102.
107. Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, et al. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(4):1544-9.
108. Irwin S, Houde RW, Bennett DR, Hendershot LC, SeEVERS MH. The effects of morphine methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1951;101(2):132-43.
109. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:284.

110. Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther.* 1953;107(3):385-93.
111. Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF, Wei LN. mu Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;54(2):321-6.
112. Martínez-Navarro M, Maldonado R, Baños JE. Why mu-opioid agonists have less analgesic efficacy in neuropathic pain? *Eur J Pain.* 2019;23(3):435-54.
113. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology.* 2015;14(2):162-73.
114. Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science.* 1992;258(5090):1952-5.
115. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992;89(24):12048-52.
116. Cheng PY, Wu D, Soong Y, McCabe S, Decena JA, Szeto HH. Role of mu 1- and delta-opioid receptors in modulation of fetal EEG and respiratory activity. *Am J Physiol.* 1993;265(2 Pt 2):R433-8.
117. Feng P, Rahim RT, Cowan A, Liu-Chen LY, Peng X, Gaughan J, et al. Effects of mu, kappa or delta opioids administered by pellet or pump on oral Salmonella infection and gastrointestinal transit. *Eur J Pharmacol.* 2006;534(1-3):250-7.
118. Gallantine EL, Meert TF. A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97(1):39-51.
119. Spahn V, Stein C. Targeting delta opioid receptors for pain treatment: drugs in phase I and II clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26(2):155-60.
120. Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, et al. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology.* 1994;350(3):412-38.
121. Cahill CM, McClellan KA, Morinville A, Hoffert C, Hubatsch D, O'Donnell D, et al. Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *The Journal of comparative neurology.* 2001;440(1):65-84.
122. Abdallah K, Gendron L. The Delta Opioid Receptor in Pain Control. *Handb Exp Pharmacol.* 2018;247:147-77.
123. Mansour A, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J Chem Neuroanat.* 1993;6(6):351-62.
124. Gaveriaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, Kieffer B. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett.* 1995;369(2-3):272-6.
125. Pol O, Palacio JR, Puig MM. The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(2):455-62.

126. Salemi S, Aeschlimann A, Reisch N, Jungel A, Gay RE, Heppner FL, et al. Detection of kappa and delta opioid receptors in skin--outside the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(2):1012-7.
127. Gendron L, Cahill CM, von Zastrow M, Schiller PW, Pineyro G. Molecular Pharmacology of delta-Opioid Receptors. *Pharmacol Rev*. 2016;68(3):631-700.
128. Jutkiewicz EM, Rice KC, Traynor JR, Woods JH. Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;182(4):588-96.
129. Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, Amraei M, Chabot-Dore AJ, Millecamps M, et al. Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(14):4827-40.
130. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
131. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*. 1997;74(2):129-80.
132. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007;152(7):1092-101.
133. Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, Wellner N, Diep TA, Rehfeld JF, et al. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(9):E1409-17.
134. Zhao P, Abood ME. GPR55 and GPR35 and their relationship to cannabinoid and lysophospholipid receptors. *Life Sci*. 2013;92(8-9):453-7.
135. Deliu E, Sperow M, Console-Bram L, Carter RL, Tilley DG, Kalamarides DJ, et al. The Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55 Modulates Pain Perception in the Periaqueductal Gray. *Molecular pharmacology*. 2015;88(2):265-72.
136. Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*. 1988;34(5):605-13.
137. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-4.
138. Mackie K. Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System. In: Pertwee RG, editor. *Cannabinoids*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 299-325.
139. Lindsey KP, Glaser ST, Gatley SJ. Imaging of the brain cannabinoid system. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(168):425-43.
140. Huestis MA, Boyd SJ, Heishman SJ, Preston KL, Bonnet D, Le Fur G, et al. Single and multiple doses of rimonabant antagonize acute effects of smoked cannabis in male cannabis users. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;194(4):505-15.
141. Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol*. 2003;2(5):291-8.
142. Navarrete M, Diez A, Araque A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1654):20130599.

143. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *1995;48(3):443-50.*
144. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J. 1995;312 (Pt 2):637-41.*
145. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev. 2010;62(4):588-631.*
146. Choi S, Lovinger DM. Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated Ca²⁺ channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1996;16(1):36-45.*
147. Twitchell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol. 1997;78(1):43-50.*
148. Johanek LM, Simone DA. Activation of peripheral cannabinoid receptors attenuates cutaneous hyperalgesia produced by a heat injury. *Pain. 2004;109(3):432-42.*
149. Zhu CZ, Mikusa JP, Fan Y, Hollingsworth PR, Pai M, Chandran P, et al. Peripheral and central sites of action for the non-selective cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in a rat model of post-operative pain. *Br J Pharmacol. 2009;157(4):645-55.*
150. Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, et al. Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain. 2006;124(1-2):175-83.*
151. Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature neuroscience. 2007;10(7):870-9.*
152. Yoon MH, Choi JI. Pharmacologic interaction between cannabinoid and either clonidine or neostigmine in the rat formalin test. *Anesthesiology. 2003;99(3):701-7.*
153. Cui JH, Kim WM, Lee HG, Kim YO, Kim CM, Yoon MH. Antinociceptive effect of intrathecal cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in a rat bone tumor pain model. *Neurosci Lett. 2011;493(3):67-71.*
154. Deng L, Cornett BL, Mackie K, Hohmann AG. CB1 Knockout Mice Unveil Sustained CB2-Mediated Antiallodynic Effects of the Mixed CB1/CB2 Agonist CP55,940 in a Mouse Model of Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain. *Molecular pharmacology. 2015;88(1):64-74.*
155. Vera G, Lopez-Miranda V, Herradon E, Martin MI, Abalo R. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Pharmacol Biochem Behav. 2012;102(2):335-43.*
156. Goncalves MR, da Conceicao MS, Jesus CHA, Gasparin AT, Rosa ES, da Cunha JM. Spinal cannabinoid CB1 or CB2 receptors activation attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Behav Pharmacol. 2020.*
157. Fox A, Kessingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, et al. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain. 2001;92(1-2):91-100.*
158. Hama A, Sagen J. Antinociceptive effect of cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in rats with a spinal cord injury. *Exp Neurol. 2007;204(1):454-7.*

159. Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, et al. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;58(4):322-8.
160. Frideri E, Perchuk A, Hall FS, Uhl GR, Onaivi ES. Behavioral methods in cannabinoid research. *Methods Mol Med*. 2006;123:269-90.
161. Kendall DA, Yudowski GA. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:294.
162. Volkow ND, Baler RD, Compton WM, Weiss SRB. Adverse Health Effects of Marijuana Use. 2014;370(23):2219-27.
163. Metna-Laurent M, Mondesir M, Grel A, Vallee M, Piazza PV. Cannabinoid-Induced Tetrad in Mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2017;80:9 59 1-9 10.
164. Komorowska-Muller JA, Schmöle AC. CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
165. Starowicz K, Finn DP. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv Pharmacol*. 2017;80:437-75.
166. Hsieh GC, Pai M, Chandran P, Hooker BA, Zhu CZ, Salyers AK, et al. Central and peripheral sites of action for CB(2) receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Br J Pharmacol*. 2011;162(2):428-40.
167. Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D. Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci*. 2003;17(12):2750-4.
168. Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2005;132(4):1093-102.
169. Wotherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience*. 2005;135(1):235-45.
170. Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology*. 2007;106(4):787-94.
171. Malan PT, Jr., Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, et al. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain*. 2001;93(3):239-45.
172. Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, et al. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(25):14228-33.
173. Buckley NE, McCoy KL, Mezey É, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, et al. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor. *European Journal of Pharmacology*. 2000;396(2):141-9.
174. Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL, Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem*. 2009;1(7):1333-49.
175. Tambaro S, Casu MA, Mastinu A, Lazzari P. Evaluation of selective cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor agonists in a mouse model of lipopolysaccharide-induced interstitial cystitis. *Eur J Pharmacol*. 2014;729:67-74.

176. Mastinu A, Premoli M, Ferrari-Toninelli G, Tambaro S, Maccarinelli G, Memo M, et al. Cannabinoids in health and disease: pharmacological potential in metabolic syndrome and neuroinflammation. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2018;36(2).
177. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, et al. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem.* 1996;237(3):704-11.
178. Gu X, Mei F, Liu Y, Zhang R, Zhang J, Ma Z. Intrathecal administration of the cannabinoid 2 receptor agonist JWH015 can attenuate cancer pain and decrease mRNA expression of the 2B subunit of N-methyl-D-aspartic acid. *Anesth Analg.* 2011;113(2):405-11.
179. Niu J, Huang D, Zhou R, Yue M, Xu T, Yang J, et al. Activation of dorsal horn cannabinoid CB2 receptor suppresses the expression of P2Y12 and P2Y13 receptors in neuropathic pain rats. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):185.
180. Zhu M, Yu B, Bai J, Wang X, Guo X, Liu Y, et al. Cannabinoid Receptor 2 Agonist Prevents Local and Systemic Inflammatory Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. *J Bone Miner Res.* 2019;34(4):739-51.
181. Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, et al. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(8):3093-8.
182. Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, et al. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(18):10529-33.
183. Yamamoto W, Mikami T, Iwamura H. Involvement of central cannabinoid CB2 receptor in reducing mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2008;583(1):56-61.
184. Yao BB, Hsieh GC, Frost JM, Fan Y, Garrison TR, Daza AV, et al. In vitro and in vivo characterization of A-796260: a selective cannabinoid CB2 receptor agonist exhibiting analgesic activity in rodent pain models. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):390-401.
185. Racz I, Nadal X, Alferink J, Banos JE, Rehnelt J, Martin M, et al. Crucial role of CB(2) cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2008;28(46):12125-35.
186. Wilkerson JL, Gentry KR, Dengler EC, Wallace JA, Kerwin AA, Armijo LM, et al. Intrathecal cannabidiol CB(2)R agonist, AM1710, controls pathological pain and restores basal cytokine levels. *Pain.* 2012;153(5):1091-106.
187. Toth CC, Jedrzejewski NM, Ellis CL, Frey WH, 2nd. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. *Mol Pain.* 2010;6:16.
188. Romero-Sandoval EA, Horvath R, Landry RP, DeLeo JA. Cannabinoid receptor type 2 activation induces a microglial anti-inflammatory phenotype and reduces migration via MKP induction and ERK dephosphorylation. *Mol Pain.* 2009;5:25.

189. Sindt JE, Jenkinson RH. Nonintravenous Opioids. In: Hemmings HC, Egan TD, editors. *Pharmacology and Physiology for Anesthesia (Second Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 354-68.
190. Centers for Disease Control and Prevention. The Drug Overdose Epidemic: Behind the Numbers 2020 [Available from: <https://www.cdc.gov/opioids/data/index.html>].
191. Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S153-62.
192. Cullen JM, Cascella M. Physiology, Enkephalin. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

193. Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature*. 1997;386(6624):499-502.
194. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. 2008;11(2 Suppl):S133-53.
195. Przewlocki R, Labuz D, Mika J, Przewlocka B, Tomboly C, Toth G. Pain inhibition by endomorphins. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;897:154-64.
196. Stone LS, Fairbanks CA, Laughlin TM, Nguyen HO, Bushy TM, Wessendorf MW, et al. Spinal analgesic actions of the new endogenous opioid peptides endomorphin-1 and -2. *Neuroreport*. 1997;8(14):3131-5.
197. Tseng LF, Narita M, Suganuma C, Mizoguchi H, Ohsawa M, Nagase H, et al. Differential antinociceptive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;292(2):576-83.
198. Czaplá MA, Gozal D, Alea OA, Beckerman RC, Zadina JE. Differential cardiorespiratory effects of endomorphin 1, endomorphin 2, DAMGO, and morphine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3 Pt 1):994-9.
199. Gu ZH, Wang B, Kou ZZ, Bai Y, Chen T, Dong YL, et al. Endomorphins: Promising Endogenous Opioid Peptides for the Development of Novel Analgesics. *Neurosignals*. 2017;25(1):98-116.
200. Takahashi A. Subchapter 7A - Enkephalin. In: Takei Y, Ando H, Tsutsui K, editors. *Handbook of Hormones*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 55-e7A-2.
201. Henry MS, Gendron L, Tremblay ME, Drolet G. Enkephalins: Endogenous Analgesics with an Emerging Role in Stress Resilience. *Neural Plast*. 2017;2017:1546125.
202. Noble F, Roques BP. Assessment of endogenous enkephalins efficacy in the hot plate test in mice: comparative study with morphine. *Neurosci Lett*. 1995;185(2):75-8.
203. Emmerson PJ, Liu MR, Woods JH, Medzihradsky F. Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;271(3):1630-7.
204. Vardanyan R. Chapter 5 - 4-Substituted and 1,4-Disubstituted Piperidines. In: Vardanyan R, editor. *Piperidine-Based Drug Discovery*: Elsevier; 2017. p. 147-221.
205. Heykants J, Michiels M, Knaeps A, Brugmans J. Loperamide (R 18 553), a novel type of antidiarrheal agent. Part 5: the pharmacokinetics of loperamide in rats and man. *Arzneimittelforschung*. 1974;24(10):1649-53.

