

Université de Montréal

Caractériser l'effet des cannabinoïdes sur la réponse nociceptive et identifier les cibles  
moléculaires chez *Caenorhabditis elegans*

*Par*

Fatma Boujenoui

Département de biomédecine vétérinaire Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)

en sciences vétérinaires option pharmacologie

Août 2023

© Fatma Boujenoui, 2023

Université de Montréal

Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Ce mémoire intitulé*

**Caractériser l'effet des cannabinoïdes sur la réponse nociceptive et identifier les cibles  
moléculaires chez *Caenorhabditis elegans***

*Présenté par*

**Fatma Boujenoui**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Gustavo Zamberlam**  
Président-rapporteur

**Francis Beaudry**  
Directeur de recherche

**Marion Desmarchelier**  
Membre du jury

## Résumé

Ce projet de recherche porte sur l'étude de la régulation des systèmes cannabinoïdes et vanilloïdes chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dans le but d'évaluer les effets antinociceptifs du tétrahydrocannabinol (THC) et du cannabidiol (CBD). *C. elegans* est un modèle largement utilisé pour étudier la nociception, visant principalement à caractériser les réponses nociceptives induites par le THC et le CBD, ainsi qu'à identifier les mécanismes et les cibles moléculaires impliqués. Les résultats des études sur l'utilisation du cannabis dans le traitement de la douleur chronique chez les mammifères sont controversés. Cette recherche vise à étudier l'effet du CBD et du THC sur la réponse nociceptive chez *C. elegans* et à approfondir la compréhension des mécanismes pharmacologiques sous-jacents.

La méthodologie consiste à quantifier l'effet antinociceptif du CBD et du THC chez *C. elegans* par la méthode de la thermotaxie. Les nématodes sauvages (N2) étaient exposés à des concentrations croissantes de phytocannabinoïdes pour évaluer la relation concentration-effet. D'autres tests étaient effectués sur des souches mutantes exprimant des récepteurs cannabinoïdes et vanilloïdes afin d'identifier préalablement leurs cibles. Enfin, les analyses protéomiques et bio-informatiques seront effectuées pour identifier les voies de signalisation et les processus biologiques induits par l'interaction entre les phytocannabinoïdes et leurs cibles.

Cette étude démontre l'activité antinociceptive du CBD et du THC chez *C. elegans* avec des effets rémanents pour THC, en ciblant respectivement le vanilloïde pour le CBD et le cannabinoïde pour les systèmes THC. Les analyses protéomiques et bio-informatiques mettent en évidence des différences significatives dans leurs voies de signalisation et leurs processus biologiques.

**Mots-clés :** *Caenorhabditis elegans*, Systèmes cannabinoïdes, Systèmes vanilloïdes, Effets antinociceptifs, Tétrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Réponses nociceptives, Thermotaxie, Analyses protéomiques, Analyses bio-informatiques.

## **Abstract**

The objective of this research project was to focus on studying the regulation of cannabinoid and vanilloid systems in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) to evaluate the anti-nociceptive effects of tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *C. elegans* is a widely used model for studying nociception, with the main objective being to characterize nociceptive responses induced by THC and CBD, as well as identify the underlying molecular mechanisms and targets involved. Recent studies on the use of cannabis for the treatment of chronic pain in mammals have shown controversial results. This research aims to investigate the effect of CBD and THC on the nociceptive response in *C. elegans* and understand the underlying pharmacological mechanisms.

The methodology consisted in quantifying the antinociceptive effect of CBD and THC in *C. elegans* using the thermotaxis method. WT(N2) were exposed to decreasing concentrations of phytocannabinoids to evaluate the dose and effect relationship. Further tests performed on mutant expressing cannabinoid and vanilloid receptors allowed preliminary identification of their targets. Finally, proteomic and bioinformatics analyses were used to identify the signaling pathways and biological processes induced by these phytocannabinoids.

The result of this study confirmed the antinociceptive effect of CBD and THC in *C. elegans*, with a remanent effect of THC. This effect is mediated by the vanilloid system for CBD and the cannabinoid system for THC, respectively. Also, proteomics and bioinformatics analyses revealed significant differences in signaling pathways and biological processes.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*, Cannabinoid systems, Vanilloid systems, Anti-nociceptive effects, Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Nociceptive responses, Thermotaxis, Proteomic analyses, Bioinformatic analyses.

## Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	4
Table des matières .....	5
Liste des tableaux .....	7
Liste des figures .....	8
Liste des sigles et abréviations .....	10
Remerciements .....	14
Introduction.....	16
Chapitre 1 – Recension de la littérature .....	18
1 – Physiologie de la douleur.....	18
1.1. Définition de la douleur.....	18
1.2. Vue d’ensemble du système nerveux, de la neuroanatomie et de la physiologie des mammifères .....	18
1.3. Nocicepteurs.....	20
1.3.1. Mécanisme d’action des nocicepteurs .....	21
1.4. Les voies de la douleur .....	23
1.5. Introduction aux récepteurs TRP (Transient Receptor Potential) .....	25
1.5.1. TRPV1.....	26
1.6. Introduction aux récepteurs cannabinoïdes.....	28
1.6.1. CB1.....	29
1.6.2. CB2.....	33
2 – Les cannabinoïdes.....	37
2.1. Définition, structures, classification et propriétés chimiques .....	37
2.2. Origines métaboliques (biosynthèse) des phytocannabinoïdes ( <i>Cannabis sativa</i> ) .....	38
2.3. Fonctions et cibles du THC .....	39
2.4. Fonctions et cibles du CBD .....	41
3 – Introduction à <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	45
3.1. Neuroanatomie et neurophysiologie de <i>C. elegans</i> .....	45
3.2. Nocicepteurs chez <i>C. elegans</i> .....	47
3.2.1. TRPV chez <i>C. elegans</i> ( <i>osm-9</i> et <i>ocr-2</i> ).....	48
3.3. Neurotransmission et neurotransmetteur chez <i>C. elegans</i> .....	50

3.4. Système cannabinoïdes chez <i>C. elegans</i> (effecteurs, localisation, fonction) .....	51
Chapitre 2 - L'hypothèse et Les objectifs.....	54
Chapitre 3 – Article scientifique .....	55
Chapitre 4 – Discussion générale.....	85
4.1. Les résultats obtenus .....	85
4.2. Discussion sur les implications des résultats.....	86
4.3. Les limites et perspectives .....	88
Chapitre 5 – Conclusions .....	90
Chapitre 6 - Références bibliographiques .....	91
Annexes .....	104

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Les antagonistes de CB1 : ses effets thérapeutiques et ses effets indésirables ..... 32

**Tableau 2** : Les agonistes et antagonistes de CB2 : effets thérapeutiques et ses effets  
indésirables ..... 35

## Liste des figures

Figure 1 : Les principales composantes du système nerveux.....	19
Figure 2 : Neurophysiologie du système nerveux.....	20
Figure 3 : Physiologie des nocicepteurs.....	21
Figure 4 : Les nocicepteurs et leurs actions.....	23
Figure 5 : Les trois voies de la douleur .....	25
Figure 6 : Structure polyprotéique d'un TRPV1.....	27
Figure 7 : Activation du TRPV1 par les ligands exogènes ou endogènes.....	28
Figure 8 : L'expression des récepteurs cannabinoïdes chez l'humain .....	29
Figure 9 : Régulation de l'activité neuronale par le récepteur CB1.....	30
Figure 10 : Métabolisme d'endocannabinoïdes AEA et 2-AG.....	31
Figure 11 : Les structures chimiques des agonistes exogènes de CB1 .....	32
Figure 12 : Rôle du CB2 dans l'inflammation et la réponse immunitaire .....	34
Figure 13 : La structure chimique d'agonistes et antagonistes de CB2 .....	36
Figure 14 : Les structures chimiques de cannabinoïdes .....	38
Figure 15 : La biosynthèse des cannabinoïdes dans le <i>Cannabis sativa</i> .....	39
Figure 16 : Les structures tridimensionnelles de THC et AEA.....	40
Figure 17 : L'interaction entre les récepteurs CB1 et THC ou AEA .....	40
Figure 18 : Interaction entre TRPV1 et son ligand endogène AEA et ses ligands exogènes CBD/CAP .....	42
Figure 19 : L'interaction entre THC et CBD et le système cannabinoïde .....	43
Figure 20 : La neuroanatomie du système nerveux chez <i>C. elegans</i> et sa connectivité.....	46
Figure 21 : Cartographie des neurones sensoriels de la tête chez <i>C. elegans</i> .....	47
Figure 22 : Les canaux TRP chez <i>C. elegans</i> et la structure de TRPV .....	48
Figure 23 : L'activation de TRPV chez <i>C. elegans</i> ( <i>osm-9</i> et <i>ocr-2</i> ) et leur circuit neuronal.....	49
Figure 24 : La similarité dans la neurotransmission : comparaison entre les mammifères et <i>C. elegans</i> .....	51
Figure 25 : La similitude entre les récepteurs cannabinoïdes entre les mammifères et..... <i>C. elegans</i> .....	52



Figure 26 : La similitude entre le métabolisme des endocannabinoïdes entre les mammifères et  
*C. elegans* ..... 53

## Liste des sigles et abréviations

AA: Acide arachidonique

AAE1: Enzyme activatrice d'acyle 1

ACh: Acétylcholine (ACh)

ADL: Amphid sensory left

ADF: Amphid defective

AEA: Anandamide

ANK: Ankyrine

ARN<sub>m</sub>: Acide ribonucléique messenger

ASH: Anterior starburst head

ASI: Amphid sensory right

ASJ: Amphid sensory joint

ASK: Amphid sensory neuron K

ASG: Amphid sensory neuron G

ATP: Adénosine triphosphate

AWA: Amphid wing sensory neuron A

AWB: Amphid wing sensory neuron B

AWC: Amphid wing cell

A1: Récepteur A1 de l'adénosine

A2A: Récepteur A2A de l'adénosine

*C. elegans: Caenorhabditis elegans*

Cap: Capsaïcine

CB1: Récepteur cannabinoïde de type 1

CB2: Récepteur cannabinoïde de type 2

CBC: Cannabichromène

CBD: Cannabidiol

CBDA : Acide cannabidiolique

CBDAS: Acide cannabidiolique synthase

CBG: Cannabigerol

CBGA: Acide cannabigérolique  
CBGAS : Acide cannabigérolique synthase  
CBN: Cannabinol  
CGRP: Calcitonin gene-related peptide  
CGRPr: Calcitonin gene-related peptide receptor  
CP55,940: 2-[(1R,2R,5R)-5-Hydroxy-2-(3-hydroxypropyl) cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2yl) phenol  
CM : Centromédian  
Ca<sup>2+</sup>: Calcium  
DAGL: Diacylglycérol lipase  
DEP : Protéines différentiellement abondantes  
DRG : Ganglion de la racine dorsale  
eIF4E: Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4<sup>E</sup>  
ERK: Extracellular signal-regulated kinase  
FAAH: Fatty acid amide hydrolase  
GABA: Acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GO : Ontologie génique  
GPP: Géranyl-pyrophosphate  
GPR55 : Récepteur couplé aux protéines G 55  
HU 210 : 1,1-Diméthylheptyl- 11-hydroxy- tetrahydrocannabinol  
IPP : Interactions protéine-protéine  
IRM: Imagerie par résonance magnétique  
JWH-018: 1-pentyl-3-(1-naphthoyl) Indole or naphthalen-1-yl-(1-pentyl-1H-indol-3-yl) methanone  
K<sup>+</sup>: Potassium  
LG : Ganglion lombaire (LG)  
MAGL: Monoacylglycérol lipase  
MCODE: Molecular vomplex detection  
MEP: 4-phosphate de méthylérythritol

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex  
NADA : N-arachidonoyldopamine  
NAPE : Phospholipase  
NK : Natural Killer  
NPR-19: Neuropeptide récepteur 19  
NPR-32: Neuropeptide récepteur 32  
Na<sup>+</sup> : Sodium  
OAC: Acide olivétolique cyclase  
OCR-2: Osmotic avoidance and calcium response 2  
OLS: Olivétol synthase  
PA: Potentiel d'action  
PAG : Ganglion antérieur  
PF : Parafascicular  
PHA: Phasmid sensory neuron A  
PHB : Phasmid sensory neuron B  
RTX : Résinifératoxine  
RVG: Ganglion rétrovésiculaire  
SN: Système nerveux  
SNC: Système nerveux central  
SNP: Système nerveux périphérique  
SR141716: Rimonabant  
THC: Delta-9-tétrahydrocannabinol  
THCA : Acide tétrahydrocannabinolique  
THCAS: Acide delta-9-tétrahydrocannabinol synthase  
TRP: Transient receptor potentiel  
TRPA1 : Transient receptor potential ankyrin 1  
TRPV1: Transient receptor potential vanilloid 1  
VG: Ganglion ventral  
VPI : Ventral postéro-inférieur (VPI)

VPL : Ventraux postéro-latéraux

WIN 55212-2: 5-methyl-3-(morpholin-4-ylmethyl) -2,3 dihydro[1,4]oxazino[2,3,4-hi]

WT: Wild Type

5-HT1A: Récepteur de la sérotonine 1A

5-HT3A: Récepteur ionotrope

## Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, **Pr Francis Beaudry**, pour son rôle essentiel tout au long de ce projet. Ses conseils, sa disponibilité et son expertise inestimable m'ont énormément aidée à mieux comprendre le sujet, surtout au début de ma maîtrise alors que mes connaissances en pharmacologie étaient limitées en tant que chimiste. Grâce à son encadrement, et sa passion pour la recherche, j'ai pu mener à bien ce travail et dépasser mes limites. Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute ma reconnaissance envers lui et énumérer toutes ses contributions dans mon parcours académique. J'ai pu découvrir et explorer de nouveaux horizons sous sa supervision.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances envers le doctorant **Bruno Nkambeu** et la post-doctorante **Jennifer Ben Salem**. Leur formation sur *C. elegans*, offerte dès le début, a été d'une importance inestimable. Ces deux étudiants exceptionnels ont continué à me soutenir tout au long de mon parcours. En particulier, je tiens à adresser un immense merci à Jennifer, qui n'a pas cessé de me prodiguer ses conseils. Je suis infiniment reconnaissante à Jennifer. Je salue sa bienveillance et sa brillance.

De plus, je tiens à exprimer ma gratitude envers la doctorante **Claudia Gauthier**, qui m'a généreusement partagé son temps et son expertise pour m'assister durant la deuxième phase de ce projet. Ses explications claires et simples ont été d'une aide précieuse. Claudia est toujours accompagnée d'une attitude positive et d'un sourire rayonnant. Je réalise à quel point je suis chanceuse d'être si bien entourée par ces personnes exceptionnelles, qui ont contribué au succès de ce projet.

Je tiens à adresser mes remerciements à une autre étudiante, **Kaoutar Benkhraba**, que j'ai eu l'occasion de rencontrer à la fin de ma maîtrise. Bien que nous n'ayons pas eu suffisamment de temps pour travailler ensemble au laboratoire, elle m'a généreusement offert son aide et a même consacré un peu de son temps à la révision de mon mémoire. J'espère que notre amitié perdurera, car c'est une personne inoubliable.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de conseil, **Pr. Kalidou Ndiaye** et **Pr. Imourana Alassane-Kpembé**, pour leurs précieux conseils et leur disponibilité. Cela a été un véritable honneur d'avoir échangé avec vous.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers **les membres de ma famille**, qui m'ont soutenue de diverses manières. Leur encouragement m'a donné la motivation pour poursuivre ce projet sans me soucier des frais de scolarité ou des problèmes financiers. Bien qu'ils ne comprennent pas entièrement ce que je fais, ils ont toujours su me soutenir et m'inspirer malgré la distance. Je me sens véritablement bénie d'avoir une famille aussi magnifique. Vous m'avez énormément manqué et j'espère vous revoir bientôt.

J'adresse enfin mes remerciements à ma meilleure amie, **Tesnime**, pour son précieux soutien. Elle est souvent venue chez moi pour m'encourager à rédiger, sans oublier de m'apporter des chocolats et des gâteaux. Merci beaucoup !

## Introduction

La crise des opioïdes a mis en évidence la nécessité d'un traitement alternatif pour soulager la douleur chronique (Bicket *et al.*, 2017; Montgomery *et al.*, 2016; Philips *et al.*, 2017), ce qui a suscité un intérêt croissant pour l'utilisation du cannabis (Amin & Ali, 2019). Les phytocannabinoïdes, tels que le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) et le cannabidiol (CBD), sont abondamment présents dans les plantes herbacées *Cannabis sativa* (Amin & Ali, 2019; Silver, 2019). Plusieurs études suggèrent que les phytocannabinoïdes interagissent simultanément avec les récepteurs TRPV1, CB1 et CB2 présents dans le système nerveux, ce qui pourrait entraîner une modulation du signal de la douleur (Cristino *et al.*, 2006; Anand *et al.*, 2009; Vučković, 2018). Toutefois, les évidences qui démontrent des effets antidouleurs statistiquement significatifs pour les phytocannabinoïdes restent limitées. Les résultats de plusieurs études restent controversés en raison des effets psychologiques impliqués. Ces effets psychologiques, tels que les changements dans l'état émotionnel et la perception sensorielle, peuvent influencer la manière dont les individus perçoivent et modulent la douleur (Busse, 2021). Les mécanismes d'action des cannabinoïdes sur la réponse nociceptive n'ont pas été élucidés, et l'identification des voies de signalisation et des cibles moléculaires est essentielle pour mieux comprendre leurs potentiels thérapeutiques.

Le système nerveux élémentaire de *C. elegans* est composé de 959 cellules, incluant 302 neurones, ce qui confère à ce modèle expérimental un intérêt pour étudier les différents aspects du système nerveux en raison de sa structure simple (Bargmann, 1998; Nkambeu, 2019). Des études antérieures réalisées ont démontré que le comportement d'évitement est bien défini et reproductif en réponse à des stimuli thermiques nocifs, ce qui en fait un organisme intéressant pour étudier la nociception (Hart *et al.*, 1995; Nkambeu, 2019).

Bien que *C. elegans* ne présente pas les caractéristiques complexes des mammifères impliquant les aspects émotionnels et cognitifs de la douleur, il offre une occasion pour étudier les mécanismes sous-jacents aux processus de nociception (Zimmermann, 2007; Bargmann, 1998). De plus, *C. elegans* possède des endocannabinoïdes, des ligands endogènes qui activent les récepteurs cannabinoïdes de la même manière que chez les mammifères, tels que



l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG). *C. elegans* possède également des composantes de récepteurs du système cannabinoïde, tels que *npr-19* et *npr-32* (Estrada-Valencia, 2021; M. Oakes *et al.*, 2019; M. D. Oakes *et al.*, 2017; Pastuhov *et al.*, 2016).

De plus, les canaux ioniques TRPV de *C. elegans*, notamment les homologues aux TRPV1, tels que *osm-9* et *ocr-2*, sont coexprimés dans les neurones sensoriels et jouent un rôle dans la médiation des comportements d'évitement de la chaleur (Glaser *et al.*, 2011; Ohnishi *et al.*, 2020). Les études menées par notre équipe ont démontré que la capsaïcine, un agoniste des récepteurs TRPV1, peut moduler la réponse nocive de *C. elegans* à la chaleur nocive (Nkambeu *et al.*, 2020, 2021; Ben Salem *et al.*, 2022). De plus, ces études ont suggéré que la capsaïcine cible le récepteur TRPV1 homologue d'*ocr-2* chez *C. elegans* (Nkambeu *et al.*, 2020, 2023). Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés aux interactions entre les récepteurs cannabinoïdes et vanilloïdes, dans le but de moduler la perception de la douleur.

## **Chapitre 1 – Recension de la littérature**

### **1 – Physiologie de la douleur**

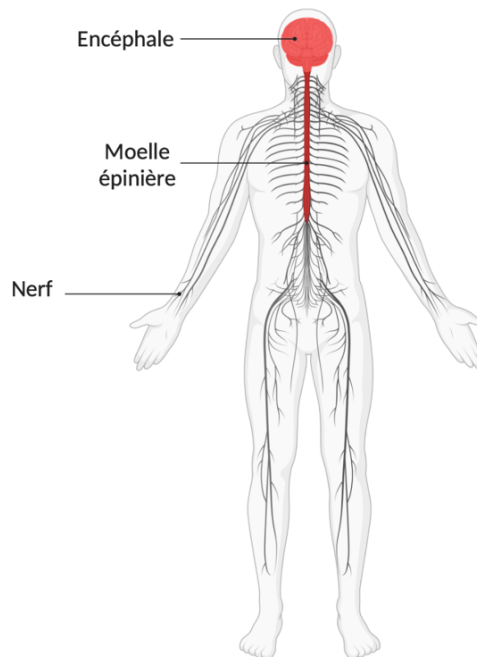
#### **1.1. Définition de la douleur**

La douleur a été définie comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée aux lésions tissulaires réelles ou potentielles (International Association for the Study of Pain IASP, 1979). Cependant, la définition de la douleur demeure complexe. Cette expérience neurophysiologique est subjective et individuelle, influencée par l'interaction complexe entre les signaux nerveux périphériques et les processus cognitifs, émotionnels et sociaux (Vader *et al.*, 2021; Raja *et al.*, 2020). L'évolution des connaissances sur le système nerveux, la neuroanatomie et la physiologie nous permet de mieux comprendre la complexité de l'expérience douloureuse (Muir *et al.*, 2010; Beaulieu, 2005; Regan *et al.*, 2000).

#### **1.2. Vue d'ensemble du système nerveux, de la neuroanatomie et de la physiologie des mammifères**

Le système nerveux des mammifères (SN) est un complexe système de régulation et de communication des cellules nerveuses qui maintient l'homéostasie de l'organisme (Rankin, 2018). Il assure la transmission des influx nerveux (Khan, 2013). Le rôle principal du système nerveux est de produire, transmettre et traiter les signaux nerveux en établissant des correspondances entre les capteurs et les récepteurs sensoriels, en les reliant anatomiquement à l'aide de fibres nerveuses et des nerfs après intégration des stimuli dans les centres nerveux où les informations sont traitées. Le système nerveux (SN) est composé de deux parties distinctes : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP) (figure 1).

Le SNC est composé deux centres nerveux : l'encéphale, qui englobe le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral, ainsi que la moelle épinière, située à l'intérieur de la colonne vertébrale. Son rôle central est de traiter les informations sensorielles et de réguler les réponses motrices. Il est associé au SNP, qui se trouve à l'extérieur du SNC et comprend les nerfs s'étendant du SNC vers les différentes parties du corps (Ferris *et al.*, 2020; Catala *et al.*, 2013).

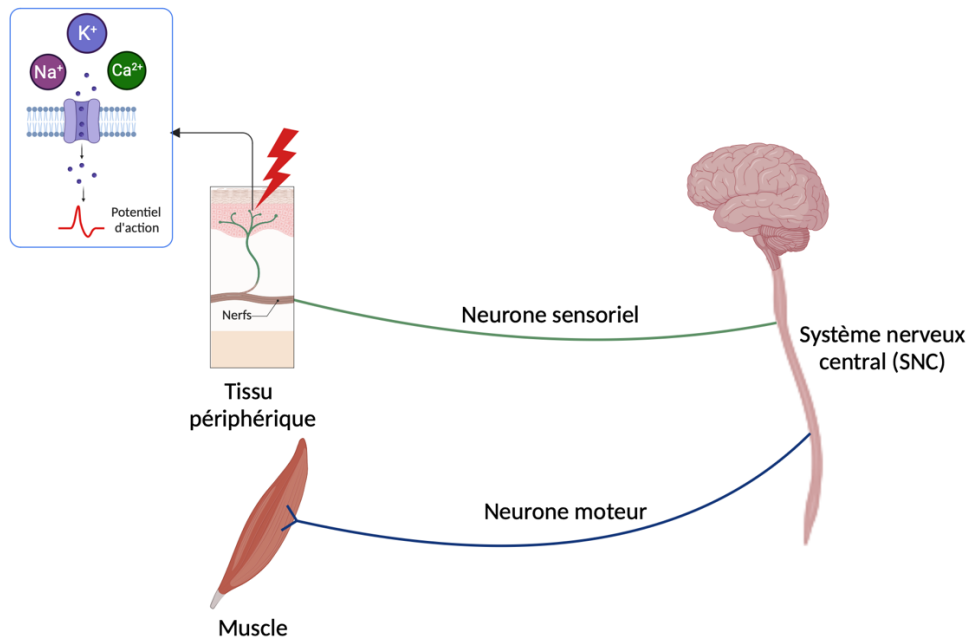


**Figure 1 : Les principales composantes du système nerveux**

La figure 1 illustre les deux principales parties du système nerveux des mammifères (SN) : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC comprend l'encéphale, qui englobe la moelle épinière logée dans la colonne vertébrale. Le SNP se situe à l'extérieur du SNC et comprend les nerfs qui se ramifient du SNC vers différentes parties du corps. Illustration par BioRender.com.

Le système nerveux se compose de deux types de cellules : les cellules gliales et les neurones. Les cellules gliales jouent un rôle de soutien et de maintien du système nerveux, contribuant à la formation d'une gaine de myéline entourant les axones, ce qui permet une conduction rapide et efficace du signal électrique. Quant aux neurones, ils transmettent les flux nerveux sous forme de signaux électriques et chimiques. Ces signaux sont essentiels pour la perception des stimuli sensoriels, y compris la douleur. La détection des stimuli nocifs est réalisée par des récepteurs appelés nocicepteurs, présents dans les tissus périphériques tels que la peau. Les neurones sensoriels convertissent ces informations en signaux électriques, qui sont ensuite transmis au système nerveux central (Zhang, 2019; Yam *et al.*, 2018).

La génération des signaux électriques est le résultat de changements de polarité électrique à travers la membrane neuronale. Ces changements sont induits par le déplacement d'ions tels que le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le potassium ( $\text{K}^+$ ) et le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à travers les canaux ioniques présents dans la membrane neuronale. Les signaux électriques, transmis le long des axones, permettent la transmission d'informations vers le système nerveux central (figure 2) (Celesia, 2001; Rubin, 2021).



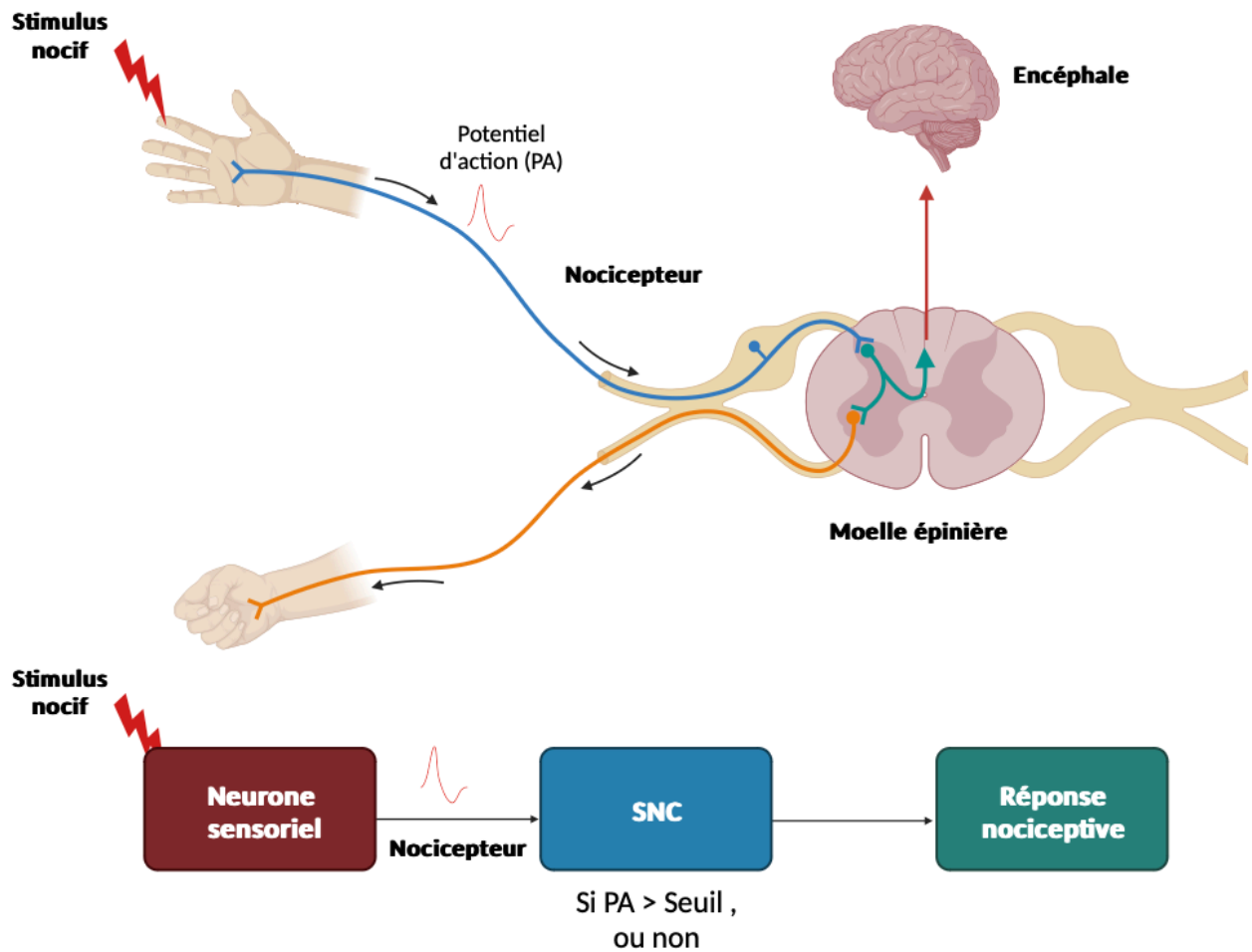
**Figure 2 : Neurophysiologie du système nerveux**

La figure 2 présente le processus de transmission des signaux électriques dans le système nerveux. Ces signaux électriques sont engendrés par des changements de polarité électrique à travers la membrane neuronale, induits par le déplacement d'ions tels que le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le potassium ( $\text{K}^+$ ) et le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à travers les canaux ioniques situés dans la membrane neuronale. Ces signaux électriques se propagent le long des axones des neurones sensoriels jusqu'au système nerveux central (SNC). Dans le SNC, les signaux sont traduits, traités, et ensuite transmis à d'autres neurones, notamment les neurones moteurs qui coordonnent les réponses motrices aux stimuli sensoriels (Celesia, 2001). Illustration par BioRender.com.

### 1.3. Nocicepteurs

Les nocicepteurs sont des récepteurs sensoriels spécifiques, qui sont situés dans différents tissus du corps, capables de transmettre des stimuli nocifs tels que la chaleur, la pression et certains produits chimiques. Ces récepteurs transforment ces stimuli en signaux électriques qui sont ensuite transmis vers le système nerveux central (SNC), pouvant générer une sensation de douleur nociceptive et permettant ainsi à l'organisme de réagir pour protéger son intégrité (Wang *et al.*, 2022; Parl, 2023; Nikolenko *et al.*, 2022).

Localisés dans les parties terminales des nerfs, les nocicepteurs ne sont pas uniquement des récepteurs de la douleur, mais des terminaisons nerveuses libres qui peuvent être activées par différents types de stimuli (figure 3). L'interprétation de cette activation en tant que sensation douloureuse dépend de la manière dont le cerveau traite les signaux (Fink, 2005 ; Colon *et al.*, 2012).



**Figure 3 : Physiologie des nocicepteurs**

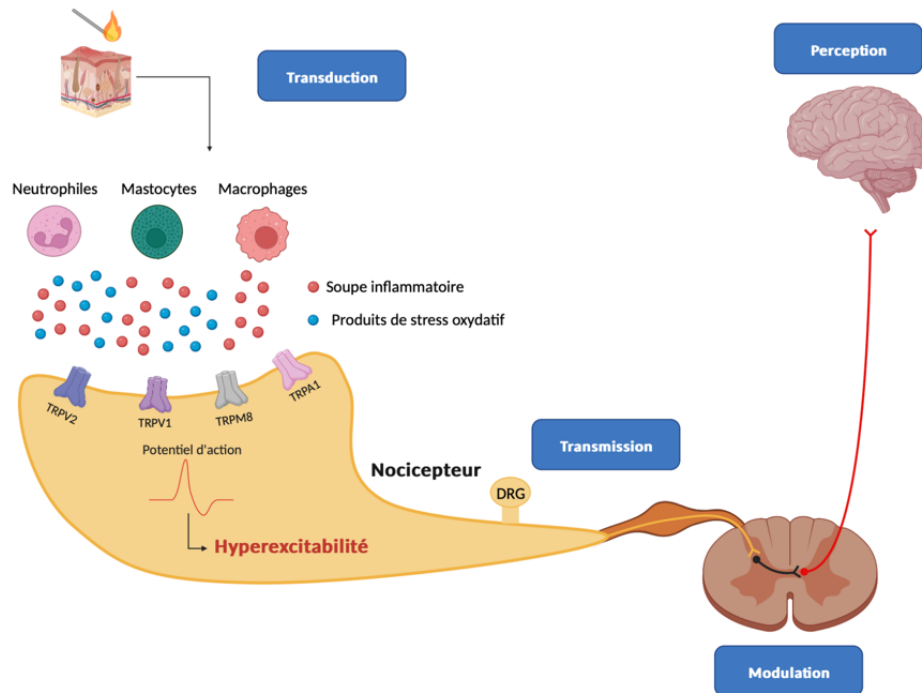
La figure 3 met en évidence le rôle important des nocicepteurs dans la transmission des flux nerveux en réponse à des stimuli nocifs. Les nocicepteurs détectent les stimuli nocifs et génèrent un potentiel d'action (PA), un signal électrique qui se propage le long d'axones jusqu'au système nerveux central (SNC). Au niveau du SNC, l'information est intégrée, et une réponse nociceptive appropriée est générée en fonction du seuil de potentiel d'action (Fink, 2005; Colon et al, 2012). Illustration par BioRender.com.

