



**DOSSIER DE CANDIDATURE
A UNE ALLOCATION DE RECHERCHE
POUR LA RENTREE 2018**

Dossier complété et revêtu des signatures à transmettre impérativement pour le :

07 janvier 2018 au plus tard.

A la Direction de la Recherche et Valorisation

secretariat.recherche@univ-littoral.fr

Titre de la thèse :

Encapsulation de principes bioactifs par des cyclodextrines modifiées dans des mélanges eutectiques profonds

Laboratoire d'accueil ULCO :

Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV)

Directeur de thèse ULCO :

Directeur : Landy David, Pr

Co-encadrant : Mallard Isabelle, MCF

☒ LIBAN – Université Libanaise

- Nom du codirecteur étranger et laboratoire partenaire :
Equipe de Recherche des Molécules Bioactives (ERMB) de l'Université Libanaise
Direction de thèse : Pr. Hélène Greige ; Co-direction : Dr Maya Kayouka

- Thématique : (3) L'obésité, la nutrition et les activités sportives

☒ LIBAN – CNRS Libanais

- Nom du codirecteur étranger et laboratoire partenaire
Equipe de Recherche des Molécules Bioactives (ERMB) de l'Université Libanaise
Direction de thèse : Pr. Hélène Greige ; Co-direction : Dr Maya Kayouka

- Thématique : (3) L'obésité, la nutrition et les activités sportives



***LABORATOIRE D'ACCUEIL**

Nom du laboratoire d'accueil :

Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV)

Nombre de HDR dans le laboratoire : 16

Nombre de thèses encadrées dans le laboratoire (rentrée 2017) : 21

Durée moyenne des thèses soutenues dans le laboratoire, sur la période 2013-2017 :
38 mois

ENCADREMENT

Nom, Prénom du directeur de laboratoire :

Courcot Dominique, Pr

Nom, Prénom du directeur de thèse (si différent du directeur de laboratoire) :

Directeur : Landy David, Pr

Co-encadrant : Mallard Isabelle, MCF

Nombre de doctorats en préparation sous la direction du directeur de thèse :

1 Thèse en cours (soutenance prévue en décembre 2018)



Avis détaillé du directeur de thèse :

L'encapsulation de molécules bioactives est au cœur des thématiques de notre équipe Chimie Supramoléculaire, notamment via l'utilisation de cyclodextrines modifiées. L'exploitation des solvants eutectiques profonds en combinaison avec ces cyclodextrines constitue par ailleurs une orientation à la fois forte et récente de nos activités. Le développement de ce sujet est donc en parfaite cohérence avec le projet de l'équipe, ce qui garantit que les différents moyens humains et matériels nécessaires à la réalisation de cette thèse seront mis en œuvre.

Signature du directeur de thèse

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Joly', is written over a white background.

Avis détaillé du directeur de laboratoire :

Le laboratoire dispose des compétences scientifiques nécessaires au développement de ce sujet de thèse, qui s'inscrit d'ailleurs parfaitement dans les objectifs du futur contrat quinquennal. L'Unité dispose par ailleurs des différents matériels indispensables à la réalisation de ce projet (réacteurs micro-ondes, spectroscopies RMN et optiques, calorimétries). La collaboration avec l'ERMB de l'université libanaise conduit à un consortium complémentaire garantissant une parfaite conduite de ce projet de thèse. J'émetts par conséquent un avis très favorable pour cette proposition de sujet.

Signature du directeur de laboratoire

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. Courcot', is written over a white background.

D. COURCOT



PROJET DE THESE

Intitulé du projet de thèse :

Encapsulation de principes bioactifs par des cyclodextrines modifiées dans des mélanges eutectiques profonds

Domaine scientifique : Chimie

Résumé (1/2 page maxi.) :

Ce projet de thèse repose sur le développement de nouvelles cyclodextrines en tant qu'agents d'encapsulation de principes bioactifs. L'objectif est d'améliorer la solubilité et la stabilité de ces principes, ainsi que leur biodisponibilité. Dans cette optique, le projet sera décliné selon trois axes complémentaires :

Axe 1 : Synthèse de cyclodextrines polymériques par association avec des agents réticulants menant à des mélanges à bas points d'ébullition.

