

Allocations de recherche doctorale (ARED)

Fiche projet 2015

- Date de la demande (06/03/2015) :

1- Identification du projet (en langue française)

- Acronyme du projet (8 caractères *maximum*) : PHADRUG

- Intitulé du projet (en langue française) : Potentiels des Poly-hydroxyalcanoates (PHA) bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique.

2- Domaine d'innovation stratégique (DIS) du projet

- Cocher le DIS prioritaire au sein duquel le projet de thèse s'intègre. Vous pouvez cocher un DIS secondaire (à préciser en ce cas, point 6 de la présentation du projet). Si aucun DIS ne correspond, cocher « Projet Blanc ».

- 1/ Innovations sociales et citoyennes pour une société ouverte et créative
- 2/ Chaîne alimentaire durable pour des aliments de qualité
- 3/ Activités maritimes pour une croissance bleue
- 4/ Technologies pour la société numérique
- 5/ Santé et bien-être pour une meilleure qualité de vie (secondaire)
- 6/ Technologies de pointe pour les applications industrielles
- 7/ Observation et ingénieries écologique et énergétique au service de l'environnement
- Projet Blanc

- Préciser le sous-domaine correspondant :

Pour une plus ample présentation des DIS et des sous-domaines, merci de vous référer au Schéma régional de l'enseignement supérieur et de la recherche disponible à l'adresse suivante : http://www.bretagne.fr/internet/upload/docs/application/pdf/2013-11/sresr_version_finale.pdf

DIS3, 3B - Valorisation de la biomasse marine et biotechnologies (pour toutes les applications)
secondaire DIS5, 3B – Nouvelles approches thérapeutiques alliant génétique, bio-marqueurs et biomolécules

3- Présentation de l'établissement porteur (bénéficiaire de l'aide régionale)

- Établissement porteur du projet (implantation obligatoire sur le territoire régional) : IFREMER Centre de Bretagne

- Ecole Doctorale : Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

4- Identification du/de la responsable du projet (futur-e directeur-trice de thèse)

- Nom et prénom : SIMON-COLIN Christelle

- Genre du/de la responsable du projet (F/H) : F

- e-mail : christelle.simon.colin@ifremer.fr

- Téléphone : 02 98 22 45 28

- Equipe de recherche encadrante (JE/EA/...) :

- Unité (U/UMR/USR /...) : UMR6197 Microbiologie des Environnements Extrêmes LM2E

- Nombre HDR dans l'équipe d'accueil : 9

- Nombre de thèses en cours : 12

- Nombre de post-docs en cours : 2

- Publications récentes du directeur-trice de thèse (nb total et 5 références max au cours des 5 dernières années) :

1- Deschatre M., Lescop B., Simon Colin C., Ghillebaert F., Guezennec J., Rioual S. 2015. Characterization of exopolysaccharides after sorption of silver ions in aqueous solution. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3 : 210-216.

Allocations de recherche doctorale (ARED)

Fiche projet 2015

2- Chalkiadakis E., Dufourcq R., Schmitt S., Brandily C., Kervarec N., Coatanea D., Amir H., Loubersac L., Chanteau S., Guezennec J., Dupont-Rouzeyrol M., Simon-Colin C. 2013. Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp. nov., from New Caledonia. *Journal of Applied Microbiology*, 114 : 1702-1712.

3- Lemechko P., Renard E., Simon-Colin C., Guezennec J., Langlois V. 2012. Synthesis of Dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach. *Reactive and Functional Polymers*, 72 : 487-494.

4- Simon-Colin C., Gouin C., Lemechko P., Kervarec N., Guezennec J. 2012. Development of a three-steps derivatization assay for the localization of double bond in monounsaturated monomers of poly-beta-hydroxyalkanoates by GC-MS. *Journal of Chromatography B*, 900 : 64-70.

5- Simon-Colin C., Gouin C., Lemechko P., Schmitt S., Senant A., Kervarec N., Guezennec J. 2012. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenneci* from alkanates and glucose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51 : 1063-1069.