### 1.3.1. Mécanisme d'action des nocicepteurs

L'activation des nocicepteurs implique plusieurs étapes essentielles pour l'initiation d'un influx nerveux, nécessitant trois neurones et deux synapses et se déroulant en quatre étapes (Figure 4) :

1. Transduction : les nocicepteurs transforment les stimuli nocifs tels que la chaleur, les molécules inflammatoires, l'ATP et les cytokines libérées en signaux électriques. Ces signaux activent les nocicepteurs en ouvrant les canaux ioniques TRP (potentiels de récepteurs transitoires) en réponse aux stimuli nocifs, et générant un potentiel de récepteur qui se transforme en un potentiel d'action (PA).

2. Transmission : l'activation des nocicepteurs produit un potentiel d'action sous forme d'un signal électrique, qui se propage le long des fibres nerveuses afférentes du nocicepteur vers le système nerveux central (SNC). Ce processus crée également une hyperexcitabilité des nocicepteurs. Les principales fibres impliquées dans la transmission des signaux sont les fibres A-béta ( $A\beta$ ), A-delta ( $A\delta$ ) et les fibres C. Les fibres A-delta ( $A\delta$ ) sont plus grandes et myélinisées, ce qui confère une vitesse de transmission plus rapide. En revanche, les fibres C sont plus petites et non myélinisées, ralentissant leur transmission. Les neurotransmetteurs tels que le glutamate et la substance P sont principalement utilisés par les nocicepteurs pour transmettre le flux nerveux. Les signaux nociceptifs sont acheminés des neurones du ganglion nerveux vers la moelle épinière, qui agissent comme des intermédiaires. Ensuite, les signaux nociceptifs sont transmis à d'autres régions du SNC, y compris le cerveau, via des voies ascendantes spécifiques. Ces signaux sont ensuite traités et interprétés par les régions du cerveau impliquées dans la perception de la douleur.
3. Modulation : les signaux transmis vont être intégrés et modulés par le système nerveux central (SNC). Les mécanismes de modulation peuvent influencer l'intensité et la perception de la douleur. Cette étape fait référence au processus de la régulation effectué sur les neurones dirigeant la communication de la périphérie vers le cortex.
4. Perception : c'est l'étape de la transition de la nociception à la douleur. Les signaux nociceptifs sont traités et interprétés dans le cerveau, ce qui conduit à la sensation de douleur. Plusieurs facteurs individuels affectent la perception de la douleur. Il convient de noter que la douleur neuropathique se caractérise par la perception douloureuse en absence d'une nociception périphérique à la suite des différentes expériences antérieures (Dubin *et al.*, 2010; Osterweis *et al.*, 1987).



**Figure 4 : Les nocicepteurs et leurs actions**

La figure 4 montre que les nocicepteurs jouent un rôle clé dans la détection des stimuli nocifs résultant de lésions tissulaires. Ces lésions déclenchent la libération des molécules inflammatoires, d'ATP et de molécules pro-inflammatoires incluant les cytokines. Ces substances activent les canaux récepteurs passifs TRP situés dans les nocicepteurs. Cette stimulation conduit à une hyperexcitabilité des neurones sensoriels dans le ganglion de la racine dorsale (DRG), entraînant une hyperexcitabilité des neurones sensoriels dans le ganglion de la racine dorsale (DRG). Ces neurones activent ensuite les interneurones dans la moelle épinière, qui transmettent des signaux au cerveau pour interprétation et perception (Fink, 2005; Colon *et al.*, 2012). Illustration par BioRender.com.

#### 1.4. Les voies de la douleur

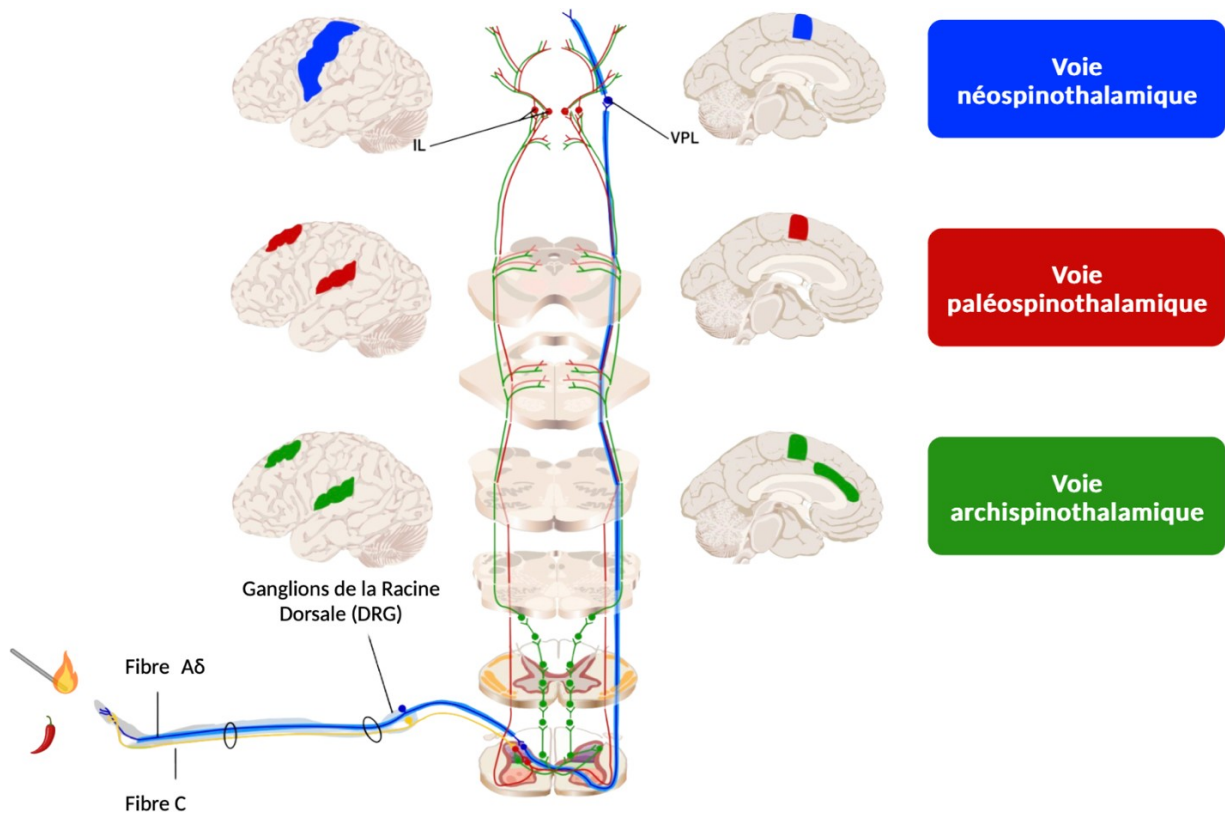
Les voies de la douleur transmettent les signaux des stimuli nociceptifs au cerveau, soit la perception de la douleur qui se produit. Parmi les voies impliquées dans la transmission de la douleur (figure 5), on en retrouve trois:

1. Voie néospinothalamique : cette voie est essentielle dans le processus des signaux de nocicepteurs jusqu'au thalamus et au cortex cérébral, où la perception de la douleur se réalise. Lorsque les nocicepteurs détectent un stimulus nociceptif, les fibres nerveuses de type A-delta ( $A\delta$ ) transmettent les signaux. Ces derniers se lient aux neurones dans la corne dorsale de la moelle épinière dans laquelle l'information est transmise de l'autre côté de la moelle épinière. Ensuite, les signaux sont transmis par la voie néospinothalamique ascendante vers le thalamus, en particulier les noyaux ventraux postéro-latéral (VPL) et

ventral postéro-inférieur (VPI) du thalamus. À partir du thalamus, les informations nociceptives sont projetées vers le cortex somatosensoriel primaire, impliqué dans la perception de la douleur. Pareillement, les neurones thalamiques expédiant ces informations, abordent des parties amplement plus énormes que celles agencées aux informations proprioceptives transmises par le lemnisque médian.

2. Voie paléospinothalamique : cette voie participe également dans la transmission des signaux douloureux vers le thalamus, puis vers les zones corticales du cerveau impliquées dans la perception et la modulation de la douleur. Lorsque des stimuli nociceptifs sont détectés par les fibres de type C, ces derniers pénètrent dans la moelle épinière par les racines dorsales et se connectent à des neurones. Les neurones de la corne dorsale découlent vers des voies ascendantes traversant ainsi les différentes parties de la moelle épinière avant de se connecter aux neurones du tronc cérébral.
3. Voie archispinothalamique : cette voie joue un rôle modulateur dans la transmission de l'information. Elle reçoit des informations de différentes parties cérébrales impliquées dans la régulation de l'attention, les émotions et de la douleur. Cette voie module les signaux des voies néospinothalamique et paléospinothalamique, affectant ainsi la perception de la douleur. Elle est impliquée dans les réactions viscérales et émotionnelles à la douleur, relayant l'information à l'hypothalamus, aux noyaux du système limbique, au noyau PF (parafasciculaire) et au noyau CM (centromédian) (Dafny, 2020; Kendroud *et al.*, 2017; Willis *et al.*, 1997).





**Figure 5 : Les trois voies de la douleur**

La figure 5 illustre les trois principales voies de la douleur : la voie néospinothalamique (en bleu), la voie paléospinothalamique (en rouge) et la voie archispinothalamique (en vert). Elles permettent la transmission des signaux de douleur des stimuli nociceptifs vers le thalamus et les régions corticales du cerveau impliquées dans la modulation et la perception de la douleur. Illustration adaptée de Dafny, 2020.

### 1.5. Introduction aux récepteurs TRP (Transient Receptor Potential)

Récemment, une famille très diverse de canaux ioniques TRP a été identifiée. Elle est présente dans plusieurs types cellulaires des mammifères, les canaux TRP. Lors de l'activation par des stimuli nocifs, ces canaux traduisent les signaux électriques en modifiant le potentiel membranaire ou la concentration des différents ions  $Ca^{2+}$ . Grâce à leur perméabilité calcique, ces récepteurs exécutent une mission importante dans la régulation de la physiologie cellulaire en participant à des processus tels que l'excitabilité neuronale et la régulation du calcium intracellulaire (Mickle *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2010).

Les TRP forment une grande famille de protéines transmembranaires qui ont été découvertes pour la première fois chez *Drosophila melanogaster*, puis chez de nombreuses autres espèces telles que les nématodes (*C. elegans*) et les mammifères. La famille des

canaux TRP est classée en six sous-familles différentes : TRPV<sub>1-6</sub> (TRP vanilloïdes), les TRPM<sub>1-8</sub> (TRP melastatines), les TRPA (TRP ankyrines), les TRPC<sub>1-7</sub> (TRP canoniques), les TRPP<sub>1-3</sub> (TRP polycystines) et les TRPML (TRP mucolipines). Chacune de ces familles de récepteurs TRP possède des caractéristiques structurales et fonctionnelles spécifiques, leur permettant de répondre spécifiquement à certains types de stimuli (Vriens *et al.*, 2004; Vassort *et al.*, 2008).

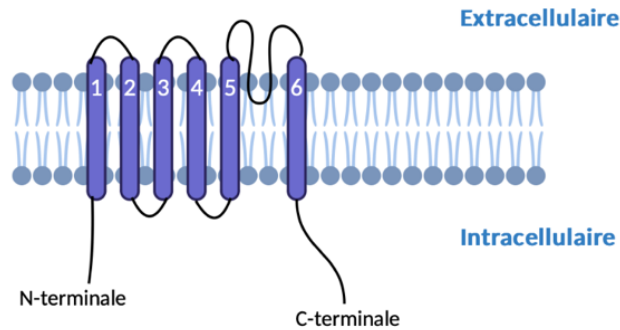
Notre revue de littérature se concentre sur un des récepteurs TRP, le TRPV1, qui joue un rôle important dans la détection de la chaleur nocive (Szolcsányi *et al.*, 2021). Le récepteur TRPV1 ainsi que les récepteurs cannabinoïdes sont indispensables dans la modulation de la douleur (Etemad *et al.*, 2010).

### 1.5.1. TRPV1

#### - TRPV1 – Gène, structure, localisation et expression

La famille des canaux vanilloïdes (ou encore TRPV) est formée de six membres : TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 et TRPV6. Notre étude se concentre sur le TRPV1 qui est composé de 838 acides aminés chez le rat et de 839 acides aminés chez l'Homme, avec un poids moléculaire estimé d'environ 95 000 Da (Nagy *et al.*, 2014). Ce récepteur est codé par un gène situé sur le segment p13.2 du chromosome 17 chez l'Homme (Dorfman *et al.*, 2010).

La structure du TRPV1 est tétramérique et possède six segments transmembranaires hélicoïdaux (S1-S6) qui traversent la membrane cellulaire et contribuent à la formation de canaux. Entre les segments S5 et S6, il y a un groupement hydrophobe qui joue un rôle important dans la fonction de canal en permettant le passage des ions de calcium Ca<sup>2+</sup> (Shen *et al.*, 2016). À l'intérieur de la membrane cellulaire de TRPV1, nous trouvons les extrémités N-terminale et C-terminale (figure 6) qui sont primordiales dans la régulation de l'activité fonctionnelle de la protéine (Chappe *et al.*, 2022).



**Figure 6 : Structure polyprotéique d'un TRPV1**

La figure 6 montre la structure polyprotéique de TRPV1, composée de 6 sous-unités identiques (cylindre violet), qui forme un canal ionique central permettant le passage des ions. Sa région extracellulaire interagit avec les protéines de liaison et de signalisation, tandis que sa région intracellulaire interagit avec des protéines et des cascades de signalisation intracellulaire, contribuant ainsi à la transmission du signal de la douleur. Bien que la distance entre les segments S1-S5 soit uniforme, il y a un changement de la distance entre les derniers segments S5-S6 à cause de la présence de groupe hydrophile, qui facilite l'entrée des ions (Chappe *et al.*, 2022). Illustration par BioRender.com.

Les récepteurs TRPV1 sont situés à l'extrémité périphérique des neurones sensoriels de petit à moyen diamètre présents dans les ganglions sensoriels. Ces neurones de TRPV1 se projettent en périphérie vers la peau, les muscles, les articulations et l'intestin, tandis que leurs terminaisons centrales se projettent vers la moelle épinière (Mickle *et al.*, 2015).

#### - **TRPV1 – Fonction, activation et circuit neuronal**

TRPV1 est impliqué dans la détection des stimuli nocifs, tels que la chaleur intense supérieure 43°C. Lorsque ces canaux ioniques sont activés par un stimulus, ils subissent un changement de conformation qui entraîne l'ouverture du canal. Cela permet une entrée massive d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ), ce qui induit une dépolarisation cellulaire. Lorsque cette dépolarisation atteint le seuil, elle déclenche un potentiel d'action (PA), qui est un signal électrique (Vangeel *et al.*, 2019).

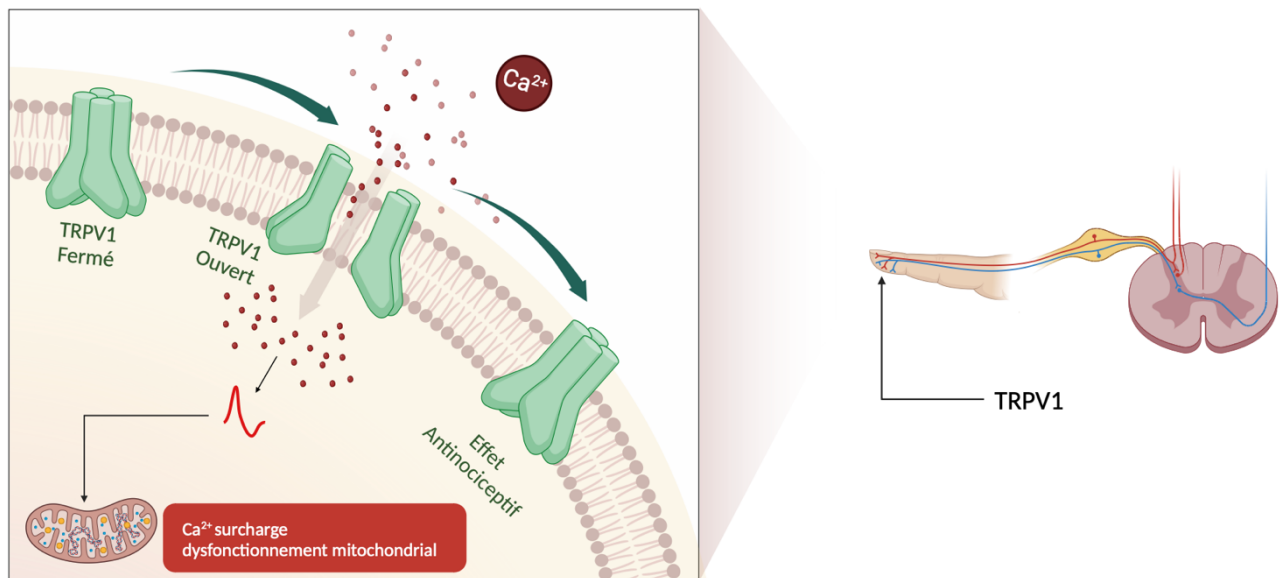
#### - **TRPV1 – Ligands endogènes, agonistes et antagonistes**

Les activateurs de TRPV1 comprennent deux types de ligands différents (figure 7) :

- Les ligands endogènes (endovanilloïdes), comme la prostaglandine E2, ainsi que des lipides bioactifs tels que l'endocannabinoïde (l'anandamide (AEA)), la N-arachidonoyldopamine (NADA) et les produits de lipoxygénase de l'acide arachidonique AA (Van Der Stelt *et al.*, 2004).

- Les agonistes exogènes, tels que la capsaïcine (Cap), qui est un agoniste du TRPV1, se trouve dans les piments. D'autres exemples d'agonistes incluent la résinifératoxine (RTX) et le cannabidiol (CBD) (Muller *et al.*, 2019).

D'autre part, les antagonistes sont des substances inhibitrices de l'activité du TRPV1. Ils se lient au récepteur et bloquent son activation, tels que le ruthénium rouge, la capsazépine, empêchant ainsi la réponse neurosensorielle induite par le TRPV1 (Chappe, 2022).



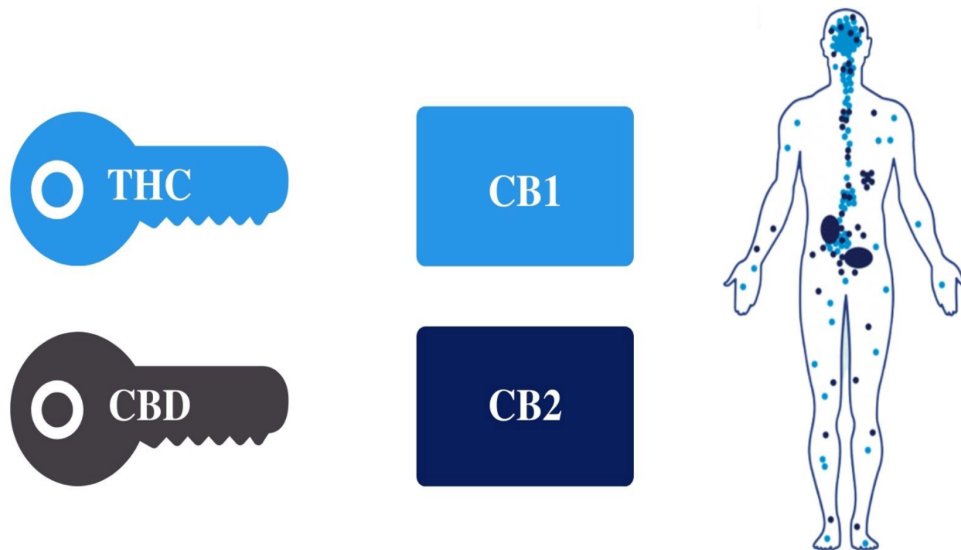
**Figure 7 : Activation du TRPV1 par les ligands exogènes ou endogènes**

L'activation du récepteur TRPV1 par des ligands provoque l'afflux de calcium dans les cellules, ce qui entraîne une dépolarisation neuronale et une transmission de signaux sensoriels liés à la douleur. En conséquence, l'entrée massive de calcium va entraîner la fermeture du canal ionique TRPV1, ce qui peut induire une désensibilisation des neurones nociceptifs. Des études suggèrent que l'activation prolongée de TRPV1 peut perturber le fonctionnement des mitochondries, notamment en inhibant le transport des électrons de la chaîne respiratoire (Juárez-Contreras *et al.*, 2020). Illustration par BioRender.com.

### 1.6. Introduction aux récepteurs cannabinoïdes

Le système endocannabinoïde exécute un rôle primordial dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires, aussi bien sur le plan central que sur les plans périphériques. Ce système intervient en contournant un grand nombre de dysfonctions physiologiques. Chez l'Homme, ce système comprend deux récepteurs : CB1 au niveau du système nerveux central et nerfs périphériques; et CB2 sur les cellules immunitaires et certains tissus périphériques (Pertwee, 2001). Ces récepteurs interagissent avec des cannabinoïdes, qui peuvent être naturels, synthétiques ou endogènes (Marzo *et al.*, 2006).

Lorsque ces récepteurs sont activés par les endocannabinoïdes AEA et 2-AG, ils modulent l'activité neuronale et influencent la perception de la douleur, entraînant ainsi une désensibilisation (Pertwee, 2001). Lors d'un dysfonctionnement des endocannabinoïdes, les phytocannabinoïdes, comme le cannabidiol (CBD) et le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) (figure 8), peuvent activer les récepteurs CB1 et CB2 de manière différente de l'AEA et du 2-AG, mais les mécanismes sous-jacents du CBD et THC sont différents (Dawson *et al.*, 2022).



**Figure 8 : L'expression des récepteurs cannabinoïdes chez l'humain**

La figure 8 montre que CBD et THC se lient aux récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB,2 qui agissent comme des clés. Les récepteurs CB1 se trouvent dans le SNC et les nerfs périphériques, tandis que les récepteurs CB2 se trouvent sur les cellules immunitaires et certains tissus périphériques. Le CBD n'interagit pas avec les récepteurs CB1 ou CB2, mais il a de puissants effets indirects par l'interaction entre le système vanilloïde et cannabinoïde, ce qui est l'objectif de plusieurs études (Pertwee, 2001 ; Ralevic 2003).

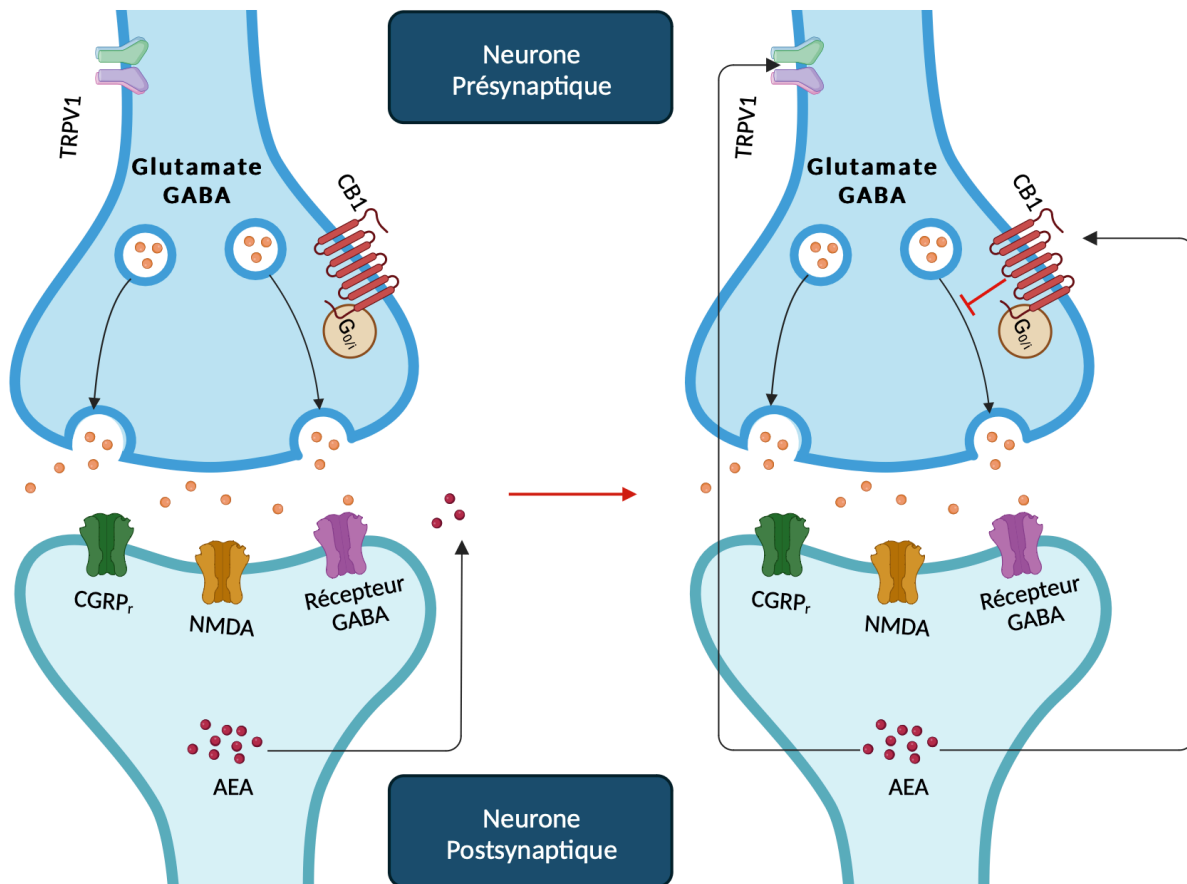
### 1.6.1. CB1

#### - CB1 – Gène, structure, localisation et expression

Le gène CNR1 est situé sur le chromosome 6 et code le récepteur cannabinoïde CB1 (Abood *et al.*, 2018). Ce dernier est couplé aux protéines G (GPCR) et est composé de 473 acides aminés ainsi que de 7 segments transmembranaires (TM1 à TM7). Il possède une extrémité N-terminale glycosylée située à l'extracellulaire et une extrémité C-terminale située à l'intracellulaire (Shim *et al.*, 2003; Cabral *et al.*, 2009). Son expression est principalement localisée dans le système nerveux central et dans certains tissus périphériques (Kendall *et al.*, 2017).

## - CB1 – Fonction, activation et circuit neuronal

Le récepteur CB1 est impliqué dans la modulation de la neurotransmission et dans divers processus physiologiques afin de maintenir l'homéostasie dans le corps. Il joue un rôle clé dans certaines fonctions telles que la perception de la douleur, l'appétit, l'humeur, la mémoire, le sommeil, la régulation du stress, la neuroprotection et la régulation du système immunitaire. Lorsqu'il est déséquilibré, le récepteur CB1 régule la libération des neurotransmetteurs et modifie la signalisation neuronale pour rétablir l'équilibre. L'activation de ce récepteur par les endocannabinoïdes ou les ligands exogènes déclenche une cascade de signalisation intracellulaire, modulant l'activité neuronale et la libération de neurotransmetteurs (figure 9) tels que la substance P, GABA et le glutamate (Forteza *et al.*, 2021; Matei *et al.*, 2023; Brotchie, 2003).



**Figure 9 : Régulation de l'activité neuronale par le récepteur CB1**

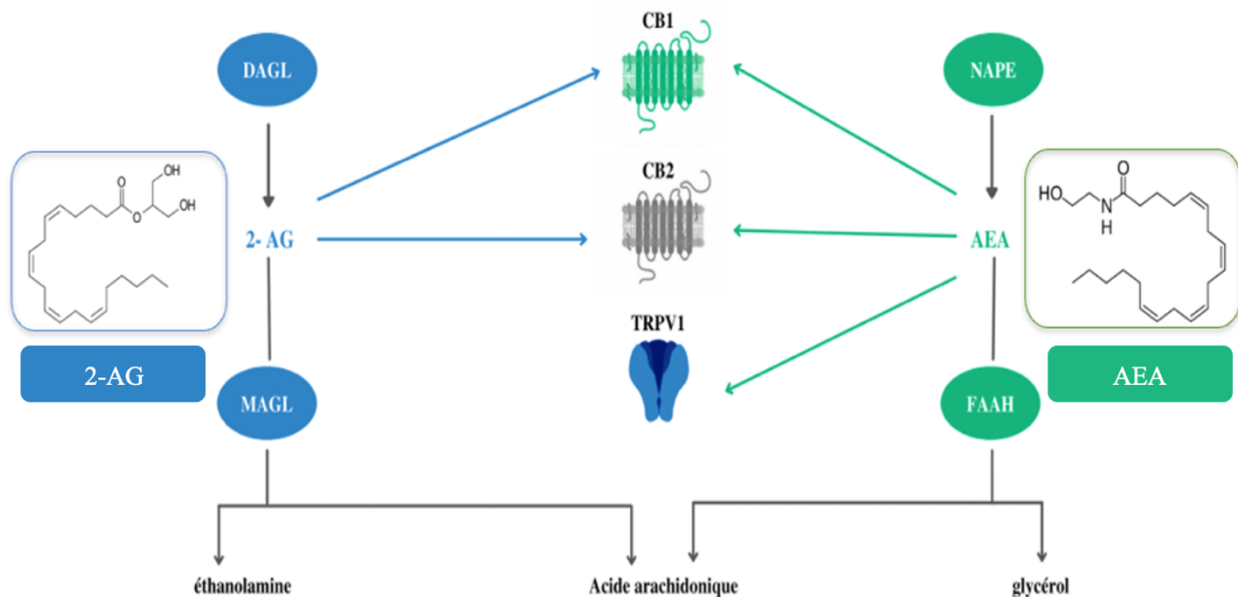
Lorsque des neurotransmetteurs glutamates et GABA sont libérés dans les synapses, cela entraîne la synthèse de l'endocannabinoïde AEA. L'AEA va activer le récepteur cannabinoïde CB1 présynaptique, ce qui entraîne l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs. De plus, l'AEA va activer le récepteur TRPV1 pour générer une suppression de la

neurotransmission synaptique. Ces mécanismes jouent un rôle dans la régulation de la transmission synaptique. Illustration par BioRender.com.

- **CB1 – Ligands endogènes, agonistes et antagonistes**

Les activateurs de CB1 comprennent deux types de ligands différents :

- Les ligands endogènes : les principaux endocannabinoïdes sont l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), qui sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique par l'action d'une enzyme spécifique (figure 10) (Maccarrone, 2020).