Axe 2 : Etude des capacités d'encapsulation et de relargage de ces agents vis-à-vis de principes bioactifs (large gamme de principes médicamenteux et de composés issus de la nutrition).

Axe 3 : Etude de l'influence de ces systèmes (cyclodextrines seules et incorporant des principes bioactifs) sur des systèmes biologiques (études des interactions avec l'albumine humaine et étude de la fluidité et de la perméabilité membranaire).

Le projet s'appuiera sur l'utilisation des techniques de synthèse sous micro-ondes, des spectroscopies R.M.N. et optiques (fluorescence, UV-visible, IRTF), des calorimétries différentielle à balayage et de titration isotherme, ainsi que de la chromatographie d'exclusion stérique.



Encapsulation de principes bioactifs par des cyclodextrines modifiées dans des mélanges eutectiques profonds

Contexte scientifique et

La biodisponibilité des principes actifs, qu'il s'agisse de principes médicamenteux ou de composés issus de la nutrition, est conditionnée par divers facteurs, aux premiers rangs desquels on peut citer la solubilité aqueuse, la stabilité chimique ainsi que les interactions avec les transporteurs biologiques. De nombreux efforts sont donc consacrés à la formulation de ces composés actifs avec des agents d'encapsulation, afin d'améliorer ces différentes propriétés.

Dans ce cadre, les cyclodextrines (CDs), molécules cages issues de l'amidon, constituent une cible de choix, non seulement parce qu'elles sont facilement accessibles et présentent généralement une parfaite innocuité, mais également parce qu'elles s'associent avec la majorité des molécules organiques, dont elles augmentent la solubilité et la stabilité. De plus, l'efficacité de ces CDs peut être optimisée en les modifiant chimiquement. De telles modifications sont généralement réalisées par synthèse en solution, via la solubilisation préalable des CDs à l'aide de solvants organiques ou aqueux. Comme les solvants ont une influence directe sur les modifications aléatoires introduites sur les cyclodextrines, tout développement de CDs dans un nouveau solvant conduit à obtenir des propriétés d'encapsulation différentes de celles qui ont été observées dans un solvant déjà exploité.

Par ailleurs, des études ont montré qu'il était possible de réaliser des synthèses organiques diverses au sein de mélanges à bas points d'ébullition. Ces nouveaux solvants, apparus depuis le début des années 2000 et désignés sous les acronymes D.E.S. (Deep Eutectic Solvent) ou plus largement L.M.M. (Low Melting Mixture), associent généralement deux molécules distinctes, qui sont solides à la température ambiante lorsqu'elles sont isolées l'une de l'autre, mais liquides quand elles sont mélangées et ainsi en interaction par le biais de liaisons hydrogène (Smith 2014).

Il a été récemment montré que les CDs pouvaient également être solubilisées au sein des L.M.M.. Notre équipe (Chimie Supramoléculaire - UCEIV) a par ailleurs réussi à former des L.M.M. directement à partir des CDs, par simple association avec une seconde molécule apte à former des liaisons hydrogène. **Ces premiers résultats ouvrent ainsi la voie à la modification chimique des CDs au sein des L.M.M., concept qui serait totalement nouveau dans la littérature.**

Notre équipe vient également de démontrer que les CDs conservaient une certaine capacité d'inclusion au sein des D.E.S. (études sur des systèmes modèles : orange de méthyle, butyl-cyclohexane, au sein du D.E.S. urée-chlorure de choline). Cette propriété pourrait être mise à profit pour réaliser des synthèses de CDs avec empreinte moléculaire. En effet, lorsque la polymérisation de CDs est réalisée dans un milieu où l'on a introduit une molécule invitée, le réseau polymérique qui se forme



optimise sa structure pour l'inclusion de cette molécule. Les cyclodextrines modifiées en milieu eutectique profond pourraient donc profiter **de l'amélioration de leurs propriétés d'encapsulation via le concept d'empreinte moléculaire**.