206. Shannon HE, Lutz EA. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology*. 2002;42(2):253-61.
207. Regnard C, Twycross R, Mihalyo M, Wilcock A. Loperamide. *J Pain Symptom Manage*. 2011;42(2):319-23.
208. Oosterlinck W, De Sy W. A double-blind comparison between meptazinol (Wy 22811) and 'Buscopan' Compositum in renal colic. *Current Medical Research and Opinion*. 1976;3(10):716-8.
209. Holmes B, Ward A. Meptazinol. *Drugs*. 1985;30(4):285-312.
210. Johnson RE, Jasinski DR. Human pharmacology and abuse potential of meptazinol. *Clin Pharmacol Ther*. 1987;41(4):426-33.
211. Jordan C, Lehane JR, Robson PJ, Jones JG. A comparison of the respiratory effects of meptazinol, pentazocine and morphine. *Br J Anaesth*. 1979;51(6):497-502.
212. Siegel C, Sunshine A, Richman H, Olson NZ, Robissa N, Cordone R, et al. Meptazinol and Morphine in Postoperative Pain Assessed with a New Method for Onset and Duration. 1989;29(11):1017-25.
213. Kaiko RF, Wallenstein SL, Rogers AG, Canel A, Jacobs B, Houde RW. Intramuscular meptazinol and morphine in postoperative pain. *Clin Pharmacol Ther*. 1985;37(5):589-96.
214. Spiegel K, Pasternak GW. Meptazinol: a novel Mu-1 selective opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984;228(2):414-9.
215. Green D. Current concepts concerning the mode of action of meptazinol as an analgesic. *Postgrad Med J*. 1983;59 Suppl 1:9-12.
216. Bill DJ, Hartley JE, Stephens RJ, Thompson AM. The antinociceptive activity of meptazinol depends on both opiate and cholinergic mechanisms. *Br J Pharmacol*. 1983;79(1):191-9.
217. Threlkeld M, Parran TV, Adelman CA, Grey SF, Yu J. Tramadol versus buprenorphine for the management of acute heroin withdrawal: a retrospective matched cohort controlled study. *Am J Addict*. 2006;15(2):186-91.
218. Lewis VA, Gebhart GF. Evaluation of the periaqueductal central gray (PAG) as a morphine-specific locus of action and examination of morphine-induced and stimulation-produced analgesia at coincident PAG loci. *Brain Res*. 1977;124(2):283-303.
219. Cheng ZF, Fields HL, Heinricher MM. Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Res*. 1986;375(1):57-65.
220. Yaksh TL, Rudy TA. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain*. 1978;4(4):299-359.
221. Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(7):565-75.
222. Dickenson AH. Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids. *Br Med Bull*. 1991;47(3):690-702.
223. Yaksh TL. Opioid receptor systems and the endorphins: a review of their spinal organization. *J Neurosurg*. 1987;67(2):157-76.
224. De Pietri L, Siniscalchi A, Reggiani A, Masetti M, Begliomini B, Gazzini M, et al. The use of intrathecal morphine for postoperative pain relief after liver resection: a comparison with epidural analgesia. *Anesth Analg*. 2006;102(4):1157-63.

225. Qin W, Li Y, Liu B, Liu Y, Zhang Y, Zhang X, et al. Intrathecal Morphine Infusion Therapy via a Percutaneous Port for Refractory Cancer Pain in China: An Efficacy, Safety and Cost Utilization Analysis. *J Pain Res.* 2020;13:231-7.
226. Sharpe EE, Molitor RJ, Arendt KW, Torbenson VE, Olsen DA, Johnson RL, et al. Intrathecal Morphine versus Intrathecal Hydromorphone for Analgesia after Cesarean Delivery: A Randomized Clinical Trial. *Anesthesiology.* 2020;132(6):1382-91.
227. Bujedo BM, Santos SG, Azpiazu AU. A review of epidural and intrathecal opioids used in the management of postoperative pain. *J Opioid Manag.* 2012;8(3):177-92.
228. Trang T, Al-Hasani R, Salvemini D, Salter MW, Gutstein H, Cahill CM. Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2015;35(41):13879-88.
229. Stein C, Machelska H, Binder W, Schafer M. Peripheral opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(1):62-5.
230. Rodrigues AR, Duarte ID. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *British journal of pharmacology.* 2000;129(1):110-4.
231. Yaksh TL. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Research.* 1988;458(2):319-24.
232. Celik MO, Labuz D, Henning K, Busch-Dienstfertig M, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL, et al. Leukocyte opioid receptors mediate analgesia via Ca(2+)-regulated release of opioid peptides. *Brain Behav Immun.* 2016;57:227-42.
233. Stein C, Hassan AH, Przewłocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1990;87(15):5935-9.
234. Vadivelu N, Mitra S, Hines RL. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review. *J Opioid Manag.* 2011;7(1):55-68.
235. Iwaszkiewicz K, Schneider J, Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. 2013;4(132).
236. Machelska H, Celik MÖ. Advances in Achieving Opioid Analgesia Without Side Effects. 2018;9(1388).
237. Morgan MM, Christie MJ. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1322-34.
238. Contet C, Kieffer BL, Befort K. Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Current Opinion in Neurobiology.* 2004;14(3):370-8.
239. Schmid CL, Kennedy NM, Ross NC, Lovell KM, Yue Z, Morgenweck J, et al. Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics. *Cell.* 2017;171(5):1165-75.e13.
240. Hill R, Santhakumar R, Dewey W, Kelly E, Henderson G. Fentanyl depression of respiration: Comparison with heroin and morphine. *British journal of pharmacology.* 2020;177(2):254-66.
241. Roy S, Liu HC, Loh HH. mu-Opioid receptor-knockout mice: the role of mu-opioid receptor in gastrointestinal transit. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;56(1-2):281-3.
242. Dahan A, Aarts L, Smith TW. Incidence, Reversal, and Prevention of Opioid-induced Respiratory Depression. *Anesthesiology.* 2010;112(1):226-38.
243. Varga AG, Reid BT, Kieffer BL, Levitt ES. Differential impact of two critical respiratory centres in opioid-induced respiratory depression in awake mice. *J Physiol.* 2020;598(1):189-205.

244. Levitt ES, Abdala AP, Paton JF, Bissonnette JM, Williams JT. μ opioid receptor activation hyperpolarizes respiratory-controlling Kölliker-Fuse neurons and suppresses post-inspiratory drive. *J Physiol*. 2015;593(19):4453-69.
245. Montandon G, Ren J, Victoria NC, Liu H, Wickman K, Greer JJ, et al. G-protein-gated Inwardly Rectifying Potassium Channels Modulate Respiratory Depression by Opioids. *Anesthesiology*. 2016;124(3):641-50.
246. Wei AD, Ramirez JM. Presynaptic Mechanisms and KCNQ Potassium Channels Modulate Opioid Depression of Respiratory Drive. *Front Physiol*. 2019;10:1407.
247. Raehal KM, Walker JK, Bohn LM. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314(3):1195-201.
248. Kliewer A, Gillis A, Hill R, Schmiedel F, Bailey C, Kelly E, et al. Morphine-induced respiratory depression is independent of beta-arrestin2 signalling. *Br J Pharmacol*. 2020;177(13):2923-31.
249. Kliewer A, Schmiedel F, Sianati S, Bailey A, Bateman JT, Levitt ES, et al. Phosphorylation-deficient G-protein-biased mu-opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects. *Nat Commun*. 2019;10(1):367.
250. Kurz A, Sessler DI. Opioid-induced bowel dysfunction: pathophysiology and potential new therapies. *Drugs*. 2003;63(7):649-71.
251. Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH. Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum. *Gastroenterology*. 1991;101(4):970-6.
252. Azevedo Neto J, Costanzini A, De Giorgio R, Lambert DG, Ruzza C, Calo G. Biased versus Partial Agonism in the Search for Safer Opioid Analgesics. *Molecules*. 2020;25(17).
253. Kang M, Maguma HT, Smith TH, Ross GR, Dewey WL, Akbarali HI. The role of beta-arrestin2 in the mechanism of morphine tolerance in the mouse and guinea pig gastrointestinal tract. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;340(3):567-76.
254. Duraffourd C, Kumala E, Anselmi L, Brecha NC, Sternini C. Opioid-induced mitogen-activated protein kinase signaling in rat enteric neurons following chronic morphine treatment. *PLoS one*. 2014;9(10):e110230.
255. Porreca F, Ossipov MH. Nausea and Vomiting Side Effects with Opioid Analgesics during Treatment of Chronic Pain: Mechanisms, Implications, and Management Options. *Pain Medicine*. 2009;10(4):654-62.
256. Herndon CM, Jackson II KC, Hallin PA. Management of Opioid-Induced Gastrointestinal Effects in Patients Receiving Palliative Care. 2002;22(2):240-50.
257. Smith HS, Smith JM, Seidner PJAoPM. Opioid-induced nausea and vomiting. 2012. 2012;1(2):121-9.
258. Dumas EO, Pollack GM. Opioid tolerance development: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *AAPS J*. 2008;10(4):537-51.
259. Allouche S, Noble F, Marie N. Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. 2014;5(280).
260. Melief EJ, Miyatake M, Bruchas MR, Chavkin C. Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(25):11608-13.
261. Terman GW, Jin W, Cheong Y-P, Lowe J, Caron MG, Lefkowitz RJ, et al. G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal. 2004;141(1):55-64.

262. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science*. 1999;286(5449):2495-8.
263. Koblish M, Carr R, Siuda ER, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Cowan CL, et al. TRV0109101, a G protein-biased agonist of the μ -Opioid receptor, does not promote opioid-induced mechanical allodynia following chronic administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;362(2):254-62.
264. Fan X, Zhang J, Zhang X, Yue W, Ma L. Acute and chronic morphine treatments and morphine withdrawal differentially regulate GRK2 and GRK5 gene expression in rat brain. *Neuropharmacology*. 2002;43(5):809-16.
265. Fan XL, Zhang JS, Zhang XQ, Yue W, Ma L. Differential regulation of beta-arrestin 1 and beta-arrestin 2 gene expression in rat brain by morphine. *Neuroscience*. 2003;117(2):383-9.
266. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. 1975;72(8):3092-6.
267. Nagi K, Piñeyro G. Regulation of opioid receptor signalling: Implications for the development of analgesic tolerance. *Molecular Brain*. 2011;4(1):25.
268. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. 2003;97(4):1108-16.
269. Kreuzwiser D, Tawfic QA. Expanding Role of NMDA Receptor Antagonists in the Management of Pain. *CNS Drugs*. 2019;33(4):347-74.
270. Bartlett SE, Cramond T, Smith MT. The excitatory effects of morphine-3-glucuronide are attenuated by LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, and by midazolam, an agonist at the benzodiazepine site on the GABAA receptor complex. *Life Sci*. 1994;54(10):687-94.
271. Trujillo KA. The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Neurotox Res*. 2002;4(4):373-91.
272. Zhao YL, Chen SR, Chen H, Pan HL. Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptor activity in spinal cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(30):25073-85.
273. Vanderah TW, Ossipov MH, Lai J, Malan PTJ, Porreca F. Mechanisms of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance: descending facilitation and spinal dynorphin. 2001;92(1):5-9.
274. Lai J, Luo M-C, Chen Q, Ma S, Gardell LR, Ossipov MH, et al. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nature neuroscience*. 2006;9(12):1534-40.
275. Bannister K, Lee YS, Goncalves L, Porreca F, Lai J, Dickenson AH. Neuropathic plasticity in the opioid and non-opioid actions of dynorphin A fragments and their interactions with bradykinin B2 receptors on neuronal activity in the rat spinal cord. *Neuropharmacology*. 2014;85:375-83.
276. Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF. Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;261(2):669-77.
277. Liu J-G, Anand KJS. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Research Reviews*. 2001;38(1):1-19.
278. Aston-Jones G, Waterhouse B. Locus coeruleus: From global projection system to adaptive regulation of behavior. *Brain research*. 2016;1645:75-8.
279. Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Current neuropharmacology*. 2008;6(3):235-53.

