

TITRE DU PROJET (limité chacun à 255 caractères)

Evaluation de l'effet d'endocannabinoïdes et de cannabinoïdes candidats médicament sur le microenvironnement lipidique membranaire et les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 plaquettaires

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : Davani

Prénom : Siamak

Section CNU : 4803

Grade : Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

HDR : Date de soutenance : 05/12/2008 - Discipline : Science la vie

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : CHU de Besançon - 3 Boulevard Alexandre Fleming – Service de Pharmacologie Clinique et Toxicologie - Bâtiment bleu PC BIO R+2 - 25030 BESANCON CEDEX, 03 81 66 81 66 poste 32043 ; siamak.davani@univ-fcomte.fr

Unité d'appartenance : UR4662 SINERGIES, Directeur : Frédéric Auber

Co-directrice de thèse :

Nom : Lagoutte-Renosi

Prénom : Jennifer

Section CNU : 4803

Grade : Maitresse de conférences des universités – Praticienne hospitalière

HDR : non ☒ ; oui ☐

Coordonnées : CHU de Besançon - 3 Boulevard Alexandre Fleming – Service de Pharmacologie Clinique et Toxicologie - Bâtiment bleu PC BIO R+2 - 25030 BESANCON CEDEX, 03 81 66 81 66 poste 32379 ; jlagoutte@chu-besancon.fr ou jennifer.lagoutte_rensoi@univ-fcomte.fr

Unité d'appartenance: UR4662 SINERGIES, Directeur : Frédéric Auber

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

Nom et label de l'unité de recherche : UR4662 SINERGIES

Localisation : UFR Sciences de la Santé - UMLP

Directeur de thèse : Pr Siamak Davani (siamak.davani@univ-fcomte.fr)

Co-directeur : Dr Jennifer Lagoutte-Renosi (jennifer.lagoutte_rensoi@univ-fcomte.fr)

Adresse courriel du contact scientifique : jennifer.lagoutte_rensoi@univ-fcomte.fr

Titre du projet : Etude de l'effet de cannabinoïdes endogènes et exogènes sur le microenvironnement lipidique des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 au niveau plaquettaire

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

Description du projet (2 pages maximum)

1. Positionnement du projet et contexte scientifique

Ce projet de thèse fait partie du travail initié par les équipes SINERGIES et Chrono-Environnement autour de la détermination de la composition lipidique des membranes plasmiques des plaquettes, la modélisation numérique de celles-ci et l'étude de composés membranotropes. Depuis son lancement, ce projet a permis la soutenance de 4 thèses de doctorat et la valorisation par la publication d'une quinzaine d'articles. Pour aller plus loin dans la compréhension du microenvironnement lipidique des récepteurs, nous souhaitons conforter ces liens et développer une collaboration avec l'Institut de chimie et biologie des membranes et nano-objets (CBMN) de Bordeaux. Ce travail a déjà débuté grâce aux données préliminaires recueillies par l'équipe du Dr Isabel Alves (médaille de bronze du CNRS) qui est une experte de la mesure du microenvironnement lipidique des membranes et des récepteurs cannabinoïdes en France.

Jusqu'à présent et dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés aux récepteurs P2Y₁₂ et leur microenvironnement lipidique. Dans ce travail, nous souhaitons étendre nos recherches aux récepteurs cannabinoïdes. En effet, le système endocannabinoïde participe à la régulation de l'homéostasie générale de l'organisme et à divers mécanismes physiopathologiques, notamment les maladies cardiovasculaires [1,2]. Ainsi, ce système endocannabinoïde constitue une cible de choix pour de nouveaux candidats médicament. Deux récepteurs cannabinoïdes, CB₁ et CB₂, appartenant à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ont été identifiés comme cible chez l'Homme. Ces récepteurs CB₁ et CB₂ sont retrouvés au niveau central et exprimés également sur d'autres types cellulaires telles que les plaquettes [3]. Les antagonistes CB₁ et les agonistes CB₂ sont des traitements qui semblent prometteurs dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires [4–6] mais leur développement clinique reste encore limité en raison de leur profil d'effets indésirables, lié en partie au fait que ces récepteurs sont ubiquitaires.

La modulation spécifique du système endocannabinoïde au niveau des plaquettes a été envisagée pour réguler les phénomènes d'athérosclérose et de thromboses artérielles [7]. En effet, la fonction plaquettaire peut être modulée par les endocannabinoïdes circulants ou produit par l'endothélium lui-même [8,9]. L'endothélium est source de synthèse des endocannabinoïdes, mais également un site de métabolisme [10]. Par conséquent, l'équilibre entre la libération d'endocannabinoïdes et leur métabolisme dépendant de l'endothélium est un élément clé dans la formation des thromboses, avec parfois un équilibre modifié dans les états pathologiques, notamment dans l'athérosclérose. Les plaquettes contiennent, à l'instar de l'endothélium, des précurseurs lipidiques permettant la synthèse d'endocannabinoïdes.