Sujet de recherche et programme

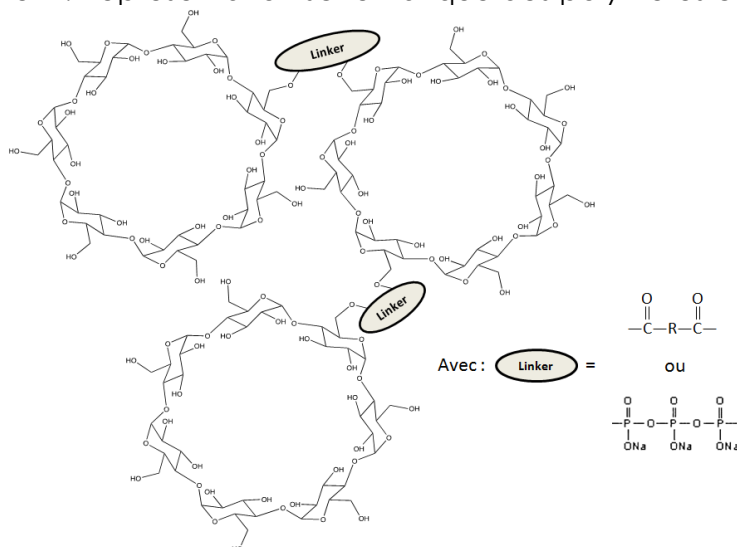
Dans ce contexte, nous nous proposons d'une part de développer de nouvelles cyclodextrines modifiées dans des mélanges eutectiques profonds, et d'autre part d'étudier leurs capacités d'encapsulation et de relargage vis-à-vis de principes bioactifs. Leurs interactions avec l'albumine humaine et des modèles membranaires seront également investiguées.

Le premier axe de ce projet consistera à mettre en œuvre la synthèse des cyclodextrines modifiées. Il s'agira tout d'abord d'effectuer un screening des mélanges aptes à former des mélanges à bas points d'ébullition, par association de cyclodextrines natives et modifiées avec des agents réticulants. La première classe d'agents réticulants qui sera mise en œuvre concernera des polyacides carboxyliques, et en particulier les di et triacides carboxyliques (citrique, malonique, glutarique, glycolique, malique et itaconique). Ces différents acides ont déjà été utilisés avec le chlorure de choline pour la préparation de L.M.M. (Florindo 2014). De plus, les acides carboxyliques sont déjà exploités comme agent réticulant dans la synthèse de polymères de cyclodextrines, permettant ainsi leur utilisation comme agents de vectorisation (Anand 2013) qui profitent de l'augmentation des constantes de complexation vis à vis de certains principes actifs (Danel 2013). En parallèle, une seconde classe d'agent réticulant à base de phosphore sera évaluée pour la formation de L.M.M.. Les polymères à base de phosphore ont l'avantage, en tant qu'agent de vectorisation de principes actifs, d'être généralement biodégradables, hémocompatibles et d'avoir tendance à présenter une affinité pour le calcium. Il a d'ailleurs été montré que les polymères à base de cyclodextrines et de phosphates permettent une libération efficace de principes actifs (Wintgens 2015). Dans notre étude, l'agent réticulant choisi sera le trimétaphosphate (Bejenariu 2009).

Par suite, les couples (CDs/agents réticulant) conduisant à la formation de L.M.M. seront exploités dans des conditions de synthèse permettant l'obtention de polymères (Figure 1). Dans ce cadre, l'usage des micro-ondes sera privilégié pour respecter le principe de chimie verte. Après obtention de ces premiers polymères, le concept d'empreinte moléculaire sera exploré en transposant ces synthèses en présence d'un agent complexant.

Les cyclodextrines modifiées et les polymères de cyclodextrines seront caractérisés par RMN et chromatographie d'exclusion stérique. En amont de ces caractérisations structurales des produits finaux, les nouveaux L.M.M. obtenus pour réaliser ces synthèses seront validés grâce à trois paramètres thermophysiques, la viscosité, l'indice de réfraction et la densité.