280. Shippenberg TS, Bals-Kubik R, Herz A. Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: role of the mesolimbic dopamine system and D-1 vs. D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;265(1):53-9.
281. Ungless MA, Grace AA. Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends Neurosci.* 2012;35(7):422-30.
282. Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1992;12(2):483-8.
283. Omelchenko N, Sesack SR. Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse.* 2009;63(10):895-906.
284. Bonci A, Williams JT. Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1997;17(2):796-803.
285. Hjelmstad GO, Xia Y, Margolis EB, Fields HL. Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013;33(15):6454-9.
286. Bull FA, Baptista-Hon DT, Lambert JJ, Walwyn W, Hales TG. Morphine activation of mu opioid receptors causes disinhibition of neurons in the ventral tegmental area mediated by beta-arrestin2 and c-Src. *Sci Rep.* 2017;7(1):9969.
287. World Health O. *Pharmacovigilance : ensuring the safe use of medicines.* Geneva: World Health Organization; 2004.
288. Beninger P. *Pharmacovigilance: An Overview.* *Clinical Therapeutics.* 2018;40(12):1991-2004.
289. Administration UFaD. *Questions and Answers on FDA's Adverse Event Reporting System (FAERS) 2018* [Available from: <https://www.fda.gov/drugs/surveillance/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers>].
290. Williamson T, Lévesque L, Morkem R, Birtwhistle R. Le rôle du RCSSSP dans une meilleure pharmacovigilance. *Canadian Family Physician.* 2014;60(7):679-80.
291. Lerch M, Nowicki P, Manlik K, Wirsching G. Statistical Signal Detection as a Routine Pharmacovigilance Practice: Effects of Periodicity and Resignalling Criteria on Quality and Workload. *Drug Saf.* 2015;38(12):1219-31.
292. Noguchi Y, Tachi T, Teramachi H. Review of Statistical Methodologies for Detecting Drug–Drug Interactions Using Spontaneous Reporting Systems. 2019;10.
293. Johnson K, Guo C, Gosink M, Wang V, Hauben M. Multinomial modeling and an evaluation of common data-mining algorithms for identifying signals of disproportionate reporting in pharmacovigilance databases. *Bioinformatics.* 2012;28(23):3123-30.
294. Gan TJ, Diemunsch P, Habib AS, Kovac A, Kranke P, Meyer TA, et al. Consensus Guidelines for the Management of Postoperative Nausea and Vomiting. 2014;118(1):85-113.
295. Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesth Analg.* 2003;97(2):534-40.
296. Graziottin A, Gardner-Nix J, Stumpf M, Berliner MN. Opioids: how to improve compliance and adherence. *Pain Pract.* 2011;11(6):574-81.

297. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(1):1-13.
298. Rankovic Z, Brust TF, Bohn LM. Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(2):241-50.
299. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nature reviews Drug discovery.* 2013;12(3):205-16.
300. Stott LA, Hall DA, Holliday ND. Unravelling intrinsic efficacy and ligand bias at G protein coupled receptors: A practical guide to assessing functional data. *Biochem Pharmacol.* 2016;101:1-12.
301. Onaran HO, Ambrosio C, Ugur O, Madaras Koncz E, Gro MC, Vezzi V, et al. Systematic errors in detecting biased agonism: Analysis of current methods and development of a new model-free approach. *Sci Rep.* 2017;7:44247.
302. Black JW, Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1983;220(1219):141-62.
303. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(3):193-203.
304. Rajagopal S. Quantifying biased agonism: understanding the links between affinity and efficacy. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2013;12(6):483-.
305. Kelly E. Ligand bias at the mu-opioid receptor. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(1):218-24.
306. Kenakin T, Christopoulos A. Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2013;12(6):483-.
307. Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends in pharmacological sciences.* 2014;35(7):308-16.
308. DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, et al. A G Protein-biased ligand at the μ -Opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;344(3):708-17.
309. Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature.* 2000;408(6813):720-3.
310. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2002;22(23):10494-500.
311. Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, et al. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature.* 2016;537(7619):185-90.
312. Váradi A, Marrone GF, Palmer TC, Narayan A, Szabó MR, Le Rouzic V, et al. Mitragnine/Corynantheidine Pseudoindoxyls As Opioid Analgesics with Mu Agonism and Delta Antagonism, Which Do Not Recruit β -Arrestin-2. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2016;59(18):8381-97.
313. Pineyro G, Nagi K. Signaling diversity of mu- and delta- opioid receptor ligands: Re-evaluating the benefits of β -arrestin/G protein signaling bias. *Cell Signal.* 2021;80:109906.
314. Food and Drug Administration U. FDA Approves New Opioid for Intravenous Use in Hospitals, Other Controlled Clinical Settings 2020 [Available from: <https://www.fda.gov/news->

[events/press-announcements/fda-approves-new-opioid-intravenous-use-hospitals-other-controlled-clinical-settings.](#)

315. Kingwell K. Pioneering biased ligand offers efficacy with reduced on-target toxicity. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14(12):809-10.
316. Hill R, Disney A, Conibear A, Sutcliffe K, Dewey W, Husbands S, et al. The novel μ -opioid receptor agonist PZM21 depresses respiration and induces tolerance to antinociception. *Br J Pharmacol*. 2018;175(13):2653-61.
317. Gillis A, Gondin AB, Kliever A, Sanchez J, Lim HD, Alamein C, et al. Low intrinsic efficacy for G protein activation can explain the improved side effect profiles of new opioid agonists. *Sci Signal*. 2020;13(625).
318. Du GH, Yuan TY, Du LD, Zhang YX. The Potential of Traditional Chinese Medicine in the Treatment and Modulation of Pain. *Adv Pharmacol*. 2016;75:325-61.
319. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry*. 2006;28(2):153-7.
320. Bridgeman MB, Abazia DT. Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *P T*. 2017;42(3):180-8.
321. Beaulieu P. Les cannabinoïdes. *La douleur Guide pharmacologique et thérapeutique: Les presses de l'Université de Montréal*; 2013. p. 123-7.
322. Minister of Justice. Marijuana Medical Access Regulations 2001 [Available from: <https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/sor-2001-227/index.html>].
323. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*. 1964;86(8):1646-7.
324. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
325. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90.
326. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;215(1):89-97.
327. Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Fride E, Vogel Z, Bayewitch M, et al. Endogenous cannabinoid ligands--chemical and biological studies. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1996;14(1-3):45-9.
328. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 1997;277(5329):1094-7.
329. Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci*. 2012;6:9.
330. Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J*. 1996;316 (Pt 3):977-84.

331. Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J.* 1997;322 (Pt 2):671-7.
332. Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules.* 2014;19(11):17078-106.
333. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature reviews Drug discovery.* 2004;3(9):771-84.
334. Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature.* 2001;410(6828):588-92.
335. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 2003;83(3):1017-66.
336. Guindon J, Beaulieu P. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 2006;50(7):814-23.
337. Welch SP, Dunlow LD, Patrick GS, Razdan RK. Characterization of anandamide- and fluoroanandamide-induced antinociception and cross-tolerance to delta 9-THC after intrathecal administration to mice: blockade of delta 9-THC-induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273(3):1235-44.
338. Jhaveri MD, Richardson D, Kendall DA, Barrett DA, Chapman V. Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2006;26(51):13318-27.
339. Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(3):969-82.
340. Guindon J, Desroches J, Beaulieu P. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. *Br J Pharmacol.* 2007;150(6):693-701.
341. Alkaitis MS, Solorzano C, Landry RP, Piomelli D, DeLeo JA, Romero-Sandoval EA. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PloS one.* 2010;5(5):e10891.
342. Desroches J, Charron S, Bouchard JF, Beaulieu P. Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB(1) and CB(2) receptors. *Neuropharmacology.* 2014;77:441-52.
343. Woodhams SG, Sagar DR, Burston JJ, Chapman V. The role of the endocannabinoid system in pain. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;227:119-43.
344. Yin A-q, Wang F, Zhang X. Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2019;40(3):336-41.
345. Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(7):5298-305.

346. Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* 2003;163(3):463-8.
347. O'Sullivan SE. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2016;173(12):1899-910.
348. Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:487.
349. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves KM. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends in pharmacological sciences.* 2009;30(2):79-84.
350. Caterina MJ. TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(11):1107-16.
351. Winter Z, Buhala A, Otvos F, Josvay K, Vizler C, Dombi G, et al. Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel--an overview of the current mutational data. *Mol Pain.* 2013;9:30.
352. Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;131:73-118.
353. Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016;9(4).
354. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816-24.
355. Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, et al. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature.* 2018;555(7698):662-6.
356. Moran MM, Szallasi A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *Br J Pharmacol.* 2018;175(12):2185-203.
357. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17002.
358. Urano H, Ara T, Fujinami Y, Hiraoka BY. Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain. *Int J Med Sci.* 2012;9(8):690-7.
359. Zhang BY, Zhang YL, Sun Q, Zhang PA, Wang XX, Xu GY, et al. Alpha-lipoic acid downregulates TRPV1 receptor via NF-kappaB and attenuates neuropathic pain in rats with diabetes. *CNS Neurosci Ther.* 2020;26(7):762-72.
360. Cui YY, Xu H, Wu HH, Qi J, Shi J, Li YQ. Spatio-temporal expression and functional involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in diabetic mechanical allodynia in rats. *PloS one.* 2014;9(7):e102052.
361. Premkumar LS, Abooj M. TRP channels and analgesia. *Life Sci.* 2013;92(8-9):415-24.
362. Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA. Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules.* 2016;21(7).
363. Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, et al. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain.* 2006;123(1-2):106-16.
364. Iannotti FA, Hill CL, Leo A, Alhusaini A, Soubrane C, Mazzarella E, et al. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize

transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(11):1131-41.

365. Derry S, Rice AS, Cole P, Tan T, Moore RA. Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1:CD007393.

366. Chung MK, Campbell JN. Use of Capsaicin to Treat Pain: Mechanistic and Therapeutic Considerations. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(4).

367. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999;400(6743):452-7.

368. Storozhuk MV, Zholos AV. TRP Channels as Novel Targets for Endogenous Ligands: Focus on Endocannabinoids and Nociceptive Signalling. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(2):137-50.

369. Grant I, Atkinson JH, Gouaux B, Wilsey B. Medical marijuana: clearing away the smoke. *Open Neurol J*. 2012;6:18-25.

370. Lu Y, Anderson HD. Cannabinoid signaling in health and disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(4):311-27.

371. Reiman A, Welty M, Solomon P. Cannabis as a Substitute for Opioid-Based Pain Medication: Patient Self-Report. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017;2(1):160-6.

372. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol*. 2018;227:300-15.

373. Ware MA, Wang T, Shapiro S, Robinson A, Ducruet T, Huynh T, et al. Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *CMAJ*. 2010;182(14):E694-701.

374. Kevin FB, Saurav G, Daniel JC, Rebecca LH. Qualifying Conditions Of Medical Cannabis License Holders In The United States. 2019;38(2):295-302.

375. Häuser W, Finn DP, Kalso E, Krceviski-Skvarc N, Kress H-G, Morlion B, et al. European Pain Federation (EFIC) position paper on appropriate use of cannabis-based medicines and medical cannabis for chronic pain management. 2018;22(9):1547-64.