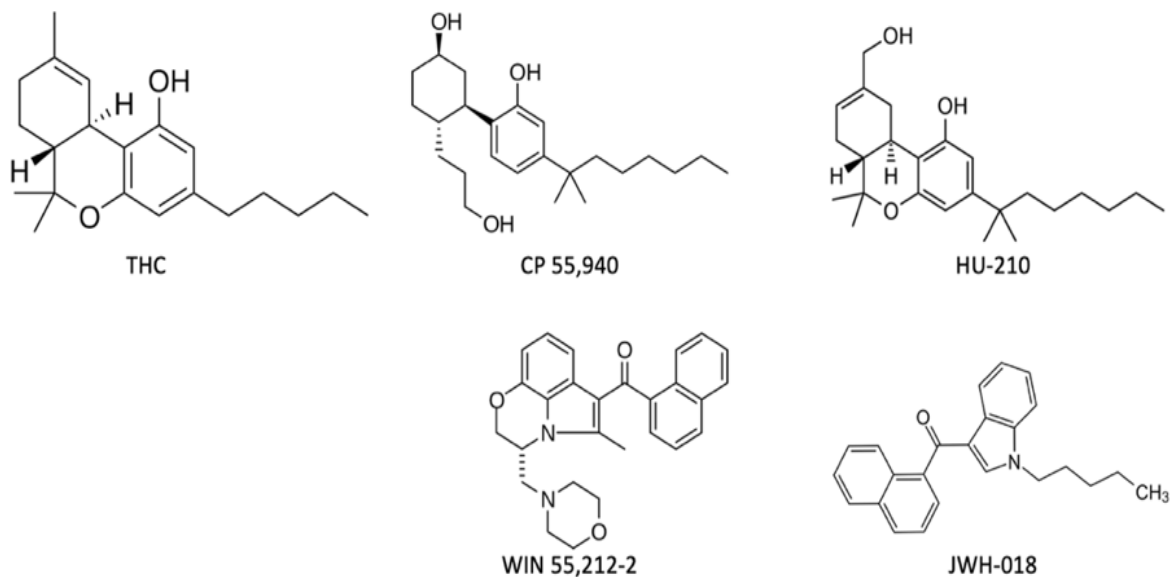


**Figure 10 : Métabolisme d'endocannabinoïdes AEA et 2-AG**

Le métabolisme des principaux endocannabinoïdes implique la synthèse de l'AEA, qui est synthétisé par l'action d'une enzyme NAPE. En ce qui concerne le 2-AG, il est synthétisé par l'activité de l'enzyme diacylglycérol lipase (DAGL). Par la suite, l'AEA est dégradé par l'enzyme FAAH [(fatty acid amide hydrolase) /AEA], qui hydrolyse l'AEA en acide arachidonique et glycérol. Quant au 2-AG, il est dégradé par l'enzyme MAGL [(monoacylglycérol lipase) /2-AG], qui le dégrade en acide arachidonique et éthanolamine. L'AEA et le 2-AG sont des ligands endogènes pour les récepteurs CB1 et CB2, et l'AEA peut également agir sur le récepteur TRPV1. Illustration par BioRender.com

- Les agonistes exogènes : les agonistes exogènes du récepteur CB1 peuvent avoir des effets variés et induire des réponses spécifiques en fonction de leur affinité et de leur activité. Certains agonistes sont naturels, tels que le Δ9-Tétrahydrocannabinol (THC) (figure 11) extrait de la plante de cannabis (Hrubá *et al.*, 2014; Coronado-Álvarez *et al.*, 2021). D'autre part, certains agonistes sont synthétiques, tels que CP 55,940, HU-210, WIN 55212-2 et

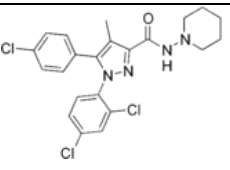
JWH-018 qui sont utilisés pour le traitement analgésique, anti-inflammatoire, neuroprotecteur, et effets antiémétiques (Papaseit *et al.*, 2018; Roque-Bravo *et al.*, 2023; Castaneto *et al.*, 2014). Cependant, leur utilisation est limitée, car ils ont des effets indésirables tels que des effets psychoactifs (euphorie, anxiété), une tachycardie, une altération de la cognition et un potentiel d'abus (Ashton, 2012; Karila *et al.*, 2016; Tai *et al.*, 2014).



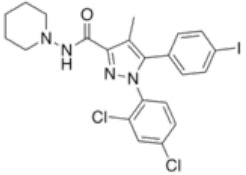
**Figure 11 : Les structures chimiques des agonistes exogènes de CB1**

Les antagonistes de CB1 sont : Rimonabant (SR141716) et l'autre antagoniste AM251 qui est utilisé en recherche (tableau 1) (Kogan *et al.*, 2022).

**Tableau 1 : Les antagonistes de CB1 : ses effets thérapeutiques et ses effets indésirables**

Antagoniste	Effets thérapeutiques	Effets indésirables	Références
 <b>SR141716</b>	Gestion de l'obésité Amélioration des facteurs de risque cardiovasculaire	Troubles psychiatriques Troubles gastro-intestinaux Insomnie Infections respiratoires	Samat <i>et al.</i> , 2008 Sritvastava <i>et al.</i> , 2018 Bifulco <i>et al.</i> , 2007



 <p><b>AM251</b></p>	<p>Analgésique Dépendance aux drogues</p>	<p>Troubles psychiatriques Problèmes cardiovasculaires Et l'altération de la fonction cognitive</p>	<p>Seely et al, 2012 Moreira <i>et al.</i>, 2009</p>
---	---	---	--

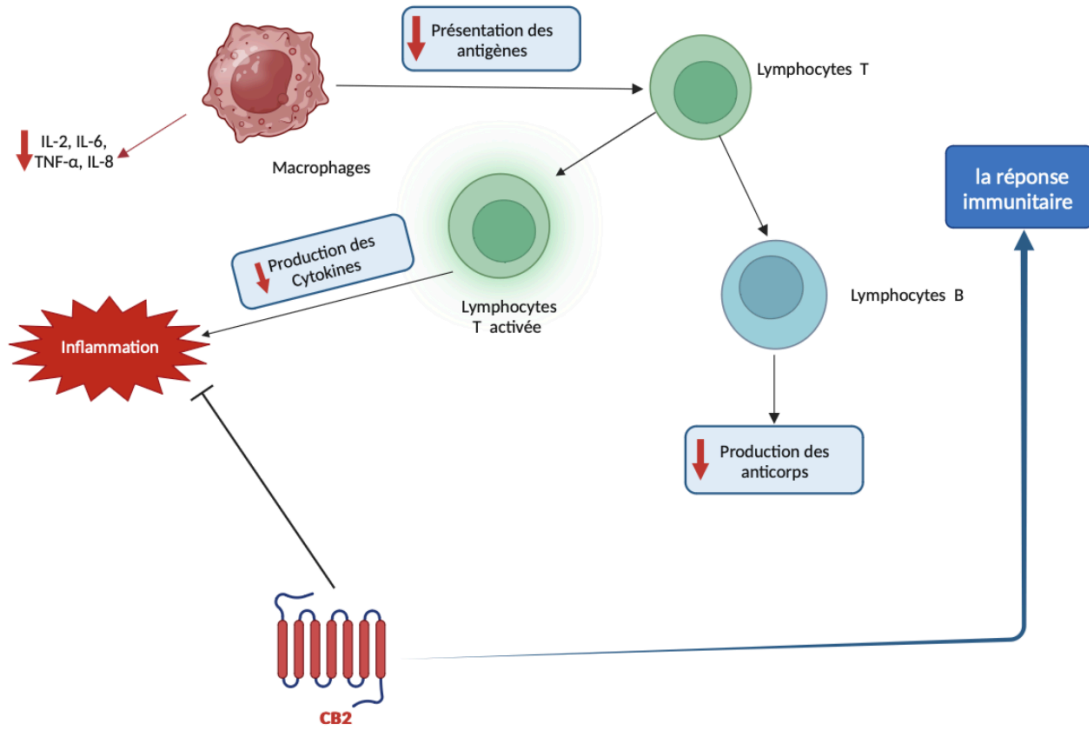
### 1.6.2. CB2

#### - CB2 – Gène, structure, localisation et expression

Le gène CNR2 est situé sur le chromosome 1 et code le récepteur cannabinoïde CB2. Sa structure de 360 acides aminés est similaire au CB1. Le CB2 est couplé à la protéine G (GPCR), avec sept domaines transmembranaires et une extrémité N-terminale glycosylée et une extrémité C-terminale intracellulaire. Son expression est principalement localisée dans les cellules et les tissus du système immunitaire, comme les macrophages, les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK. CB2 peuvent être détectés dans le système nerveux central, précisément dans les microglies en cas d'inflammation (Cabral *et al.*, 2009).

#### - CB2 – Fonction, activation et circuit neuronal

Principalement, la fonction du CB2 est de réguler la réponse immunitaire ainsi que l'inflammation. Lorsque CB2 est activé (figure 12), une modulation de la libération des médiateurs inflammatoires se manifeste pour maintenir l'homéostasie immunitaire et le contrôle négatif de la modulation des processus inflammatoires (Argenziano *et al.*, 2019).



**Figure 12 : Rôle du CB2 dans l'inflammation et la réponse immunitaire**

L'activation de CB2 va inhiber la production de cytokines et réduit la présentation des antigènes, modulant l'inflammation et la réponse immunitaire. Illustration par BioRender.com.

#### - **CB2 – Ligands endogènes, agonistes et antagonistes**

Les activateurs de CB2 comprennent deux types de ligands différents :

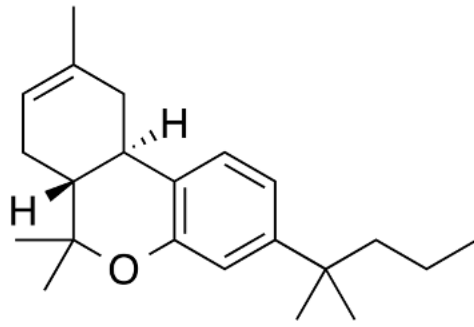
- Les ligands endogènes : pareillement au CB1, les principaux endocannabinoïdes sont l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG). Ces ligands endogènes jouent un rôle important dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire (Maccarrone, 2020).
- Les agonistes exogènes : la minocycline est l'un des antibiotiques qui ont été étudiés récemment pour leur potentiel d'activation du récepteur CB2 (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2015). De plus,  $\Delta$ 9-Tétrahydrocannabinol (THC) montre une affinité partielle envers les récepteurs CB2 (McHann *et al.*, 2023). Simultanément, il existe des cannabinoïdes synthétiques, les plus connus HU210 et JWH133, qui présentent une similitude de structure chimique avec  $\Delta$ 9-THC et ciblent les récepteurs CB2. Le JWH133 a des propriétés thérapeutiques qui peuvent moduler la réponse immunitaire et réduire l'inflammation sans

provoquer les effets psychoactifs associés à l'activation des récepteurs CB1. En revanche, HU-210 est considéré comme un agoniste des récepteurs CB1 et CB2 (tableau 2). En raison de sa forte affinité pour les récepteurs CB1, ce composé peut induire des effets psychoactifs semblables aux effets du THC (Shahbazi *et al.*, 2020).

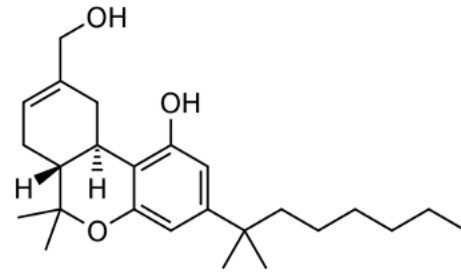
Les antagonistes de CB2, tels que SR144528 (figure 13), sont utilisés pour étudier les fonctions du récepteur CB2 (tableau 2).

**Tableau 2** : Les agonistes et antagonistes de CB2 : effets thérapeutiques et ses effets indésirables

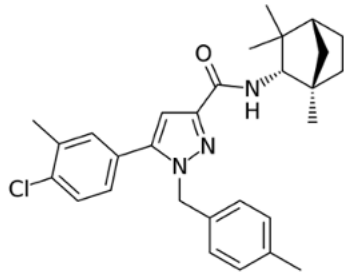
<b>Ligand</b>	<b>Effets thérapeutiques</b>	<b>Effets indésirables</b>	<b>Références</b>
Minocycline	Anti-acnéique Antibiotique Anti-rosacée	Troubles gastro-intestinaux Réactions allergiques Sensibilité cutanée	Martins <i>et al.</i> , 2021
HU-210	Analgésique Anti-inflammatoire Neuroprotection	Troubles psychiatriques Troubles cardiovasculaires Dépendance et abus	Biegon, 2004 Papaseit <i>et al.</i> , 2018 Ashton, 2012
JWH133	Immunomodulateur Anti-inflammatoire Neuroprotection Anti-cancéreux	Troubles cardiovasculaires Toxicité systémique Manque de sélectivité	Wang <i>et al.</i> , 2019 Hashiesh <i>et al.</i> , 2021
SR144528	Analgésique Anti-inflammatoire	Effets psychologiques Troubles cardiovasculaires Perturbation du système immunitaire	Oláh <i>et al.</i> , 2017 Fulmer <i>et al.</i> , 2018 Pandey, <i>et al.</i> , 2009



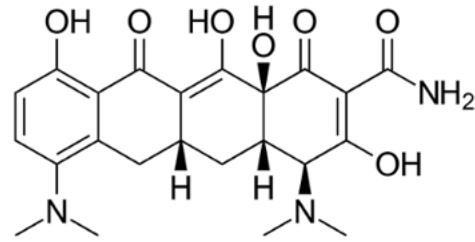
JWH133



HU210



SR144528



Minocycline

Figure 13 : La structure chimique d'agonistes et antagonistes de CB2

## 2 – Les cannabinoïdes

### 2.1. Définition, structures, classification et propriétés chimiques

Les endocannabinoïdes sont des composés essentiels qui régulent le système cannabinoïde et jouent un rôle essentiel dans la modulation des divers processus biologiques régulés par les récepteurs cannabinoïdes. Leur structure classique est caractérisée par une base contenant deux cycles benzéniques liés à un cycle pyranique, avec des substituants chimiques variés. Cette diversité structurale contribue aux propriétés pharmacologiques spécifiques des cannabinoïdes. Toutefois, il existe certaines exceptions, notamment l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), qui sont des dérivés de l'acide arachidonique et possèdent une structure semblable à celle d'un acide gras. Contrairement aux cannabinoïdes classiques tels que le THC et le CBD, les endocannabinoïdes ne possèdent pas le noyau de dibenzopyrane caractéristique (Zou *et al.*, 2008; Shevyrin *et al.*, 2015; Cumella *et al.*, 2012).

Ces composés sont classés selon trois grandes catégories (figure 14) :

- Phytocannabinoïdes : extraits de la plante de cannabis, les plus abondants sont le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC), le cannabidiol (CBD), et d'autres phytocannabinoïdes moins abondants tels que le cannabichromène (CBC), le cannabigerol (CBG) et le cannabinoïde (CBN).
- Endocannabinoïdes : ces cannabinoïdes sont synthétisés dans le corps. Des exemples incluent l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG).
- Cannabinoïdes synthétiques : élaborés en laboratoire pour imiter les effets des phytocannabinoïdes, certains exemples sont le dronabinol (THC synthétique) et le nabilone. Ces cannabinoïdes sont synthétisés dans le but de générer des composés qui, bien qu'ils présentent des similitudes avec les phytocannabinoïdes, ferment des structures qui ne sont pas intrinsèquement présentes au sein de la biosphère naturelle (Grotenhermen, 2008; Zou *et al.*, 2018).

Les propriétés chimiques des cannabinoïdes varient en fonction de leur structure moléculaire spécifique. De manière générale, les cannabinoïdes présentent une caractéristique d'hydrophobie, ce qui implique qu'ils ont une faible solubilité dans l'eau, mais une bonne solubilité dans les solvants

organiques, en particulier les solvants non polaires tels que le dichlorométhane ou le chloroforme (Zou *et al.*, 2018).

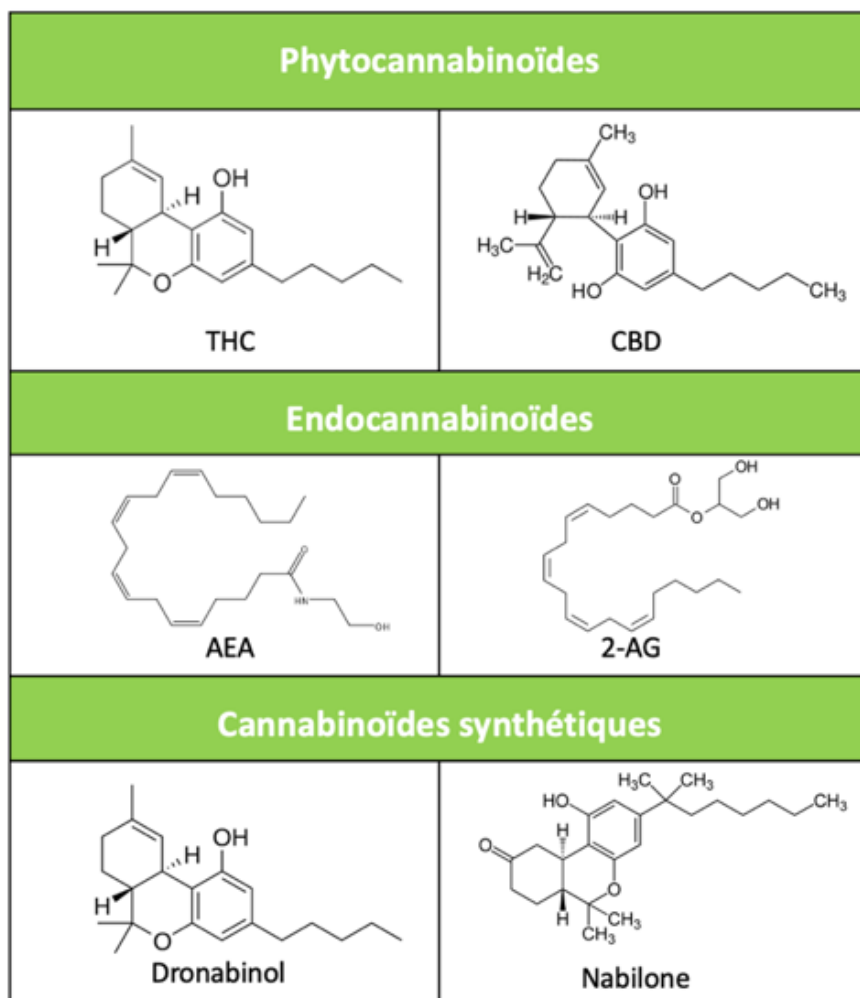
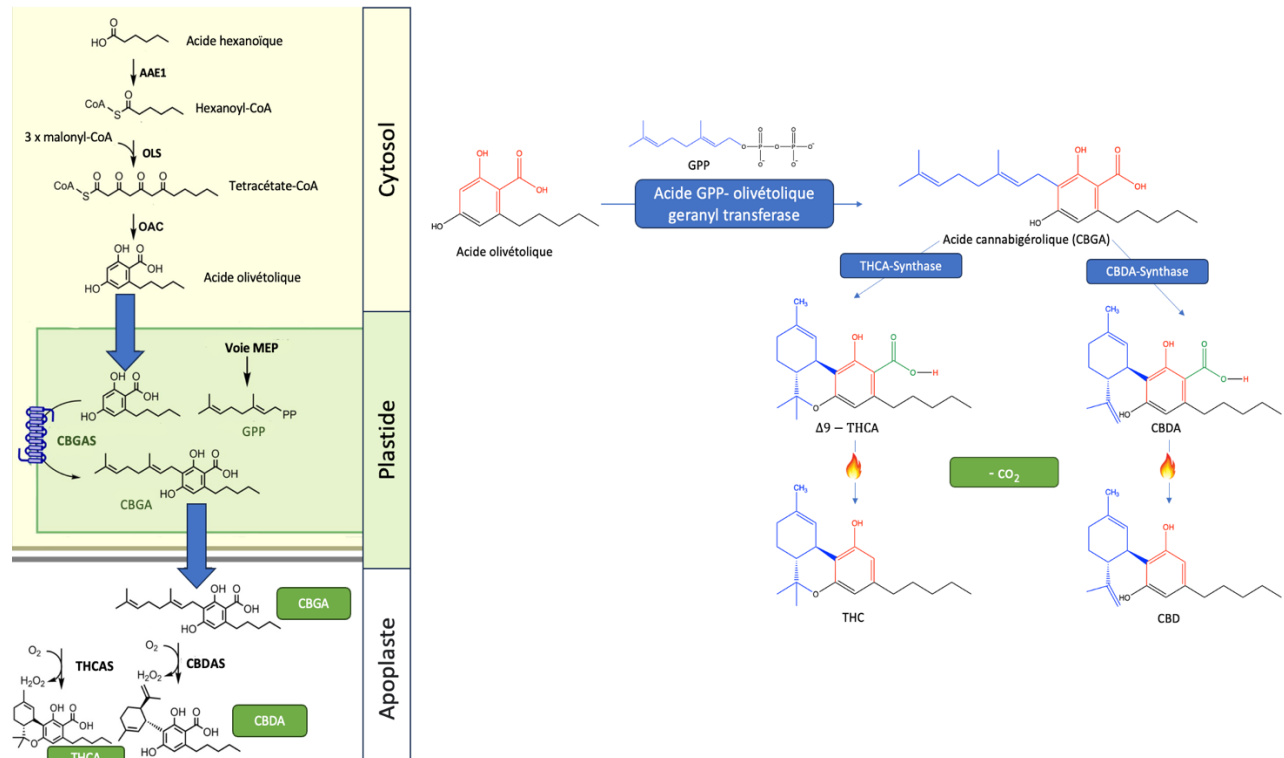


Figure 14 : Les structures chimiques de cannabinoïdes

## 2.2. Origines métaboliques (biosynthèse) des phytocannabinoïdes (*Cannabis sativa*)

Les phytocannabinoïdes ont été initialement découverts dans le *Cannabis sativa*, ces composés sont extraits et isolés par diverses méthodes. La biosynthèse des cannabinoïdes dans cette plante implique plusieurs processus métaboliques. Ces composés sont produits à partir d'un précurseur métabolique commun, qui est l'acide olivetolique, qui résulte de la condensation de trois molécules d'acide malonique. Sous l'action de l'enzyme olivetol synthase, l'acide olivetolique est converti en cannabigérol (CBG). Ensuite, le CBG est transformé en différents cannabinoïdes tels que delta-9-tétrahydrocannabinol (THC), le cannabidiol (CBD) (figure 15), et d'autres, résultant de

l'action d'enzymes spécifiques. Le processus de la biosynthèse est influencé par de nombreux facteurs, tels que les conditions environnementales et les signaux internes de la plante. Des modifications de gènes impliqués dans cette biosynthèse peuvent également être entraînées chez différentes variétés de *Cannabis sativa* (Holly *et al.*, 2020).

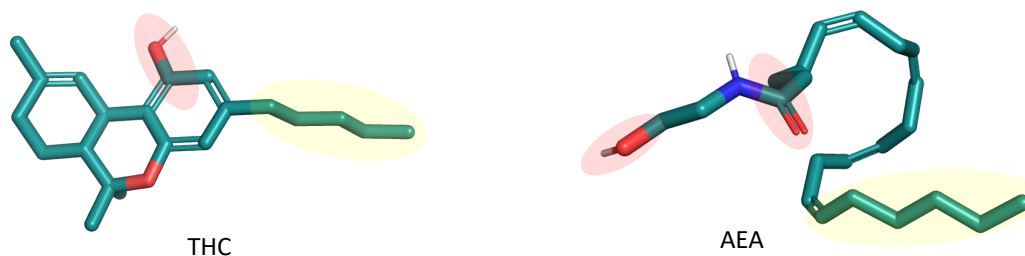


**Figure 15 : La biosynthèse des cannabinoïdes dans le *Cannabis sativa***

Dans une réaction catalysée par l'enzyme AAE1, l'acide hexanoïque est converti en thioéther hexanoyl-CoA, qui réagit avec trois molécules de malonyl-CoA dans une réaction catalysée par l'oléivétol synthase (OLS). Ensuite, tétracétate-CoA est cyclisée par l'acide olivétolique cyclase (OAC) pour produire de l'acide olivétolique (OA). Cette production d'OA à partir de l'acide hexanoïque se produit dans le cytosol. Dans le plastide, OA réagit avec GPP pour la synthèse de cannabigérolique acide (CBGA) par l'action de cannabigérolique acide synthase (CBGAS). Enfin, CBGA est converti en cannabidiol acide (CBDA) et en acide tétrahydrocannabinoïque (THCA) par des enzymes spécifiques CBDAS et THCAS. Illustration adaptée de Gülck *et al.*, 2020.

### 2.3. Fonctions et cibles du THC

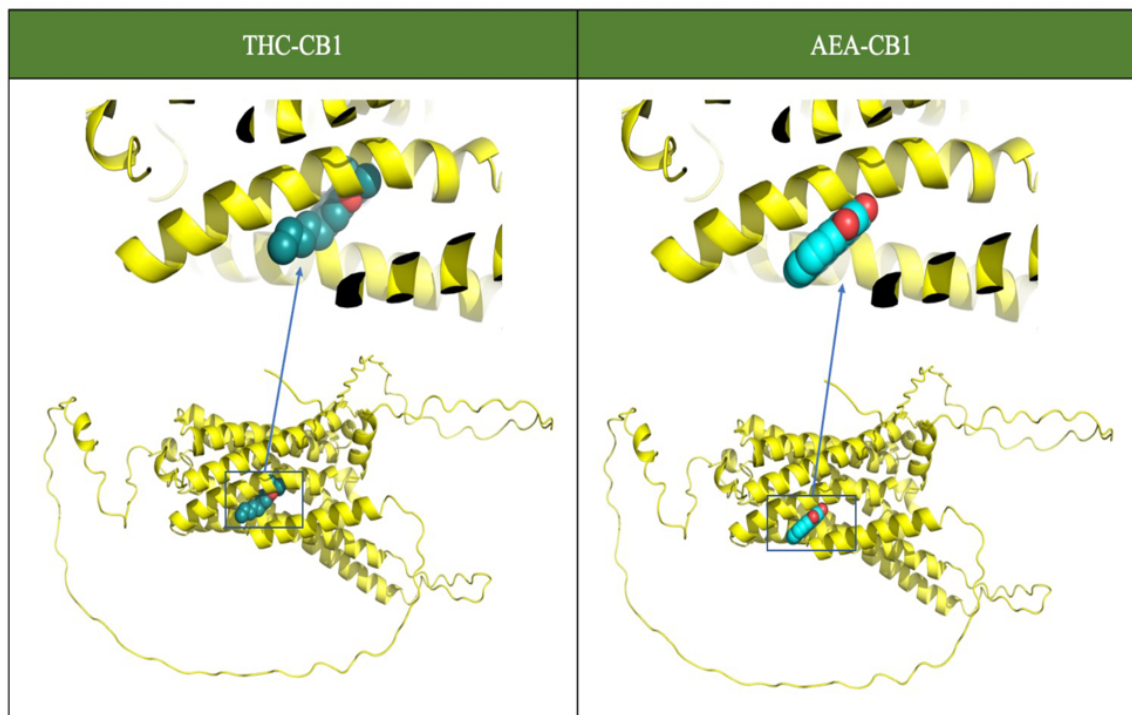
Malgré les différences structurales entre AEA et THC, les études récentes montrent une similitude dans leurs structures tridimensionnelles (figure 16), en particulier la surface de Van der Waals des pharmacophores partagés par les deux cannabinoïdes. Ces régions du pharmacophore permettent au THC d'être capable d'activer les récepteurs cannabinoïdes, de manière similaire à l'AEA, ce qui entraîne des effets biologiques similaires (Maccarrone *et al.*, 2003).



**Figure 16 : Les structures tridimensionnelles de THC et AEA**

Les structures tridimensionnelles de l'anandamide (AEA, PubChem 5281969, à droite) et du  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC, PubChem 16078, à gauche), ont été créées à l'aide du logiciel Pymol (Schrodinger, [www.pymol.org](http://www.pymol.org)) pour représenter les surfaces van der Waals des pharmacophores et mettre en évidence positions correspondantes (cercle rouge et jaune). Les atomes de carbone sont représentés en vert, les atomes d'oxygène en rouge, l'atome de l'azote en bleu et hydrogène polaire en blanc.

Cependant, l'AEA et le THC présentent des différences pharmacologiques. Par exemple, le THC a une affinité plus élevée pour les récepteurs CB1 par rapport à l'AEA, en raison de son encombrement stérique réduit (figure 17). Étant donné que les récepteurs CB1 sont principalement présents dans le système nerveux central (SNC), cela explique les effets psychoactifs du THC (Maccarrone *et al.*, 2003; Chayasirisobhon, 2020).



**Figure 17 : Les interactions entre les récepteurs CB1 et THC ou AEA**

Les interactions entre les récepteurs CB1 (jaune) et THC (vert) /AEA (bleu), ont été créées à l'aide du logiciel Pymol (Schrodinger, [www.pymol.org](http://www.pymol.org))

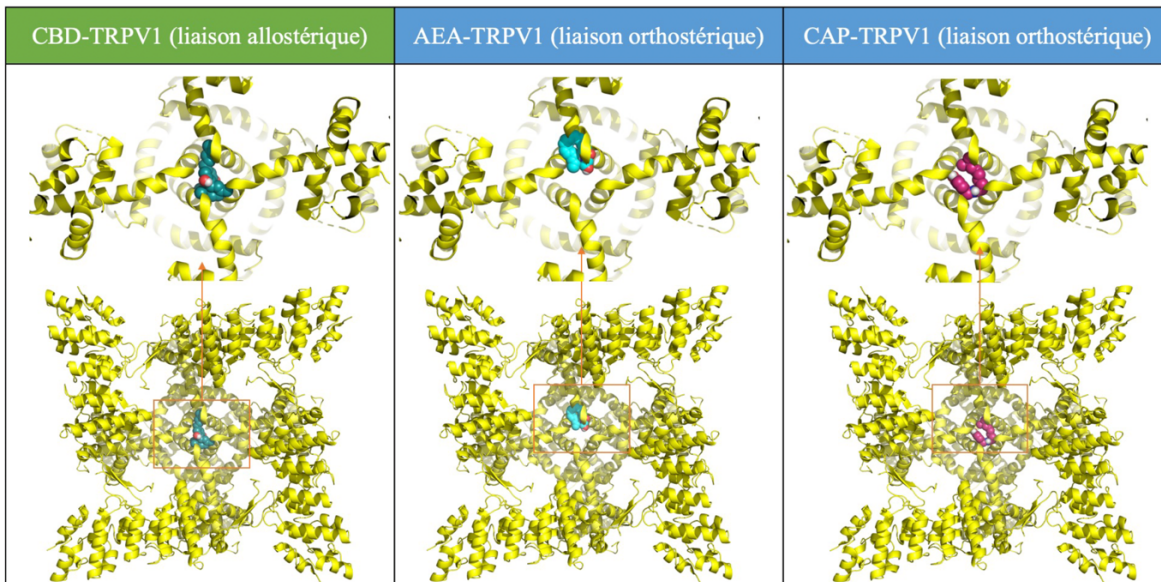


En activant les récepteurs CB1, le THC induit la libération de neurotransmetteurs tels que la dopamine, le GABA et le glutamate, ce qui contribue à ses effets psychoactifs (figure 19). De plus, le THC interagit avec les neurones pro-opiomélanocortine, qui affectent l'appétit. Cette interaction entraîne la libération d'une hormone qui favorise la faim. Par conséquent, le THC peut être utilisé comme un traitement pour stimuler l'appétit chez les personnes sous traitement de chimiothérapie, en aidant à réduire les nausées et à améliorer l'appétit (Nahler *et al.*, 2018; Corchero *et al.*, 2001; Sette *et al.*, 2023).

En se liant aux récepteurs phytocannabinoïdes, le THC entraîne des effets pharmacologiques importants potentiellement bénéfiques pour différentes pathologies. Les effets physiologiques du THC sont influencés par son affinité élevée avec le récepteur CB1 (Shahbazi *et al.*, 2020). Premièrement, le THC a montré des effets analgésiques en modulant la perception de la douleur dans le système nerveux central (SNC) chez les patients qui souffrent de douleurs chroniques. En activant les récepteurs CB1, le THC peut moduler la libération des neurotransmetteurs et inhiber la transmission des signaux douloureux, ce qui réduit l'intensité de la sensation douloureuse (Lötsch *et al.*, 2018). Deuxièmement, le THC peut être utilisé comme traitement pour le soulagement de nausées et de vomissements résultant de traitement de chimiothérapie. En se liant au CB1, le THC agit sur les centres de contrôle des nausées dans le cerveau, aidant ainsi à atténuer les effets secondaires de ce traitement (Rock *et al.*, 2016).

#### **2.4. Fonctions et cibles du CBD**

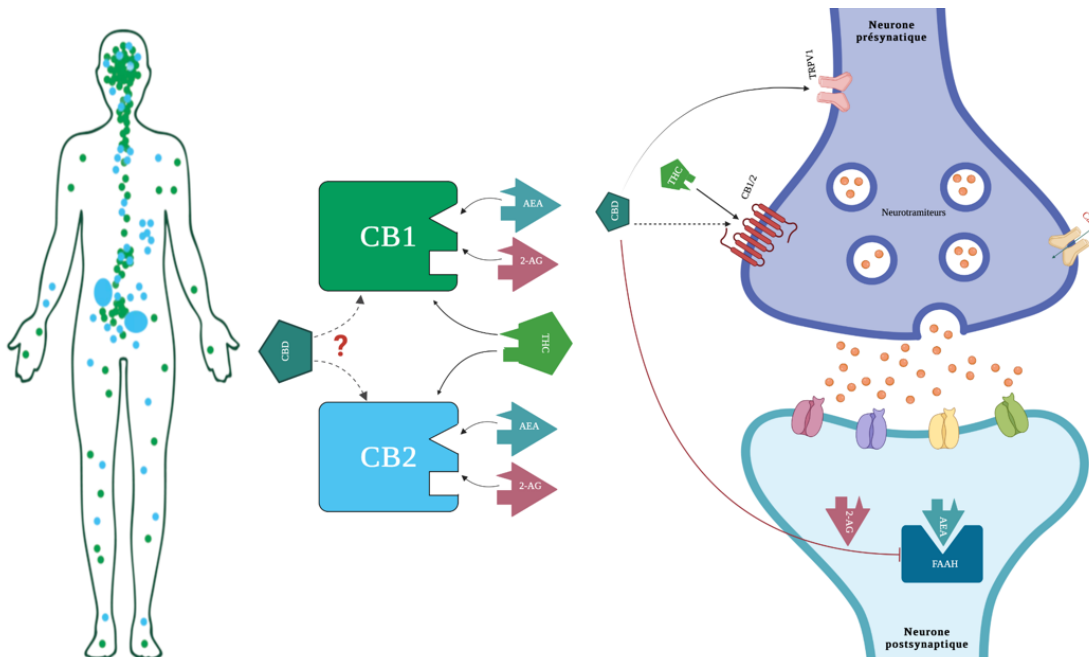
Le CBD est le deuxième phytocannabinoïde le plus abondant dans la plante de *Cannabis sativa*. Contrairement au THC, ce cannabinoïde est non psychoactif, ce qui signifie qu'il ne provoque pas les effets psychotropes associés à la consommation de cannabis. Des recherches récentes ont suscité un intérêt croissant pour l'utilisation médicale du CBD, notamment comme traitement pour atténuer la douleur (Etemad *et al.*, 2022). Certaines études montrent que le CBD présente une affinité pour les récepteurs TRPV1 (figure 18).