Figure 1 : Représentation schématique des polymères cibles



Le second axe de ce travail sera dédié à l'étude des capacités de complexation et de relargage des cyclodextrines synthétisées. Un panel de principes actifs modèles (médicaments et composés relatifs à la nutrition: A.I.N.S., glucocorticoïdes, triterpènes issus de l'huile d'olive...) sera investigué en solution aqueuse, et les résultats feront l'objet d'une comparaison systématique entre les nouvelles CDs synthétisées et les CDs commerciales. Les capacités de complexations seront caractérisées par spectroscopie UV-visible (méthodes directes et compétitives, études de solubilité) et RMN (1H, DOSY, ROESY). En parallèle de ces études en milieu aqueux, des études de complexation seront menées dans les milieux L.M.M. en tant que tels ; l'objectif sera de définir les agents complexants nécessaires à la mise en œuvre des synthèses par empreinte moléculaire (axe I du projet).

Le troisième axe de ce projet visera à caractériser la stabilité et le comportement de ces systèmes CDs/principes actifs vis-à-vis d'entités biologiques. Tout d'abord, le relargage, vers l'albumine humaine (HSA), des principes actifs complexés par les CDs sera étudiée par calorimétrie de titration isotherme (ITC). Par ailleurs, la capacité des CDs à extraire les lipides membranaires et à affecter la stabilité des membranes vésiculaires dépend à la fois de leur nature et de leur concentration. En conséquence, l'effet des nouvelles cyclodextrines synthétisées sur les propriétés des membranes synthétiques (liposomes) sera étudié. La dépolariation de fluorescence, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la calorimétrie différentielle à balayage seront utilisées pour des mesures de fluidité membranaire (Abboud 2017). La perméabilité membranaire sera étudiée dans le cas de la sulforhodamine B (agent fluorescent hydrophile) encapsulée dans les vésicules lipidiques (Kaddah 2018), en l'absence et en la présence des CD modifiées. Les études seront faites sur des membranes de composition différente en cholestérol. Par ailleurs, la stabilité des complexes CDs/principe actif et le relargage des principes actifs vers les membranes cellulaires et/ou vésiculaires lipidiques sera étudiée.



Calendrier prévisionnel

Laboratoire - pays	Période	Activités
UL-Liban	septembre 2018-décembre 2018	Etude bibliographique Etude de l'interaction CD native/principe actif avec des membranes lipidiques
UCEIV-France	janvier 2019-juin 2019	Synthèse de cyclodextrines modifiées en milieu L.M.M.
UL-Liban	juillet 2019-décembre 2019	Effet des cyclodextrines modifiées sur la fluidité et la perméabilité des bicouches lipidiques
UCEIV-France	janvier 2020-juin 2020	Etude des capacités de complexation en milieu L.M.M. Synthèse de cyclodextrines modifiées par empreinte moléculaire au sein des L.M.M. Etude des capacités de complexation des cyclodextrines modifiées en solution aqueuse
UL-Liban	juillet 2020-décembre 2020	Relargage des systèmes CDs modifiées/principes actifs en présence de liposomes
UCEIV-France	janvier 2021-juin 2021	Etude de relargage des systèmes CDs modifiées/principes actifs en présence d'albumine
UL-Liban	juillet 2021-septembre 2021	Rédaction du manuscrit de thèse Soutenance

Collaborations entre les deux partenaires, état du sujet dans le laboratoire

Le projet se base sur l'action conjointe de l'UCEIV-ULCO et de l'Equipe de Recherche des Molécules Bioactives de l'Université Libanaise.