376. Busse JW, Vankrunkelsven P, Zeng L, Heen AF, Merglen A, Campbell F, et al. Medical cannabis or cannabinoids for chronic pain: a clinical practice guideline. 2021;374:n2040.

377. Rock EM, Parker LA. Constituents of Cannabis Sativa. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1264:1-13.

378. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011;163(7):1344-64.

379. Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses*. 2006;66(2):234-46.

380. Hudson R, Renard J, Norris C, Rushlow WJ, Laviolette SR. Cannabidiol Counteracts the Psychotropic Side-Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in the Ventral Hippocampus through Bidirectional Control of ERK1-2 Phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2019;39(44):8762-77.

381. Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod*. 2017;103:103-31.

382. Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. Antihyperalgesic effect of a Cannabis sativa extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phyther Res*. 2008;22(8):1017-24.

383. Formukong EA, Evans AT, Evans FJ. Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of *Cannabis sativa* L. *Inflammation*. 1988;12(4):361-71.
384. Costa B, Trovato AE, Comelli F, Giagnoni G, Colleoni M. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2007;556(1-3):75-83.
385. Mao J, Price DD, Lu J, Keniston L, Mayer DJ. Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. *Neurosci Lett*. 2000;280(1):13-6.
386. Smith PB, Martin BR. Spinal mechanisms of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia. *Brain Res*. 1992;578(1-2):8-12.
387. De Gregorio D, McLaughlin RJ, Posa L, Ochoa-Sanchez R, Enns J, Lopez-Canul M, et al. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*. 2019;160(1):136-50.
388. Aly E, Khajah MA, Masocha W. beta-Caryophyllene, a CB2-Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Antiretroviral-Induced Neuropathic Pain. *Molecules*. 2019;25(1).
389. Stith SS, Vigil JM, Brockelman F, Keeling K, Hall B. The Association between Cannabis Product Characteristics and Symptom Relief. *Sci Rep*. 2019;9(1):2712.
390. Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):389-462.
391. Beardsley PM, Scimeca JA, Martin BR. Studies on the agonistic activity of delta 9-11-tetrahydrocannabinol in mice, dogs and rhesus monkeys and its interactions with delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;241(2):521-6.
392. Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR. Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;247(3):1046-51.
393. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem*. 1999;6(8):635-64.
394. Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(168):1-51.
395. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161-202.
396. Pacher P, Mechoulam R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res*. 2011;50(2):193-211.
397. McHugh D, Page J, Dunn E, Bradshaw HB. Delta(9) -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br J Pharmacol*. 2012;165(8):2414-24.
398. Vara D, Morell C, Rodriguez-Henche N, Diaz-Laviada I. Involvement of PPARgamma in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*. 2013;4:e618.
399. Barann M, Molderings G, Bruss M, Bonisch H, Urban BW, Gothert M. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT3A receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol*. 2002;137(5):589-96.
400. Russo EB, Marcu J. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Adv Pharmacol*. 2017;80:67-134.

401. Kathmann M, Flau K, Redmer A, Trankle C, Schlicker E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006;372(5):354-61.
402. Smith FL, Cichewicz D, Martin ZL, Welch SP. The enhancement of morphine antinociception in mice by delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;60(2):559-66.
403. Xiong W, Cheng K, Cui T, Godlewski G, Rice KC, Xu Y, et al. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nature chemical biology.* 2011;7(5):296-303.
404. De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, Bisogno T, Petrosino S, et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol.* 2011;163(7):1479-94.
405. Jardin I, Lopez JJ, Diez R, Sanchez-Collado J, Cantonero C, Albarran L, et al. TRPs in Pain Sensation. *Front Physiol.* 2017;8:392.
406. Wood TB, Spivey WTN, Easterfield TH. III.—Cannabinol. Part I. *Journal of the Chemical Society, Transactions.* 1899;75(0):20-36.
407. Karniol IG, Shirakawa I, Takahashi RN, Knobel E, Musty RE. Effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabiniol in man. *Pharmacology.* 1975;13(6):502-12.
408. Wong H, Cairns BE. Cannabidiol, cannabiniol and their combinations act as peripheral analgesics in a rat model of myofascial pain. *Arch Oral Biol.* 2019;104:33-9.
409. Sofia RD, Vassar HB, Knobloch LC. Comparative analgesic activity of various naturally occurring cannabinoids in mice and rats. *Psychopharmacologia.* 1975;40(4):285-95.
410. Welburn PJ, Starmer GA, Cheshier GB, Jackson DM. Effect of cannabinoids on the abdominal constriction response in mice: within cannabinoid interactions. *Psychopharmacologia.* 1976;46(1):83-5.
411. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, et al. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 2015;313(24):2456-73.
412. Niesink RJM, van Laar MW. Does Cannabidiol Protect Against Adverse Psychological Effects of THC? *Front Psychiatry.* 2013;4:130-.
413. Pennypacker SD, Romero-Sandoval EA. CBD and THC: Do They Complement Each Other Like Yin and Yang? *Pharmacotherapy.* 2020;40(11):1152-65.
414. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Denovan-Wright EM. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2015;172(20):4790-805.
415. Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007;150(5):613-23.
416. Finlay DB, Sircombe KJ, Nimick M, Jones C, Glass M. Terpenoids From Cannabis Do Not Mediate an Entourage Effect by Acting at Cannabinoid Receptors. *Front Pharmacol.* 2020;11:359.
417. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):199-215.
418. Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res.* 2005;30(8):1037-43.

419. Jesus CHA, Redivo DDB, Gasparin AT, Sotomaio BB, de Carvalho MC, Genaro K, et al. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT_{1A} receptors. *Brain Res.* 2019;1715:156-64.
420. Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR₁ receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001;134(4):845-52.
421. Anand U, Jones B, Korchev Y, Bloom SR, Pacchetti B, Anand P, et al. CBD Effects on TRPV₁ Signaling Pathways in Cultured DRG Neurons. *J Pain Res.* 2020;13:2269-78.
422. Davis WM, Hatoum NS. Neurobehavioral actions of cannabichromene and interactions with delta 9-tetrahydrocannabinol. *Gen Pharmacol.* 1983;14(2):247-52.
423. Rosenthaler S, Pohn B, Kolmanz C, Huu CN, Krewenka C, Huber A, et al. Differences in receptor binding affinity of several phytocannabinoids do not explain their effects on neural cell cultures. *Neurotoxicol Teratol.* 2014;46:49-56.
424. Udoh M, Santiago M, Devenish S, McGregor IS, Connor M. Cannabichromene is a cannabinoid CB₂ receptor agonist. *British journal of pharmacology.* 2019;176(23):4537-47.
425. Maione S, Piscitelli F, Gatta L, Vita D, De Petrocellis L, Palazzo E, et al. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br J Pharmacol.* 2011;162(3):584-96.
426. De Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS, Aviello G, Stott C, Izzo AA, et al. Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV₃ and TRPV₄ and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol (Oxf).* 2012;204(2):255-66.
427. Evans FJ. Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Med.* 1991;57(7):S60-7.
428. Navarro G, Varani K, Reyes-Resina I, Sánchez de Medina V, Rivas-Santisteban R, Sánchez-Carnerero Callado C, et al. Cannabigerol Action at Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors and at CB₁-CB₂ Heteroreceptor Complexes. *Frontiers in pharmacology.* 2018;9:632-.
429. Borrelli F, Fasolino I, Romano B, Capasso R, Maiello F, Coppola D, et al. Beneficial effect of the non-psychoactive plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(9):1306-16.
430. Cascio MG, Gauson LA, Stevenson LA, Ross RA, Pertwee RG. Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha₂-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT_{1A} receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2010;159(1):129-41.
431. LaVigne JE, Hecksel R, Keresztes A, Streicher JM. Cannabis sativa terpenes are cannabimimetic and selectively enhance cannabinoid activity. *Sci Rep.* 2021;11(1):8232.
432. de Oliveira DR, da Silva DM, Florentino IF, de Brito AF, Fajemiroye JO, da Silva DPB, et al. Monoamine Involvement in the Antidepressant-Like Effect of beta-Caryophyllene. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2018;17(4):309-20.
433. Singh B, Sharma RA. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech.* 2015;5(2):129-51.
434. Bahi A, Al Mansouri S, Al Memari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Ojha S. beta-Caryophyllene, a CB₂ receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol Behav.* 2014;135:119-24.

435. Katsuyama S, Mizoguchi H, Kuwahata H, Komatsu T, Nagaoka K, Nakamura H, et al. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in beta-caryophyllene-induced antinociception. *Eur J Pain*. 2013;17(5):664-75.
436. Boggs DL, Nguyen JD, Morgenson D, Taffe MA, Ranganathan M. Clinical and Preclinical Evidence for Functional Interactions of Cannabidiol and Delta(9)-Tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(1):142-54.
437. Dalton WS, Martz R, Lemberger L, Rodda BE, Forney RB. Influence of cannabidiol on delta-9-tetrahydrocannabinol effects. *Clin Pharmacol Ther*. 1976;19(3):300-9.
438. Ilan AB, Gevins A, Coleman M, ElSohly MA, de Wit H. Neurophysiological and subjective profile of marijuana with varying concentrations of cannabinoids. *Behav Pharmacol*. 2005;16(5-6):487-96.
439. King KM, Myers AM, Soroka-Monzo AJ, Tuma RF, Tallarida RJ, Walker EA, et al. Single and combined effects of Delta(9) -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Br J Pharmacol*. 2017;174(17):2832-41.
440. Casey SL, Atwal N, Vaughan CW. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model. *Pain*. 2017;158(12):2452-60.
441. Potter DJ. A review of the cultivation and processing of cannabis (*Cannabis sativa* L.) for production of prescription medicines in the UK. *Drug Test Anal*. 2014;6(1-2):31-8.
442. Johnson JR, Burnell-Nugent M, Lossignol D, Ganee-Motan ED, Potts R, Fallon MT. Multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy, safety, and tolerability of THC:CBD extract and THC extract in patients with intractable cancer-related pain. *J Pain Symptom Manage*. 2010;39(2):167-79.
443. Mandolino G, Bagatta M, Carboni A, Ranalli P, de Meijer E. Qualitative and Quantitative Aspects of the Inheritance of Chemical Phenotype in Cannabis. *Journal of Industrial Hemp*. 2003;8(2):51-72.
444. Small E, Beckstead HD. Letter: Cannabinoid phenotypes in *Cannabis sativa*. *Nature*. 1973;245(5421):147-8.
445. Food and Drug Administration U. FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products, Including Cannabidiol (CBD) 2021 [Available from: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd#approved>].
446. The Minister of Justice C. Cannabis Regulations 2018 [Available from: <https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/sor-2018-144/FullText.html>].
447. Potts AJ, Cano C, Thomas SHL, Hill SL. Synthetic cannabinoid receptor agonists: classification and nomenclature. *Clinical Toxicology*. 2020;58(2):82-98.
448. Coronado-Alvarez A, Romero-Cordero K, Macias-Triana L, Tatum-Kuri A, Vera-Barron A, Budde H, et al. The synthetic CB1 cannabinoid receptor selective agonists: Putative medical uses and their legalization. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021;110:110301.
449. Beltramo M. Cannabinoid type 2 receptor as a target for chronic - pain. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9(1):11-25.
450. Tsou K, Lowitz KA, Hohmann AG, Martin WJ, Hathaway CB, Bereiter DA, et al. Suppression of noxious stimulus-evoked expression of Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord by a selective cannabinoid agonist. *Neuroscience*. 1996;70(3):791-8.