Deux endocannabinoïdes impliqués dans le fonctionnement des plaquettes, le 2-Arachidonylglycérol (2-AG) et l'anandamide, ont été identifiés. En effet, les plaquettes activées par la thrombine libèrent du 2-AG [11,12] qui a la capacité de se lier avec le récepteur cannabinoïde ($K_i=15$ mM), bien que cette activité soit plus faible que celle de l'anandamide [11]. Plusieurs études antérieures ont rapporté des résultats controversés concernant l'effet des cannabinoïdes sur l'agrégation et la survie des plaquettes [13–19] avec un effet parfois indépendant de l'activation des récepteurs CB₁ et/ou CB₂.

Par ailleurs, Di Scala *et al.* [20] a montré que l'anandamide a la capacité de s'insérer dans la membrane plasmique avec une sélectivité pour le cholestérol et les céramides. Le cholestérol assure l'insertion membranaire de l'anandamide et son transport vers les récepteurs CB₁ pour atteindre la voie classique de transduction du signal et/ou vers les protéines intracellulaires pour atteindre la voie de l'hydrolyse. Cette observation rejoint nos travaux sur les antiagrégants plaquettaires et en particulier avec le ticagrélor. Récemment, nous avons mis en évidence les propriétés membranotrope du ticagrélor, qui en s'insérant dans la membrane des plaquettes modifie le microenvironnement lipidique autour des récepteurs cibles P2Y₁₂. Ce remaniement du microenvironnement lipidique participe au changement conformationnel des récepteurs P2Y₁₂ et favorise ainsi la liaison de ces derniers au ticagrélor [21].

Afin de mieux comprendre les interactions entre des endocannabinoïdes et des cannabinoïdes candidats médicaments et les plaquettes, nous souhaitons 1) évaluer l'effet de ces ligands sur le microenvironnement lipidique membranaire plasmique des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂ des plaquettes, 2) étudier l'impact sur la dynamique, la conformation et la fonctionnalité de ces récepteurs CB₁ et CB₂ vis-à-vis de ces ligands.

Cette approche permettrait à l'avenir d'améliorer le design des pharmacophores des nouveaux candidats médicaments en optimisant la fonctionnalité via l'interaction membranaire et en optimisant la spécificité cellulaire, ici les plaquettes.

2. Etapes du projet

2.1. Etape bibliographique et d'identification des endocannabinoïdes exogènes d'intérêts

Il s'agira de faire un état de l'art bibliographique des ligands endogènes et des ligands exogènes agonistes, antagoniste, agoniste inverse des récepteurs CB1 et CB2 pour préciser ceux qui ont un potentiel usage thérapeutique dans l'athérosclérose et les thromboses artérielles. Cet état de l'art pourra s'appuyer sur des méthodes de machine learning de recherche bibliographique développées par l'équipe de Chrono-Environnement.

2.2. Etape d'étude des ligands endogènes et de candidats médicament des récepteurs CB

- Expérimentations *in silico* (UMR Chrono-environnement) :

Il s'agira de modéliser les récepteurs CB1 et CB2 intégrés dans la membrane plasmique plaquettaire. Cela s'appuie sur nos précédents travaux qui ont permis d'élaborer un modèle de membrane plasmique plaquettaire numérique spécifique, ainsi que sur la description de la structure cristallisée des récepteurs CB1 et CB2 décrites dans la littérature. L'insertion des différents ligands d'intérêts identifiés dans l'étape précédente sera évaluée, ainsi que l'impact sur le microenvironnement membranaire (réorganisation des lipides, paramètres d'ordre, niveau d'énergie, dynamique des lipides...) et sur les récepteurs eux-mêmes (positionnement, conformation, oligomérisation)

- Expérimentations *in vitro* :

o D'une part avec une évaluation des effets au niveau moléculaire (CBMN) :

Des techniques impliquant des modèles de Large Unilamellar Vesicles (LUVs) incubées en l'absence ou en présence des ligands identifiés préalablement à différentes concentrations, d'utilisation de spectroscopie à résonance plasmonique (PWR), de microscopie et de spectroscopie de fluorescence permettront d'évaluer la variation de la fluidité membranaire, l'évolution des transitions de phases des lipides, et les changements structuraux et dynamiques de la membrane lors de l'interaction entre des ligands et des récepteurs couplés aux protéines G, afin de mieux caractériser l'interaction des ligands d'intérêts que nous aurons identifiés.

o D'autre part avec une évaluation des effets au niveau cellulaire (UR SINERGIES) :

Les phénomènes d'oligomérisation des récepteurs CB au niveau des plaquettes avant ou après incubation avec les ligands identifiés seront évalués, via des techniques SDS-Page non réducteur suivi d'un Western Blot en cas de liaison non covalente entre les dimères voire d'un Cross-link chimique suivi d'un Western Blot en cas de liaison non covalente entre les dimères. Pour finir, l'effet fonctionnel des endocannabinoïdes et des ligands candidat médicament sur les plaquettes humaines sera évalué *in vitro* via des tests d'agrégation plaquettaires.