**Figure 18 : Interaction entre TRPV1 et son ligand endogène AEA et ses ligands exogènes CBD/CAP**

CBD (en vert) agit au niveau du site de liaison allostérique du récepteur TRPV1 (en jaune), contrairement à la capsaïcine (en bleu) et à l'AEA (en rose), qui agissent sur le site de liaison orthostérique du TRPV1. Le CBD n'active pas directement le site orthostérique du TRPV1. Lorsque le CBD se lie au site allostérique, il provoque une modification de la conformation de ce récepteur, entraînant ainsi une modulation de son activité. Cela peut avoir des effets antidouleur, tout comme la capsaïcine et l'anandamide.

Cette interaction avec les récepteurs TRPV1 pourrait contribuer à la modulation des récepteurs cannabinoïdes, ce qui va entraîner la réduction de la sensibilité à la douleur (figure 19). Toutefois, il existe actuellement peu des évidences confirmant une interaction entre les systèmes vanilloïdes et les cannabinoïdes. Ces systèmes modulent diverses fonctions, telles que la perception de la douleur, l'humeur, le sommeil et la réponse du système immunitaire, et les mécanismes sous-jacents restent à être identifiés (Etemad *et al.*, 2022; Avila *et al.*, 2020). En conclusion, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre cette interaction et son mécanisme spécifique.



**Figure 19 : L'interaction entre THC et CBD et le système cannabinoïde**

Le THC interagit avec les récepteurs cannabinoïdes CB1/CB2, comme les endocannabinoïdes AEA et 2-AG. Cette interaction avec les récepteurs CB1/CB2 entraîne une libération de neurotransmetteurs. Contrairement au THC, le CBD est un composé non psychoactif et n'a pas d'affinité directe pour les récepteurs CB1/CB2. Cependant, des études suggèrent que le CBD peut moduler indirectement l'activation des récepteurs CB1/CB2. Il agit en activant le récepteur TRPV1, qui peut influencer l'activité des récepteurs CB1/CB2. De plus, le CBD inhibe l'enzyme de dégradation FAAH, ce qui entraîne une augmentation d'AEA. Cet endocannabinoïde peut ensuite activer les récepteurs cannabinoïdes CB1/CB2. Illustration par BioRender.com.

Le CBD agit comme un inhibiteur de FAAH, ce qui conduit à une augmentation des niveaux d'endocannabinoïde (Peng *et al.*, 2022). D'autre part, le CBD agit comme un agoniste du récepteur 5-HT1A et du récepteur TRPA1, et il agit également comme un antagoniste du récepteur 5-HT3A et du récepteur GPR55. En effet, le CBD peut réguler les niveaux de neurotransmetteurs, notamment la sérotonine et l'adénosine, ce qui peut contribuer à l'atténuation de la douleur et à l'amélioration de l'humeur (Nahler *et al.*, 2018; de Almeida *et al.*, 2020).

Effectivement, le CBD possède de nombreux effets physiologiques et un potentiel pharmacologique dans le traitement de diverses pathologies, sans provoquer les effets psychoactifs du THC. En modulant l'activité sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, le CBD agit sur d'autres cibles pharmacologiques pour exercer une variété d'effets thérapeutiques (Etemad *et al.*, 2022; Nahler *et al.*, 2018; de Almeida *et al.*, 2020). Premièrement, des études ont montré que le CBD peut être utilisé comme analgésique pour les personnes souffrant de douleur chronique et de douleur

neuropathique. Il régule les voies de signalisation de la douleur en inhibant la transmission des signaux de douleur. Deuxièmement, le CBD peut traiter des affections inflammatoires telles que l'arthrite, les maladies inflammatoires de l'intestin et d'autres maladies auto-immunes (Crescente *et al.*, 2022). Un autre effet physiologique du CBD, résultant de sa capacité à inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires, offre une perspective prometteuse pour influencer les mécanismes complexes qui combinent le système immunitaire et les processus douloureux. En effet, les cytokines pro-inflammatoires sont essentielles pour amplifier des réponses inflammatoires et sensibiliser des neurones à la douleur (Bertin *et al.*, 2019).

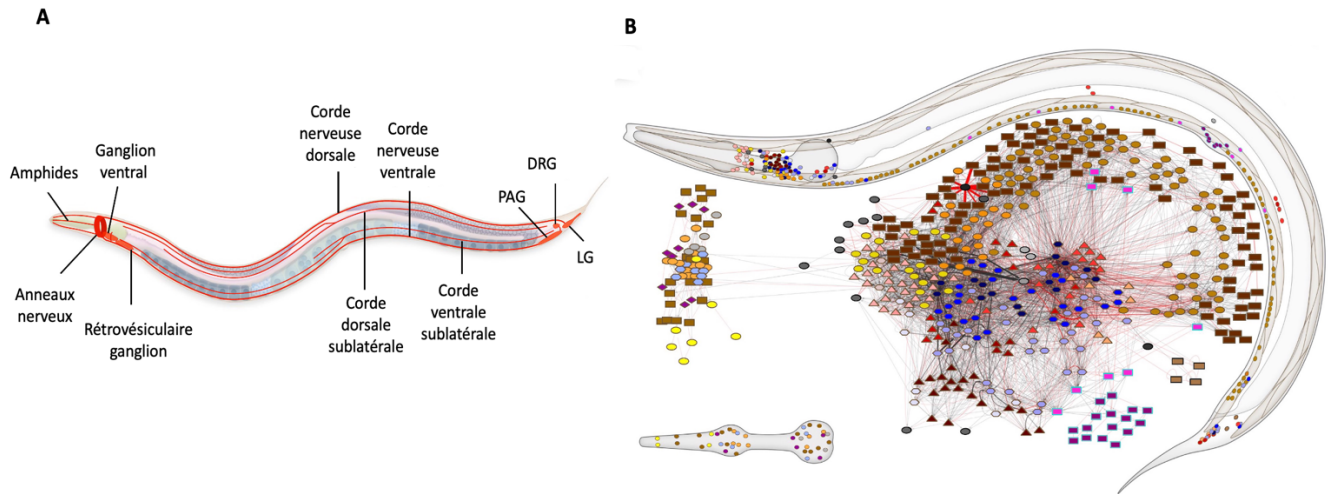
### **3 – Introduction à *Caenorhabditis elegans***

De nombreuses études impliquent l'utilisation des espèces d'invertébrés, comme *C. elegans* qui permet de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à divers processus thérapeutiques et physiologiques. Bien que cet organisme soit plus simple que les vertébrés, en ce qui concerne le nombre de cellules et de complexités du système nerveux, il reste tout de même assez complexe et offre des avantages uniques pour les recherches en neurobiologie et en pharmacologie. Ce modèle permet d'identifier plus facilement les interactions entre les neurones et les circuits nerveux, ce qui peut aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou à mieux comprendre les mécanismes de certaines pathologies (Rankon *et al.*, 1990).

La neuroanatomie et la neurophysiologie de *C. elegans* ont fait l'objet des nombreuses études pendant des années et ont fourni des connaissances essentielles sur l'organisation et la connectivité du système nerveux de cette espèce invertébrée. Ce nématode, avec un corps transparent qui mesure environ 1 mm de longueur, est un organisme modèle utilisé par les scientifiques depuis les années 1960. Ce petit nématode se caractérise par son anatomie bien définie, son cycle de vie court de trois jours et ses connexions neuronales entièrement cartographiées. *C. elegans* a fourni des informations cruciales sur les processus biologiques qui ont contribué ensuite à notre compréhension des plusieurs phénomènes biologiques complexes (Veigl *et al.*, 2021; Mori, 1999).

#### **3.1. Neuroanatomie et neurophysiologie de *C. elegans***

Le système nerveux de *C. elegans* est composé de 959 cellules, dont environ 302 sont des neurones, et il a été exhaustivement cartographié. Cette cartographie a révélé les circuits neuronaux impliqués dans différentes fonctions comportementales, telles que la locomotion, l'alimentation et la réponse aux stimuli environnementaux. Ces neurones sont divisés en grand système nerveux somatique de 282 neurones et un petit système nerveux pharyngé composé de 20 neurones, qui communiquent par une paire d'interneurones (figure 20) (Achacoso *et al.*, 2022).



**Figure 20 : La neuroanatomie du système nerveux chez *C. elegans* et sa connectivité**

Le schéma **A** présente les principaux cordons nerveux et ganglions du système nerveux de l'hermaphrodite adulte. Les nerfs latéraux contiennent les processus de trois neurones associés à la cellule du canal et les processus des neurones latéraux. Les principaux ganglions identifiés sont le ganglion dorsorectal (DRG), le ganglion lombaire (LG), le ganglion antérieur (PAG), le ganglion rétrovésiculaire (RVG) et le ganglion ventral (VG). **B** Le diagramme de *C. elegans* montre les emplacements des noyaux cellulaires. Les bords dirigés (flèches noires) symbolisent les synapses chimiques, tandis que les bords non arrondis (lignes rouges) représentent les connexions des jonctions. Une légende unique est utilisée pour les diagrammes de réseau : les triangles représentent les neurones sensoriels, les hexagones représentent les interneurons, les ovales ou cercles représentent les motoneurons, et les rectangles représentent les muscles, cette figure est adoptée de Cook et al., 2019.

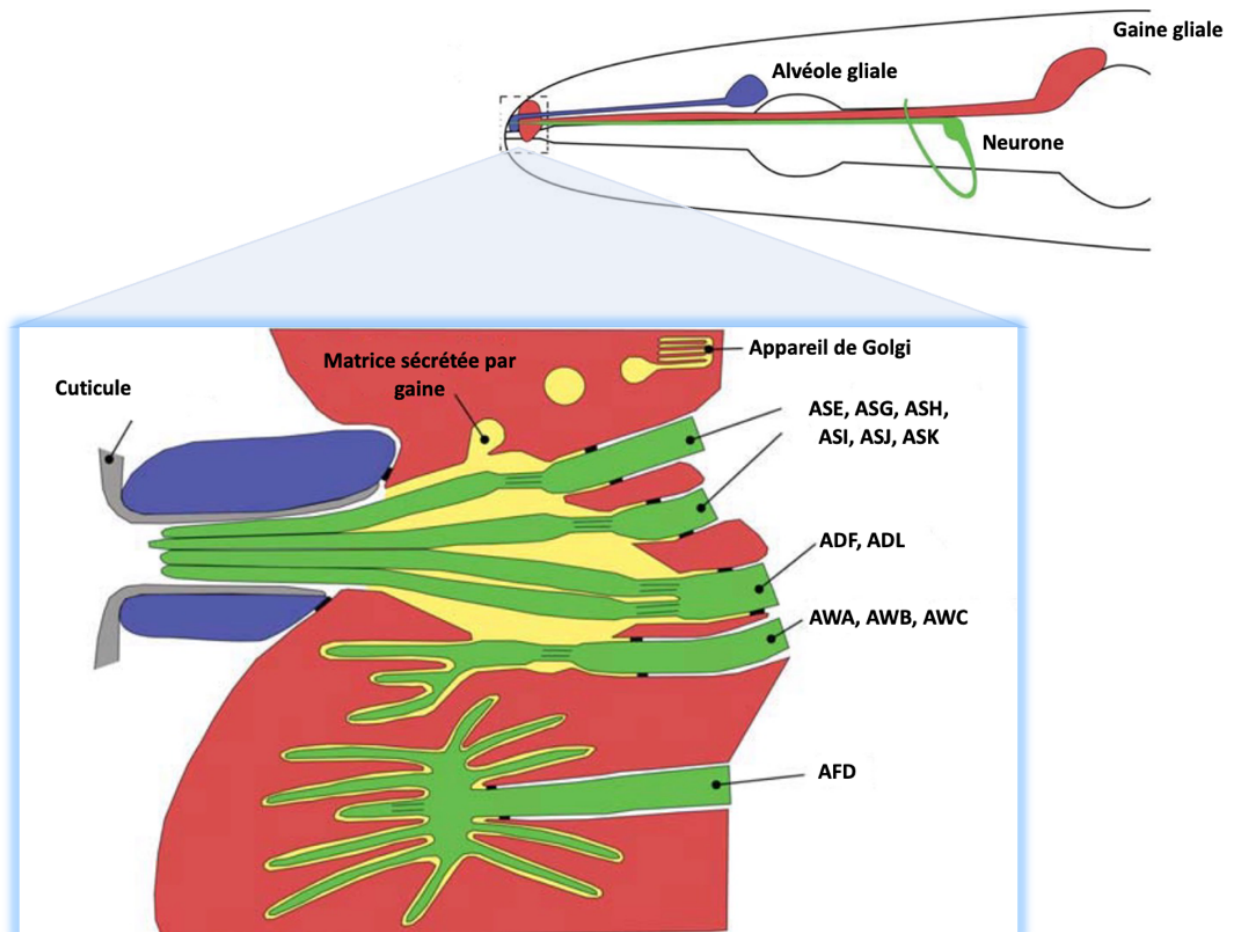
Les connexions synaptiques entre chaque neurone ont été déterminées avec précision, comprenant environ 7 000 synapses, dont 2 000 jonctions neuromusculaires. Les jonctions neuromusculaires excitatrices libèrent de l'acétylcholine (ACh), provoquant ainsi une contraction musculaire. En revanche, les jonctions neuromusculaires inhibitrices libèrent de l'acide γ aminobutyrique (GABA), induisant une relaxation musculaire. Ces synapses jouent un rôle important dans la transmission de l'information nerveuse et dans la régulation des fonctions physiologiques et comportementales de l'organisme face aux stimulus nocifs (White *et al.*, 1986; Richmond, 2005).

La découverte de gènes impliqués dans la fonction et la régulation des synapses, ainsi que dans la transmission de l'information neuronale, a été facilitée par des mutations génétiques qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes de la plasticité synaptique. De plus, de nombreux gènes impliqués dans les processus neuronaux chez les mammifères, y compris les humains, présentent des similitudes avec ceux du génome de *C. elegans*. Environ 83% des gènes humains ont des homologues dans le génome de *C. elegans*, ce qui rend ce modèle pertinent pour étudier les

mécanismes neuronaux fondamentaux et leur implication dans divers comportements et fonctions (Kim *et al.*, 2018).

### 3.2. Nocicepteurs chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, les nocicepteurs sont des neurones sensoriels tels que ASH, ADL, ADF (figure 21) et d'autres spécifiques qui détectent les stimuli nocifs et contribuent aux réponses comportementales d'évitement (de Bono *et al.*, 2002).



**Figure 21 : Cartographie des neurones sensoriels de la tête chez *C. elegans***

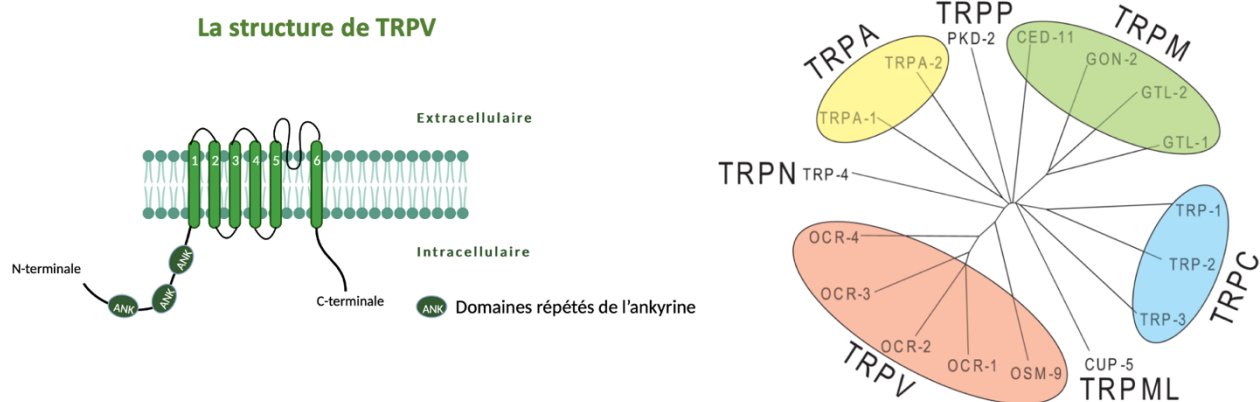
La tête de *C. elegans* est composée de neurones (en vert) qui étendent des cils sensoriels à travers le canal amphidique, un tube formé par l'alignement des cellules gliales de la gaine (en rouge) et de l'alvéole (en bleu). Les neurones présentent différentes morphologies de cils : des cils uniques dans les neurones ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ et ASK, des cils doubles dans les neurones ADF et ADL, et des cils en forme d'ailes dans les neurones AWA, AWB et AWC. Les cellules gliales entourent les cils sensoriels des neurones et créent une niche protectrice remplie de matière matricielle sécrétée par les cellules gliales, favorisant ainsi le bon fonctionnement des cils sensoriels. Figure adaptée de Oikonomou, 2011.

Le neurone ASH (Anterior Starburst Head) est le principal neurone thermosensoriel responsable de la détection d'une large gamme de stimuli nocifs tels que la chaleur, le pH et les produits chimiques. Situé dans la région antérieure de la tête, ce neurone est hautement spécialisé pour détecter la chaleur nocive. Bien que d'autres neurones sensoriels, tels que l'ADL et l'ADF, puissent détecter la chaleur nocive, le neurone ASH occupe une place prépondérante en raison de sa spécialisation (Ferkey *et al.*, 2021; Xu, 2005).

Les neurones sensoriels ASH, ADL et ADF coexpriment les canaux ioniques *osm-9* et *ocr-2*, qui sont des homologues du canal TRPV1 chez les mammifères. Ces canaux sont essentiels dans la détection de la chaleur nocive. Lorsqu'ils sont activés par la chaleur, *osm-9* et *ocr-2* génèrent des signaux électriques qui sont transmis au système nerveux central (SNC) pour déclencher des réponses comportementales d'évitement (de Bono *et al.*, 2002; Glauser, 2022).

### 3.2.1. TRPV chez *C. elegans* (*osm-9* et *ocr-2*)

Chez *C. elegans*, les gènes *osm-9* et *ocr-2* codent deux protéines distinctes faisant partie de la famille des TRPV. Ces protéines partagent des caractéristiques structurales et fonctionnelles similaires. Elles sont constituées des répétitions ankyrines dans leur extrémité N-terminale et six segments transmembranaires, avec une extrémité C-terminale (figure 22).



**Figure 22 : Les canaux TRP chez *C. elegans* et la structure de TRPV**

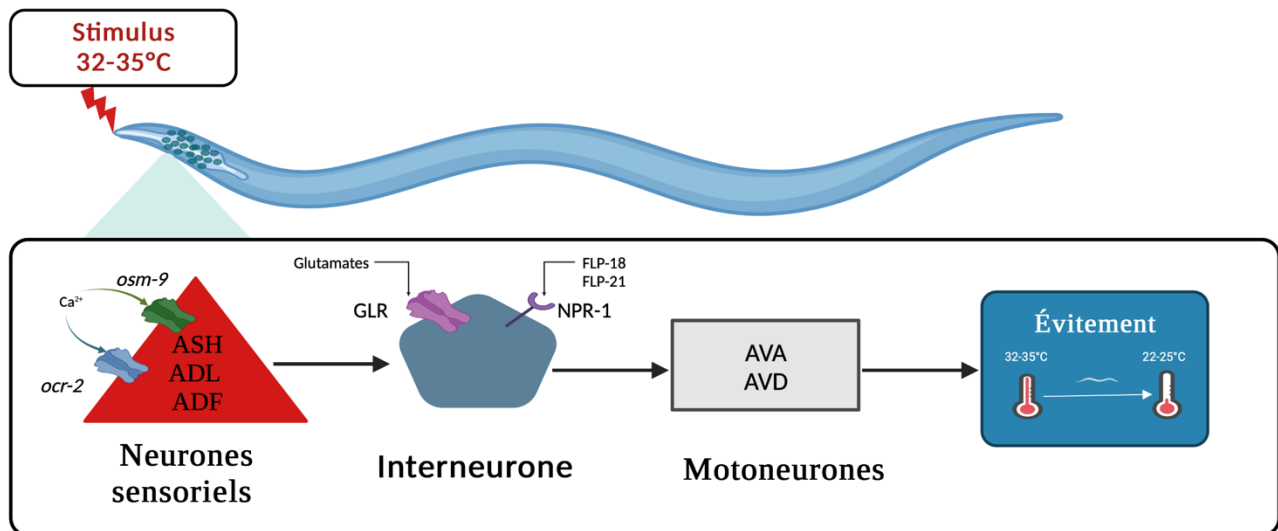
La figure 22 présente les 17 canaux TRP chez *C. elegans*. Les canaux TRPV se caractérisent par la présence de six segments transmembranaires, ainsi que trois à cinq domaines répétés d'ankyrine (ANK) dans les terminaux N et C des segments. Figure, adaptée de Xiao *et al.*, 2009.



Les canaux ioniques *osm-9* et *ocr-2*, appartenant à la famille des TRPV chez *C. elegans*. Ils sont coexprimés dans six neurones sensoriels : AWA, AWC, ASH, ADL, ADF, PHA et PHB. Au sein de ces cellules nerveuses, il a été observé que ces canaux sont colocalisés, suggérant ainsi la formation de complexes canaux dans les cils neuronaux pour la transduction sensorielle (Mehle *et al.*, 2020).

En effet, *osm-9* et *ocr-2* jouent un rôle essentiel dans les neurones ASH impliqués dans la nociception et dans les neurones AWA impliqués dans la chémoréception. Leur présence dans les neurones sensoriels ASH et ADL est nécessaire pour la détection des carences alimentaires et des augmentations de densité de population. En outre, leur rôle en tant que médiateurs du comportement d'évitement de la chaleur a été démontré dans les neurones intermédiaires FLP et PHC (Ohnishi *et al.*, 2020).

Les canaux *osm-9* et *ocr-2* sont sensibles à divers stimuli, y compris la chaleur nocive. Lorsque la température dépasse 32 °C, ces canaux s'ouvrent, permettant l'entrée du calcium intracellulaire, ce qui génère un signal électrique dans les neurones (Glauser, 2022). Ce signal est ensuite transmis le long des neurones sensoriels jusqu'aux interneurones. Les interneurones traitent cette information et la transmettent aux motoneurones. Les motoneurones, quant à eux, déclenchent alors une réponse comportementale appropriée, comme le comportement d'évitement ou l'attraction de stimulus (figure 23) (Glauser, 2022; Xiao *et al.*, 2009).



**Figure 23 : L'activation de TRPV chez *C. elegans* (*osm-9* et *ocr-2*) et leur circuit neuronal**

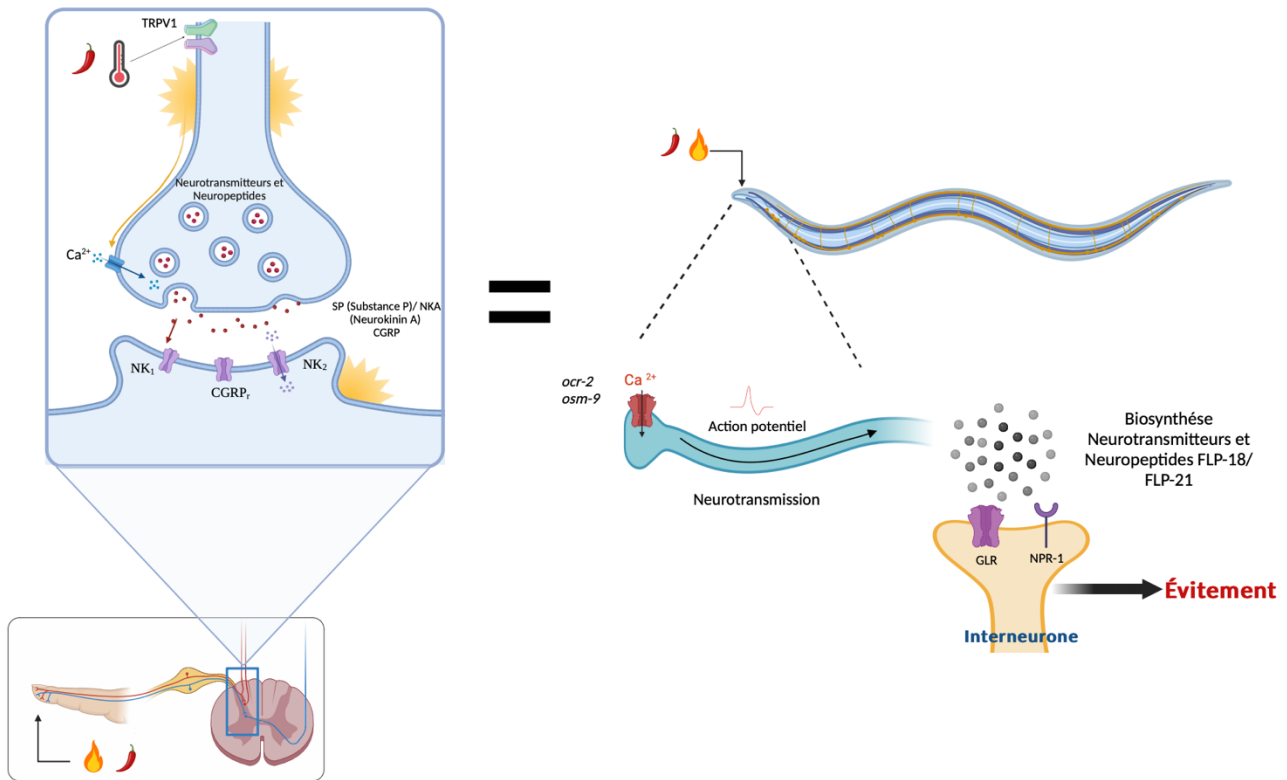
Lorsque la température dépasse 32°C, les canaux ioniques *osm-9* et *ocr-2*, présents dans les neurones sensoriels ASH, ADL et ADF, sont activés. Cette activation provoque l'ouverture de ces canaux, ce qui permet l'entrée de calcium dans

les neurones et entraîne la libération de neuropeptides tels que le glutamate, le FLP-21 et le FLP-18. En conséquence, un signal électrique est généré et transmis le long des neurones sensoriels jusqu'aux interneurons. Ces interneurons traitent cette information et la transmettent aux motoneurons AVA et AVD. Ces événements neurobiologiques jouent un rôle crucial dans la détection et la réponse de *C. elegans* aux stimuli nocifs en modulant les comportements d'évitement appropriés. Illustration par BioRender.com.

### **3.3. Neurotransmission et neurotransmetteur chez *C. elegans***

Chez *C. elegans*, la nociception est un processus par lequel l'organisme détecte et répond à des stimuli potentiellement nocifs, tels que la chaleur nocive. Ce mécanisme implique la neurotransmission, c'est-à-dire la transmission des signaux nerveux, et l'action de neurotransmetteurs spécifiques.

Lorsqu'un stimulus nocif est détecté, les nocicepteurs coexpriment les canaux ioniques *osm-9* et *ocr-2*. Cette activation provoque une entrée massive d'ions calcium dans les neurones sensoriels, induisant une dépolarisation cellulaire. Cette dépolarisation déclenche ensuite la libération de neurotransmetteurs et de neuropeptides à partir des terminaisons présynaptiques des neurones sensoriels (figure 24). Parmi les neurotransmetteurs impliqués dans la nociception, on trouve le glutamate, l'acétylcholine (ACh) et le GABA, qui jouent un rôle dans la modulation des réponses sensorielles. De plus, les neuropeptides FLP-18 et FLP-21 participent à la régulation de la nociception chez *C. elegans* (Nkambeu, 2018; Treinin *et al.*, 2021; Rosikon *et al.*, 2023). Ces mécanismes moléculaires spécifiques permettent à l'organisme de détecter les stimuli nocifs et d'y répondre de manière adaptée.

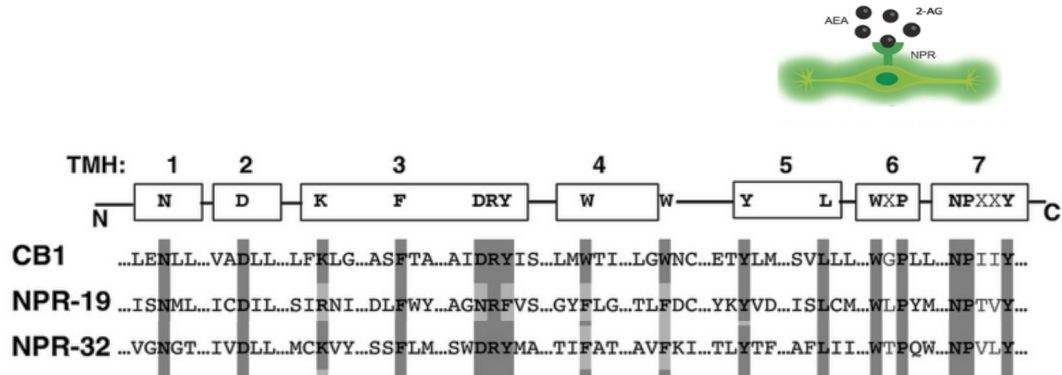


**Figure 24 : La similarité dans la neurotransmission : comparaison entre les mammifères et *C. elegans***

La neurotransmission chez *C. elegans* (à droite) présente des similitudes avec celle des mammifères (à gauche). En effet, chez *C. elegans*, on observe la présence de neurotransmetteurs tels que le glutamate, le GABA, l'acétylcholine et d'autres, de manière similaire à ce que l'on retrouve chez les mammifères. Lorsque les nocicepteurs de *C. elegans* détectent des stimuli nocifs, ils libèrent ces neurotransmetteurs dans la synapse. Ces substances se lient ensuite aux récepteurs spécifiques situés sur les neurones post-synaptiques, ce qui déclenche des réponses électriques et biochimiques. Ces réponses modulent l'activité de ces neurones et conduisent à des réponses comportementales.

### 3.4. Système cannabinoïdes chez *C. elegans* (effecteurs, localisation, fonction)

Des études sur le système cannabinoïdes chez *C. elegans* ont révélé que l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) constituent les deux principaux endocannabinoïdes, des substances lipidiques essentielles pour la modulation des comportements et de la nociception. Cette découverte majeure a également permis l'identification des récepteurs cannabinoïdes, des protéines membranaires qui détectent et réagissent aux endocannabinoïdes dans le système nerveux. Parmi ces récepteurs, *npr-19* et *npr-32* ont été confirmés comme homologues fonctionnels des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 chez l'humain (voir figure 25).



**Figure 25 : La similitude entre les récepteurs cannabinoïdes entre les mammifères et *C. elegans* (adaptée par M. Oakes *et al.*, 2019; M. Oakes *et al.*, 2017)**

Chez *C. elegans*, le récepteur *npr-19* est exprimé de manière sélective dans un petit nombre de neurones, notamment les neurones glutamatergiques du pharynx M3 du pharynx et les neurones sensoriels URX (Estrada-Valencia, 2021). Dans les neurones M3 du pharynx, l'activation de *npr-19* par les endocannabinoïdes anandamide (AEA) et 2-arachidonoylglycérol (2-AG) entraîne une inhibition du pharynx et de l'alimentation. Cependant, des concentrations plus élevées de ces ligands endogènes sont nécessaires pour inhiber les réponses aversives à divers stimuli.

De plus, le *npr-19* participe à la régulation de la mobilisation du cholestérol par des voies indépendantes de *npr-32*. La modulation du cholestérol, par les endocannabinoïdes, est étroitement associée à la voie de l'insuline, qui joue un rôle essentiel dans la production de dopamine et la formation de larve d'adulte *C. elegans*. Par conséquent, les récepteurs cannabinoïdes, *npr-19* et *npr-32* occupent une position clé dans la régulation du métabolisme lipidique et des processus de survie chez le nématode (Hernandez-Craverro *et al.*, 2022; M. Oakes *et al.*, 2019; M. Oakes *et al.*, 2017; Pastuhov *et al.*, 2016).

En outre, les récepteurs *npr-32* jouent un rôle dans la signalisation neuronale et le métabolisme lipidique. Leur activation par des ligands endogènes, tels que le 2-AG, régule la modulation de la signalisation neuronale, notamment celle des monoamines telles que la sérotonine et la dopamine, qui sont des neurotransmetteurs essentiels pour la régulation de divers comportements comme l'humeur, le comportement alimentaire et la locomotion chez *C. elegans*. De plus, des études ont montré que 2-AG active les récepteurs *npr-32*, ce qui entraîne des cascades

de signalisation intracellulaire qui modulent l'activité neuronale et influencent les réponses du nématode aux stimuli nocifs. En outre, ces récepteurs jouent un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique, en particulier dans la mobilisation du cholestérol.