451. Kang S, Kim CH, Lee H, Kim DY, Han JI, Chung RK, et al. Antinociceptive synergy between the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and bupivacaine in the rat formalin test. *Anesth Analg*. 2007;104(3):719-25.
452. Dogrul A, Gul H, Yildiz O, Bilgin F, Guzeldemir ME. Cannabinoids blocks tactile allodynia in diabetic mice without attenuation of its antinociceptive effect. *Neurosci Lett*. 2004;368(1):82-6.
453. Jahanabadi S, Hadian MR, Shamsaee J, Tavangar SM, Abdollahi A, Dehpour A, et al. The effect of spinally administered WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on thermal pain sensitivity in diabetic rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2016;19(4):394-401.
454. Jeske NA, Patwardhan AM, Gamper N, Price TJ, Akopian AN, Hargreaves KM. Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(43):32879-90.
455. Patwardhan AM, Jeske NA, Price TJ, Gamper N, Akopian AN, Hargreaves KM. The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(30):11393-8.
456. Soethoudt M, Grether U, Fingerle J, Grim TW, Fezza F, de Petrocellis L, et al. Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nat Commun*. 2017;8:13958.
457. Khajehali E, Malone DT, Glass M, Sexton PM, Christopoulos A, Leach K. Biased Agonism and Biased Allosteric Modulation at the CB₁ Cannabinoid Receptor. 2015;88(2):368-79.
458. Laprairie RB, Bagher AM, Denovan-Wright EM. Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;32:32-43.
459. Navarro G, Reyes-Resina I, Rivas-Santisteban R, Sánchez de Medina V, Morales P, Casano S, et al. Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes. *Biochemical Pharmacology*. 2018;157:148-58.
460. Shoemaker JL, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL. Agonist-Directed Trafficking of Response by Endocannabinoids Acting at CB2 Receptors. 2005;315(2):828-38.
461. Gillis A, Sreenivasan V, Christie MJ. Intrinsic Efficacy of Opioid Ligands and Its Importance for Apparent Bias, Operational Analysis, and Therapeutic Window. *Molecular pharmacology*. 2020;98(4):410-24.
462. Onaran HO, Costa T. Conceptual and experimental issues in biased agonism. *Cellular Signalling*. 2021;82:109955.
463. Benredjem B, Dallaire P, Pineyro G. Analyzing biased responses of GPCR ligands. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;32:71-6.
464. Poyatos L, Pérez-Acevedo AP, Papaseit E, Pérez-Mañá C, Martin S, Hladun O, et al. Oral Administration of Cannabis and Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) Preparations: A Systematic Review. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(6):309.
465. Fraguas-Sánchez AI, Torres-Suárez AI. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs*. 2018;78(16):1665-703.
466. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(4):327-60.
467. Lucas CJ, Galettis P, Schneider J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(11):2477-82.

468. Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol.* 1992;16(5):276-82.
469. Organization. WH. Alcohol, Drugs and Addictive Behaviours Unit 2021 [Available from: <https://www.who.int/teams/mental-health-and-substance-use/alcohol-drugs-and-addictive-behaviours/drugs-psychoactive/cannabis>].
470. Badowski ME, Yanful PK. Dronabinol oral solution in the management of anorexia and weight loss in AIDS and cancer. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:643-51.
471. INSERM Indlstedlrm. Cannabinoïdes et système nerveux central. *Cannabis : Quels effets sur le comportement et la santé ?*: Les éditions Inserm; 2001. p. 297-310.
472. Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain.* 2003;126(6):1252-70.
473. Joshi M, Joshi A, Bartter T. Marijuana and lung diseases. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20(2):173-9.
474. Curran HV, Freeman TP, Mokrysz C, Lewis DA, Morgan CJ, Parsons LH. Keep off the grass? Cannabis, cognition and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17(5):293-306.
475. Blanco C, Hasin DS, Wall MM, Florez-Salamanca L, Hoertel N, Wang S, et al. Cannabis Use and Risk of Psychiatric Disorders: Prospective Evidence From a US National Longitudinal Study. *JAMA Psychiatry.* 2016;73(4):388-95.
476. Gazendam A, Nucci N, Gouveia K, Abdel Khalik H, Rubinger L, Johal H. Cannabinoids in the Management of Acute Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2020;5(4):290-7.
477. Pergolizzi JV, Jr., Lequang JA, Taylor R, Jr., Raffa RB, Colucci D, Group NR. The role of cannabinoids in pain control: the good, the bad, and the ugly. *Minerva Anesthesiol.* 2018;84(8):955-69.
478. Stevens AJ, Higgins MD. A systematic review of the analgesic efficacy of cannabinoid medications in the management of acute pain. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2017;61(3):268-80.
479. Campbell FA, Tramèr MR, Carroll D, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ (Clinical research ed).* 2001;323(7303):13-6.
480. Fallon MT, Albert Lux E, McQuade R, Rossetti S, Sanchez R, Sun W, et al. Sativex oromucosal spray as adjunctive therapy in advanced cancer patients with chronic pain unalleviated by optimized opioid therapy: two double-blind, randomized, placebo-controlled phase 3 studies. *Br J Pain.* 2017;11(3):119-33.
481. Bestard JA, Toth CC. An open-label comparison of nabilone and gabapentin as adjuvant therapy or monotherapy in the management of neuropathic pain in patients with peripheral neuropathy. *Pain Pract.* 2011;11(4):353-68.
482. Serpell M, Ratcliffe S, Hovorka J, Schofield M, Taylor L, Lauder H, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group study of THC/CBD spray in peripheral neuropathic pain treatment. *Eur J Pain.* 2014;18(7):999-1012.
483. Moulin DE, Clark AJ, Gilron I, Ware MA, Watson CP, Sessle BJ, et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag.* 2007;12(1):13-21.

484. Malan TP, Jr., Ibrahim MM, Lai J, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(1):62-7.
485. Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol.* 1999;81(2):575-83.
486. Lichtman AH, Martin BR. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;258(2):517-23.
487. Martin WJ, Patrick SL, Coffin PO, Tsou K, Walker JM. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sci.* 1995;56(23-24):2103-9.
488. Lichtman AH, Cook SA, Martin BR. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;276(2):585-93.
489. Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature.* 1998;395(6700):381-3.
490. Martin WJ, Tsou K, Walker JM. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neurosci Lett.* 1998;242(1):33-6.
491. Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Molecular pharmacology.* 2000;57(2):288-95.
492. Meng ID, Johansen JP. Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. *Neuroscience.* 2004;124(3):685-93.
493. Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F, et al. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2007;27(50):13739-49.
494. Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, et al. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology.* 2007;52(2):415-22.
495. Siegling A, Hofmann HA, Denzer D, Mauler F, De Vry J. Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2001;415(1):R5-7.
496. Giordano C, Cristino L, Luongo L, Siniscalco D, Petrosino S, Piscitelli F, et al. TRPV1-dependent and -independent alterations in the limbic cortex of neuropathic mice: impact on glial caspases and pain perception. *Cereb Cortex.* 2012;22(11):2495-518.
497. Yaksh TL. The antinociceptive effects of intrathecally administered levonantradol and desacetyllevonantradol in the rat. *J Clin Pharmacol.* 1981;21(S1):334S-40S.
498. Dogrul A, Gul H, Akar A, Yildiz O, Bilgin F, Guzeldemir E. Topical cannabinoid antinociception: synergy with spinal sites. *Pain.* 2003;105(1-2):11-6.
499. Ikeda H, Ikegami M, Kai M, Ohsawa M, Kamei J. Activation of spinal cannabinoid CB2 receptors inhibits neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic mice. *Neuroscience.* 2013;250:446-54.

500. Mao Y, Huang Y, Zhang Y, Wang C, Wu H, Tian X, et al. Cannabinoid receptor 2selective agonist JWH015 attenuates bone cancer pain through the amelioration of impaired autophagy flux induced by inflammatory mediators in the spinal cord. *Mol Med Rep.* 2019;20(6):5100-10.
501. Elmes SJ, Jhaveri MD, Smart D, Kendall DA, Chapman V. Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in I rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Neurosci.* 2004;20(9):2311-20.
502. Strangman NM, Walker JM. Cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits the activity-dependent facilitation of spinal nociceptive responses. *J Neurophysiol.* 1999;82(1):472-7.
503. Herrero JF. Wind-Up of Spinal Cord Neurons. In: Schmidt RF, Willis WD, editors. *Encyclopedia of Pain.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 2668-70.
504. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain.* 2009;10(9):895-926.
505. Starowicz K, Makuch W, Osikowicz M, Piscitelli F, Petrosino S, Di Marzo V, et al. Spinal anandamide produces analgesia in neuropathic rats: possible CB(1)- and TRPV1-mediated mechanisms. *Neuropharmacology.* 2012;62(4):1746-55.
506. Lim G, Sung B, Ji RR, Mao J. Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain.* 2003;105(1-2):275-83.
507. Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I, Urban L. Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 2001;429(1-3):93-100.
508. Morisset V, Urban L. Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J Neurophysiol.* 2001;86(1):40-8.
509. Sideris A, Piskoun B, Russo L, Norcini M, Blanck T, Recio-Pinto E. Cannabinoid 1 receptor knockout mice display cold allodynia, but enhanced recovery from spared-nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain.* 2016;12.
510. Racz I, Nadal X, Alferink J, Banos JE, Rehnelt J, Martin M, et al. Interferon-gamma is a critical modulator of CB(2) cannabinoid receptor signaling during neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2008;28(46):12136-45.
511. Kanai Y, Nakazato E, Fujiuchi A, Hara T, Imai A. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology.* 2005;49(7):977-84.
512. Pabbidi RM, Yu SQ, Peng S, Khardori R, Pauza ME, Premkumar LS. Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. *Mol Pain.* 2008;4:9.
513. Haranishi Y, Hara K, Terada T. Inhibitory effect of intrathecally administered AM404, an endocannabinoid reuptake inhibitor, on neuropathic pain in a rat chronic constriction injury model. *Pharmacol Rep.* 2021;73(3):820-7.
514. Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(2-3):243-56.
515. Basu S, Dittel BN. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol Res.* 2011;51(1):26-38.
516. Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain.* 1998;75(1):111-9.

517. Svizenska IH, Brazda V, Klusakova I, Dubovy P. Bilateral changes of cannabinoid receptor type 2 protein and mRNA in the dorsal root ganglia of a rat neuropathic pain model. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(7):529-47.
518. Zhou Y, Wang Y, Abdelhady M, Mourad MS, Hassouna MM. Change of vanilloid receptor 1 following neuromodulation in rats with spinal cord injury. *J Surg Res.* 2002;107(1):140-4.
519. Hong S, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(1):618-27.
520. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, et al. Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;335(3):572-9.
521. Gillis A, Kliewer A, Kelly E, Henderson G, Christie MJ, Schulz S, et al. Critical Assessment of G Protein-Biased Agonism at the μ -Opioid Receptor. *Trends in pharmacological sciences.* 2020;41(12):947-59.
522. Bagheri Tudashki H, Haddad Y, Charfi I, Couture R, Pineyro G. Ligand-specific recycling profiles determine distinct potential for chronic analgesic tolerance of delta-opioid receptor (DOPr) agonists. *J Cell Mol Med.* 2020;24(10):5718-30.
523. Rouhollahi E, MacLeod BA, Barr AM, Puil E. Cannabis Extract CT-921 Has a High Efficacy-Adverse Effect Profile in a Neuropathic Pain Model. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:3351-61.
524. Deng L, Guindon J, Cornett BL, Makriyannis A, Mackie K, Hohmann AG. Chronic cannabinoid receptor 2 activation reverses paclitaxel neuropathy without tolerance or cannabinoid receptor 1-dependent withdrawal. *Biol Psychiatry.* 2015;77(5):475-87.
525. Costa B. On the pharmacological properties of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC). *Chem Biodivers.* 2007;4(8):1664-77.
526. Javadi-Paydar M, Nguyen JD, Kerr TM, Grant Y, Vandewater SA, Cole M, et al. Effects of Delta9-THC and cannabidiol vapor inhalation in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2018;235(9):2541-57.
527. Linher-Melville K, Zhu YF, Sidhu J, Parzei N, Shahid A, Seesankar G, et al. Evaluation of the preclinical analgesic efficacy of naturally derived, orally administered oil forms of Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), and their 1:1 combination. *PloS one.* 2020;15(6):e0234176-e.
528. Harris HM, Rousseau MA, Wanas AS, Radwan MM, Caldwell S, Sufka KJ, et al. Role of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis-Mediated Analgesia in Rats. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2019;4(3):177-82.
529. Dewey W. Buprenorphine. In: Enna SJ, Bylund DB, editors. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* New York: Elsevier; 2007. p. 1-8.
530. Klein Herenbrink C, Sykes DA, Donthamsetti P, Canals M, Coudrat T, Shonberg J, et al. The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. *Nature Communications.* 2016;7(1):10842.
531. Kelly E. Efficacy and ligand bias at the μ -opioid receptor. *Br J Pharmacol.* 2013;169(7):1430-46.
532. Nickolls SA, Waterfield A, Williams RE, Kinloch RA. Understanding the effect of different assay formats on agonist parameters: a study using the micro-opioid receptor. *J Biomol Screen.* 2011;16(7):706-16.