- Co-directeur-trice de thèse (éventuellement) : LANGLOIS Valérie

- Equipe de recherche co-encadrante (JE/EA/...) : UMR7182, Institut de Chimie des Matériaux de Paris Est

5- Présentation du projet (en langue française, 2 à 3 pages)

- Résumé du projet (15 lignes) :

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des polymères de réserve naturels produits par certaines bactéries en réponse à un stress énergétique résultant notamment d'un appauvrissement en éléments nécessaires à la croissance (N, P...) et d'un excès simultané de carbone. Ces polyesters sont les seuls bioplastiques combinant à la fois les caractéristiques biosourcés, biodégradables et biocompatibles. En particulier, leur biocompatibilité intrasèque, en sus de leur innocuité vis-à-vis de l'organisme humain, les rend très intéressants pour des applications dans le domaine biomédical.

Le présent sujet d'étude doctorale propose d'étudier les potentialités des PHA issus de bactéries marines isolées au niveau d'environnements extrêmes, pour l'élaboration de systèmes de libération contrôlée de molécules à visée thérapeutique. Pour cela, nous proposons 1)- en premier lieu, de rechercher par des techniques de biologie moléculaire les marqueurs génétiques permettant d'identifier les organismes producteurs de PHA ; 2) de sélectionner par fermentation bactérienne les meilleurs candidats bactériens pour la production de PHA de structures contrôlées et originales, et 3) d'élaborer à partir de ces PHA des nanoparticules permettant d'encapsuler et de vectoriser des molécules thérapeutiques c'est-à-dire transporter spécifiquement ces molécules jusqu'aux cellules cibles, afin d'améliorer l'efficacité du traitement et en réduire les effets secondaires.

- Présentation détaillée du projet :

1-Contexte scientifique et socio-économique du projet :

Un atout majeur des PHA est lié à leur biocompatibilité c'est-à-dire leur capacité à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique, en sus de leur innocuité vis-à-vis de l'organisme humain (1). De nombreux travaux attestent du caractère biocompatible des PHAs (plus particulièrement du PHB (poly-b-hydroxybutyrate), PHA à courtes chaînes) qui sont, de fait, considérés comme d'excellents candidats pour des applications dans le domaine biomédical (2, 3). La biocompatibilité des PHA est liée à différents paramètres comme la nature chimique, la masse moléculaire, les caractéristiques de surface (hydrophile/hydrophobe et angle de contact), l'aspect de surface (porosité, microtopographie de surface) ainsi que l'environnement et les produits de dégradation du polymère dans cet environnement.

Les applications des PHA dans le domaine médical se situent en tant que support ou substitut résorbable dans le cadre de l'ingénierie tissulaire (prothèses, valves cardiaques, stents...), la régénération tissulaire (facilite l'attachement et la prolifération cellulaire) (4-5) ou pour élaborer des systèmes de libération contrôlée de principes actifs (Drug delivery) (6). Ces systèmes doivent permettre d'encapsuler un principe actif et de le libérer de manière contrôlée au cours du temps afin de limiter les effets secondaires et les prises répétées du médicament.

Le présent projet dirigé par l'Ifremer s'appuiera sur l'expertise du LM2E UMR6197 dans la production et la

Allocations de recherche doctorale (ARED)

Fiche projet 2015

caractérisation de PHA de structures contrôlées qui seront produits par fermentation bactérienne à partir de bactéries isolées au niveau d'environnements marins extrêmes. Il sera réalisé selon une approche pluridisciplinaire en collaboration avec l'équipe du Pr Langlois, ICMPE (7-11). La complémentarité de nos deux équipes a dorénavant et déjà permis le développement de nouveaux biopolymères tout à faits originaux (natifs, ou fonctionnalisés) ouvrant un large champ d'investigations en particulier dans le domaine biomédical. Enfin, nous envisageons une application ciblée pour la libération contrôlée de médicaments en collaboration avec l'équipe du Pr Berthou, IRTMS Brest (Institut de Recherche Translationnelle en Maladies du Sang), pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique B.

2-Hypothèse et questions posées, identification des points de blocages scientifiques que le travail de thèse se propose de lever :