Le métabolisme, incluant les voies de synthèse et de dégradation des endocannabinoïdes AEA et 2-AG chez ces nématodes présentent des similitudes avec ceux observés chez les espèces vertébrées (figure 26). Ces similitudes comprennent des enzymes spécifiques telles que NAPE-1 et NAPE-2 dans la synthèse des endocannabinoïdes AEA et 2-AG à partir du précurseur acide arachidonique, ainsi que FAAH-1 et FAAH-4 dans la dégradation des endocannabinoïdes AEA et 2-AG. Notamment, les enzymes de dégradation FAAH-1 et FAAH-4 montrent une homologie significative avec les protéines humaines MAGL (39 %) ET FAAH (40 %), respectivement (Estrada-Valencia, 2021; M. Oakes *et al.*, 2019; M. Oakes *et al.*, 2017; Pastuhov *et al.*, 2016).

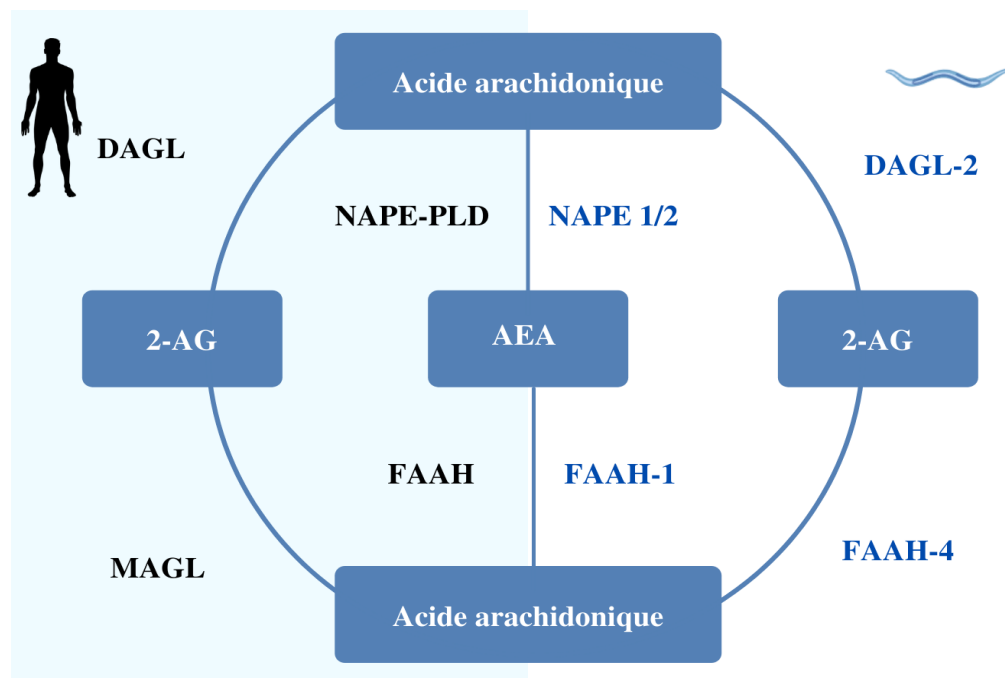


Figure 26 : La similitude entre le métabolisme des endocannabinoïdes entre les mammifères et *C. elegans*

## Chapitre 2 - L'hypothèse et Les objectifs

Cette étude se base sur l'hypothèse que la modulation des récepteurs cannabinoïdes et vanilloïdes chez *C. elegans* entraînera un effet antinociceptif quantifiable à la suite de l'exposition aux phytocannabinoïdes THC et CBD.

Les objectifs de notre étude étaient les suivants :

- 1) Caractériser la relation concentration-effet après l'exposition au CBD et au THC à l'aide de *C. elegans* et en analysant le comportement d'évitement des stimuli thermiques.
- 2) Identifier les mécanismes et les cibles moléculaires du CBD et du THC en utilisant des techniques d'analyse protéomique et bio-informatique.

### Chapitre 3 – Article scientifique

#### **Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol Antinociceptive Activity is Mediated by Distinct Receptors in *Caenorhabditis elegans***

Fatma Boujenoui<sup>1,2</sup>, Bruno Nkambeu<sup>1,2</sup>, Jennifer Ben Salem<sup>1,2</sup>, Jesus David Castano Uruena<sup>1,2</sup> and Francis Beaudry<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

<sup>2</sup> Centre de recherche sur le cerveau et l'apprentissage (CIRCA), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author:

Francis Beaudry, Ph.D.

Professor of Analytical Pharmacology

Canada Research Chair in metrology of bioactive molecules and target discovery

Département de Biomédecine Vétérinaire

Faculté de Médecine Vétérinaire

Université de Montréal

3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC

Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

**Keywords:** *Cannabis sativa*, phytocannabinoid, cannabidiol, tetrahydrocannabinol. *Caenorhabditis elegans*, nociception, pain, proteomics, vanilloid receptor

Article soumis: Neurochemical Research. Manuscript ID: 5689be3f-bd89-4b89-9f7f-fa3213874e75.  
Octobre 2023

**Abstract**

Cannabis has gained popularity in recent years as a substitute treatment for pain following the risks of typical treatments uncovered by the opioid crisis. The active ingredients frequently associated with pain-relieving effects are the phytocannabinoids  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), but their effectiveness and mechanisms of action are still under research. In this study, we used *Caenorhabditis elegans*, an ideal model organism for the study of nociception that expresses mammal ortholog cannabinoid (NPR-19 and NPR-32) and vanilloid (OSM-9 and OCR-2) receptors. Here, we evaluated the antinociceptive activity of THC and CBD, identifying receptor targets and several metabolic pathways activated following exposure to these molecules. The thermal avoidance index was used to phenotype each tested *C. elegans* experimental group. The data revealed for the first time that THC and CBD decreases the nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat (32°C – 35°C). The effect was reversed 6h post- CBD exposure but not for THC. Further investigations using specific mutants revealed CBD and THC are targeting different systems, namely the vanilloid and cannabinoid systems, respectively. Proteomic analysis revealed differences following Reactome pathways and Gene Ontology Biological Process database enrichment analyses between CBD or THC-treated nematodes and provided insights into potential targets for future drug development.



## 1. Introduction

Chronic pain in patients is a topic of increasing importance around the world [1, 2]. It is a complex condition involving physical, mental, and emotional components [3–5] that frequently requires polymodal approaches [5]. In recent years, typical treatments such as opioids have been called into question, and medicinal cannabis has emerged as a plausible substitute for chronic pain, but not without many controversies [6–9]. For instance, brain magnetic resonance imaging (MRI) suggests that cannabis may not be a pain killer but rather a pain distracter [10]. In addition to pain treatment, several preclinical and clinical trials provide evidence of other therapeutic effects of cannabis such as Parkinson's disease or epilepsy [8, 11, 12]. Despite this, the therapeutic benefits of cannabis for various health disorders remain to be confirmed, particularly for  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) which are the compounds that have shown the most promising benefits [7].

Cannabinoid receptors are widely found in mammals. They are an integrated part of the endocannabinoid system and have long been associated with antinociception and immunomodulatory roles [13–16]. The interaction between selected phytocannabinoids with cannabinoid receptors is believed to be associated with analgesic response in chronic pain patients. THC, the principal psychoactive constituent of *Cannabis sativa*, was recently licensed (i.e. dronabinol) for medical use to treat chemotherapy-induced nausea and vomiting [17, 18]. This compound is a partial agonist for Cannabinoid receptor type 1 (CB1) and Cannabinoid receptor type 2 (CB2) but with a higher affinity for CB1. However, THC (i.e. dronabinol) presents limited analgesic efficacy and patient response to treatment is variable [19]. CBD is a non-psychoactive component of *Cannabis sativa* with anti-inflammatory and analgesic properties [20–22]. Recent studies on CBD showed interaction with CB1 but also with the Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) [23,

24]. The TRPV1 is considered an important target to develop new analgesic drugs [25]. By modulating TRPV1 activity, drugs can effectively control pain signals, offering potential relief for various pain-related conditions without the side effects associated with traditional pain medications (e.g. opioids). Interestingly, CBD, THC and capsaicin share some structural similarities (Figure 1). CBD could be a promising molecule to treat chronic pain without the psychoactive effects of THC. However, despite encouraging results using animal models [26–29], human studies are sparse and inconclusive regarding the effectiveness of CBD for the treatment of pain [30–32]. Consequently, we need to strengthen our basic knowledge on the mechanism of action and resulting signaling processes.

The use of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is well established for the study of the nervous system. From 959 cells in adult *C. elegans*, around a third are neurons, making this model unique to study the physiology of the nervous system. In *C. elegans*, nociceptive neurons are specialized sensory cells that detect and respond to noxious stimuli, playing a critical role in the nematode's ability to avoid potentially harmful conditions. Thus, nociceptive neurons sense harmful conditions and activate avoidance behaviors. *C. elegans* displays a well-defined and reproducible nocifensive behavior involving a reversal and change in direction away from noxious stimuli. Although it lacks the complexity of mammalian pain, studying *C. elegans* offers insights into basic nociceptive processes and potential targets for pain research. In addition, the endocannabinoid system in *C. elegans* exhibits several similarities with that in mammals. *C. elegans* has several endocannabinoids structurally related to cannabinoid receptor ligands in mammals including anandamide and 2-arachidonoylglycerol [33]. Moreover, recent studies have identified receptor components of the *C. elegans* cannabinoid system with orthologs in mammals, NPR-19 (a CB1/2 ortholog) and NPR-32 (a GPR18/55 ortholog) [34–36]. NPR-19 and NPR-32 are playing crucial roles in regulating various physiological processes in the worm's nervous system, including sensory perception and behavior modulation as similarly found in higher species including humans. *C. elegans* also expresses several

genes encoding TRP ion channels with sequence homology and similar regulatory mechanisms compared to mammalian TRP channels, including TRPVs. In *C. elegans*, vanilloid receptors play central roles in sensory perception and transduction of environmental cues, contributing to the nematode's ability to respond to a variety of sensory stimuli. For instance, TRPV channels such as OSM-9 and OCR-2, which are important to mediate heat avoidance behavior, are co-expressed in sensory neurons [37–40]. The TRPV1 activation by capsaicin leading to desensitization is well known. Interestingly, we demonstrated that capsaicin and other vanilloids can impede the nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat (i.e., 32°C – 35°C) following sustained exposure, and that this effect was reversed 6 h after capsaicin exposure [41–43]. Further explorations suggest that capsaicin targets *C. elegans* transient receptor potential ion channel OCR-2 [42, 44]. In this study, we hypothesized that CBD and THC interact with *C. elegans* vanilloid and cannabinoid receptors and sustained exposition will hinder the nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat. The objectives of this study were to 1) characterize the CBD and THC exposure–response relationships in *C. elegans* by heat avoidance behavior analysis, 2) identify THC and CBD targets and 3) investigate proteins and pathways responsible for the antinociceptive activity by using proteomics.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals and reagents**

All chemicals and reagents were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) or Millipore Sigma (St. Louis, MO, USA). Capsaicin was purchased from Toronto Research Chemicals (North York, ON, CAN). CBD and THC were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA).

### **2.2 *C. elegans* strains**

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. The mutant strains used included *npr-19* (strain RB1668), *npr-32* (strain RB1938), *ocr-2* (strain JY243), and *osm-9* (strain JY190). N2 (Bristol) and other strains were purchased from the Caenorhabditis Genetics Center

(CGC), University of Minnesota (Minneapolis, MN, USA). Strains were maintained and handled under standard conditions as previously published [45, 46]. Nematodes were grown and kept on nematode growth medium (NGM) agar at 22°C in a Thermo Scientific Heratherm refrigerated incubator (Fair Lawn, NJ, USA). Experiments were performed at room temperature (~ 22°C) unless otherwise noted.

### **2.3 *C. elegans* pharmacological manipulations**

CBD or THC solutions (i.e. 1 mg/mL) were diluted in Type 1 Ultrapure Water at a concentration of 25 µM. Solutions were vortexed and mixed thoroughly. Further dilutions to concentrations of 10 µM, 5 µM, 1 µM and 0.25 µM in Type 1 Ultrapure Water were performed by serial dilution of the CBD or THC 25 µM solutions. Nematodes were isolated and washed according to the protocol outlined by Margie *et al.* [46]. After 72 h of feeding and growing on NGM 92 × 16 mm Petri dishes, the nematodes were taken off food and exposed to capsaicin, CBD or THC solutions. An aliquot of 7 mL of a capsaicin, CBD or THC solution was aliquoted to produce a small solution film of 2 to 3 mm (the solution was partly absorbed by NGM); thus, the nematodes were swimming in solution. Nematodes were treated with capsaicin, CBD or THC for 60 min, isolated and washed 3 times with S Basal systematically before behavioral experiments. To test for remanent (persistent) effect, after exposure to CBD or THC, the nematodes were isolated, thoroughly washed and deposited on NGM free of CBD or THC for 6 h prior to behavioral experiments (i.e., 6 h latency).

### **2.4 Thermal avoidance assays**

The behavioral analysis method conducted in this study has been extensively used before [41–43, 47]. Briefly, experiments were performed on 92 × 16 mm Petri dishes divided into four quadrants. A middle circle delimited (i.e., 1 cm diameter) an area where *C. elegans* were not counted. Petri dishes were divided into quadrants: two stimulus areas (A and D) and two control areas (B and C). Sodium azide (0.5 M) was used in all quadrants to paralyze the nematodes. Noxious heat was

generated with an electronically heated metal tip (0.8 mm in diameter) producing a radial temperature gradient (e.g., 32-35°C on NGM agar 2 mm from the tip measured with an infrared thermometer) according to previous experiments [48]. Nematodes were isolated as previously described. [46]. The nematodes were off food during all experimentations. The nematodes (typically 100 to 300 young adult nematodes) were placed at the center of a marked Petri dish, and after 30 min, the plates were placed at 4°C for at least 1 h, and the number of nematodes per quadrant were counted. Nematodes that did not cross the inner circle were not considered. The thermal avoidance index (TI), animal avoidance (%) and technical details are provided in supplementary Figure S1.

## **2.5 Sample preparation for proteomics**

Cultured nematodes (with or without CBD or THC exposure) were collected in liquid media and centrifuged at 1,000 g for 10 min; the nematodes were then collected and thoroughly washed with S Basal. Nematodes were resuspended in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) containing 1% (v/v) Triton X-100 and cOmplete™ protease inhibitor cocktails (Roche Diagnostic Canada, Laval, QC, Canada). The suspension was dispensed into reinforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 25 mg of 500 µm glass beads. The samples were homogenized using a Bead Mill Homogenizer (Fisher) with 5 bursts of 60 seconds at a speed of 5 m/s. The homogenates were centrifuged at 12,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using the Bradford assay. Proteins (~200 µg) were isolated using ice-cold acetone precipitation (1:5, v/v). The resulting protein pellet was dissolved in 100 µL of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 8), mixed with a Disruptor Genie at maximum speed (2,800 rpm) for 15 min and sonicated to improve protein dissolution. We denatured the protein by incubating the solution at 120°C for 10 min using a heated reaction block. The solution was allowed to cool for 15 min. Proteins were reduced with 20 mM dithiothreitol (DTT) at 90°C for 15 min and alkylated with 40 mM iodoacetamide (IAA) protected from light at room temperature for 30 min. Subsequently, 5

$\mu\text{g}$  of proteomic-grade trypsin were added, and the reaction was performed at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The digestion was stopped by adding  $10\ \mu\text{L}$  ( $\sim 10\%$  v/v) of a 1% trifluoroacetic acid (TFA) solution. Finally, the samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min, and  $100\ \mu\text{L}$  of the supernatant were transferred into HPLC injection vials for analysis.

## 2.6 Proteomic analysis

The online chromatography separation was performed on the Thermo Scientific Vanquish Neo UHPLC system (San Jose, CA, USA) setup in trap and elute mode (2D nanoLC system). The 2D nanoLC setup included a Thermo Scientific PepMap Neo  $5\ \mu\text{m}$  C18  $300\ \mu\text{m} \times 5\ \text{mm}$  Trap Cartridge and a Thermo Scientific PepMap Neo C18  $2\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m} \times 150\ \text{mm}$  nano column. One  $\mu\text{L}$  of sample (i.e.  $\sim 2\ \mu\text{g}$  of digested proteins) was loaded on the trap column and washed with solvent A (water/formic acid (99.9/0.1%)) at  $20\ \mu\text{L}/\text{min}$  for 0.5 min for desalting. For elution, a linear gradient from 5 to 50% solvent B (water/ acetonitrile/formic acid (20/80/0.1%)) was applied during 60 min, with a final elution step at 50% solvent B for 2 min. The flow rate was set to  $300\ \text{nL}/\text{min}$ . Then, the column was washed for 5 min, and the mobile phase composition ratio was reverted to the initial conditions (i.e. 5% solvent B) running 10 column volumes for column re-equilibration. Data acquisition was performed with a Thermo Scientific Q Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) interfaced with a Nanospray Flex ion source. Data was acquired using a nanospray voltage of 2.2 kV (e.g. positive mode), and the ion transfer tube temperature was set to  $200^{\circ}\text{C}$ . The MS was operated in TOP-10 data dependent acquisition (DDA) mode. For DDA,  $\text{MS}^1$  survey scan ( $m/z$  375-1200) was acquired at 70,000 resolution (FWHM) using an automatic gain control (AGC) target value of  $1 \times 10^6$  charges and maximum injection time of 100 ms. Precursor ions meeting monoisotopic precursor intensity (dynamic acquisition of  $\text{MS}^2$ -based TOP-10 most intense ions) with a minimum  $1 \times 10^4$  intensity threshold was selected and fragmented via higher energy collisional dissociation (HCD) at 28 NCE.  $\text{MS}^2$  spectra of up to 10 precursors were acquired at 17,500

resolution (FWHM) using an AGC target value of  $1 \times 10^5$  and maximum injection time of 100 ms.

## 2.7 Protein Quantification

Protein identification and relative quantification were performed using Thermo Proteome Discoverer (version 3.0) in conjunction with SEQUEST-HT using default settings unless otherwise specified. The raw mass spectra ( $MS^1$  and  $MS^2$ ) were searched against reference *C. elegans* proteome extracted as a FASTA database from UniProt (*C. elegans* taxon identifier 6239) with the following setting parameters:  $MS^1$  error tolerance of 10 ppm and  $MS^2$  error tolerance of 0.02 Da. Enzyme specificity was set as trypsin with two missed cleavages allowed; carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification; and oxidation of methionine, acetylation of the protein N-terminus and methionine loss were treated as variable modifications. The minimum peptide length was set to six amino acids. Decoy database search was performed using Percolator a 1% false discovery rate (FDR) was used. Relative quantification of proteins was performed with a label-free method using the peak integration feature of Proteome Discoverer 3.0 software. For each identified protein, the average ion intensity of unique peptides was used for protein abundance.

## 2.8 Bioinformatics

The abundance ratio ( $\log_2$ ): (experimental group)/(N2 control), abundance ratio p-value: (experimental group)/(N2 control) and accession columns were extracted from the datasets generated by Proteome Discoverer 3.0. Protein relative abundance was determined using ANOVA followed by a Tukey's HSD post hoc test ( $p < 0.05$ ). Volcano plots were generated using all identified and quantified proteins with both a  $\log_2$  ratio and p-value to identify differentially expressed proteins (DEP). Proteins with a p-value  $\geq 0.05$  were not used for further analysis. Additionally, only proteins with an absolute  $\log_2$  ratio  $\geq 1.0$  were used for bioinformatics analysis. Venn diagrams were used to determine the degree of overlaps between experimental groups. Proteins with significantly different expression levels (i.e. absolute  $\log_2$  ratio  $\geq 1.0$ ; p-value  $\leq 0.05$ ) were subjected to Gene Ontology

(GO) biological processing (BP) and Reactome enrichment and protein–protein interaction (PPI) network analyses performed using Metascape [49]. The interaction network (parent to root node) was mapped by Cytoscape (3.9.1), ClueGO (2.5.9) and CluePedia (1.5.9).

## 2.9 Statistical analysis

Behavioral data was analyzed using nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a Post-hoc Dunn test for multiple comparisons. Significance was set a priori to  $p \leq 0.05$ . Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM (version 9.5.1).

## 3. Results and discussion

Recently, we showed *C. elegans* can be used to evaluate the antinociceptive effect of bioactive compounds, and by using proteomics we provided insights into protein-protein interactions, allowing the study of the underlying biological pathways [41–44]. Here, we started by confirming whether there was bias in *C. elegans* behavior using our experimental system. We performed an assessment of the mobility and bias of WT (N2) and specific mutant nematodes with and without exposure to CBD or THC. For this experiment, all quadrants were maintained at room temperature ( $\sim 22^\circ\text{C}$ ). As presented in Figure 2 (supplementary Table S1), no quadrant selection bias was detected for all *C. elegans* experimental groups tested with or without CBD or THC exposure (e.g.,  $10\ \mu\text{M}$ ). The data demonstrated that nematodes did not select any specific quadrants and were uniformly dispersed 30 min following the initial placement at the center of the Petri dish. Moreover, sixty minutes of CBD or THC exposure did not significantly alter nematode mobility or induce any behavior bias.

### 3.1 Evaluation of antinociceptive activity of CBD and THC

As mentioned before, the benefits of using medicinal cannabis, CBD or THC as a pain therapy remain unclear. To uncover this, here, we evaluated whether CBD or THC displayed antinociceptive activity. As shown in Figure 3 (supplementary Table S2), the data revealed concentration-dependent



antinociceptive effects of CBD following a 1 h of exposure. Following CBD exposition, nematodes were thoroughly washed and transferred on NGM agar kept at 22 °C in an incubator for 6 h (i.e. residual effect/latency test) and thermal avoidance response was retested. The results suggest that 6 h post exposition, *C. elegans* thermal avoidance response returned to normal at all concentration tested. Thus, CBD has no remanent effect. Figure 4 (supplementary Table S3) shows the concentration-dependent antinociceptive effects of THC following a 1 h of exposure. Following THC exposure, the nematodes were thoroughly washed as in the CBD test. Contrary to CBD, THC exposure ( $\geq 5\mu\text{M}$ ) still affected *C. elegans* thermal avoidance response after 6 h. These results suggest THC has remanent effects, possibly due to its highly lipophilic nature. This compound has a high octanol/water partition coefficient and is readily absorbed. Lipophilic molecules can accumulate in the adipose tissues of organisms and exhibit a long elimination phase potentially leading to remanent effects [50]. Vanilloid receptors (i.e. OCR-2 and OSM-9) are nociceptors found mainly on peripheral terminals of nociceptive neurons, and cannabinoid receptors (i.e. NPR-19 and NPR-32) are G-protein-coupled receptors (GPCRs) expressed in a limited number of neurons. To interact with *C. elegans* cannabinoid receptors, typically a drug needs to readily enter by ingestion of the solution suspension and by transdermic absorption. Interestingly, *C. elegans* store fat largely in their intestinal and skin-like epidermal cells [51]. These two physiologic compartments could serve a reservoir for lipophilic drugs. Furthermore, as shown in supplementary Figure S2, when comparing CBD, THC and capsaicin, we observed comparable antinociceptive activity at  $25\mu\text{M}$  and  $1\mu\text{M}$ . Interestingly, in human, CBD and THC are suspected to provide pain relief, but controversies surround their efficacy [52, 53]. CBD shows potential for chronic pain, but results vary. THC may provide pain relief but comes with many side effects and legal concerns. Still to date, ongoing research seeks to clarify their effectiveness, safety, and proper usage for pain management.

### 3.2 Identification of CBD and THC targets

To understand the observed effects, it is critical to identify CBD and THC targets. Pharmacological effects can be measured when the tested molecule binds to a sufficient fraction of the target receptor, leading to a specific response (i.e., physiological or phenotypic changes). Thus, we performed experiments using specific *C. elegans* vanilloid receptor mutants (*ocr-2*, *osm-9*) and cannabinoid receptor mutants (*npr-19* and *npr-32*) to potentially identify the CBD and THC targets. *C. elegans* mutants were exposed to CBD or THC at a concentration of 10  $\mu$ M for 60 min prior to experiments. As exposed in Figure 5A and B (supplementary Table S4), no significant CBD effects ( $p > 0.05$ ) were observed in *ocr-2* and *osm-9* mutants. However, THC antinociceptive effects were significant in *ocr-2* and *osm-9* mutants. These results suggest CBD is targeting *C. elegans* vanilloid receptor orthologs. Also, when vanilloid receptors are genetically knocked out, the ability to sense and respond to heat stimuli should be diminished, leading to reduced sensitivity to heat. As shown in Figure 5A and B, *C. elegans* vanilloid receptor mutants (*ocr-2*, *osm-9*) are less sensitive to noxious heat, despite only the results from *osm-9* mutants were statistically significant. These results suggest OSM-9 and OCR-2 are important for the detection of noxious heat stimuli, which is in line with previous reports [37].

Figure 5C and D (supplementary Table S4) displayed no significant THC effects ( $p > 0.05$ ) in *npr-19* and *npr-32* mutants. Thus, THC targets *C. elegans* cannabinoid receptor orthologs. THC binding to cannabinoid receptors may disinhibit dopaminergic signaling. Dopamine is a signaling molecule important for the modulation of behavior in *C. elegans* [54]. However, its role in nocifensive behavior response to noxious stimuli remains unknown. In humans, there is mounting evidence that descending dopaminergic pathways have a central role in pain modulation [55]. Interestingly, in humans, the descending dopaminergic pathways can lead to both facilitatory or inhibitory pain-modulating effects [56, 57]. Moreover, Figure 5C and D reveal that cannabinoid

mutants (*npr-19*, *npr-32*) display reduced sensitivity probably due to the disruption of the endocannabinoid system's regulatory functions. This can result in differences in sensitivity leading to a modulation of the avoidance response. The difference observed was only statistically significant for *npr-32* mutants.

These results are very interesting since it suggests CBD and THC are targeting different receptors and systems, but both are impeding nocifensive response to noxious heat. In line with this, new therapeutic strategies, including dual-acting drug targeting the vanilloid and cannabinoid systems, are being explored as a pharmacotherapy for chronic pain [58]. Interestingly, in human, cannabinoid, opioid, and vanilloid systems share complex interactions [59]. These systems can mutually influence each other, affecting pain perception, mood, and overall homeostasis. For example, cannabinoids like CBD can potentiate effects of endorphins (i.e. endogenous opioid peptides) or pain-relieving effects of synthetic opioids, while interactions with vanilloid receptors can modulate both cannabinoid and opioid signaling, demonstrating their interconnected roles in regulating physiological responses.

### **3.3 Proteomic and bioinformatic investigations**

CBD and THC showed antinociceptive activity in *C. elegans* and both molecules activated distinct systems, the vanilloid and cannabinoid system, respectively. Thus, we used mass spectrometry-based proteomics and network biology to decipher the relationship between pathway and drug response. Label-free proteomics was performed on *C. elegans* exposed to CBD (10  $\mu$ M) and THC (10  $\mu$ M) for 1 h. Figure 6 displays volcano plots to illustrate the differential abundance of proteins, with the x-axis representing the  $\log_2$  ratio and the y-axis plotting  $-\log_{10}$  (p-value). The lines represent a 2-fold change and p-value  $\leq 0.05$ . Several DEPs were identified following CBD (Fig. 6A) and THC (Fig. 6B) treatments. Tables S5 and S6 (supplementary file) contain the  $\log_2$  fold changes and a p-values for all DEP's identified. Proteins with a single high-scoring peptide hit were not

excluded based on recommendations [60]. Further investigation of all DEPs using Venn diagrams (Figure 6C) revealed several specific DEPs for each treatment but also an important degree of overlapping. This is coherent with our data suggesting they are targeting different systems, the vanilloid and cannabinoid systems, which are still closely related to each other [59]. However, it also suggests both molecules will lead to differential biological and molecular effects.

Enrichment and PPI analysis of Reactome pathways and Gene Ontology Biological Process database was performed. Using Metascape, we applied clustering algorithm called Molecular Complex Detection (MCODE), that aims at detecting densely connected regions in protein-protein interaction networks that potentially indicate molecular complexes [49, 61]. As revealed in Figure 7A, MCODE 1 cluster components (GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit; Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC); SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane) very significantly enriched following CBD treatment. It is important to outline that these pathways are associated with Eukaryotic Translation Initiation (Reactome identifier R-CEL-72613) as shown in the Parent to Root analysis (Figure S3). These results are in line with our recent study using specific vanilloid ligands, where we also revealed child (or sub level) pathways connected to the pathway hierarchy of Eukaryotic Translation Initiation (Reactome identifier R-CEL-72613) [44]. Components of Eukaryotic Translation Initiation pathways play an important role during the development of chronic pain in animals or humans [62]. Specifically, eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is an important effector for ERK and mTORC1 signaling pathways implicated during the development of chronic pain. Consequently, eIF4E-dependent mechanisms are proposed as an emerging drug target to develop analgesics. Other enriched processes identified in MCODE 2,3 and 4 contain complex networks of chemical reactions essential for energy metabolism and lead to simple precursors that act as building blocks for anabolism reactions. The maintenance of anabolism and regulating catabolism is vital to enhancing

the healing process. Following THC treatment, different processes were identified as shown in Figure 7B. MCODE 4 cluster components (Nucleotide biosynthesis; ribonucleoside monophosphate biosynthetic process; nucleoside monophosphate biosynthetic process) were significantly enriched. Nucleotide signaling is strongly associated with inflammation and some effectors that promote chronic inflammation [63]. One MCODE 3 cluster component (Class I MHC mediated antigen processing & presentation) is associated with the adaptive immune system. The adaptive immune system is activated in response to an injury leading to chronic pain [64]. This is also linked to systemic inflammation, which has a role in the development and maintenance of chronic pain [65, 66]. Also, these processes are associated with anabolic reactions that can play an essential role during healing. Interestingly, Mitochondrion child terms were significantly clustered in MCODE 1. This is highly compatible with the ATP requirements associated with nucleotide signaling. The maintenance of anabolism and regulating catabolism are two hallmarks of chronic pain healing.

#### **4. Conclusion**

This study revealed that CBD and THC have antinociceptive activity in *C. elegans* but target different systems, namely the vanilloid and cannabinoid system, respectively. CBD and THC impede the nocifensive response to noxious heat. Proteomic analyses revealed differences in the enriched pathways following exposure to these molecules. Interestingly, CBD treatment is connected to eukaryotic translation initiation as we previously discovered for Capsaicin, a vanilloid receptor ligand. It was suggested that eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) -dependent mechanisms could be investigated as a new target to develop new drugs to alleviate pain. Moreover, our data revealed that THC treatment is associated with nucleotide signaling, a process related to inflammation undergoing several clinical studies. All the above suggests that CBD and THC may alleviate pain in humans under controlled conditions, but further research is needed to establish dosage and application methods.

## **Acknowledgements**

A Ph.D. scholarship was awarded to J. Ben Salem from the *Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS)*. The Université de Montréal partially provided financial support to F. Boujenoui and B. Nkambeu.

## **Funding information**

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. RGPIN-2020-05228). Laboratory equipment was funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the Fonds de Recherche du Québec (FRQ), the Government of Quebec (F. Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706 and 42043). F. Beaudry is the holder of the Canada Research Chair in metrology of bioactive molecule and target discovery (grant no. CRC-2021-00160). This research was undertaken, partly, thanks to funding from the Canada Research Chairs Program.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **Data availability**

The data that support the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## **Author contribution statement**

F. Boujenoui, and F. Beaudry conceived and designed this study. F. Boujenoui, B. Nkambeu J. Ben Salem and F. Beaudry conducted the experiments. F. Boujenoui, J.D. Castano Uruena and F. Beaudry conducted data analysis and wrote the manuscript. All the authors have read and approved the final manuscript.