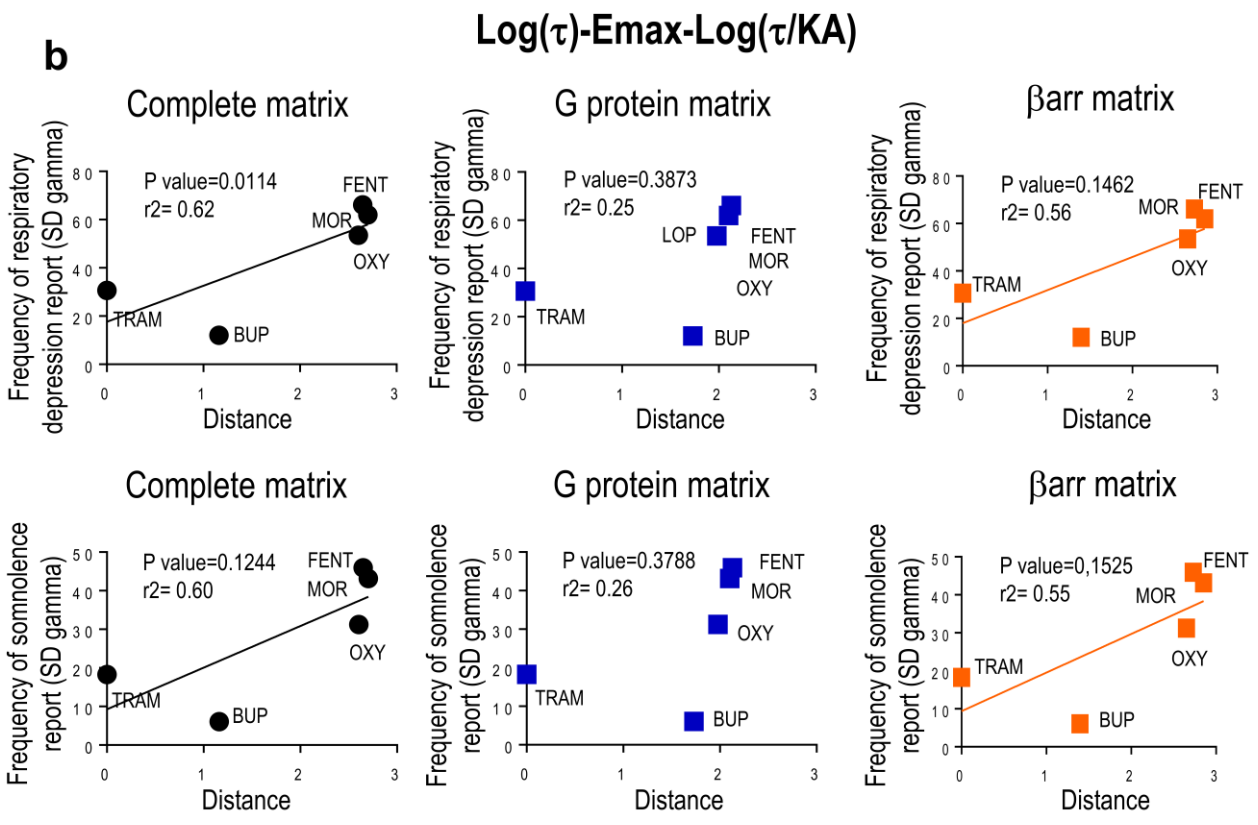
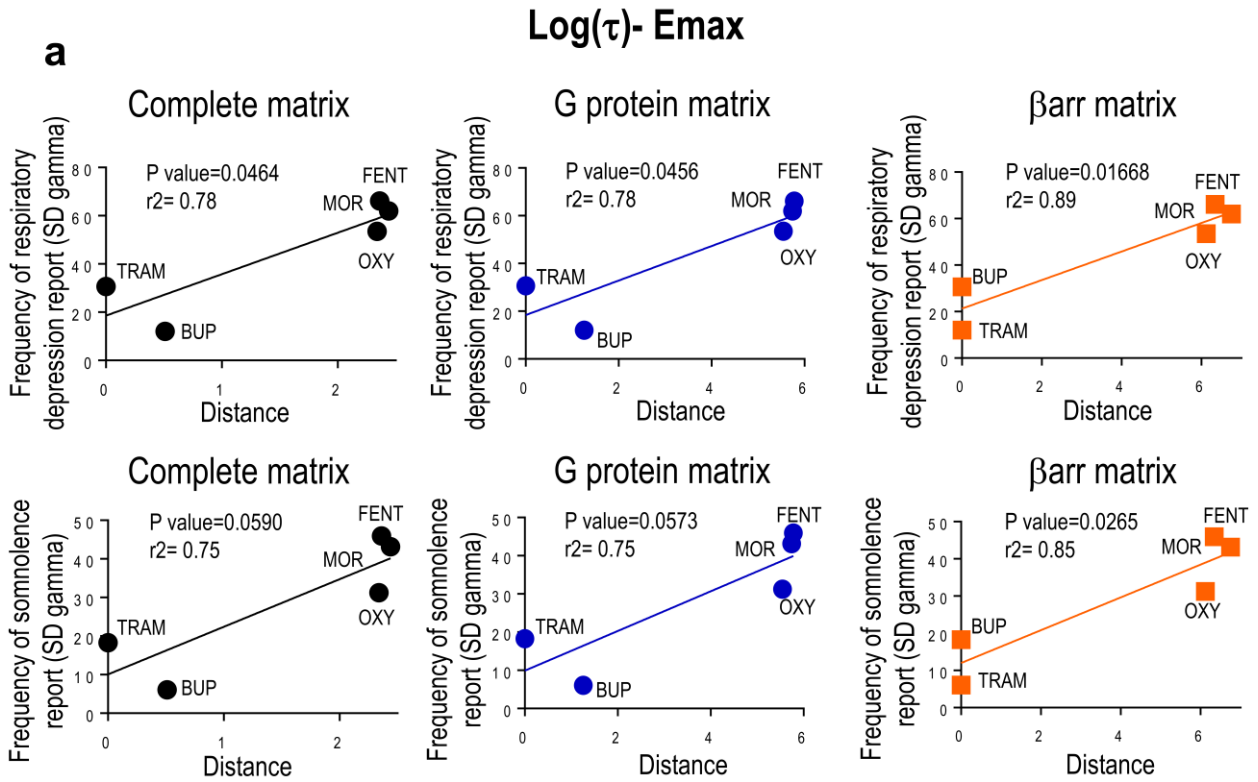
533. Wan Q, Okashah N, Inoue A, Nehmé R, Carpenter B, Tate CG, et al. Mini G protein probes for active G protein-coupled receptors (GPCRs) in live cells. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(19):7466-73.
534. Charfi I, Nagi K, Mnie-Filali O, Thibault D, Balboni G, Schiller PW, et al. Ligand- and cell-dependent determinants of internalization and cAMP modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(8):1529-46.
535. Vasudevan L, Vandeputte M, Deventer M, Wouters E, Cannaert A, Stove CP. Assessment of structure-activity relationships and biased agonism at the Mu opioid receptor of novel synthetic opioids using a novel, stable bio-assay platform. *Biochemical Pharmacology*. 2020;177:113910.
536. Conibear AE, Kelly E. A Biased View of μ -Opioid Receptors? *Molecular pharmacology*. 2019;96(5):542-9.
537. Singla NK, Skobieranda F, Soergel DG, Salamea M, Burt DA, Demitrack MA, et al. APOLLO-2: A Randomized, Placebo and Active-Controlled Phase III Study Investigating Oliceridine (TRV130), a G Protein-Biased Ligand at the μ -Opioid Receptor, for Management of Moderate to Severe Acute Pain Following Abdominoplasty. *Pain Pract*. 2019;19(7):715-31.
538. Singla N, Minkowitz HS, Soergel DG, Burt DA, Subach RA, Salamea MY, et al. A randomized, Phase IIb study investigating oliceridine (TRV130), a novel μ -receptor G-protein pathway selective (μ -GPS) modulator, for the management of moderate to severe acute pain following abdominoplasty. *Journal of pain research*. 2017;10:2413-24.
539. Lyden J, Binswanger IA. The United States opioid epidemic. *Semin Perinatol*. 2019;43(3):123-31.
540. Rivero G, Llorente J, McPherson J, Cooke A, Mundell SJ, McArdle CA, et al. Endomorphin-2: A Biased Agonist at the μ -Opioid Receptor. 2012;82(2):178-88.
541. McPherson J, Rivero G, Baptist M, Llorente J, Al-Sabah S, Krasel C, et al. μ -opioid receptors: correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization. *Molecular pharmacology*. 2010;78(4):756-66.
542. Fatseas M, Auriacombe M. Why buprenorphine is so successful in treating opiate addiction in France. *Curr Psychiatry Rep*. 2007;9(5):358-64.
543. Raffa RB, Haidery M, Huang HM, Kalladeen K, Lockstein DE, Ono H, et al. The clinical analgesic efficacy of buprenorphine. *J Clin Pharm Ther*. 2014;39(6):577-83.
544. Yamanishi Y, Pauwels E, Kotera M. Drug side-effect prediction based on the integration of chemical and biological spaces. *Journal of chemical information and modeling*. 2012;52(12):3284-92.
545. Stepensky D. Prediction of drug disposition on the basis of its chemical structure. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52(6):415-31.
546. Boix F, Andersen JM, Mørland J. Pharmacokinetic modeling of subcutaneous heroin and its metabolites in blood and brain of mice. *Addict Biol*. 2013;18(1):1-7.
547. Golembiewski J. Opioid-Induced Pruritus. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*. 2013;28(4):247-9.
548. Lansu K, Karpiak J, Liu J, Huang X-P, McCorvy JD, Kroeze WK, et al. In silico design of novel probes for the atypical opioid receptor MRGPRX2. *Nature chemical biology*. 2017;13(5):529-36.
549. Rosow CE, Moss J, Philbin DM, Savarese JJ. Histamine release during morphine and fentanyl anesthesia. *Anesthesiology*. 1982;56(2):93-6.