Pour la partie française, le sujet sera mené au sein de l'équipe chimie supramoléculaire de l'UCEIV. Nos thématiques sont centrées sur la formation et la caractérisation de divers édifices supramoléculaires. Nous avons ainsi une longue expérience non seulement des cyclodextrines modifiées mais également des complexes formés avec des molécules d'intérêt pharmaceutique (Monteil 2017), environnemental et agro-alimentaire. En particulier, nous avons développé des méthodes de pointe pour la détermination des affinités intermoléculaires, par le biais de méthodes calorimétriques (ITC), spectrales (absorption UV-visible, Fluorescence, RMN) et chromatographiques (Headspace-GC). Des méthodes spécifiques de la reconnaissance moléculaire par l'albumine ont également été développées par notre équipe. Enfin, nous travaillons depuis 2014 sur les L.M.M. (Moura 2017) et leurs interactions avec les cyclodextrines.

Pour la partie libanaise, le sujet sera mené au sein de l'Equipe de Recherche des Molécules Bioactives de l'Université Libanaise. Le laboratoire a une large expérience dans la formulation et la caractérisation des liposomes conventionnels et du système mixte d'encapsulation à base de cyclodextrines et de liposomes (Drug-in-cyclodextrin-in-liposome). Ces études font appel à des techniques allant de la spectroscopie (FTIR, UV-Vis, fluorescence) et la chimie analytique (HPLC), vers les



méthodes biophysiques, en particulier calorimétriques (DSC) et morphologiques (AFM).

Retombées scientifiques et économiques attendues

Ce projet de thèse devrait permettre d'acquérir des connaissances inédites sur la synthèse de cyclodextrines au sein de L.M.M., sur les capacités d'encapsulation de ces nouveaux agents vis-à-vis de principes actifs et sur leurs interactions avec des entités biologiques (albumine, modèles membranaires). En fonction des résultats obtenus, une valorisation dans le cadre de produits pharmaceutiques ou de compléments alimentaires pourra être envisagée.

Références :

- R. Abboud, C. Charcosset, H. Greige-Gerges, Tetra- and Penta-Cyclic Triterpenes Interaction with Lipid Bilayer Membrane: A Structural Comparative Study, *J Membr Biol.* (2016), 249, 327-38.
- R. Anand, M. Malanga, I. Manet, F. Manoli, K. Tuza, A. Aykac, C. Ladavière, E. Fenyvesy, A. Vargas-Berenguel, R. Gref, S. Monti, Citric acid- α -cyclodextrin crosslinked oligomers as carriers for doxorubicin delivery, *Photochem. Photobiol. Sci.* (2013), 12, 1841-1854.
- A. Bejenariu, M. Popa, V. Dulong, L. Picton, D. Le Cerf, Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks : Synthesis, swelling, loading and releasing behaviour, *Polymer Bulletin.* (2009), 62, 525-538.
- C. Danel, N. Azaroval, C. Chavaria, P. Odou, B. Martel, C. Vaccher, Comparative study of the complex forming ability and enantioselectivity of cyclodextrin polymers by CE and H-1 NMR, *Carbohydr. Polym.* (2013), 92, 2282-2292.
- C. Florindo, F. S. Oliveira, L.P.N. Rebelo, A. M. Fernandes, I. M. Marrucho, Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids, *ACS Sustain. Chem. Eng.* (2014,) 2, 2416-2425.
- S. Kaddah, N. Khreich, F. Kaddah, C. Charcosset, H. Greige-Gerges, Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule, *Food Chem Toxicol.* (2018), 113, 40-48.
- M. Monteil, M. Lecouvey, D. Landy, S. Ruellan, I. Mallard, Cyclodextrins: A promising drug delivery vehicle for bisphosphonate, *Carb. Pol.* (2017) 156, 285-293.
- L. Moura, T. Moufawad, M. Ferreira, H. Bricout, S. Tilloy, E. Monflier, M.F. Costa Gomes, D. Landy, S. Fourmentin, Deep eutectic solvents as green absorbents of volatile organic pollutants, *Env. Chem. Lett.* (2017), 15 (4), 747-753.
- E. Smith, A. Abbott, K. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.* (2014), 114 (21), 11060-11082.
- V. Wintgens, C. Lorthioir, P. Dubot, B. Sébille, C. Amiel, Cyclodextrin/ dextran based hydrogels prepared by cross-linking with sodium trimetaphosphate, *Carbohydr. Polym.* (2015), 132, 80-88.