Dans ce projet, nous proposons d'utiliser la biodiversité et l'originalité des microorganismes marins pour la production de PHA de structures originales et d'étudier leurs potentialités pour le développement de nouveaux systèmes d'encapsulation de médicaments. Les bactéries isolées au niveau d'environnements marins extrêmes seront cultivées en bioreacteur en conditions contrôlées afin d'aboutir à la biosynthèse de PHA de structures diverses, associant la présence de monomères à courtes chaînes carbonées saturées et/ou à chaînes carbonées moyennes portant ou non des insaturations. A partir de cette diversité de PHA à l'état natif, nous envisageons dans un premier temps l'élaboration de systèmes de nanoparticules de PHA comme système de diffusion du principe actif (PA). Plus particulièrement, nous envisageons d'élaborer des nanoparticules à base de PHA pour encapsuler le granzyme B qui peut être utilisé comme thérapie ciblant la leucémie lymphoïde chronique B. En effet, les cellules effectrices du système immunitaire, les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules « *natural killer* » induisent la mort cellulaire chez leur cible en libérant deux sortes de granules dans la synapse immunologique, les perforines qui forment des pores dans la cellule cible, les forçant ainsi à absorber le deuxième type de granule, les granules cytotoxiques appelées granzymes (pour « granule enzyme ») qui vont activer la mort cellulaire. Le granzyme B (GzmB) est une sérine protéase qui, une fois délivrée dans le cytosol des cellules cibles, induit la mort cellulaire par apoptose (rapide et irréversible). Parmi les différentes approches possibles, nous envisageons d'encapsuler les GzmB dans des nanoparticules de polyhydroxyalcanoates (PHA) afin de faciliter la délivrance intra-cellulaire du GzmB. En deuxième approche, il est envisagé d'élaborer des systèmes de libération ciblée constitués de nanoparticules de PHA préalablement modifiés chimiquement. Ces systèmes doivent véhiculer l'agent thérapeutique directement au niveau de son site d'action. Ainsi, afin de cibler directement les cellules de LLC-B, nous proposons de greffer sur ces PHA une chaîne polysaccharidique ciblant le CD22, celui-ci étant spécifique des lymphocytes B.

3-Approche méthodologique et technique envisagée :

Tâche 1 : Recherche Production de PHA de structures différentes (scl, mcl)

La première tâche de ce travail consistera à rechercher au sein de la collection de bactéries marines isolées au niveau d'environnements extrêmes de l'Ifremer, les isolats capables de produire des PHA. Les méthodes de criblage utilisées coupleront l'observation phénotypique de la croissance des colonies bactériennes sur milieu favorisant la production des PHA ainsi que des techniques de biologie moléculaire ciblant la recherche de gènes spécifiques impliqués dans les voies de biosynthèse des PHA (12, 13). A l'issue de ce criblage, les bactéries ayant répondu positivement seront placées en culture en milieu liquide afin d'en déterminer les paramètres de croissance optimales, avant la mise en culture en conditions de production favorables à la synthèse des PHA. Ce travail s'attachera aussi à l'identification taxonomique des souches productrices.

Tâche 2: Production de PHA de structures différentes (scl, mcl) / Caractérisation

En se basant sur les travaux réalisés par Ifremer depuis 12 ans, un panel de PHA de structures différentes (PHB, PHBV, PHA mcl) sera produit par fermentation bactérienne (14-16). Différents substrats carbonés (sucres, acides organiques...) seront utilisés afin d'orienter le métabolisme bactérien vers la synthèse de PHA à courtes (moins de 6C) ou moyennes chaînes (6 à 12C) de structures contrôlées (saturées, insaturées, taux d'insaturation contrôlé). Un effort particulier sera porté sur la production de P4HB (poly-4-hydrobutyrate), PHA approuvé par la FDA (Food and Drug Administration, USA) comme biomatériau pour des applications médicales. Actuellement ce PHA d'intérêt n'est pas commercialisé et est produit uniquement à partir de souches recombinantes (17, 18). L'enjeu est donc de produire ce P4HB par fermentation à partir d'une souche « sauvage » cultivée en présence de gamma-hydroxybutyrate utilisé comme source de carbone.

Allocations de recherche doctorale (ARED)

Fiche projet 2015

Les caractérisations chimiques, mécaniques, et thermiques des PHA seront réalisées selon des méthodes couramment utilisées au laboratoire, utilisant la FTIR, GCMS, HPSEC et RMN (Plateforme Technologique RMN-RPE-SM de l'UBO) pour l'analyse chimique du polymère, ainsi que par AED et ATG pour la détermination des paramètres thermiques et mécaniques, données indispensables à la connaissance de ces matériaux.