550. Garcia-Serna R, Vidal D, Remez N, Mestres J. Large-Scale Predictive Drug Safety: From Structural Alerts to Biological Mechanisms. *Chemical Research in Toxicology*. 2015;28(10):1875-87.
551. Vidal D, Garcia-Serna R, Mestres J. Ligand-based approaches to in silico pharmacology. *Methods Mol Biol*. 2011;672:489-502.
552. Scheiber J, Chen B, Milik M, Sukuru SCK, Bender A, Mikhailov D, et al. Gaining Insight into Off-Target Mediated Effects of Drug Candidates with a Comprehensive Systems Chemical Biology Analysis. *Journal of chemical information and modeling*. 2009;49(2):308-17.
553. Schmidt F, Matter H, Hessler G, Czich A. Predictive in silico off-target profiling in drug discovery. *Future Med Chem*. 2014;6(3):295-317.
554. Wattiez AS, Dupuis A, Courteix C. Le rat STZ-diabétique: modèle adapté à l'étude de la neuropathie diabétique douloureuse ? *Douleur et Analgésie*. 2012;25(1):38-45.
555. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain*. 1993;53(1):81-8.
556. Varvel SA, Wiley JL, Yang R, Bridgen DT, Long K, Lichtman AH, et al. Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;186(2):226-34.
557. Finn DP, Beckett SR, Roe CH, Madjd A, Fone KC, Kendall DA, et al. Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur J Neurosci*. 2004;19(3):678-86.
558. Karniol IG, Carlini EA. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacologia*. 1973;33(1):53-70.
559. Attal N, Brasseur L, Guirimand D, Clermond-Gnamien S, Atlami S, Bouhassira D. Are oral cannabinoids safe and effective in refractory neuropathic pain? 2004;8(2):173-7.
560. Fitzcharles MA, Baerwald C, Ablin J, Häuser W. Efficacy, tolerability and safety of cannabinoids in chronic pain associated with rheumatic diseases (fibromyalgia syndrome, back pain, osteoarthritis, rheumatoid arthritis): A systematic review of randomized controlled trials. *Schmerz*. 2016;30(1):47-61.
561. Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(24):6231-8.
562. Shahbazi F, Grandi V, Banerjee A, Trant JF. Cannabinoids and Cannabinoid Receptors: The Story so Far. *iScience*. 2020;23(7):101301.
563. Williams J, Haller VL, Stevens DL, Welch SP. Decreased basal endogenous opioid levels in diabetic rodents: effects on morphine and delta-9-tetrahydrocannabinoid-induced antinociception. *Eur J Pharmacol*. 2008;584(1):78-86.
564. Margulies JE, Hammer RP, Jr. Delta 9-tetrahydrocannabinol alters cerebral metabolism in a biphasic, dose-dependent manner in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1991;202(3):373-8.
565. Grisham MG, Ferraro DP. Biphasic effects of 9-tetrahydrocannabinol on variable interval schedule performance in rats. *Psychopharmacologia*. 1972;27(2):163-9.
566. Talbot S, Chahmi E, Dias JP, Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation*. 2010;7(1):36.
567. Argueta DA, Ventura CM, Kiven S, Sagi V, Gupta K. A Balanced Approach for Cannabidiol Use in Chronic Pain. *Front Pharmacol*. 2020;11:561.

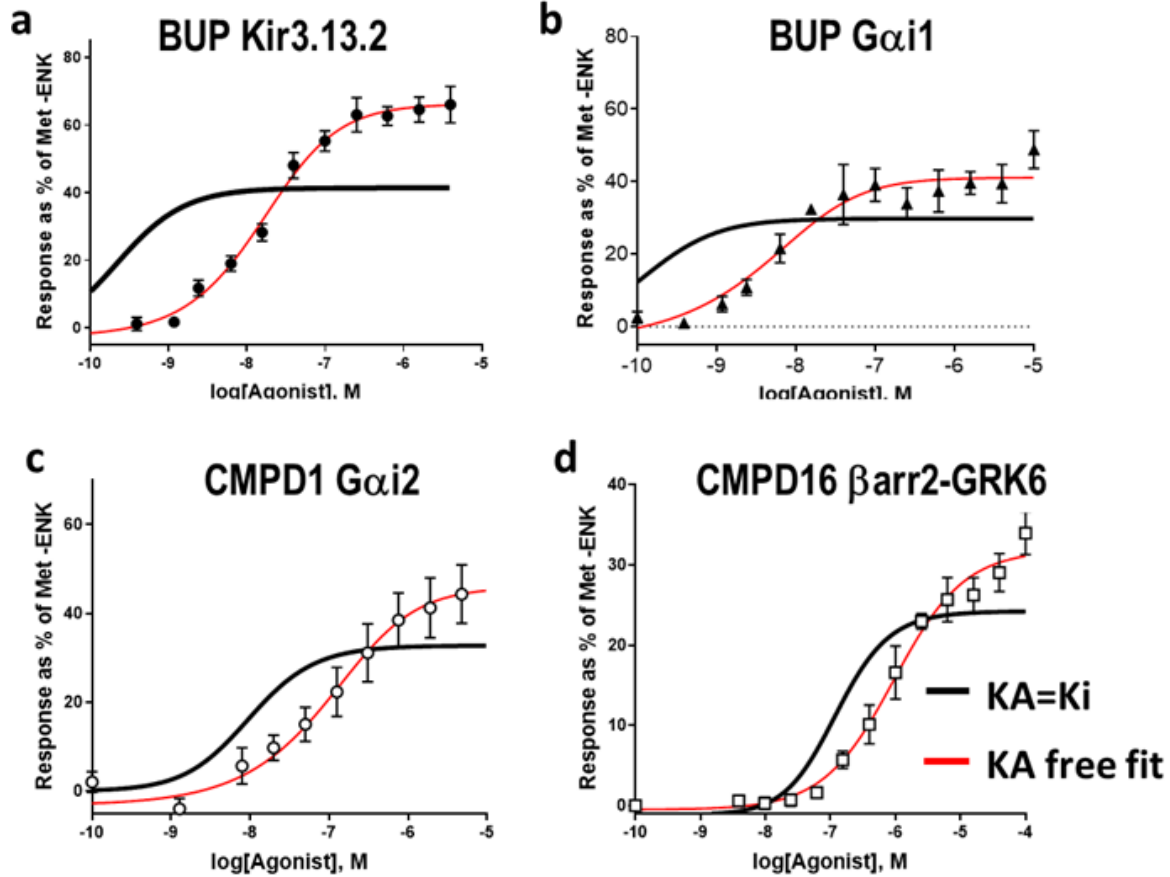
568. Benredjem B, Gallion J, Pelletier D, Dallaire P, Charbonneau J, Cawkill D, et al. Exploring use of unsupervised clustering to associate signaling profiles of GPCR ligands to clinical response. *Nat Commun.* 2019;10(1):4075.
569. Abrams DI, Couey P, Shade SB, Kelly ME, Benowitz NL. Cannabinoid-opioid interaction in chronic pain. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(6):844-51.
570. Altun A, Yildirim K, Ozdemir E, Bagcivan I, Gursoy S, Durmus N. Attenuation of morphine antinociceptive tolerance by cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonists. *J Physiol Sci.* 2015;65(5):407-15.
571. Chen X, Cowan A, Inan S, Geller EB, Meissler JJ, Rawls SM, et al. Opioid-sparing effects of cannabinoids on morphine analgesia: participation of CB1 and CB2 receptors. *Br J Pharmacol.* 2019;176(17):3378-89.
572. Desroches J, Bouchard JF, Gendron L, Beaulieu P. Involvement of cannabinoid receptors in peripheral and spinal morphine analgesia. *Neuroscience.* 2014;261:23-42.
573. Maguire DR, France CP. Antinociceptive effects of mixtures of mu opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists in rats: Impact of drug and fixed-dose ratio. *Eur J Pharmacol.* 2018;819:217-24.
574. Welch SP, Stevens DL. Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;262(1):10-8.
575. Nielsen S, Sabioni P, Trigo JM, Ware MA, Betz-Stablein BD, Murnion B, et al. Opioid-Sparing Effect of Cannabinoids: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychopharmacology.* 2017;42(9):1752-65.
576. Portenoy RK, Ganae-Motan ED, Allende S, Yanagihara R, Shaiova L, Weinstein S, et al. Nabiximols for opioid-treated cancer patients with poorly-controlled chronic pain: a randomized, placebo-controlled, graded-dose trial. *J Pain.* 2012;13(5):438-49.
577. Roberts JD, Gennings C, Shih M. Synergistic affective analgesic interaction between delta-9-tetrahydrocannabinol and morphine. *Eur J Pharmacol.* 2006;530(1-2):54-8.
578. Bohn LM, Dykstra LA, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS. Relative opioid efficacy is determined by the complements of the G protein-coupled receptor desensitization machinery. *Molecular pharmacology.* 2004;66(1):106-12.
579. Lynch WJ, Nicholson KL, Dance ME, Morgan RW, Foley PL. Animal models of substance abuse and addiction: implications for science, animal welfare, and society. *Comp Med.* 2010;60(3):177-88.
580. Suzuki T, Funada M, Narita M, Misawa M, Nagase H. Morphine-induced place preference in the CXBK mouse: characteristics of mu opioid receptor subtypes. *Brain Res.* 1993;602(1):45-52.
581. Zhang J-J, Kong Q. Locomotor activity: A distinctive index in morphine self-administration in rats. *PloS one.* 2017;12(4):e0174272.
582. Kawa AB, Allain F, Robinson TE, Samaha AN. The transition to cocaine addiction: the importance of pharmacokinetics for preclinical models. *Psychopharmacology (Berl).* 2019;236(4):1145-57.
583. Huang P, Kehner GB, Cowan A, Liu-Chen LY. Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(2):688-95.
584. Kim HK, Smiddy M, Hoffman RS, Nelson LS. Buprenorphine may not be as safe as you think: a pediatric fatality from unintentional exposure. *Pediatrics.* 2012;130(6):e1700-3.

585. O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J*. 2014;54(3):259-72.
586. Kamei J, Kashiwazaki T, Hitosugi H, Nagase H. The role of spinal δ 1-opioid receptors in inhibiting the formalin-induced nociceptive response in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*. 1997;326(1):31-6.
587. Castany S, Carcolé M, Leánez S, Pol O. The antinociceptive effects of a δ -opioid receptor agonist in mice with painful diabetic neuropathy: Involvement of heme oxygenase 1. *Neuroscience Letters*. 2016;614:49-54.
588. Kamei J, Ohhashi Y, Aoki T, Kawasima N, Kasuya Y. Streptozotocin-induced diabetes selectively alters the potency of analgesia produced by μ -opioid agonists, but not by δ - and κ -opioid agonists. *Brain Research*. 1992;571(2):199-203.
589. Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. Blockade of CCR4 Diminishes Hypersensitivity and Enhances Opioid Analgesia – Evidence from a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Neuroscience*. 2020;441:77-92.
590. Chefer VI, Shippenberg TS. Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(4):887-98.
591. Schiller PW, Fundytus ME, Merovitz L, Weltrowska G, Nguyen TMD, Lemieux C, et al. The Opioid μ Agonist/ δ Antagonist DIPP-NH₂[Ψ] Produces a Potent Analgesic Effect, No Physical Dependence, and Less Tolerance than Morphine in Rats. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1999;42(18):3520-6.
592. Zhu Y, King MA, Schuller AG, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, et al. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron*. 1999;24(1):243-52.
593. Mansour A, Nagi K, Dallaire P, Lukasheva V, Le Gouill C, Bouvier M, et al. Comprehensive Signaling Profiles Reveal Unsuspected Functional Selectivity of δ -Opioid Receptor Agonists and Allow the Identification of Ligands with the Greatest Potential for Inducing Cyclase Superactivation. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2021;4(5):1483-98.
594. Cooper ZD, Craft RM. Sex-Dependent Effects of Cannabis and Cannabinoids: A Translational Perspective. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2018;43(1):34-51.

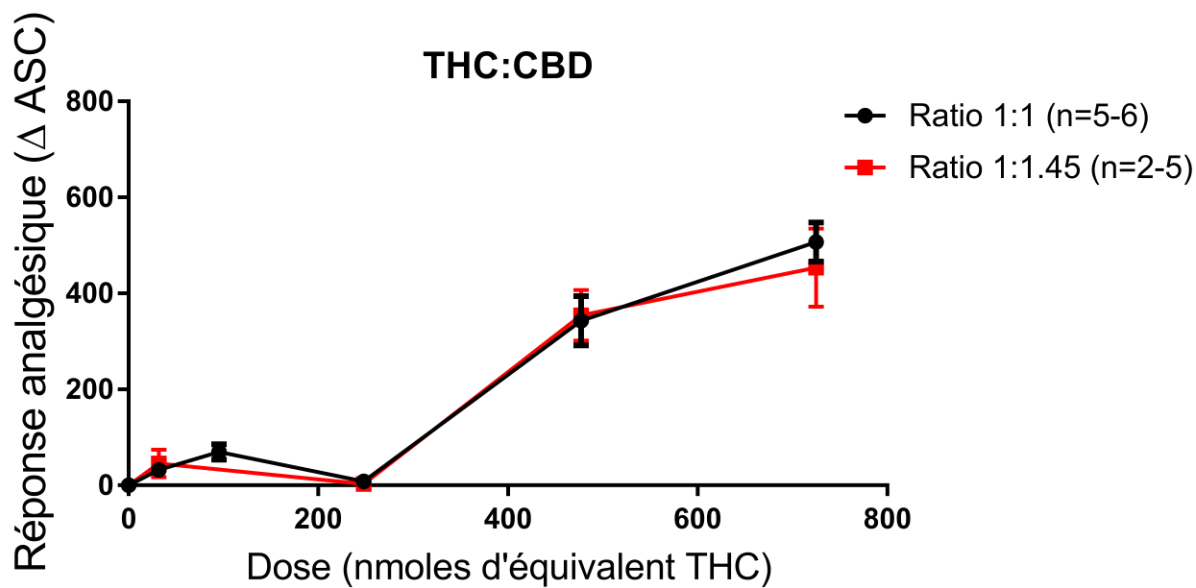
10 Annexes



Annexe I. Corrélation de signaux spécifiques aux effets indésirables de dépression respiratoire et de somnolence. Des matrices partielles pour lesquelles les agonistes ont été classifiés selon des réponses dépendantes des protéines G ou des β -arrestines ont été générées en utilisant soit les paramètres Log(τ)-Emax (**a**) soit les paramètres Log(τ)-Emax-Log(τ/K_A) (**b**). Les distances séparant les agonistes dans la matrice complète ou les matrices partielles ont été corrélées avec des fréquences de rapport de dépression respiratoire ou de somnolence comme indiqué dans la figure. Tout comme pour les rapports de fécalome, dû à la présence de la buprénorphine, l'ajout du paramètre Log(τ/K_A) ne permet pas d'obtenir une corrélation entre les réponses des protéines G et la fréquence de rapports des effets indésirable.