## References

1. Mills SEE, Nicolson KP, Smith BH (2019) Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *Brit J Anaesth* 123:e273–e283. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>
2. Cohen SP, Vase L, Hooten WM (2021) Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *Lancet* 397:2082–2097. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00393-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00393-7)
3. Knotkova H, Hamani C, Sivanesan E, et al (2021) Neuromodulation for chronic pain. *Lancet* 397:2111–2124. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00794-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00794-7)
4. Rosser BA, Fisher E, Eccleston C, et al (2021) Psychological therapies delivered remotely for the management of chronic pain (excluding headache) in adults. *Cochrane Db Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd013863>
5. Finnerup NB (2019) Nonnarcotic Methods of Pain Management. *New Engl J Med* 380:2440–2448. <https://doi.org/10.1056/nejmra1807061>
6. Ortiz YT, McMahon LR, Wilkerson JL (2022) Medicinal Cannabis and Central Nervous System Disorders. *Front Pharmacol* 13:881810. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.881810>
7. Amin MR, Ali DW (2019) Pharmacology of Medical Cannabis. *Adv Exp Med Biol* 1162:151–165. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8)
8. Procaccia S, Lewitus GM, Feder CL, et al (2022) Cannabis for Medical Use: Versatile Plant Rather Than a Single Drug. *Front Pharmacol* 13:894960. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.894960>
9. Romero-Sandoval EA, Fincham JE, Kolano AL, et al (2018) Cannabis for Chronic Pain: Challenges and Considerations. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 38:651–662. <https://doi.org/10.1002/phar.2115>
10. Lee MC, Ploner M, Wiech K, et al (2013) Amygdala activity contributes to the dissociative effect of cannabis on pain perception. *Pain* 154:124–134. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.09.017>
11. Pauli CS, Conroy M, Heuvel BDV, Park S-H (2020) Cannabidiol Drugs Clinical Trial Outcomes and Adverse Effects. *Front Pharmacol* 11:63. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00063>
12. Baratta F, Pignata I, Enri LR, Brusa P (2022) Cannabis for Medical Use: Analysis of Recent Clinical Trials in View of Current Legislation. *Front Pharmacol* 13:888903. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.888903>
13. Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678–682. <https://doi.org/10.1126/science.1063545>

14. Zieglgänsberger W, Brenneisen R, Berthele A, et al (2022) Chronic Pain and the Endocannabinoid System: Smart Lipids – A Novel Therapeutic Option? *Medical Cannabis Cannabinoids* 5:61–75. <https://doi.org/10.1159/000522432>
15. Lovinger D (2010) Endocannabinoids rein in pain outside the brain. *Nat Neurosci* 13:1155–1156. <https://doi.org/10.1038/nn1010-1155>
16. Lutz B (2002) Molecular biology of cannabinoid receptors. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 66:123–142. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0342>
17. Badowski ME, Yanful PK (2018) Dronabinol oral solution in the management of anorexia and weight loss in AIDS and cancer. *Ther Clin Risk Manag* 14:643–651. <https://doi.org/10.2147/term.s126849>
18. May MB, Glode AE (2016) Dronabinol for chemotherapy-induced nausea and vomiting unresponsive to antiemetics. *Cancer Management Res* 8:49–55. <https://doi.org/10.2147/cmar.s81425>
19. Vries M de, Rijkevorsel DC van, Wilder-Smith OH, Goor H van (2014) Dronabinol and chronic pain: importance of mechanistic considerations. *Expert Opin Pharmaco* 15:1525–1534. <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.918102>
20. Luz-Veiga M, Azevedo-Silva J, Fernandes JC (2023) Beyond Pain Relief: A Review on Cannabidiol Potential in Medical Therapies. *Pharm* 16:155. <https://doi.org/10.3390/ph16020155>
21. Dieterle M, Zurbriggen L, Mauermann E, et al (2022) Pain response to cannabidiol in opioid-induced hyperalgesia, acute nociceptive pain, and allodynia using a model mimicking acute pain in healthy adults in a randomized trial (CANAB II). *Pain* 163:1919–1928. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002591>
22. Frane N, Stapleton E, Iturriaga C, et al (2022) Cannabidiol as a treatment for arthritis and joint pain: an exploratory cross-sectional study. *J Cannabis Res* 4:47. <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00154-9>
23. Etemad L, Karimi G, Alavi MS, Roohbakhsh A (2022) Pharmacological effects of cannabidiol by transient receptor potential channels. *Life Sci* 300:120582. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120582>
24. Bisogno T, Hanuš L, Petrocellis LD, et al (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Brit J Pharmacol* 134:845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
25. Iftinca M, Defaye M, Altier C (2021) TRPV1-Targeted Drugs in Development for Human Pain Conditions. *Drugs* 81:7–27. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01429-2>



26. Klatzkow S, Davis G, Shmalberg J, et al (2023) Evaluation of the efficacy of a cannabidiol and cannabidiolic acid rich hemp extract for pain in dogs following a tibial plateau leveling osteotomy. *Frontiers Vet Sci* 9:1036056. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1036056>
27. Britch SC, Craft RM (2023) Cannabidiol and Delta-9-Tetrahydrocannabinol Interactions in Male and Female Rats With Persistent Inflammatory Pain. *J Pain* 24:98–111. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2022.09.002>
28. Muresan P, Woodhams S, Smith F, et al (2023) Evaluation of cannabidiol nanoparticles and nanoemulsion biodistribution in the central nervous system after intrathecal administration for the treatment of pain. *Nanomed Nanotechnol Biology Medicine* 102664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2023.102664>
29. Henderson-Redmond AN, Lulek CF, Morgan DJ (2022) The Role of Cannabidiol (CBD) in a Cisplatin-Induced Model of Chronic Neuropathic Pain. *Faseb J* 36:. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.s1.r5197>
30. Vela J, Dreyer L, Petersen KK, et al (2022) Cannabidiol treatment in hand osteoarthritis and psoriatic arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain* 163:1206–1214. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002466>
31. Schneider T, Zurbriggen L, Dieterle M, et al (2022) Pain response to cannabidiol in induced acute nociceptive pain, allodynia, and hyperalgesia by using a model mimicking acute pain in healthy adults in a randomized trial (CANAB I). *Pain* 163:e62–e71. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002310>
32. Rossignol J, Hatton S, Ridley A, et al (2023) The Effectiveness and Safety of Pharmaceutical-Grade Cannabidiol in the Treatment of Mastocytosis-Associated Pain: A Pilot Study. *Biomed* 11:520. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020520>
33. Galles C, Prez GM, Penkov S, et al (2018) Endocannabinoids in *Caenorhabditis elegans* are essential for the mobilization of cholesterol from internal reserves. *Scientific reports* 8:6398. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24925-8>
34. Oakes MD, Law WJ, Clark T, et al (2017) Cannabinoids Activate Monoaminergic Signaling to Modulate Key *C. elegans* Behaviors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37:2859–2869. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3151-16.2017>
35. Oakes M, Law WJ, Komuniecki R (2019) Cannabinoids Stimulate the TRP Channel-Dependent Release of Both Serotonin and Dopamine to Modulate Behavior in *C. elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 39:4142–4152. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2371-18.2019>
36. Pastuhov SI, Matsumoto K, Hisamoto N (2016) Endocannabinoid signaling regulates regenerative axon navigation in *Caenorhabditis elegans* via the GPCRs NPR-19 and NPR-32. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 21:696–705. <https://doi.org/10.1111/gtc.12377>

37. Ohnishi K, Saito S, Miura T, et al (2020) OSM-9 and OCR-2 TRPV channels are accessorial warm receptors in *Caenorhabditis elegans* temperature acclimatisation. *Sci Rep-uk* 10:18566. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75302-3>
38. Ezak MJ, Ferkey DM (2011) A Functional Nuclear Localization Sequence in the *C. elegans* TRPV Channel OCR-2. *Plos One* 6:e25047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025047>
39. Liedtke WB, Heller S, Sze JY (2007) *The TRPV Channel in C. elegans Serotonergic Neurons*. CRC Press
40. Glauser DA, Chen WC, Agin R, et al (2011) Heat avoidance is regulated by transient receptor potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 188:91–103. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127100>
41. Nkambeu B, Salem JB, Beaudry F (2021) Eugenol and Other Vanilloids Hamper *Caenorhabditis elegans* Response to Noxious Heat. *Neurochem Res* 46:252–264. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03159-z>
42. Nkambeu B, Salem JB, Beaudry F (2020) Capsaicin and Its Analogues Impede Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat. *Neurochem Res* 45:1851–1859. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03049-4>
43. Salem JB, Nkambeu B, Arvanitis DN, Beaudry F (2022) Resiniferatoxin Hampers the Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat, and Pathway Analysis Revealed that the Wnt Signaling Pathway is Involved. *Neurochem Res* 47:622–633. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03471-2>
44. Nkambeu B, Salem JB, Beaudry F (2023) Antinociceptive Activity of Vanilloids in *Caenorhabditis elegans* is Mediated by the Desensitization of the TRPV Channel OCR-2 and Specific Signal Transduction Pathways. *Neurochem Res* 48:1900–1911. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03876-1>
45. Brenner S (1974) THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* 77:71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
46. Margie O, Palmer C, Chin-Sang I (2013) *C. elegans* Chemotaxis Assay. *Journal of visualized experiments : JoVE* 1–6. <https://doi.org/10.3791/50069>
47. Nkambeu B, Salem JB, Leonelli S, et al (2018) EGL-3 and EGL-21 are required to trigger nocifensive response of *Caenorhabditis elegans* to noxious heat. *Neuropeptides* 73:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.11.002>
48. Wittenburg N, Baumeister R (1999) Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: an approach to the study of nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10477–10482

49. Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10:1523. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>
50. Chayasirisobhon S (2021) Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *Perm J* 25:1–3. <https://doi.org/10.7812/tpp/19.200>
51. Mullaney BC, Ashrafi K (2009) *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Mol Cell Biology Lipids* 1791:474–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.12.013>
52. Aviram J, Samuelly-Leichtag G (2017) Efficacy of Cannabis-Based Medicines for Pain Management: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain physician* 20:E755–E796
53. Russo EB (2016) Current Therapeutic Cannabis Controversies and Clinical Trial Design Issues. *Front Pharmacol* 7:309. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00309>
54. Vidal-Gadea AG, Pierce-Shimomura JT (2012) Conserved role of dopamine in the modulation of behavior. *Commun Integr Biology* 5:440–447. <https://doi.org/10.4161/cib.20978>
55. Li C, Liu S, Lu X, Tao F (2019) Role of Descending Dopaminergic Pathways in Pain Modulation. *Curr Neuropharmacol* 17:1176–1182. <https://doi.org/10.2174/1570159x17666190430102531>
56. Kim J-YV, Tillu DV, Quinn TL, et al (2015) Spinal Dopaminergic Projections Control the Transition to Pathological Pain Plasticity via a D1/D5-Mediated Mechanism. *J Neurosci* 35:6307–6317. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3481-14.2015>
57. Liu S, Tang Y, Shu H, et al (2019) Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway–produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. *Pain* 160:334–344. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001414>
58. Malek N, Starowicz K (2016) Dual-Acting Compounds Targeting Endocannabinoid and Endovanilloid Systems—A Novel Treatment Option for Chronic Pain Management. *Front Pharmacol* 7:257. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00257>
59. Zádor F, Wollemann M (2015) Receptome: Interactions between three pain-related receptors or the “Triumvirate” of cannabinoid, opioid and TRPV1 receptors. *Pharmacol Res* 102:254–263. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.015>
60. Gupta N, Pevzner PA (2009) False Discovery Rates of Protein Identifications: A Strike against the Two-Peptide Rule. *J Proteome Res* 8:4173–4181. <https://doi.org/10.1021/pr9004794>
61. Bader GD, Hogue CW (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *Bmc Bioinformatics* 4:2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-2>

62. Uttam S, Wong C, Price TJ, Khoutorsky A (2018) eIF4E-Dependent Translational Control: A Central Mechanism for Regulation of Pain Plasticity. *Frontiers Genetics* 9:470. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00470>
63. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>
64. Totsch SK, Sorge RE (2017) Immune system involvement in specific pain conditions. *Mol Pain* 13:1744806917724559. <https://doi.org/10.1177/1744806917724559>
65. Zhou WBS, Meng J, Zhang J (2021) Does Low Grade Systemic Inflammation Have a Role in Chronic Pain? *Front Mol Neurosci* 14:785214. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.785214>
66. Zhou WBS, Shi XQ, Liu Y, et al (2023) Unbiased proteomic analysis detects painful systemic inflammatory profile in the serum of nerve-injured mice. *Pain* 164:e77–e90. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002695>

## Figures captions

**Figure 1.** Molecular structure of capsaicin, THC and CBD. Capsaicin is a known TRPV1 ligand. Ligand-receptor interactions are characteristically associated with the pharmacophore features and the vanillyl group play a fundamental role in interaction with the TRPV1.

**Figure 2.** Comparison of the mobility and bias of WT (N2) and selected mutant nematodes in plates divided into quadrants. The plates were conserved at a constant temperature (22°C) without the application of a stimulus (negative control). No quadrant selection bias was observed for any *C. elegans* genotype tested in the absence or presence of THC or CBD.

**Figure 3.** Assessment of the pharmacological effects of CBD on thermal avoidance in *C. elegans*. Nematodes were exposed to CBD for 60 min prior to behavioral experiments. Individual values and medians were derived from at least 12 independent experiments for each group. The observed effects of CBD are dose-dependent and noticeably impede thermal avoidance in *C. elegans*. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (non-parametric Kruskal-Wallis test - Dunn's multiple comparisons test). No residual antinociceptive effects were observed 6 h after exposure.

**Figure 4.** Assessment of the pharmacological effects of THC on thermal avoidance in *C. elegans*. Nematodes were exposed to THC for 60 min prior to behavioral experiments. Individual values and median were derived from at least 12 independent experiments for each group. The observed effects of THC are dose-dependent and noticeably impede thermal avoidance in *C. elegans*. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (non-parametric Kruskal-Wallis test - Dunn's multiple comparisons test). Residual antinociceptive effects were observed 6 h after exposure.

**Figure 5.** Identification of vanilloid or cannabinoid receptor orthologs responsible for the THC and CBD -induced antinociceptive effects. Individual values and medians were derived from at least 12 independent experiments for each group. Mutants tested included *ocr-2* (A), *osm-9* (B), *npr-19* (C) and *npr-32* (D). The data suggest that CBD targets vanilloid receptors OCR-2 and OSM-9 and THC targets cannabinoid receptors NPR-19 and NPR-32. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  (non-parametric Kruskal-Wallis test - Dunn's multiple comparisons test).

**Figure 6.** Volcano plots illustrate the differential abundance of proteins, with the x-axis showing the  $\log_2$  ratio with respect to the control group (N2 maintained at 22°C) and the y-axis representing  $-1 \times \log_{10}$  (p value). The boxes represent significant 2-fold changes ( $p \leq 0.05$ ). The p-values were determined by a one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD. **A.** *C. elegans* exposed for 1 h to 10  $\mu\text{M}$  CBD were compared to individuals maintained at 22°C. **B.** *C. elegans* exposed for 1 h to 10  $\mu\text{M}$  THC were compared to individuals maintained at 22°C. **C.** Venn diagram representing the degree of DEP overlap between the experimental conditions under investigation.

**Figure 7.** Protein-protein interaction (PPI) enrichment analyses. PPI network (full connection) and MCODE components identified from the overlapping protein lists following CBD (A) or THC (B) treatment using GO biological processes and REACTOME databases.

**Figure 1.**

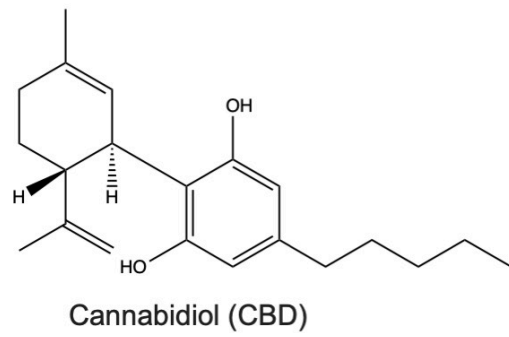
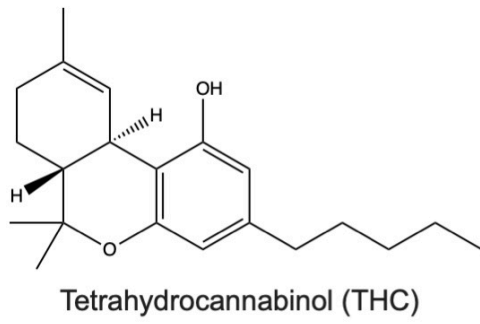
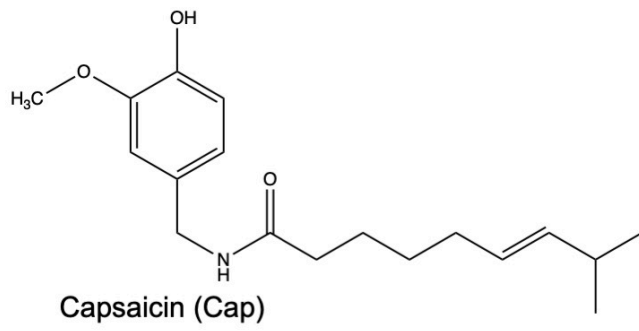
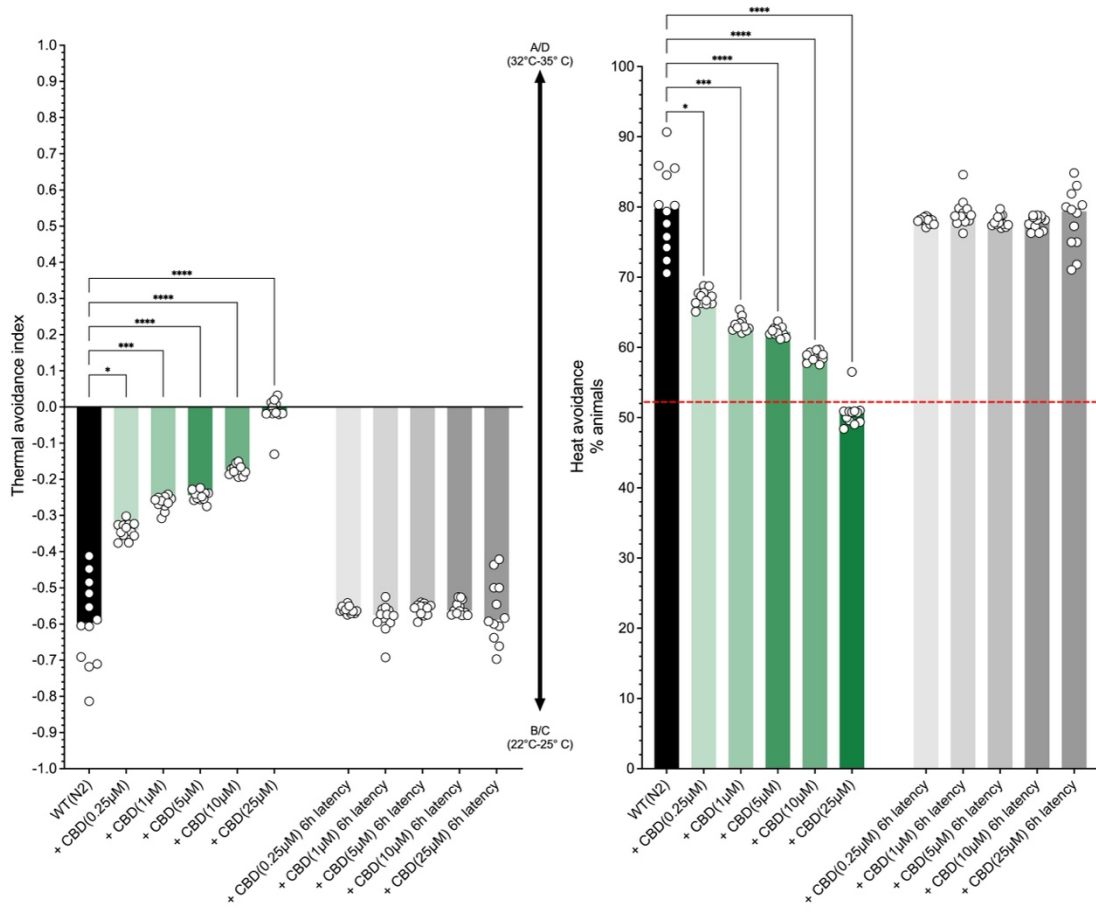


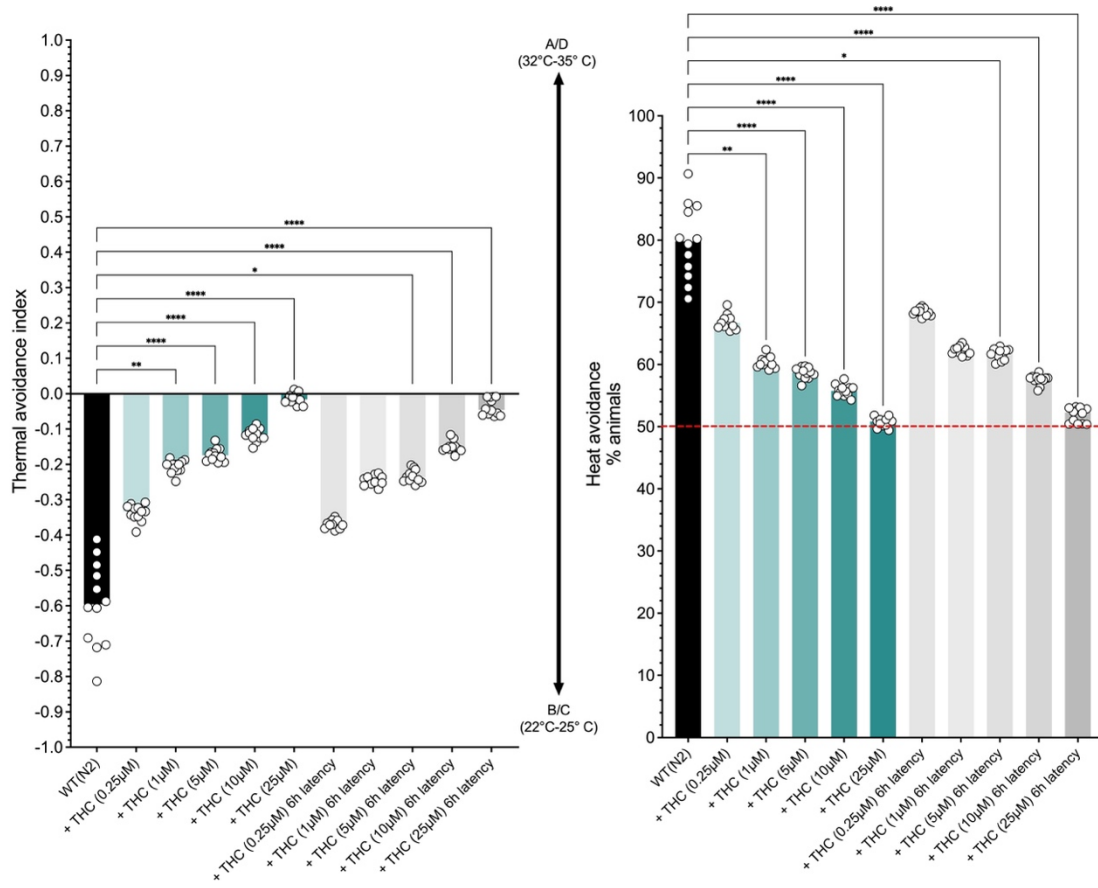


Figure 3.





**Figure 4.**



**Figure 5.**

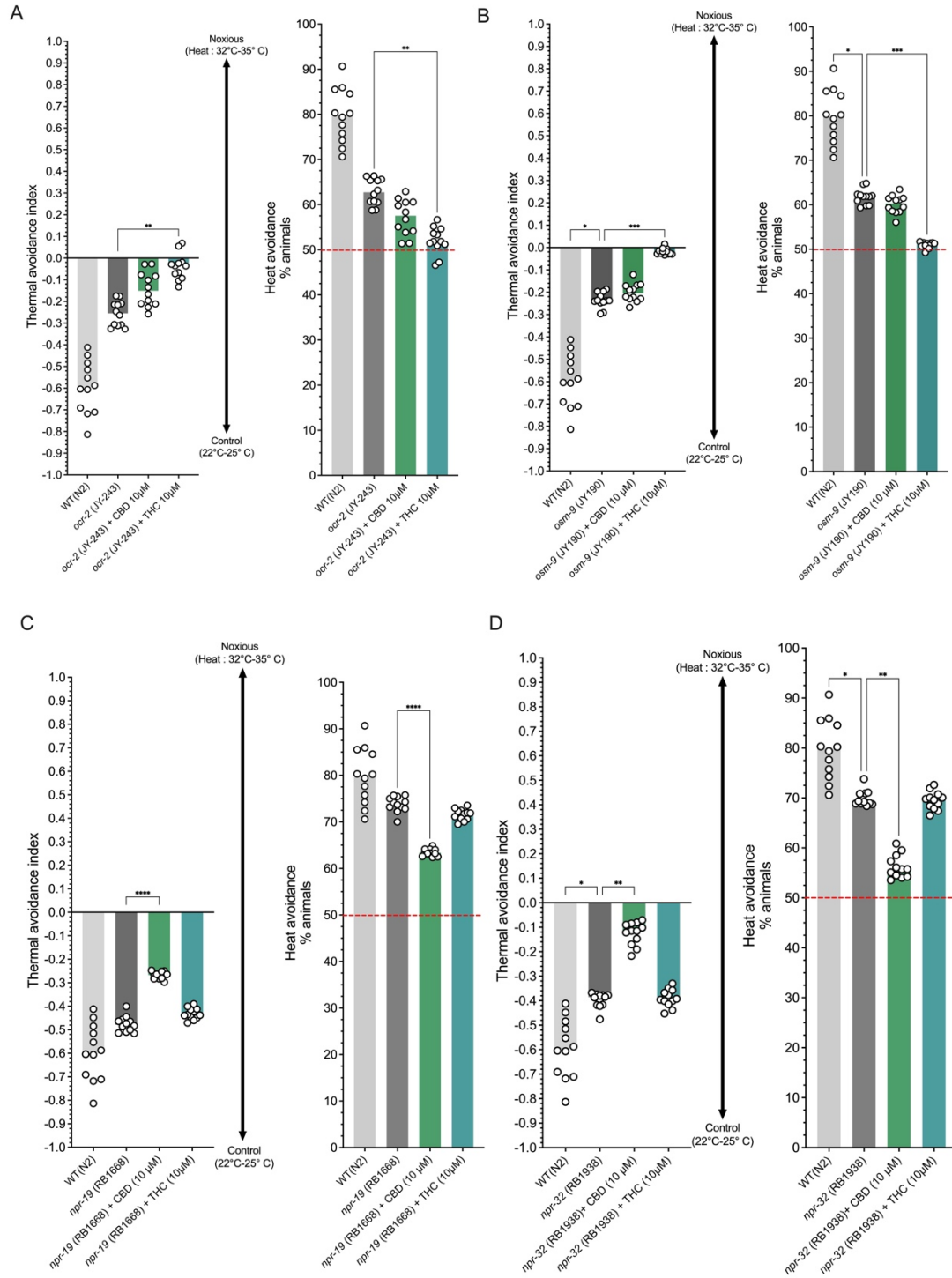


Figure 6.

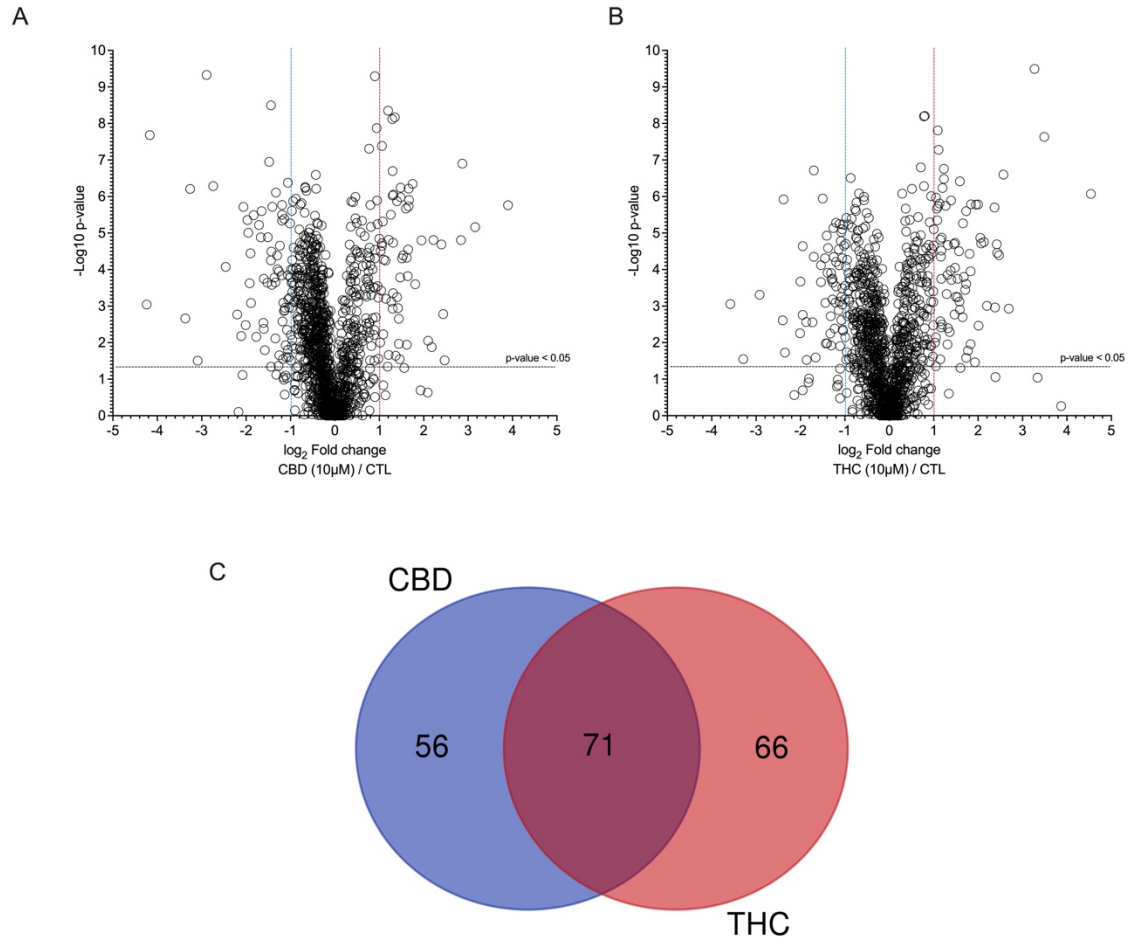
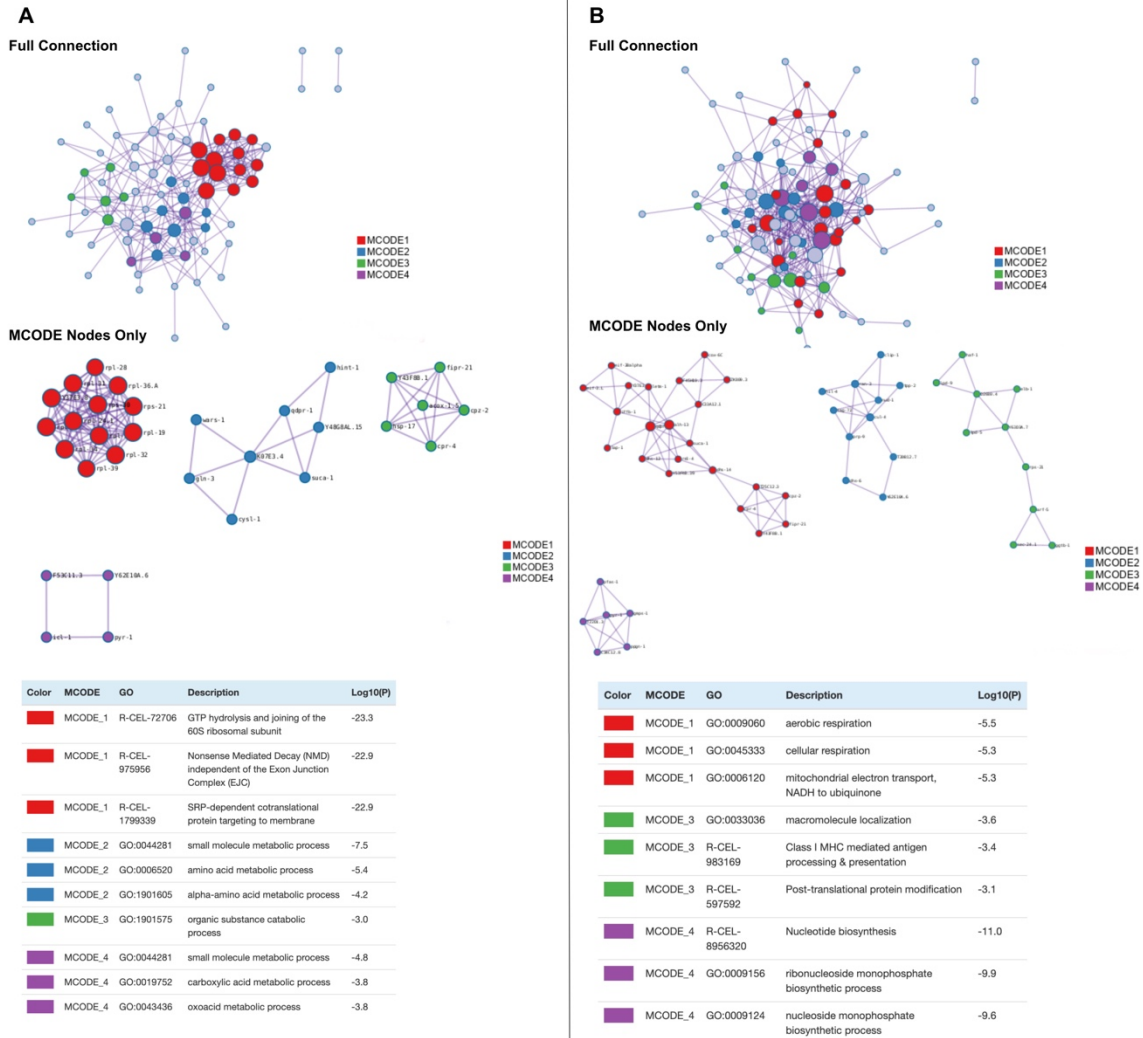


Figure 7.