Tâche 3 : Élaboration de nanoparticules de PHA / Encapsulation de molécules cibles

Il s'agira de tester différents polyesters, P3HB, P4HB, P3HB3HV, PHA mcl variant en composition, poids moléculaire... afin de moduler leur temps de dégradation et ainsi contrôler la libération des molécules cibles. En particulier, nous envisageons en première approche l'élaboration de nano ou micro structures (particules/sphères) à base de PHA permettant d'enrober les molécules thérapeutiques. La procédure envisagée repose sur une réaction d'émulsion/évaporation de solvant (19-22). A noter que la vitesse d'homogénéisation et la force ultrasonique appliquée pour l'émulsion sont des facteurs déterminants dans la taille finale des nanoparticules. La mise au point d'un protocole spécifique permettant de calibrer des nano ou micro-structures se fera en lien direct avec les contraintes de circulation des molécules thérapeutiques dans l'organisme humain.

La caractérisation des nanoparticules sera réalisée par chromatographie à perméation de gel (poids moléculaire et distribution des populations), microscopie électronique à balayage (morphologie, structure de surface), par diffusion de la lumière pour la détermination de la taille des particules et du potentiel zeta. La détermination de l'angle de contact à l'eau renseignera également sur les caractéristiques de surface des particules.

Tâche 4 : Greffage de ligand spécifique sur les nanoparticules de PHA / Tests in vitro

Afin d'augmenter l'efficacité du traitement thérapeutique, une étape importante dans l'optimisation de ces travaux sera le développement d'une stratégie de vectorisation qui consistera à modifier les nanoparticules de PHA en y greffant des fonctions spécifiques permettant d'accroître la reconnaissance et ainsi cibler les cellules cibles. En particulier, il est proposé de greffer sur ces PHA une chaîne polysaccharidique ciblant le CD22, celui-ci étant spécifique des lymphocytes B, le ciblage du CD22 étant réalisé grâce à la séquence de type Sia α 2-6Gal β 1-4GlcNAc.

Afin de valider le procédé d'élaboration des systèmes de libération, un panel de tests sera effectué *in vitro* en collaboration avec l'IRTMS, notamment pour vérifier l'encapsulation (qualité, taux), la libération (cinétique, mécanisme de libération), le maintien de l'activité de la molécule cible et son action au niveau des cellules visées.

REFERENCES

- 1 - Prime K. L., Whitesides J. M. 1991. *Science*, 252 (5009) : 1164-1167.
- 2 - M. Zinn, B. Witholt, T. Egli. 2001. *Adv. Drug Delivery Rev.* 53 : 5-21.
- 3 - C. Brigham, A. Sinskey. 2012. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2012, 1, 53-60
- 4 - Chen Q. 2009. *Chem. Soc. Rev.* 38 : 2434-2446.
- 5 - Rathbone S., Furrer P., Lübben J., Zinn M., Cartmell S. 2009. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*: 1392- 1403.
- 6 - Shrivastav A., Kim H-Y, Kim Y-R. 2013. *BioMed Research International*, 1 : 10.
- 7- Lemechko P., Renard E., Volet G., Simon-Colin C., Guezennec J., Langlois V. 2012. *React. Funct. Pol.* 72 : 160-167.
- 8 - Lemechko P., Renard E., Simon-Colin C., Guezennec J., Langlois V. 2012. *React. Funct. Pol.* 72 : 487-494.
- 9 - Simon-Colin C., Gouin C., Lemechko P., Schmitt S., Senant A., Kervarec N., Guezennec J. 2012. *Int. J. Biol. Macromol.* 51 : 1063-1069.
- 10 - Simon-Colin C., Gouin C., Lemechko P., Kervarec N., Guezennec J. 2012. *J. Chrom. B* 900 : 64-70.
- 11 - Lemechko P., Ramier J., Versace D.L., Renard E., Albanese P., Guezennec J., Simon-Colin C., Langlois V. 2013. *React. Funct. Pol.* 73 : 237-243.
- 12 - Solaiman D. K. Y., Ashby R. D., Foglia T. A., 2000. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 53: 690-694.
- 13 - Chalkiadakis E. 2013. Thèse, 218p.
- 14 - Simon-Colin C., Raguénès G., Cozien J., Guezennec J. 2008a. *J. Appl. Microbiol.* 104 (5): 1425-1432.
- 15 - Simon-Colin C., Raguénès G., Costa B., Guezennec J. 2008b. *React. Funct. Pol.* 68 : 1534-1541.
- 16 - Simon-Colin C., Alain K., Raguénès G., Schmitt S., Kervarec N., Gouin C., Crassous P., Costa B., Guezennec J.G. 2009. *Bioresource Technology* 100 : 6033-6039.
- 17 - Martin D., Williams S. 2003. *Biochem. Eng. J.* 16 : 97-105.
- 18 - Le Meur S., Zinn M., Egli T., Thony-Meyer L., Chen Q.. 2013. *Microbial Cell Factories* 12 : 123-144.
- 19 - Kurth K., Renard E., Brachet F., Robic D., Guerin Ph., Bourbouze R. 2002. *Polymer* 43 : 1095-1101.
- 20 - Errico C., Bartoli C., Chiellini F., Chiellini E. 2009. *J. Biomed. Biotech.* 2009 : 1-10.
- 21 - Yao Y., Zhan X., Zhang J., Zou X., Wang Z., Xiong Y., Chen J., Chen G. 2008. *Biomaterials* 29 (2008) 4823-4830
- 22 - Lu X-Y., Ciralo E., Stefania R., Chen G-Q., Zhang Y., Hirsch E. 2011. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 : 1423-1433.