Annexe II. Ajustement des courbes dose-réponse avec le modèle opérationnel en utilisant des valeurs de K_A conditionnelles ou des valeurs de K_i . Des cellules HEK ont été transfectées avec les récepteurs hMOR et les membranes ont été isolées. Nous avons ensuite effectué des essais de déplacement du radio-ligand $[3H]$ Diprénorphine et les valeurs de K_i pour les différents agonistes du MOR ont été mesurées. Nous avons ensuite ajusté les courbes dose-réponse générées avec différents biosenseurs BRET soit en utilisant les valeurs de K_A dérivées à partir de l'équation du modèle opérationnel (303), soit en fixant les valeurs de K_A à celles des K_i obtenues par les essais de déplacement (304). Nous avons trouvé que, pour un grand nombre de courbe dose-réponses, il y avait une inadéquation entre l'ajustement des courbes obtenu avec les valeurs de K_i et les données expérimentales réelles. La figure représente certains exemples de ces ajustements inadéquats.



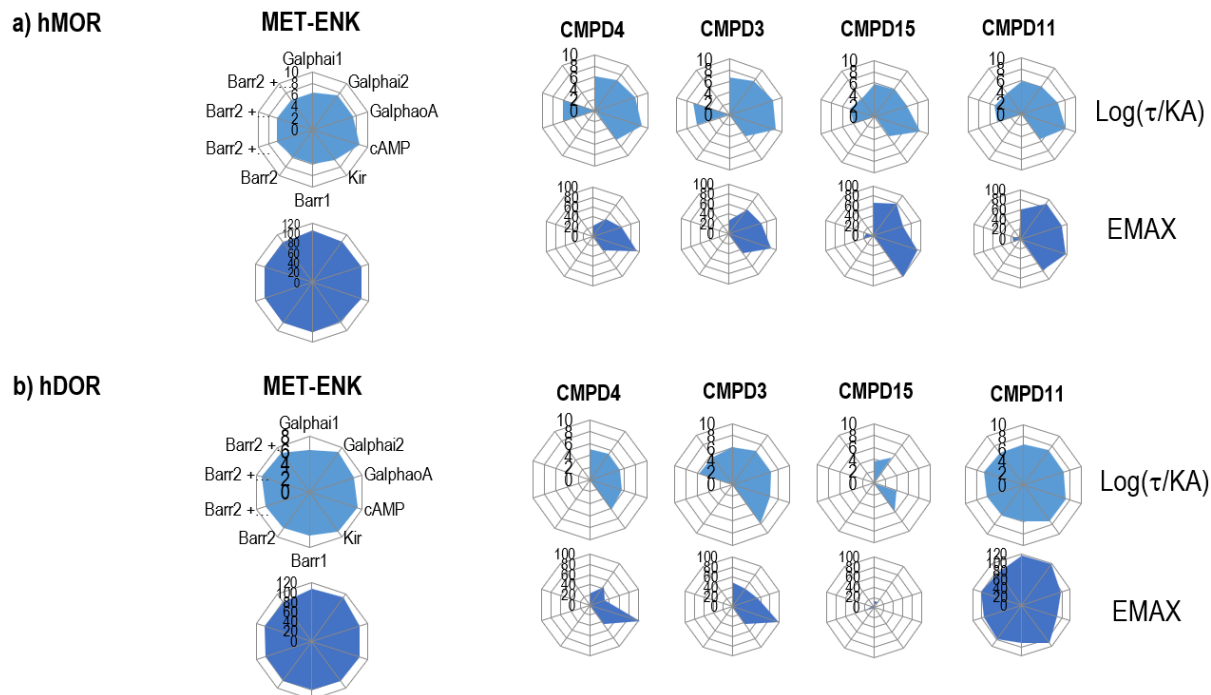
Annexe III. Courbes dose-réponse de l'effet analgésique du mélange THC:CBD à ratio 1:1 et à ratio 1:1.45. Une semaine après l'administration de STZ, les rats ont reçu des injections intrathécales de différentes doses croissantes du mélange THC:CBD à ratio 1:1 (noir) ou à ratio 1:1.45 (rouge). Les seuils de retrait mécanique ont été évalués avant l'administration du traitement, puis toutes les 15 min après l'injection jusqu'au retour à la valeur de base. Les résultats présentés correspondent aux valeurs d'aires sous la courbe normalisées par rapport aux véhicules (Δ ASC, moyenne \pm SEM) en fonction de la dose (nmol d'équivalent de THC), n=2-6 rats.

	THC			CBD			THC:CBD			Extrait		
	AM630	AM251	CPZ	AM630	AM251	CPZ	AM630	AM251	CPZ	AM630	AM251	CPZ
250 nmoles				NR	NR	NR	NR	NR	NR			
480 nmoles				NR	NR	NR						
725 nmoles	NT	NT	NT				NT	NT	NT	NT	NT	NT

AM630 : antagoniste du CB2
AM251 : antagoniste du CB1
CPZ : antagoniste du TRPV1

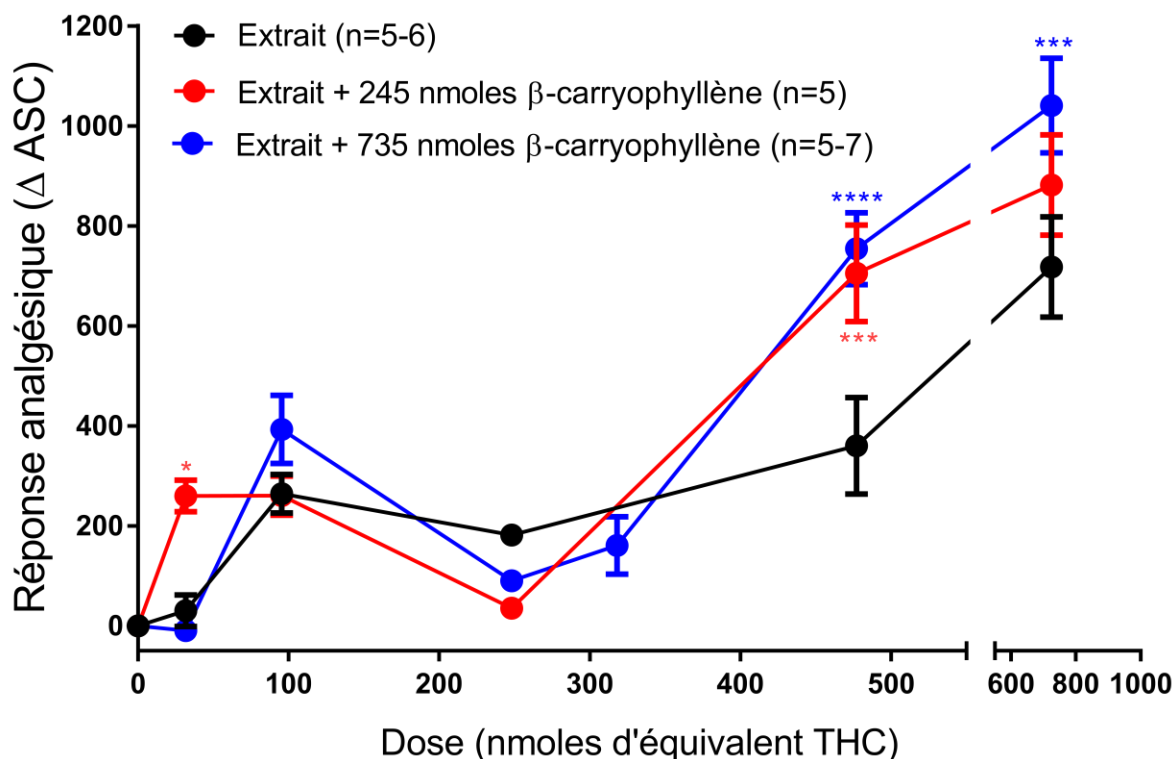
Annexe IV. Résumé des effets des prétraitement par les antagonismes des cibles CB1, CB2 et TRPV1 sur les réponses analgésiques des différents traitements cannabinoïdes.

Une flèche verte indique une diminution significative de la réponse analgésique à la première dose d'antagoniste utilisé (nmoles, dose indiquée à l'intérieur de la flèche). La première dose de capsazépine (CPZ) diffère entre les concentrations d'agonistes de 250 et de 480 nmoles, où elle est de 12.5 et de 25 nmoles respectivement. Une flèche jaune indique une diminution de la réponse analgésique à la deuxième dose d'antagoniste utilisé (nmoles, dose indiquée à l'intérieur ou à droite de la flèche). La taille des flèches est proportionnelle à l'ampleur de la diminution de la réponse. Une croix noire indique qu'il n'y a eu aucun effet du traitement antagoniste, quelle que soit la dose testée. Une flèche noire indique une augmentation de la réponse analgésique suivant le prétraitement par l'antagoniste. NR : Pas de réponse analgésique du cannabinoïde. NT : Non testé.



Annexe V. Profils de signalisation des composés Pfizer 3, 4, 11 et 15 au niveau des récepteurs hMOR et hDOR. Les valeurs de coefficients de transduction $\text{Log}(\tau/K_A)$ et d'efficacités E_{max} sont représentées sous la forme de diagrammes en radar. Celles-ci ont été dérivées à partir des courbes dose-réponse de ces composés à travers dix différents biosenseurs au niveau des récepteurs MOR et DOR humains (hMOR et hDOR). Les coefficients de transduction sont représentés à une échelle logarithmique. Les valeurs d' E_{max} ont été normalisées à la réponse maximale de Met-enképhaline (Met-Enk) et sont représentées à une échelle linéaire.

Extrait cannabis ± β -caryophyllène



Annexe VI. Courbe dose-réponse de l'effet analgésique de l'extrait de cannabis de chémotype II en présence ou en absence du terpène β -caryophyllène. Une semaine après l'administration de STZ, les rats ont reçu des injections intrathécales de différentes doses croissantes d'extrait de cannabis de chémotype II (noir) en présence ou en absence de 245 (rouge) ou 735 (bleu) nmoles du terpène β -caryophyllène. Les seuils de retrait mécanique ont été évalués avant l'administration du traitement, puis toutes les 15 min après l'injection jusqu'au retour à la valeur de base. Les résultats présentés correspondent aux valeurs d'aires sous la courbe normalisées par rapport aux véhicules (Δ ASC, moyenne \pm SEM) en fonction de la dose (nmoles d'équivalent de THC), n=5-7 rats. Les doses qui ont induit une réponse analgésique significative par rapport à l'administration de l'extrait de cannabis seul sont indiquées dans la figure et ont été établies en utilisant le test d'ANOVA à sens unique suivi du test de comparaison multiple de Dunnett. * p<0,05, *** p<0,001 et ****p<0,0001.