## Chapitre 4 – Discussion générale

Des études antérieures ont utilisé le modèle *C. elegans* pour évaluer les effets antinociceptifs de composés bioactifs, en combinant des approches protéomiques et bio-informatiques pour étudier les interactions entre protéines et les voies biologiques. Notre étude s'est concentrée sur l'évaluation pharmacologique des effets antinociceptifs du THC et CBD en utilisant *C. elegans* comme modèle expérimental, en mettant l'accent sur les déterminants physiologiques de la douleur plus tôt que sur les aspects psychologiques (Nkambeu *et al.*, 2020, 2023).

Les résultats obtenus dans le cadre de notre étude visaient à évaluer l'effet anti-nociceptif des phytocannabinoïdes THC et CBD sur *C. elegans*, en mettant en évidence la modulation des récepteurs cannabinoïdes et vanilloïdes. Notre hypothèse était que la modulation de ces récepteurs pourrait entraîner un effet anti-nociceptif quantifiable en réponse au traitement avec ces phytocannabinoïdes. Nos résultats (Article du chapitre 3 : figure 3) confirment cette hypothèse en mettant en évidence des changements significatifs dans la réponse nociceptive des nématodes exposés au THC ou au CBD.

### 4.1. Les résultats obtenus

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la méthode de stimulation thermique, appelée thermotaxie, pour quantifier les effets antinociceptifs du CBD et du THC. Cette méthode implique la division des pétris en quatre zones, comprenant deux zones stimulées (32-35 °C) et deux zones non stimulées (22-25 °C), disposées en diagonale pour assurer la symétrie (Nkambeu *et al.*, 2020, 2023). Nous avons réalisé des tests de stimulation thermique avec les WT(N2) non exposés (notre groupe contrôle) et exposés une heure au CBD ou au THC à des concentrations de 0,25, 1, 5, 10 et 25 µM, dans le but d'évaluer la relation entre la concentration et l'effet antinociceptifs du CBD ou THC, en comparaison avec notre groupe de contrôle. Nos résultats ont montré que le THC et le CBD entravent la réponse de *C. elegans* à la chaleur nocive (32-35 °C), avec la relation dépendante de la concentration pour les effets antinociceptifs des deux phytocannabinoïdes.

Après 6 heures de latence, nous répétons les tests de stimulation thermique pour évaluer les effets rémanents du THC et du CBD. Nos résultats (Article du chapitre 3 : figure 3) montrent que 6

heures de latence après l'exposition au CBD, la réponse d'évitement thermique de WT(N2) est réversible à toutes les concentrations testées, donc le CBD n'a pas d'effet rémanent. En revanche, nos résultats (Article du chapitre 3 : figure 3) montrent que l'exposition au THC continue à entraver la réponse d'évitement thermique de *C. elegans* après 6 heures. Ces observations soutiennent l'hypothèse que le THC a des effets résiduels dans l'organisme, probablement en raison de sa forte lipophilie. Une étude récente menée par Setella *et al.*, (2021) a mis en évidence le coefficient de partage octanol-eau (logP) en tant qu'un indicateur de la lipophilie d'une molécule. Dans notre cas, le THC présente un logP de 6,97, indiquant une forte lipophilie. En comparaison, le logP du CBD est de 6,3, ce qui montre également une lipophilie, bien qu'elle soit légèrement moins prononcée que celle du THC.

De plus, des études sur les humains menés par Huestis (2007) suggèrent que la persistance de concentrations résiduelles du THC, en particulier dans le cerveau et les tissus adipeux, pourrait contribuer aux déficits cognitifs observés chez les consommateurs chroniques de cannabis, même après l'arrêt de son utilisation pendant plusieurs jours. Cette étude souligne une plus grande intensité et une durée prolongée des effets cognitifs du THC par rapport au CBD, en raison de la manière dont le THC est métabolisé et reste actif dans le système nerveux central. De plus, d'autres études montrent que les molécules lipophiles ont la capacité de s'accumuler dans les tissus adipeux et de présenter une phase d'élimination prolongée, pouvant expliquer les effets rémanents du THC (Chayasirisobhon, 2021).

#### **4.2. Discussion sur les implications des résultats**

Nous avons effectué des tests de stimulation thermique en utilisant des mutants spécifiques des récepteurs vanilloïdes de *C. elegans* (*ocr-2*, *osm-9*) ainsi que des mutants des récepteurs cannabinoïdes (*npr-19*, *npr-32*) dans le but d'identifier potentiellement les cibles du CBD et du THC. Tous les mutants ont été exposés au CBD ou au THC à une concentration de 10  $\mu$ M pendant une heure avant les tests. Nos résultats (Article de chapitre 3 : figure 5A et B) ne révèlent aucun effet significatif du CBD chez les mutants aux récepteurs vanilloïdes. Cette absence d'effet démontre que le CBD cible les orthologues des récepteurs vanilloïdes, *ocr-2* et *osm-9*. Cependant, nos résultats (Article de chapitre 3 : figure 5C et D) n'indiquent aucun effet significatif du THC chez les mutants

aux récepteurs cannabinoïdes. Par conclusion, le THC cible les orthologues des récepteurs cannabinoïdes de *C. elegans*, *npr-19* et *npr-32*. En conclusion, ces résultats suggèrent que le CBD et le THC entravent la réponse nociceptive à la chaleur nocive, en ciblant différents récepteurs.

Après le traitement au CBD, nos résultats des analyses protéomiques et bio-informatiques ont révélé l'identification des voies d'initiation de la traduction eucaryote (identifiant Reactome R-CEL-72613) (Annexe : figure S3), qui jouent un rôle important dans le développement de la douleur chronique. Particulièrement, le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E) est un acteur clé dans les voies de signalisation ERK et mTORC1 associées à la douleur chronique (Uttam *et al.*, 2018). De plus, nos résultats ont permis d'identifier d'autres composants impliqués des réseaux complexes de réactions chimiques essentielles au métabolisme énergétique qui aboutissent à la formation des éléments de base pour des réactions d'anabolisme. Le maintien de l'anabolisme et la régulation du catabolisme sont essentiels pour les mécanismes de réparations associés au soulagement de la douleur (Yoon *et al.*, 2021; Di Pasquale, *et al.*, 2007; Lahaise *et al.*, 2023).

Après le traitement au THC, nos résultats ont montré une augmentation significative des composants de la voie de signalisation des nucléotides, qui est associée à l'inflammation et à certains médiateurs tels que l'adénosine triphosphate (ATP) et l'uridine diphosphate (UDP) et qui ont été identifiés comme jouant un rôle essentiel dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires (Idzko *et al.*, 2014). De plus, un composant de traitement des antigènes médiés par le CMH de classe I qui est associé au système immunitaire adaptatif, activé en réponse à une lésion inflammatoire (Totsch *et al.*, 2017). Cette activation immunitaire est liée à l'inflammation systémique, reconnue pour jouer un rôle clé dans l'initiation et la perpétuation de la douleur chronique (Zhou *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2023). De plus, ces processus coïncident avec des réactions anaboliques qui pourraient jouer un rôle important dans le soulagement de la douleur (Totsch *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2021). De plus, nous avons observé les composants qui incluent : la biosynthèse des nucléotides; le processus biosynthétique des monophosphates des ribonucléosides; le processus biosynthétique des monophosphates de nucléosides. Le maintien des voies anaboliques et la régulation du catabolisme sont des aspects essentiels pour atténuer la douleur chronique.

### 4.3. Les limites et perspectives

Nos résultats démontrent que les effets anti-nociceptifs du THC et du CBD sont quantifiables. Ces découvertes contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets anti-nociceptifs du THC et du CBD chez *C. elegans*. En conséquence, elles renforcent la caractérisation du modèle *C. elegans* et ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques visant à soulager la douleur chronique.

D'une part, nos observations suggèrent que l'effet du CBD pourrait être lié à l'initiation de la traduction eucaryote. L'implication spécifique de la voie du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E), ouvre la perspective de son utilisation en tant qu'une nouvelle cible thérapeutique pour le soulagement de la douleur chronique (Uttam *et al.*, 2018). L'eIF4E intervient dans la modulation de la synthèse protéique en initiant le processus de traduction à partir de l'ARN<sub>m</sub>. Parallèlement, l'eIF4E exerce également une influence sur la plasticité neuronale, une caractéristique indispensable pour l'adaptation des neurones aux stimulus nocifs et aux stimulations synaptiques persistantes, des éléments clés de la douleur chronique (Uttam *et al.*, 2018; Mody *et al.*, 2020). De plus, l'eIF4E interagit avec des voies de signalisation spécifiquement impliquées dans la douleur chronique, telles que la voie de l'ERK (extracellular signal-regulated kinase) et la voie mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). L'activation prolongée de ces voies est directement associée à des caractéristiques majeures de la douleur chronique, comme l'hyperexcitabilité neuronale et la sensibilisation (Whalen *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2020).

D'autre part, nos observations mettent en évidence une relation entre l'effet du THC et la signalisation des nucléotides, une voie bien connue pour son implication dans les processus inflammatoires. En effet, la signalisation des nucléotides repose sur l'action de l'ATP et de l'adénosine dans la transmission des signaux cellulaires. La libération de l'ATP active les récepteurs purinergiques qui exercent une influence significative sur la perception de la douleur. De plus, ces mécanismes activent des voies cataboliques et participent à la réparation des cellules endommagées. L'adénosine, un métabolite de l'ATP, exerce son action sur les récepteurs A1 et A2A pour moduler la transmission de la douleur (Burnstock, 2016 ; Burnstock *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2021).



Toutefois, il est essentiel de reconnaître les limites inhérentes à l'utilisation de *C. elegans* en tant que modèle expérimental. La relative simplicité physiologique de ce modèle par rapport aux mammifères limite la complexité des interactions tissulaires et peut introduire des biais dans les évaluations comportementales. De plus, des recherches supplémentaires menées sur des organismes supérieurs sont nécessaires afin de valider les cibles et l'efficacité, d'optimiser les méthodes de dosage et les modes d'administration. *C. elegans* est un excellent modèle pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la nociception, mais il reste limité pour le développement pharmacologique. L'utilisation de modèle de douleur validé reste une étape indispensable. Cependant, *C. elegans* peut permettre d'identifier rapidement des molécules prometteuses et ainsi réduire le nombre d'évaluations requis dans un modèle murin. L'utilisation d'animaux d'espèces inférieures est considérée comme une solution de remplacement des animaux d'espèces supérieures. C'est une préoccupation sociétale importante dont nous devons tenir compte en recherche. Le nématode *C. elegans* est utilisé dans l'étude du fonctionnement neuronal parce que son système nerveux est doté de 302 neurones, permettant d'étudier la fonction de chacun des neurones et leurs interactions importantes pour étudier la nociception.

## Chapitre 5 – Conclusions

Notre étude relève que CBD et THC altèrent la réponse nociceptive à la chaleur nocive, mais ces phytocannabinoïdes ciblent des différents récepteurs : le vanilloïde (*ocr-2* et *osm-9*) et le cannabinoïde (*npr-19* et *npr-32*), respectivement. De plus, l'effet antinociceptif du CBD est réversible après 6 heures, contrairement à l'effet THC qui persiste au-delà de la période de latence de 6 heures.

L'analyse protéomique a révélé des différences significatives dans les mécanismes et les voies moléculaires en réponse à l'exposition à ces phytocannabinoïdes. L'effet du CBD semble être lié à l'initiation de la traduction eucaryote, ce qui suggère que les mécanismes dépendent du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E), lequel pourrait être exploré en tant qu'une nouvelle cible thérapeutique pour le soulagement de la douleur chronique (Uttam *et al.*, 2018). D'autre part, nos résultats suggèrent que l'effet du THC est lié à la signalisation des nucléotides, une voie bien connue pour son implication dans l'inflammation.

Ces résultats contribuent à une meilleure caractérisation du modèle *C. elegans* et ouvrent des perspectives pour le développement d'approches thérapeutiques en vue de la gestion de la douleur chronique, notamment par l'utilisation de CBD et de THC ou d'autres molécules dérivées des phytocannabinoïdes. Cependant, des recherches supplémentaires menées sur des organismes supérieurs sont nécessaires, dans le but d'optimiser les méthodes de dosage et d'administration.

## Chapitre 6 - Références bibliographiques

Abood M, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Cravatt BF, Devane WA, Elphick MR, Felder CC, Herkenham M, Howlett AC, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Pertwee RG (22 August 2018). "[CB1 Receptor](#)". IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Retrieved 9 November 2018.

Achacoso, T. B., & Yamamoto, W. S. (2022). *AY's Neuroanatomy of C. elegans for Computation*. CRC Press.

Amin, M. R., & Ali, D. W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1162, 151–165. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8).

Anand, P., Whiteside, G., Fowler, C. J., and Hohmann, A. G. (2009). Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res. Rev.* 60, 255–266. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.003.

Ashton, J.C (2012). Synthetic cannabinoids as drugs of abuse. *Current drug abuse reviews*, 5(2), 158-168.

Avila, C., Massick, S., Kaffenberger, B. H., Kwatra, S. G., & Bechtel, M. (2020). Cannabinoids for the treatment of chronic pruritus: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82(5), 1205-1212.

Bader GD, Hogue CW (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *Bmc Bioinformatics* 4:2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-2>.

Bargmann, C. I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*, 282(5396), 2028-2033.

Beaulieu, P. (2005). *Pharmacologie de la douleur*. PUM.

Bertin, P., & Vergne-Salle, P. (2019). Douleur et inflammation. *Revue du Rhumatisme*, 86, A25-A29.

Biegon, A. (2004). Cannabinoids as neuroprotective agents in traumatic brain injury. *Current pharmaceutical design*, 10(18), 2177-2183.

Bifulco, M., Grimaldi, C., Gazzerri, P., Pisanti, S., & Santoro, A. (2007). Rimonabant: just an antiobesity drug? Current evidence on its pleiotropic effects. *Molecular Pharmacology*, 71(6), 1445-1456.

Brotchie, J. M. (2003). CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. *Current opinion in pharmacology*, 3(1), 54-61.

Burnstock, G. (2016). Purinergic Mechanisms and Pain. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.), 75, 91–137. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.09.001>

Burnstock, G., B Fredholm, B., & Verkhatsky, A. (2011). Adenosine and ATP receptors in the brain. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(8), 973-1011.

Busse, J. W. (2021). Medical cannabis or cannabinoids for chronic non-cancer and cancer related pain: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ*, 374, n1034. doi:10.1136/bmj.n1034.

Cabral, G. A., & Griffin-Thomas, L. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, e3.

Carey, J. (1990). Brain facts: A primer on the brain and nervous system.

Castaneto, M. S., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Pirard, S., & Huestis, M. A. (2014). Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and alcohol dependence*, 144, 12-41.

Catala, M., & Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handbook of clinical neurology*, 115, 29-41.

Chappe, Y. (2022). Étude de la pharmacologie moléculaire et de la régulation du canal TRPV1 à l'aide de la technique du transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET) (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux).

Chayasirisobhon, S. (2020). Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *The Permanente Journal*, 25, 1-3.

Chayasirisobhon S (2021) Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *Perm J* 25:1–3. <https://doi.org/10.7812/tpp/19.200>.

Colon, E., Legrain, V., & Mouraux, A. (2012). Steady-state evoked potentials to study the processing of tactile and nociceptive somatosensory input in the human brain. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, 42(5), 315-323.

Cook, S. J., Jarrell, T. A., Brittin, C. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Yakovlev, M. A., ... & Emmons, S. W. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, 571(7763), 63-71.

Corchero, J., Manzanares, J., & Fuentes, J. A. (2001). Role of gonadal steroids in the corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin gene expression response to  $\Delta^9$  tetrahydrocannabinol in the hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology*, 74(3), 185-192.

Coronado-Álvarez, A., Romero-Cordero, K., Macías-Triana, L., Tatum-Kuri, A., Vera-Barrón, A., Budde, H., ... & Murillo-Rodríguez, E. (2021). The synthetic CB1 cannabinoid receptor selective agonists: Putative medical uses and their legalization. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 110, 110301.

Celesia, G. G. (2001). Disorders of membrane channels or channelopathies. *Clinical Neurophysiology*, 112(1), 2-18.

Crescente, G., Minervini, G., Spagnuolo, C., & Moccia, S. (2022). Cannabis bioactive compound-based formulations: new perspectives for the management of orofacial pain. *Molecules*, 28(1), 106.

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., and Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405–1415. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.074.

Cumella, J., Hernández-Folgado, L., Girón, R., Sánchez, E., Morales, P., Hurst, D. P., ... & Jagerovic, N. (2012). Chromenopyrazoles: Non-psychoactive and Selective CB1 Cannabinoid Agonists with Peripheral Antinociceptive Properties. *ChemMedChem*, 7(3), 452-463.

Dafny, N. (2020). Chapter 7: Pain Tracts and Sources. In *Neuroscience Online*. Retrieved from <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s2/chapter07.html>.

Dawson, D. A., & Persad, C. P. (2022). Targeting the endocannabinoid system in the treatment of addiction disorders. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 19(2), 064-074.

de Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology research & perspectives*, 8(6), e00682.

de Bono, M., Tobin, D. M., Davis, M. W., Avery, L., & Bargmann, C. I. (2002). Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature*, 419(6910), 899-903.

Di Pasquale, M. G. (2007). *Amino acids and proteins for the athlete: The anabolic edge*. CRC Press.

Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3760-3772.

Dorfman, R., Tsui, H., Salter, M. W., & Dosch, H. M. (2010). TRPV1 genetics. *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery: Targeting Pain and Other Pathological Disorders*, 134-149.

Estrada-Valencia, R. et al. (2021). The Endocannabinoid System in *Caenorhabditis elegans*. In: Pedersen, S.H.F. (eds) *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol 184. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/112\\_2021\\_64](https://doi.org/10.1007/112_2021_64).

Etemad, L., Karimi, G., Alavi, M. S., & Roohbakhsh, A. (2022). Pharmacological effects of cannabidiol by transient receptor potential channels. *Life Sciences*, 300, 120582. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120582>.

Ferkey, D. M., Sengupta, P., & L'Etoile, N. D. (2021). Chemosensory signal transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 217(3), iyab004.

Ferris, J. K., Inglis, J. T., Madden, K. M., & Boyd, L. A. (2020). Brain and body: a review of central nervous system contributions to movement impairments in diabetes. *Diabetes*, 69(1), 3-11.

Fink, D., Mata, M., & Glorioso, J. (2005). Gene Transfer in the Treatment of Pain. *Progress in Neurological Surgery*, 18, 322.

Forteza, F., Giorgini, G., & Raymond, F. (2021). Neurobiological processes induced by aerobic exercise through the endocannabinoidome. *Cells*, 10(4), 938.

Fulmer, M. L., & Thewke, D. P. (2018). The endocannabinoid system and heart disease: the role of cannabinoid receptor type 2. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*, 18(1), 34-51.

Glauser, D. A., Chen, W. C., Agin, R., Macinnis, B. L., Hellman, A. B., Garrity, P. A., Tan, M.-W., & Goodman, M. B. (2011). Heat avoidance is regulated by transient receptor potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 188(1), 91-103. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127100>.

Glauser, D. A. (2022). Temperature sensing and context-dependent thermal behavior in nematodes. *Current Opinion in Neurobiology*, 73, 102525.

Grotenhermen, F. (2006). Cannabinoids and the endocannabinoid system. *Cannabinoids*, 1(1), 10-14.

Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and biosynthesis. *Trends in plant science*, 25(10), 985-1004.

- Hart, A. C., Sims, S., & Kaplan, J. M. (1995). Synaptic code for sensory modalities revealed by *C. elegans* GLR-1 glutamate receptor. *Nature*, 378(6552), 82-85.
- Hashiesh, H. M., Sharma, C., Goyal, S. N., Jha, N. K., & Ojha, S. (2021). Pharmacological properties, therapeutic potential and molecular mechanisms of JWH133, a CB2 receptor-selective agonist. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 702675.
- Hernandez-Cravero, B., Gallino, S., Florman, J., Vranych, C., Diaz, P., Elgoyhen, A. B., ... & De Mendoza, D. (2022). Cannabinoids activate the insulin pathway to modulate mobilization of cholesterol in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, 18(11), e1010346.
- Holly, K. J., Williams, J. B., & Hering, K. (2020). Degradants Formed During Phytocannabinoid Processing. *Cayman Currents*.
- Hrubá, L., & McMahon, L. R. (2014). The cannabinoid agonist HU-210: pseudo-irreversible discriminative stimulus effects in rhesus monkeys. *European journal of pharmacology*, 727, 35-42.
- Huestis, M. A. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1770.
- International Association for the Study of Pain (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by an IASP subcommittee on taxonomy. *Pain* 6, 249-252.
- Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>.
- Juárez-Contreras, R., Méndez-Reséndiz, K. A., Rosenbaum, T., González-Ramírez, R., & Morales-Lázaro, S. L. (2020). TRPV1 channel: A noxious signal transducer that affects mitochondrial function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8882.
- Karila, L., Benyamina, A., Blecha, L., Cottencin, O., & Billieux, J. (2016). The synthetic cannabinoids phenomenon. *Current pharmaceutical design*, 22(42), 6420-6425.
- Kendall, D. A., & Yudowski, G. A. (2017). Cannabinoid receptors in the central nervous system: their signaling and roles in disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 294.
- Kendrou, S., Fitzgerald, L. A., Murray, I., & Hanna, A. (2017). Physiology, nociceptive pathways.
- Khan, S., & Chang, R. (2013). Anatomy of the vestibular system: a review. *NeuroRehabilitation*, 32(3), 437-443.
- Kim, Y., Park, Y., Hwang, J., & Kwack, K. (2018). Comparative genomic analysis of the human and nematode *Caenorhabditis elegans* uncovers potential reproductive genes and disease associations

in humans. *Physiological Genomics*, 50(12), 1050-1057.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00063.2018>

Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2022). Cannabinoids in health and disease. *Dialogues in clinical neuroscience*.

Lahaise, M., Boujenoui, F., & Beaudry, F. (2023). Cannflavins isolated from *Cannabis sativa* impede *Caenorhabditis elegans* response to noxious heat. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1-14.

Lopez-Rodriguez, A. B., Siopi, E., Finn, D. P., Marchand-Leroux, C., Garcia-Segura, L. M., Jafarian-Tehrani, M., & Viveros, M. P. (2015). CB1 and CB2 cannabinoid receptor antagonists prevent minocycline-induced neuroprotection following traumatic brain injury in mice. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 25(1), 35–45. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht202>.

Lötsch, J., Weyer-Menkhoff, I., & Tegeder, I. (2018). Current evidence of cannabinoid-based analgesia obtained in preclinical and human experimental settings. *European journal of pain*, 22(3), 471-484.

Maccarrone, M., & Finazzi-Agro, A. (2003). The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 10(9), 946-955.

Maccarrone, M. (2020). Phytocannabinoids and endocannabinoids: Different in nature. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 31, 931-938.

Martins, A. M., Marto, J. M., Johnson, J. L., & Graber, E. M. (2021). A review of systemic minocycline side effects and topical minocycline as a safer alternative for treating acne and rosacea. *Antibiotics*, 10(7), 757.

Martin, P., Wagh, V., Reis, S. A., Erdin, S., Beauchamp, R. L., Shaikh, G., ... & Ramesh, V. (2020). TSC patient-derived isogenic neural progenitor cells reveal altered early neurodevelopmental phenotypes and rapamycin-induced MNK-eIF4E signaling. *Molecular autism*, 11(1), 1-15.

Marzo, V. D., & Petrocellis, L. D. (2006). Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu. Rev. Med.*, 57, 553-574.

Matei, D., Trofin, D., Iordan, D. A., Onu, I., Condurache, I., Ionite, C., & Buculei, I. (2023). The Endocannabinoid System and Physical Exercise. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1989.



- McHann, M., Barnes, R., Castro-Piedras, I., & Guindon, J. (2023). Tumor growth and the endocannabinoid system: Investigating CB2 agonists. In *Neurobiology and Physiology of the Endocannabinoid System* (pp. 529-541). Academic Press.
- Mehle, E. A., Sojka, S. E., Medha, K. C., Zel, R. M., Reese, S. J., & Ferkey, D. M. (2020). The *C. elegans* TRPV channel proteins OSM-9 and OCR-2 contribute to aversive chemical sensitivity. *Micropublication Biology*, 2020.
- Mickle, A. D., Shepherd, A. J., & Mohapatra, D. P. (2015). Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Progress in molecular biology and translational science*, 131, 73-118.
- Mickle, A. D., Shepherd, A. J., & Mohapatra, D. P. (2016). Nociceptive TRP channels: sensory detectors and transducers in multiple pain pathologies. *Pharmaceuticals*, 9(4), 72.
- Mody, P. H., Dos Santos, N. L., Barron, L. R., Price, T. J., & Burton, M. D. (2020). eIF4E phosphorylation modulates pain and neuroinflammation in the aged. *Geroscience*, 42(6), 1663-1674.
- Moreira, F. A., Grieb, M., & Lutz, B. (2009). Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 23(1), 133-144.
- Mori, I. (1999). Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annual review of genetics*, 33(1), 399-422.
- Muir, W. W. (2010). Pain: mechanisms and management in horses. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(3), 467-480.
- Muller, C., Morales, P., & Reggio, P. H. (2019). Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 487.
- Nagy, I., Friston, D., Valente, J. S., Perez, J. V. T., & Andreou, A. P. (2014). Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. *Capsaicin as a Therapeutic Molecule*, 39-76.
- Nahler, G., & Jones, T. M. (2018). Pure cannabidiol versus cannabidiol-containing extracts: distinctly different multi-target modulators. *Journal of Alternative Complementary & Integrative Medicine*, 4(048), 1-11.
- Nikolenko, V. N., Shelomentseva, E. M., Tsvetkova, M. M., Abdeeva, E. I., Giller, D. B., Babayeva, J. V., ... & Sinelnikov, M. Y. (2022). Nociceptors: their role in body's defenses, tissue specific variations and anatomical update. *Journal of pain research*, 867-877.

Nkambeu B, Salem JB, Beaudry F (2023) Antinociceptive Activity of Vanilloids in *Caenorhabditis elegans* is Mediated by the Desensitization of the TRPV Channel OCR-2 and Specific Signal Transduction Pathways. *Neurochem Res* 48:1900–1911. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03876-1>

Nkambeu B, Salem JB, Beaudry F (2021) Eugenol and Other Vanilloids Hamper *Caenorhabditis elegans* Response to Noxious Heat. *Neurochem Res* 46:252–264. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03159-z>

Nkambeu B, Salem JB, Beaudry F (2020) Capsaicin and Its Analogues Impede Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat. *Neurochem Res* 45:1851–1859. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03049-4>

Nkambeu, B. (2018). Études comparatives de la nociception chez *Caenorhabditis elegans* souche sauvage (N2) et mutants (*egl-3* et *egl-21*) (Doctoral dissertation, Université de Montréal).

Oakes, M., Law, W. J., Clark, T., Bamber, B. A., & Komuniecki, R. (2017). Cannabinoids Activate Monoaminergic Signaling to Modulate Key *C. elegans* Behaviors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(11), 2859–2869. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3151-16.2017>.

Oakes, M., Law, W. J., & Komuniecki, R. (2019). Cannabinoids Stimulate the TRP Channel-Dependent Release of Both Serotonin and Dopamine to Modulate Behavior in *C. elegans*. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 39(21), 4142–4152. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2371-18.2019>.

Ohnishi, K., Saito, S., Miura, T., Ohta, A., Tominaga, M., Sokabe, T., & Kuhara, A. (2020). OSM-9 and OCR-2 TRPV channels are accessorial warm receptors in *Caenorhabditis elegans* temperature acclimatisation. *Scientific Reports*, 10(1), 18566. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75302-3>.

Oikonomou, G., & Shaham, S. (2011). The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia*, 59(9), 1253–1263.

Oláh, A., Szekanecz, Z., & Bíró, T. (2017). Targeting cannabinoid signaling in the immune system: “High”-ly exciting questions, possibilities, and challenges. *Frontiers in Immunology*, 8, 1487.

Osterweis, M., Kleinman, A., & Mechanic, D. (1987). Pain and disability: Clinical, behavioral, and public policy perspectives.

Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2009). Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacological research*, 60(2), 85–92.

- Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Pérez-Acevedo, A. P., Hladun, O., Torres-Moreno, M. C., Muga, R., ... & Farré, M. (2018). Cannabinoids: from pot to lab. *International journal of medical sciences*, *15*(12), 1286.
- Park, K. S. (2023). Sensory Receptors. In *Humans and Electricity: Understanding Body Electricity and Applications* (pp. 123-145). Cham: Springer International Publishing.
- Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., & Luo, J. (2022). A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *130*(4), 439-456.
- Pertwee, R. G. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Progress in neurobiology*, *63*(5), 569-611.
- Phillips, J. K., Ford, M. A., Bonnie, R. J., & National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2017). Trends in opioid use, harms, and treatment. In *Pain Management and the opioid epidemic: balancing societal and individual benefits and risks of prescription opioid use*. National Academies Press (US).
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, *161*(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (2003). Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug news & perspectives*, *16*(3), 133-140.
- Rankin, C. H., Beck, C. D., & Chiba, C. M. (1990). *Caenorhabditis elegans*: a new model system for the study of learning and memory. *Behavioural brain research*, *37*(1), 89-92.
- Rankin, L. C., & Artis, D. (2018). Beyond host defense: emerging functions of the immune system in regulating complex tissue physiology. *Cell*, *173*(3), 554-567.
- Regan, J. M., & Peng, P. (2000). Neurophysiology of cancer pain. *Cancer Control*, *7*(2), 111-119.
- Richmond, J. (2005). Synaptic function. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*.
- Rock, E. M., & Parker, L. A. (2016). Cannabinoids as potential treatment for chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Frontiers in pharmacology*, *7*, 221.

- Romero-Sandoval, E. A., Asbill, S., Paige, C. A., & Byrd-Glover, K. (2015). Peripherally restricted cannabinoids for the treatment of pain. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10), 917-925.
- Roque-Bravo, R., Silva, R. S., Malheiro, R. F., Carmo, H., Carvalho, F., da Silva, D. D., & Silva, J. P. (2023). Synthetic cannabinoids: A pharmacological and toxicological overview. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 63, 187-209.
- Rosikon, K. D., Bone, M. C., & Lawal, H. O. (2023). Regulation and modulation of biogenic amine neurotransmission in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Physiology*, 14, 970405.
- Rubin, D. I. (2021). Basics of Neurophysiology. *Clinical Neurophysiology*, 9.
- Salem JB, Nkambeu B, Arvanitis DN, Beaudry F (2022) Resiniferatoxin Hampers the Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat, and Pathway Analysis Revealed that the Wnt Signaling Pathway is Involved. *Neurochem Res* 47:622–633. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03471-2>.
- Samat, A., Tomlinson, B., Taheri, S., & Thomas, G. N. (2008). Rimonabant for the treatment of obesity. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery (Discontinued)*, 3(3), 187-193.
- Seely, K. A., Brents, L. K., Franks, L. N., Rajasekaran, M., Zimmerman, S. M., Fantegrossi, W. E., & Prather, P. L. (2012). AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology*, 63(5), 905-915.
- Sette, C. V. D. M., Schoueri, J. H., Cubero, D. D. I. G., & Del Giglio, A. (2023). Use of medical cannabis in cancer-related symptoms: A systematic review. *Journal of Clinical Oncology*, 41(16\_suppl), e24170-e24170.
- Shahbazi, F., Grandi, V., Banerjee, A., & Trant, J. F. (2020). Cannabinoids and cannabinoid receptors: The story so far. *Iscience*, 23(7).
- Shen, P. S., Yang, X., DeCaen, P. G., Liu, X., Bulkley, D., Clapham, D. E., & Cao, E. (2016). The structure of the polycystic kidney disease channel PKD2 in lipid nanodiscs. *Cell*, 167(3), 763-773.
- Shevyrin, V. A., & Morzherin, Y. Y. (2015). Cannabinoids: structures, effects, and classification. *Russian Chemical Bulletin*, 64, 1249-1266.
- Shim, J. Y., Welsh, W. J., & Howlett, A. C. (2003). Homology model of the CB1 cannabinoid receptor: sites critical for nonclassical cannabinoid agonist interaction. *Peptide Science*, 71(2), 169-189.

Silver, R.J., 2019. The Endocannabinoid System of Animals. *Animals* 9, 686. <https://doi.org/10.3390/ani9090686>.

Song, M. Y., & Yuan, J. X. J. (2010). Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation*, 99-108.

Srivastava, G., & Apovian, C. (2018). Future pharmacotherapy for obesity: new anti-obesity drugs on the horizon. *Current obesity reports*, 7, 147-161.

Stella, B., Baratta, F., Della Pepa, C., Arpicco, S., Gastaldi, D., & Dosio, F. (2021). Cannabinoid formulations and delivery systems: Current and future options to treat pain. *Drugs*, 81, 1513-1557.

Szolcsányi, J., & Sándor, Z. (2012). Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends in pharmacological sciences*, 33(12), 646-655.

Tai, S., & Fantegrossi, W. E. (2014). Synthetic cannabinoids: pharmacology, behavioral effects, and abuse potential. *Current addiction reports*, 1, 129-136.

Tapasak, B., Edelmayer, L., & Seidman, M. D. (2022). Endocannabinoid System and the Otolaryngologist. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 55(5), 1101-1110.