Allocations de recherche doctorale (ARED)

Fiche projet 2015

4-Profil du candidat (compétences scientifiques et techniques requises) :

Le(la) candidat(e) devra être titulaire d'une formation en microbiologie et biologie moléculaire (M2/Ecole d'ingénieur), et être sensibilisé(e) à l'utilisation des biomolécules en santé. Des connaissances en chimie seront également appréciées.

5-Positionnement et environnement scientifique dans le contexte régional, et le cas échéant, national et international :

Ce projet s'appuie sur les travaux menés sur les biopolymères bactériens à l'Ifremer depuis plus de 10 ans, et sur l'expertise du LM2E dans la culture et la connaissance des bactéries associées aux environnements extrêmes. Outre le développement d'approches thérapeutiques innovantes, ce travail contribuera à la valorisation de la collection de microorganismes de l'Ifremer et à accroître nos connaissances de la biodiversité et du fonctionnement de ces microorganismes. L'approche pluridisciplinaire inter-instituts menée avec des acteurs régionaux et nationaux renforcera nos forces respectives et contribuera au rayonnement scientifique de nos activités sur la plan national et international.

6-Pertinence du projet au regard du DIS de rattachement (et/ou du DIS secondaire). Si « projet blanc », préciser les raisons de ce choix :

Le projet présenté s'intègre dans les thématiques du DIS 3, 3B par son approche liée à l'étude de la biodiversité des microorganismes marins et à la valorisation des produits qui en sont issus pour des applications en biotechnologie. Ce projet se rattache également au DIS 5, 5B par le développement de nouvelles approches thérapeutiques utilisant de biomolécules (biopolymères bactériens) issues de la biologie marine.

7-Autres informations utiles (projet relevant des Objets d'excellence -OBEX-, projet inscrit dans le cadre des « Projets réservés » régionaux, dont « Projets émergents de recherche »...) :

6- Projet de thèse en cotutelle internationale

- **S'agit-il d'un projet de thèse en cotutelle internationale (oui/non) : non**

- **Si oui, préciser l'établissement pressenti (et le pays de rattachement) :**

- **En cas de projet en cotutelle internationale, préciser -si vous en avez connaissance- l'organisation du calendrier des périodes de séjour :**

NB : Est entendue comme « thèse en cotutelle internationale », la situation où le doctorant partage son temps de thèse de manière égale, entre un établissement breton bénéficiaire, qui le rémunère pendant les périodes de thèse effectuées sur le territoire régional (18 mois sur 36 mois), et un établissement étranger, qui s'engage également à rémunérer le doctorant dans le cadre de son séjour à l'étranger, soit durant 18 mois -a minima-. (Voir article 6.4 du Dispositif ARED 2015).

7- Financement du projet de thèse

- **Part de l'enveloppe financière régionale affectée au projet (part exprimée en ETP) :**

Financement Région 100 %

Financement Région 50 % (Préconisé)

- **En cas de financement à 50 %, le cofinancement est-il déjà identifié (oui/non) : oui**

- **Si oui, préciser la nature du cofinancement (ANR, Partenaire privé, Ademe, etc.) : IFREMER**



Allocations de recherche doctorale (ARED)

Fiche projet 2015

Avis et signature du
Responsable de l'Unité

Avis et signature du
Responsable du Département

PM SARRADIN

L. LEMOINE

→ Ce document est à renvoyer pour le **23 mars au plus tard** à votre référente au service SDENSU de la Région Bretagne :
caroline.mével@region-bretagne.fr