Une étude complémentaire après incubation des plaquettes avec ou sans ligand en présence de cultures de cellules endothéliales qui coopèrent étroitement avec les plaquettes est également envisagée.

3. Bibliographie

1. O'Sullivan SE. Endocannabinoids and the Cardiovascular System in Health and Disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;231:393-422. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_14
2. Randall MD. Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol*. 2007;152:671-5. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707420>
3. Catani MV, Gasperi V, Catanzaro G, Baldassarri S, Bertoni A, Sinigaglia F, et al. Human platelets express authentic CB₁ and CB₂ receptors. *Curr Neurovasc Res*. 2010;7:311-8. <https://doi.org/10.2174/156720210793180774>
4. More SA, Deore RS, Pawar HD, Sharma C, Nakhate KT, Rathod SS, et al. CB2 Cannabinoid Receptor as a Potential Target in Myocardial Infarction: Exploration of Molecular Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2024;25:1683. <https://doi.org/10.3390/ijms25031683>

5. Zhang M, Tian Q, Liu J. Cannabinoid Receptor-2 agonist AM1241 Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion-Induced Oxidative Stress in Rats via Nrf2/HO-1 Pathway. *Med Princ Pract.* 2024;33:597-606. <https://doi.org/10.1159/000540751>
6. Masson E. The endocannabinoid system: A new approach to control cardiovascular disease [Internet]. EM-Consulte. [cité 24 févr 2025]. <https://www.em-consulte.com/article/421834/the-endocannabinoid-system-a-new-approach-to-contr>. Consulté le 24 févr 2025
7. Khayat W, Lehmann C. The Endocannabinoid System: A Potential Therapeutic Target for Coagulopathies. *Metabolites.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2022;12:541. <https://doi.org/10.3390/metabo12060541>
8. Mechoulam R, Fride E, Ben-Shabat S, Meiri U, Horowitz M. Carbachol, an acetylcholine receptor agonist, enhances production in rat aorta of 2-arachidonoyl glycerol, a hypotensive endocannabinoid. *Eur J Pharmacol.* 1998;362:R1-3. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00777-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00777-8)
9. Gauthier KM, Baewer DV, Hittner S, Hillard CJ, Nithipatikom K, Reddy DS, et al. Endothelium-derived 2-arachidonoylglycerol: an intermediate in vasodilatory eicosanoid release in bovine coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H1344-1351. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00537.2004>
10. Ho W-S, Randall MD. Endothelium-dependent metabolism by endocannabinoid hydrolases and cyclooxygenases limits vasorelaxation to anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol.* 2007;150:641-51. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707141>
11. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids PLEFA.* 2002;66:173-92. <https://doi.org/10.1054/plf.2001.0356>
12. Prescott SM, Majerus PW. Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem.* 1983;258:764-9.
13. Maccarrone M, Bari M, Menichelli A, Del Principe D, Finazzi Agrò A. Anandamide activates human platelets through a pathway independent of the arachidonate cascade. *FEBS Lett.* 1999;447:277-82. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00308-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00308-7)
14. Deusch E, Kress HG, Kraft B, Kozek-Langenecker SA. The procoagulatory effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in human platelets. *Anesth Analg.* 2004;99:1127-30. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000131505.03006.74>
15. Levy R, Schurr A, Nathan I, Dvilanski A, Livne A. Impairment of ADP induced platelet aggregation by hashish components. *Thromb Haemost.* 1976;36:634-40. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1648084>
16. Formukong EA, Evans AT, Evans FJ. The inhibitory effects of cannabinoids, the active constituents of Cannabis sativa L. on human and rabbit platelet aggregation. *J Pharm Pharmacol.* 1989;41:705-9. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1989.tb06345.x>
17. Catani MV, Gasperi V, Evangelista D, Finazzi Agrò A, Avigliano L, Maccarrone M. Anandamide extends platelets survival through CB(1)-dependent Akt signaling. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2010;67:601-10. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0198-9>
18. Brantl SA, Khandoga AL, Siess W. Mechanism of platelet activation induced by endocannabinoids in blood and plasma. *Platelets.* 2014;25:151-61. <https://doi.org/10.3109/09537104.2013.803530>
19. De Angelis V, Koekman AC, Weeterings C, Roest M, de Groot PG, Herczenik E, et al. Endocannabinoids control platelet activation and limit aggregate formation under flow. *PloS One.* 2014;9:e108282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108282>
20. Scala CD, Fantini J, Yahi N, Barrantes FJ, Chahinian H. Anandamide Revisited: How Cholesterol and Ceramides Control Receptor-Dependent and Receptor-Independent Signal Transmission Pathways of a Lipid Neurotransmitter. *Biomolecules.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018;8:31. <https://doi.org/10.3390/biom8020031>
21. Pyrshev K, Allemand F, Rabani V, Yesylevskyy S, Davani S, Ramseyer C, et al. Ticagrelor increases its own potency at the P2Y12 receptor by directly changing the plasma membrane lipid order in platelets. *Br J Pharmacol.* 2024;181:4369-80. <https://doi.org/10.1111/bph.16500>

Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat) :

Concernant la partie expérimentale numérique de cette thèse, des moyens de calcul très importants sont requis dont le financement est d'ores et déjà acquis. Les simulations numériques seront effectuées au niveau du Mésocentre de calcul de Franche-Comté. Monsieur le Pr Ramseyer du laboratoire Chrono-Environnement apportera le financement sous la forme d'un investissement important pour les ressources numériques à hauteur de 25 000 euros (achat de GPU pour le Mésocentre de Franche-Comté). Une station de travail sera mise à disposition de l'étudiant par le laboratoire Chrono-Environnement.

Concernant la partie expérimentale *in vitro*, le coût des réactifs des expériences est estimé à 8 000 € sur 3 ans et sera pris en charge par l'équipe SINERGIES.

Connaissances et compétences requises :

Le doctorant recruté devra avoir des compétences solides en calcul numérique à l'échelle moléculaire. Il devra pouvoir appréhender les mécanismes biophysiques, chimiques et des aspects de pharmacologie.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

La modulation spécifique du système endocannabinoïde au niveau des plaquettes via les récepteurs CB1 et CB2 est l'une des pistes récemment explorées pour réguler les phénomènes d'athérosclérose et la thrombose artérielle. En effet, la fonction plaquettaire peut être modulée par les endocannabinoïdes circulants ou produit par l'endothélium lui-même. Les récepteurs CB1 et CB2, appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G et peuvent former des oligomères. Des antagonistes CB1 et des agonistes CB2 ont été développés pour lutter contre les maladies cardiovasculaires mais leur développement clinique reste encore limité en raison de leur profil d'effets indésirables lié en partie au fait que ces récepteurs sont ubiquitaires.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'effet d'endocannabinoïdes et de cannabinoïdes candidats médicament sur le microenvironnement lipidique membranaire plasmique plaquettaire des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 et par conséquent d'étudier l'impact sur la dynamique, la conformation et la fonctionnalité de ces récepteurs CB1 et CB2 vis-à-vis de ces ligands.

Dans l'hypothèse où la membrane pourrait servir de réservoir au médicament, cette approche permettrait à l'avenir d'améliorer le design des pharmacophores des nouveaux candidats médicaments en optimisant la spécificité cellulaire par insertion membranaire du médicament tout en optimisant la fonctionnalité via cette insertion membranaire.

Résumé en anglais (limité chacun à 1800 caractères)

The specific modulation of the endocannabinoid system in platelets via CB1 and CB2 receptors is one of the path recently explored for treating atherosclerosis and arterial thrombosis. Indeed, platelet function can be modulated by circulating endocannabinoids or by endocannabinoids produced by the endothelium itself. CB1 and CB2 receptors belong to the large family of G protein-coupled receptors and can form oligomers. CB1 antagonists and CB2 agonists have been developed to treat cardiovascular disease, but their clinical development remains limited due to their adverse effect profile, linked in part to the fact that these receptors are ubiquitous.

The objective of this thesis is to evaluate the effect of endocannabinoids and cannabinoid drug candidates on the platelet plasma membrane lipid microenvironment of CB1 and CB2 cannabinoid receptors and, consequently, to study the impact on the dynamics, conformation, and functionality of these CB1 and CB2 receptors with respect to these ligands.

Assuming that the membrane could serve as a reservoir for the drug, this approach would make it possible in the future to improve the design of pharmacophores for new drug candidates by optimizing cellular specificity through membrane insertion of the drug while optimizing functionality via this membrane insertion.

Préciser le domaine de compétence :

- Santé, médecine humaine, vétérinaire
- Physique

Indiquez quelques mots clés concernant votre sujet) :

Plaquettes – cannabinoïdes - récepteurs cannabinoïdes – membrane – lipides – pathologies cardio-vasculaires – dynamique moléculaire – simulation numérique - biophysique