Totsch SK, Sorge RE (2017) Immune system involvement in specific pain conditions. *Mol Pain* 13:1744806917724559. <https://doi.org/10.1177/1744806917724559>.

Treinin, M., & Jin, Y. (2021). Cholinergic transmission in *C. elegans*: functions, diversity, and maturation of ACh-activated ion channels. *Journal of Neurochemistry*, 158(6), 1274-1291.

Uttam S, Wong C, Price TJ, Khoutorsky A (2018) eIF4E-Dependent Translational Control: A Central Mechanism for Regulation of Pain Plasticity. *Frontiers Genetics* 9:470. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00470>.

Vader, K., Bostick, G. P., Carlesso, L. C., Hunter, J., Mesaroli, G., Perreault, K., Tousignant-Laflamme, Y., Tupper, S., Walton, D. M., Wideman, T. H., & Miller, J. (2021). La définition révisée de la douleur de l'IASP et les notes complémentaires : les considérations pour la profession de la physiothérapie. *Physiotherapy Canada. Physiotherapie Canada*, 73(2), 106–109. <https://doi.org/10.3138/ptc-2020-0124-gef>.

Vangeel, L., & Voets, T. (2019). Transient receptor potential channels and calcium signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(6), a035048.

Vassort, G., & Fauconnier, J. (2008). Transient receptor potential, TRP channels: a new family of channels broadly expressed. *Medecine Sciences: M/S*, 24(2), 163-168.

Van Der Stelt, M., & Di Marzo, V. (2004). Endovanilloids: putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *European Journal of Biochemistry*, 271(10), 1827-1834.

Veigl, S. J. (2021). Small RNA research and the scientific repertoire: A tale about biochemistry and genetics, crops and worms, development and disease. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 43(1), 30.

Vriens, J., Owsianik, G., Voets, T., Droogmans, G., & Nilius, B. (2004). Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflügers Archiv*, 449, 213-226.

Vučković, S., Srebro, D., Vujović, K. S., Vučetić, Č., & Prostran, M. (2018). Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1259. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01259>.

Wang, F., Wang, J., Zhao, T., Zhang, Y., & Li, Q. (2019). CB2 receptor agonist JWH133 activates AMPK to inhibit growth of C6 glioma cells. *Open Life Sciences*, 14(1), 363-375.

Wang, M., & Thyagarajan, B. (2022). Pain pathways and potential new targets for pain relief. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 110-123.

Whalen, S. G., Gingras, A. C., Amankwa, L., Mader, S., Branton, P. E., Aebersold, R., & Sonenberg, N. (1996). Phosphorylation of eIF-4E on Serine 209 by Protein Kinase C Is Inhibited by the Translational Repressors, 4E-binding Proteins (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(20), 11831-11837.

White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314(1165), 1-340.

Willis, W. D., & Westlund, K. N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society*, 14(1), 2-31. <https://doi.org/10.1097/00004691-199701000-00002>.

Xiao, R., & Xu, X. S. (2009). Function and regulation of TRP family channels in *C. elegans*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 458, 851-860.

Xu, Y. (2015). Neural Circuit Dependence of Acute and Subacute Nociception in *C. Elegans*.

Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., & Basir, R. (2018). General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2164.

Yoon, H., Shaw, J. L., Haigis, M. C., & Greka, A. (2021). Lipid metabolism in sickness and in health: Emerging regulators of lipotoxicity. *Molecular cell*, *81*(18), 3708-3730.

Zhang, J. (2019). Basic neural units of the brain: neurons, synapses and action potential. arXiv preprint arXiv:1906.01703.

Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C. M., Carr, R. W., Kobayashi, J. I., ... & Reeh, P. W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1. 8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*, *447*(7146), 856-859.

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, *19*(3), 833.

Zou, Y., Yang, R., Li, L., Xu, X., & Liang, S. (2021). Purinergic signaling: a potential therapeutic target for depression and chronic pain. *Purinergic Signalling*, 1-10.

Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* *10*:1523. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>.

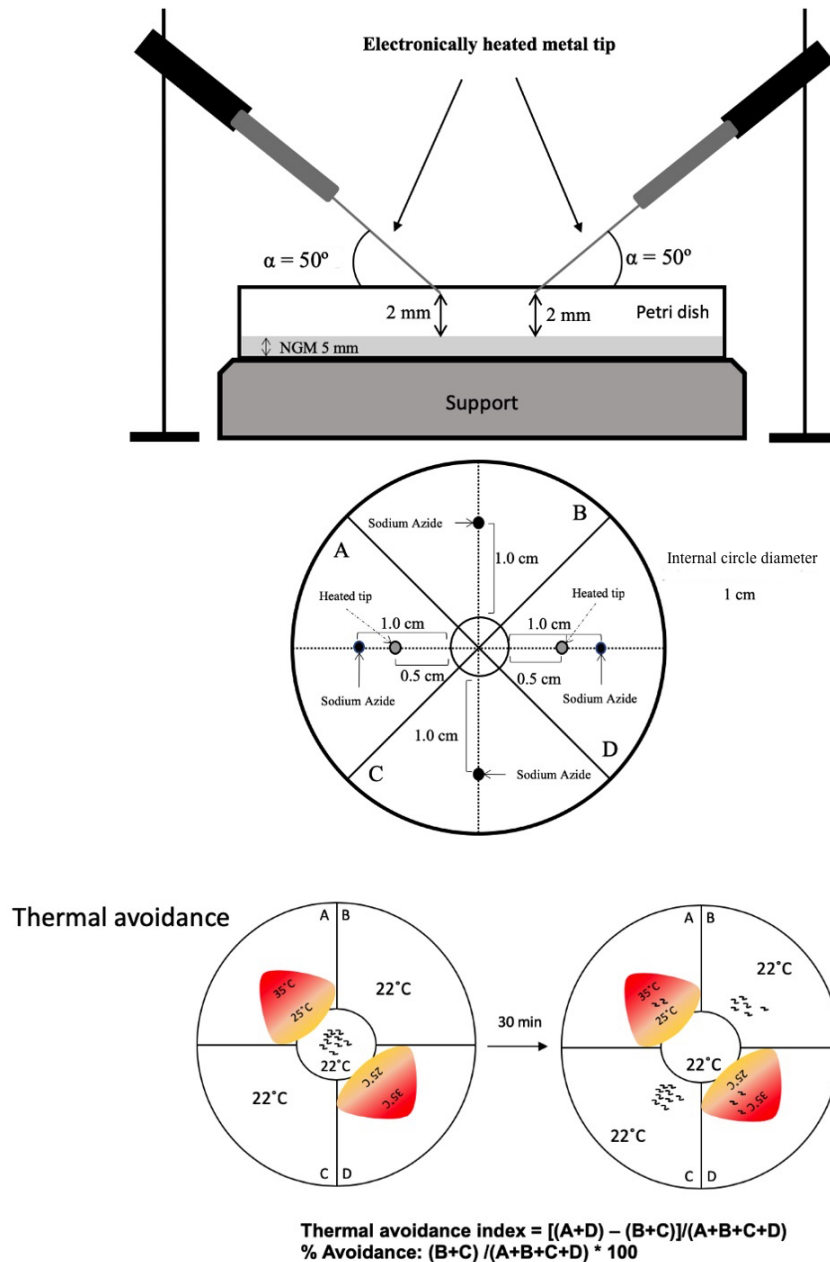
Zhou WBS, Meng J, Zhang J (2021) Does Low Grade Systemic Inflammation Have a Role in Chronic Pain? *Front Mol Neurosci* *14*:785214. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.785214>.

Zhou WBS, Shi XQ, Liu Y, et al (2023) Unbiased proteomic analysis detects painful systemic inflammatory profile in the serum of nerve-injured mice. *Pain* *164*:e77–e90.

## Annexes

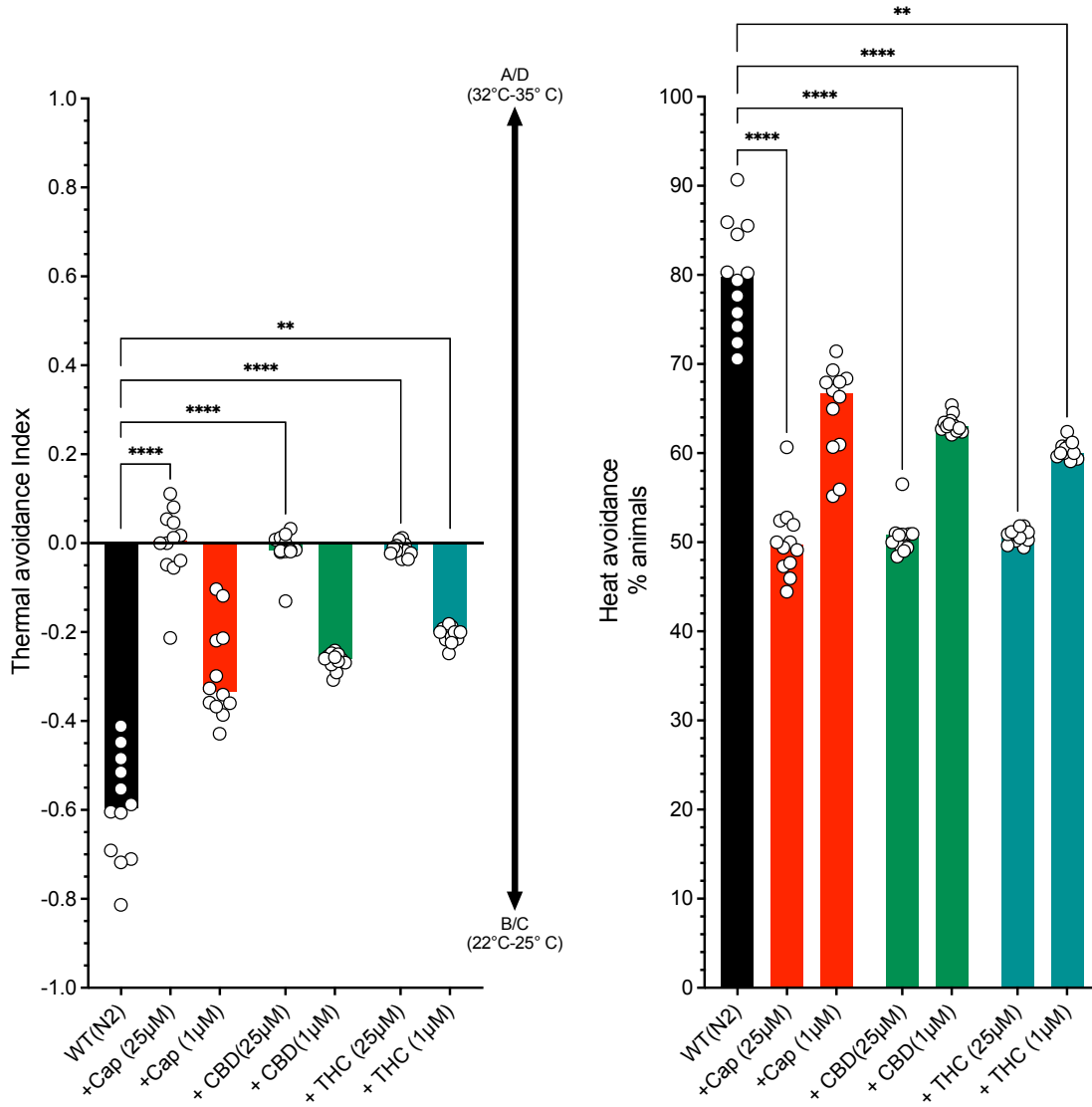
### Supplementary Data

**Figure S1.** A schematic of the four quadrants assay adapted from Margie *et al.* (2013). For head avoidance assay, plates were divided into quadrants two test (A and D) and two controls (B and C). Sodium azide was added to all four quadrants to paralyze nematodes. *C. elegans* were added at the center of the plate (typically, n = 50 to 300) and after 30 minutes, animals were counted on each quadrant. Only animals outside the inner circle were scored. The calculation of thermal avoidance index was performed as described.

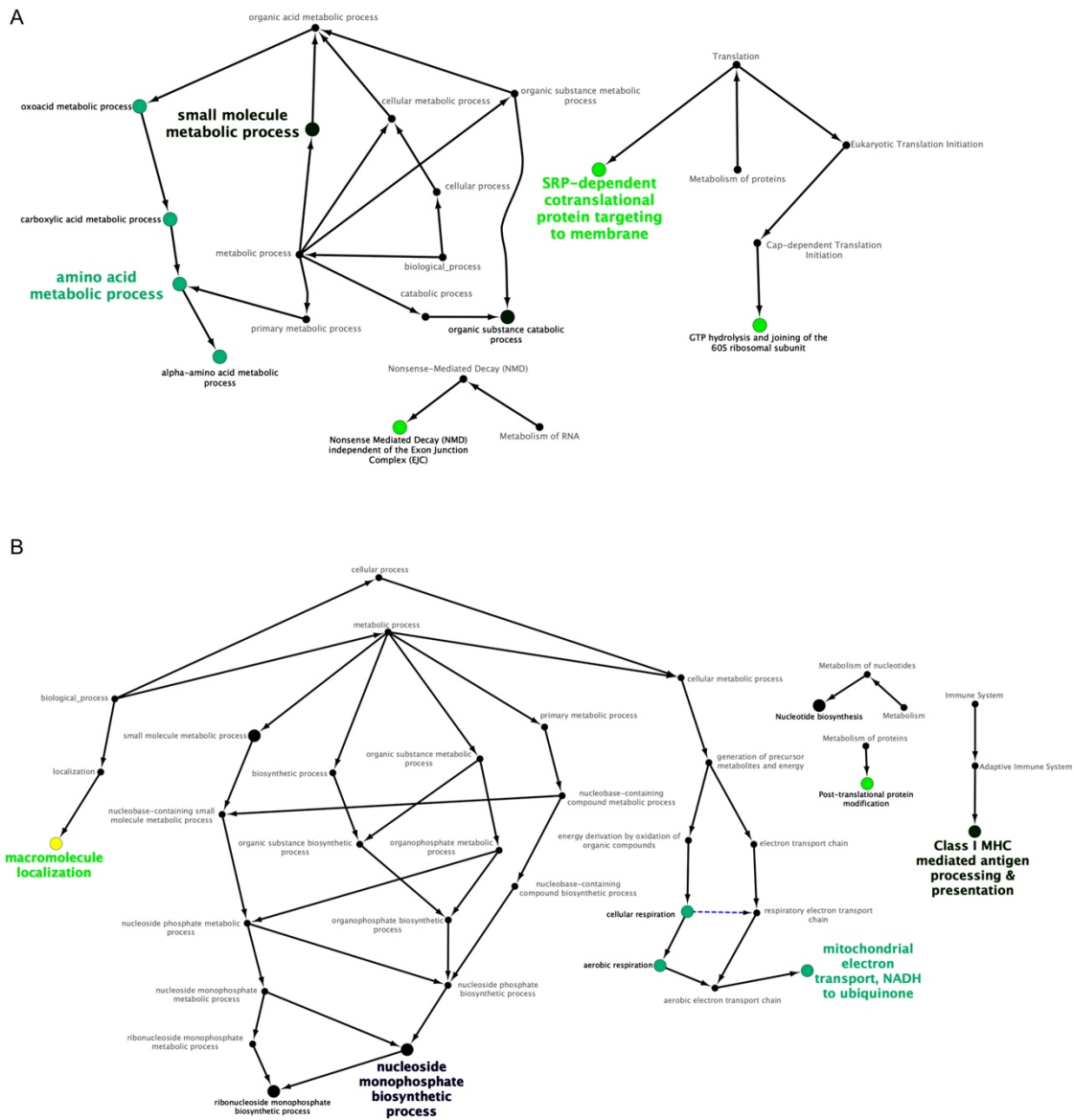




**Figure S2.** Assessment of the pharmacological effect of CBD and THC compared to Capsaicin on thermal avoidance in *C. elegans*. Nematodes were exposed to Cap, CBD or THC for 60 min prior behavior experimentations. Individual values and median are display and derived from at least 12 independent experiments for each experimental group. Antinociceptive effect were observed following *C. elegans* exposition to Cap, CBD and THC. Similar effects were observed at 25  $\mu$ M and 1  $\mu$ M for all 3 compounds. \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ; non-parametric Kruskal-Wallis test - Dunn's multiple comparisons test.



**Figure S3.** Functional characterization using Metascape combined with the GO biological processes and REACTOME databases. Parent to root node analysis of enriched GO biological processes and Reactome terms observed following *C. elegans* exposition to CBD (A) and THC (B). Node analyses were performed using ClueGO and CluePedia



**Table S1:** Data of tested strains and experimental groups described in Figure 2.

Comparison of the mobility and bias of WT (N2) and selected mutant nematodes in plates divided into quadrants conserved at a constant temperature (22°C) without the application of a stimulus (negative control).

Experimental group	Number of petri dishes	Total number of nematodes counted	Median % animals	Maximum	Minimum
N2(WT)	12	987	50.9	53.7	47.3
+ CBD 0.25μM	12	1410	50.00	53.0	49.0
+ CBD 1μM	12	2298	50.5	52.0	49.0
+ CBD 5μM	12	1278	50.0	51.7	49.2
+ CBD 10μM	12	1558	50.0	51.0	50.0
+ CBD 25μM	12	739	50.0	52.0	48.0
+ THC 0.25μM	12	1908	50.0	54.0	47.0
+ THC 1μM	12	2888	50.0	54.0	48.0
+ THC 5μM	12	1579	50.0	52.0	49.0
+ THC 10μM	12	1592	50.0	51.0	49.0
+ THC 25μM	12	1819	50.0	52.0	49.0
<i>osm-9</i> (JY190)	12	1834	50.8	52.7	48.5
+ CBD 10μM	12	1917	50.8	52.7	46.9
+ THC 10μM	12	1552	50.7	52.6	48.3
<i>ocr-2</i> (JY-243)	12	1590	51.0	52.3	44.7
+ CBD 10μM	12	1828	51.2	52.7	47.3
+ THC 10μM	12	1627	50.8	53.1	45.8
<i>npr-19</i> (ok2068)	12	1821	50.3	52.3	49.0
+ CBD 10μM	12	1500	50.0	52.4	47.6
+ THC 10μM	12	1529	50.4	51.4	47.7
<i>npr-32</i> (ok2541)	12	1984	50.0	52.0	49.2
+ CBD 10μM	12	1922	50.4	52.3	47.6
+ THC 10μM	12	1607	50.7	51.7	48.2

**Table S2:** Data of tested strains and experimental groups described in Figure 3.  
Assessment of the pharmacological effects of CBD on thermal avoidance in *C. elegans*.

Experimental group	Number of petri dishes	Total number of nematodes counted	Median % animals	Maximum	Minimum
N2(WT)	12	1405	79.8	90.7	70.6
+ CBD 0.25 $\mu$ M	12	1555	67.0	68.8	65.1
+ CBD 1 $\mu$ M	12	1833	63.0	65.4	62.1
+ CBD 5 $\mu$ M	12	1932	62.2	63.7	61.2
+ CBD 10 $\mu$ M	12	1993	58.7	59.7	57.5
+ CBD 25 $\mu$ M	12	844	50.8	56.5	48.4
+ CBD 0.25 $\mu$ M 6h latency	12	1586	78.2	78.7	77.1
+ CBD 1 $\mu$ M 6h latency	12	1748	78.8	84.6	76.3
+ CBD 5 $\mu$ M 6h latency	12	2922	77.7	79.7	77.0
+ CBD 10 $\mu$ M 6h latency	12	2001	78.2	78.8	76,3
+ CBD 25 $\mu$ M 6h latency	12	917	79.4	84.9	71.1

**Table S3:** Data of tested strains and experimental groups described in Figure 4.  
Assessment of the pharmacological effects of THC on thermal avoidance in *C. elegans*.

Experimental group	Number of petri dishes	Total number of nematodes counted	Median % animals	Maximum	Minimum
N2(WT)	12	1405	79.8	90.7	70.6
+ THC 0.25 $\mu$ M	12	1335	66.7	69.6	65.4
+ THC 1 $\mu$ M	12	2330	60.0	62.4	59.1
+ THC 5 $\mu$ M	12	1361	58.7	59.8	56.6
+ THC 10 $\mu$ M	12	1430	55.8	57.7	54.3
+ THC 25 $\mu$ M	12	1895	50.8	51.8	49.4
+ THC 0.25 $\mu$ M 6h latency	12	1667	68.5	69.4	67.4
+ THC 1 $\mu$ M 6h latency	12	2404	62.3	63.5	61.2
+ THC 5 $\mu$ M 6h latency	12	1956	61.8	63.0	60.1
+ THC 10 $\mu$ M 6h latency	12	2132	57,8	58.8	55.8
+ THC 25 $\mu$ M 6h latency	12	2087	52.3	53.2	50.4

**Table S4:** Data of tested strains and experimental groups described in Figure 5. Identification of vanilloid receptor orthologs responsible for the THC and CBD -induced antinociceptive effects.

Experimental group	Number of petri dishes	Total number of nematodes counted	Median % animals	Maximum	Minimum
<i>osm-9</i> (JY190)	12	1398	61.9	64.8	59.3
+ CBD 10 $\mu$ M	12	1833	60.3	63.4	56.1
+ THC 10 $\mu$ M	12	2842	51.1	51.7	49.3
<i>ocr-2</i> (JY-243)	12	1092	62.7	66.4	58.8
+ CBD 10 $\mu$ M	12	1095	57.5	62.9	51.4
+ THC 10 $\mu$ M	12	1126	51.8	56.6	46.4
<i>npr-19</i> (ok2068)	12	1105	73.9	75.8	70.0
+ CBD 10 $\mu$ M	12	1398	63.4	64.8	62.4
+ THC 10 $\mu$ M	12	1434	71.8	73.5	69.5
<i>npr-32</i> (ok2541)	12	1391	69.3	73.8	68.4
+ CBD 10 $\mu$ M	12	1910	55.8	60.9	53.5
+ THC 10 $\mu$ M	12	1519	69.7	72.6	66.5

**Table S5** Protein expressed differentially following exposition to CBD

Accession	Abundance Ratio (log2): (CBD) / (CTL)	Abundance Ratio P-Value: (CBD) / (CTL)
Q95Q18	3.9	1.733E-06
Q9XTV4	3.16	6.917E-06
Q9BIB8	2.87	1.255E-07
O61880	2.84	1.557E-05
O02267	2.47	3.032E-02
Q9U1X0	2.44	1.647E-03
Q17802	2.4	2.041E-05
Q09244	2.22	1.552E-05
Q22641	2.18	1.323E-02
Q93761	2.1	8.844E-03
Q17568	1.95	1.587E-05
Q9N4I3	1.81	2.513E-04
G5EDB6	1.75	4.523E-07
Q19869	1.67	1.240E-06
O01868	1.66	6.057E-07
Q9XVR3	1.66	1.861E-06
P52814	1.65	2.822E-05
Q02335	1.64	1.507E-04
B7FAR9	1.62	1.138E-02
O62388	1.62	4.755E-05
Q9U332	1.6	2.132E-06
Q21018	1.56	4.941E-02
Q9U353	1.54	4.071E-05
Q5F4W0	1.51	4.930E-05
H2L0J1	1.48	5.731E-07
Q966B4	1.48	1.046E-06
Q9XU29	1.47	1.652E-04
O17328	1.46	2.837E-02
Q23058	1.44	2.219E-03
Q22716	1.44	1.073E-02
G5EG13	1.42	1.137E-03
Q9XU97	1.4	1.345E-06
Q20660	1.4	5.678E-04
Q22714	1.37	2.285E-02
Q27389	1.35	6.827E-09
Q9BKU5	1.32	8.834E-07

O76680	1.31	4.417E-04
P10771	1.31	1.840E-05
Q21930	1.3	9.429E-07
P34334	1.3	2.012E-07
Q9XVS2	1.3	1.175E-03
O02639	1.29	7.589E-09
G8JY81	1.27	7.479E-04
P48166	1.26	3.144E-06
P53588	1.21	2.168E-02
Q9GUH8	1.21	1.532E-05
H2KYR1	1.2	4.471E-09
Q19973	1.19	4.538E-02
Q22037	1.15	6.300E-04
Q966I7	1.14	5.651E-05
H2L049	1.1	5.351E-05
Q9N3G0	1.09	5.903E-03
Q21559	1.08	4.821E-06
P34333	1.06	1.900E-05
A3QMC5	1.06	4.118E-08
Q65XX4	1.06	2.224E-05
Q27511	1.04	3.739E-04
G5ECR7	1.03	3.069E-05
Q9XVM0	1.02	9.946E-03
Q22469	-1	1.610E-04
P34531	-1.01	5.444E-06
Q17571	-1.02	5.940E-04
Q86D01	-1.03	1.084E-03
Q17993	-1.04	2.497E-02
Q09285	-1.05	6.466E-04
Q10663	-1.06	4.195E-07
Q9XVJ3	-1.06	1.433E-04
G5EDY2	-1.06	1.577E-02
Q10657	-1.08	4.493E-03
Q20456	-1.1	2.491E-02
Q93244	-1.11	1.178E-02
Q21534	-1.12	1.114E-03
Q20277	-1.13	1.292E-03
O44906	-1.14	4.077E-06
Q21284	-1.15	1.368E-03

Q9U307	-1.16	8.089E-04
P53795	-1.17	2.821E-02
O17004	-1.18	2.621E-03
H2KYT5	-1.19	1.705E-06
Q19724	-1.19	3.151E-06
P52275	-1.19	4.591E-06
H2KYZ3	-1.2	1.444E-04
A0A7R9SUJ3	-1.24	2.213E-05
Q20264	-1.25	2.216E-02
P92005	-1.26	1.132E-04
P17343	-1.27	4.325E-02
Q86NE0	-1.29	9.818E-05
P91017	-1.3	4.116E-05
O02626	-1.33	7.758E-07
Q18450	-1.34	2.253E-04
Q22814	-1.34	7.659E-03
Q94051	-1.36	1.653E-04
Q03577	-1.41	1.904E-06
Q9XWG2	-1.42	2.622E-04
Q7KX00	-1.43	3.217E-05
Q17334	-1.44	3.184E-09
O01532	-1.44	5.602E-05
Q18990	-1.44	4.552E-02
Q19371	-1.48	1.126E-07
Q09545	-1.51	1.300E-05
A0A3B1E057	-1.52	2.280E-04
Q9N4X8	-1.58	1.608E-02
Q95QA6	-1.6	1.778E-04
P34355	-1.6	4.190E-03
P34685	-1.61	2.871E-03
P43508	-1.65	2.502E-06
Q18629	-1.67	1.316E-05
P41949	-1.71	6.013E-06
Q9N393	-1.77	6.933E-03
Q22515	-1.83	3.238E-06
P34604	-1.89	8.228E-04
Q09567	-1.9	3.589E-05
O02304	-1.92	2.374E-04
Q8MXD9	-1.95	9.879E-06



P90983	-1.97	4.393E-06
Q17556	-2.01	3.303E-03
Q9XUW5	-2.06	1.925E-06
Q20964	-2.11	6.590E-03
Q20151	-2.2	1.690E-03
Q95017	-2.46	8.447E-05
G5EFI4	-2.74	5.182E-07
B3KLZ9	-2.89	4.702E-10
Q22167	-3.09	3.119E-02
P49197	-3.26	6.189E-07
P41847	-3.37	2.175E-03
Q18231	-4.17	2.092E-08
P92004	-4.24	9.050E-04

**Table S6** Protein expressed differentially following exposition to THC

Accession	Abundance Ratio (log2): (THC) / (CTL)	Abundance Ratio P-Value: (THC) / (CTL)
Q95Q18	4.54	8.491E-07
Q9BIB8	3.49	2.338E-08
Q17392	3.27	3.226E-10
Q9U1X0	2.69	1.174E-03
P91148	2.64	1.695E-11
Q9XVR3	2.57	2.519E-07
O61880	2.47	4.058E-05
G8JY81	2.43	3.494E-05
Q17802	2.42	2.030E-05
Q9N2Z7-2	2.38	1.092E-03
C0P274	2.37	2.000E-06
Q9BHK7	2.2	9.836E-04
Q93289	2.13	1.771E-05
Q09244	2.07	1.921E-05
H2FLF9	2.05	1.352E-05
Q9XV68	2.01	3.433E-03
P10771	2	1.653E-06
P91017	1.95	1.670E-06
O02267	1.93	3.480E-02
O45278	1.84	1.643E-06
Q18689	1.83	1.102E-02
Q9N5K6	1.83	1.117E-04
Q18450	1.81	3.712E-05
Q22641	1.77	1.664E-02
A0A7R9SUJ3	1.73	2.518E-06
Q21018	1.73	2.602E-02
Q9XTV4	1.73	2.460E-04
Q9N4I3	1.71	3.590E-04
O02304	1.68	1.593E-04
Q18629	1.66	5.422E-06
G5EEK5	1.65	2.016E-03
O17328	1.6	4.941E-02
O02626	1.59	3.846E-07
P45971	1.59	1.256E-03
G5EG13	1.58	7.485E-04
O62191	1.57	3.142E-05

Q19546	1.54	5.720E-04
O76680	1.54	1.791E-04
Q9XVS1	1.5	5.537E-04
O17536	1.48	1.865E-05
Q9N5S7	1.48	8.944E-05
Q9XVM0	1.47	1.709E-03
A0A1N7SYP6	1.46	2.023E-05
Q22037	1.4	1.915E-04
G5EDB6	1.39	1.286E-06
O62388	1.38	1.070E-04
Q9XW38	1.36	5.134E-03
G5EGT7	1.32	4.032E-03
P41949	1.32	2.124E-05
Q17568	1.31	1.406E-04
G5EDV3	1.31	1.120E-02
Q02335	1.29	4.685E-04
Q966B4	1.27	1.803E-06
Q86G90	1.23	1.746E-07
Q19371	1.23	3.297E-07
Q9U1W8	1.2	5.828E-07
Q9N5G3	1.19	3.190E-03
P54889	1.18	1.335E-05
Q9N3G0	1.17	3.814E-03
H2L049	1.17	3.014E-05
Q27511	1.17	1.795E-04
O16997	1.16	4.451E-05
P45895	1.15	2.611E-03
P53588	1.15	2.862E-02
G5ECR7	1.15	1.520E-05
Q18421	1.13	1.551E-06
Q27389	1.11	5.287E-08
Q9BKU5	1.1	1.850E-06
H2KYR1	1.09	1.551E-08
O01868	1.08	4.493E-06
H2L0J1	1.07	2.157E-06
B7FAR9	1.05	4.444E-02
Q19311	1.05	7.158E-03
Q9XVS4	1.05	1.068E-06
G5EE74	1.03	9.983E-03

Q21559	1	7.882E-06
P34333	1	2.196E-05
P92005	-1	6.552E-04
Q18786	-1.02	2.220E-05
O16374	-1.04	4.740E-03
P34531	-1.04	5.881E-06
Q09580	-1.05	4.432E-03
P43508	-1.06	4.906E-05
Q23597	-1.06	9.078E-04
Q18211	-1.06	7.862E-06
Q22100	-1.06	3.255E-04
P41992	-1.08	9.429E-06
Q18359	-1.08	5.639E-04
P91844	-1.08	2.407E-03
Q10943	-1.09	1.664E-05
Q95YA9	-1.11	1.240E-02
G5EFK4	-1.12	7.506E-04
G5EBI0	-1.12	5.683E-06
P90983	-1.13	7.621E-05
P34629	-1.14	2.784E-05
G5EEV5	-1.14	1.298E-03
Q21735	-1.2	2.900E-04
Q03577	-1.2	5.238E-06
Q9XUW5	-1.2	6.175E-05
O44608	-1.21	8.029E-04
Q09541	-1.23	4.109E-03
Q22469	-1.25	4.520E-05
Q21898	-1.26	7.332E-06
Q09979	-1.27	2.259E-04
Q20277	-1.28	6.623E-04
Q09285	-1.28	1.760E-04
Q8IFX7	-1.3	1.881E-04
Q86NE0	-1.31	1.246E-04
P53795	-1.31	1.200E-02
G5EDE8	-1.32	1.896E-03
P34604	-1.33	5.665E-03
Q9XVJ3	-1.38	2.585E-05
G4SLZ9	-1.39	1.228E-04
P55326	-1.4	1.049E-02

Q9GZH3	-1.41	1.177E-05
A8WHP8	-1.43	1.054E-02
Q10657	-1.44	8.163E-04
P49197	-1.45	4.887E-05
O76367	-1.5	1.136E-06
Q17571	-1.54	7.594E-05
Q9XWG2	-1.54	2.201E-04
Q19063	-1.66	2.560E-02
B3KLZ9	-1.7	1.931E-07
O01532	-1.7	4.457E-05
Q17556	-1.73	2.771E-03
G5ECR0	-1.86	2.976E-02
P90789	-1.87	2.735E-03
Q09567	-1.95	2.295E-05
Q9N4X8	-1.95	1.735E-03
Q9XUY5	-2	2.125E-04
Q18990	-2.01	5.542E-03
P17330	-2.35	1.875E-02
Q9N4L8	-2.38	1.202E-06
Q20264	-2.4	2.447E-03
Q22814	-2.92	4.900E-04
Q23066	-3.29	2.820E-02
P41847	-3.58	8.812E-04