

Demande de création de l'ERIT
"Systèmes Amphiphiles Bioactifs et Formulations Eco-compatibles » (SAFE)

1) Composition de l'ERIT SAFE :

a) Membres permanents (titulaires) :

- **Christine Pépin**, MCF Hors Classe, HDR, (**Responsable**)
- **Ange Polidori**, Pr
- **1 Personnel technique (1/3 ETP affecté à l'ERIT SAFE) : ?** probablement **Maxence Rosa** (à discuter avec la direction de l'UfR STS)
- **1 Gestionnaire affecté à l'UPRI : ?** probablement **Victoria Vidau** (à discuter avec la direction de l'UfR STS)

b) Membres temporaires (non titulaires) :

- **Stéphane Desgranges**, PhD, contrat **Post-Doc**, (financement Inca Plan Cancer, projet BubDrop4Glio, en contrat jusqu'au 31/03/2022),
- **Amra Aksamija**, PhD, contrat **Ingénieur d'Etude**, (financement SattSE, maturation du brevet Extrémulsions, en contrat jusqu'au 31/12/2021).

2) Thématique scientifique et projets en cours associés :

La thématique scientifique de l'ERIT SAFE, centrée sur un savoir-faire en chimie des molécules amphiphiles, se décline selon deux axes de recherche :

Axe 1 : Synthèse de tensioactifs biocompatibles et conception de formulations sono-activables à visée théranostique (thérapie et diagnostic),

Axe 2 : Conception de formulations éco-compatibles pour/ou issues de la chimie verte (extraction/encapsulation de produits naturels, formulations riches en métaux issus du recyclage de déchets électroniques ou de la phytoremédiation).

Axe 1 : Systèmes amphiphiles bioactifs (agents théranostiques)

Les applications thérapeutiques et diagnostiques utilisant les ultrasons sont basées sur l'utilisation de liquides ou de gaz perfluorocarbonés, appelés agents de contraste. Les agents de contrastes commerciaux sont des microbulles de perfluorocarburés (PFC) utilisés pour rehausser le signal ultrasonore en imagerie (échographie). L'utilisation des microbulles de PFC associées aux ultrasons s'étend également à des applications thérapeutiques comme l'ablation ultrasonore de tumeurs (hyperthermie) ou la destruction de calculs rénaux par ultrasons. Plus récemment, l'activation ultrasonore des microbulles de PFC pour accroître la perméabilité de la membrane cellulaire (sonoporation) ou pour perméabiliser la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui isole le cerveau de la vascularisation (US-assisted BBB-opening) sont apparues comme des approches thérapeutiques très prometteuses en cours de développement clinique.

Les gaz perfluorocarbonés ont l'avantage d'être moins solubles dans le sang et le plasma que les autres gaz. Les liquides perfluorocarbonés le sont encore moins (ce qui les rend moins toxiques que leurs homologues gazeux) et possèdent la faculté d'être vaporisables en gaz sous l'effet des ultrasons. De plus, les fluides fluorés ne se mélangent pas et n'ont pas d'affinité avec d'autres molécules non-fluorées et sont ainsi considérés comme lipophobes (qui n'aime pas et donc ne s'associe pas aux corps gras) et hydrophobes (qui ne s'associe pas à l'eau). Leur stabilisation sous forme de gouttes ou de bulles est donc difficile à réaliser par des molécules stabilisantes classiques (*i.e.* les tensioactifs classiques utilisés pour stabiliser les agents de contraste commerciaux = lipides, protéines, polymères hydrocarbonés commerciaux). Une solution est d'utiliser des tensioactifs fluorés pour former la capsule (NB : il n'existe aucun tensioactif fluoré naturel), mais tous les tensioactifs fluorés commerciaux ne sont pas biocompatibles et sont destinés à des applications industrielles

généralement très éloignées des applications biomédicales. Faute de mieux, de nombreuses recherches médicales *in vitro* et sur le petit animal utilisent ces tensioactifs industriels en attendant mieux.

Dans ce contexte, nous (C. Pépin, S. Desgranges et nos collaborateurs hors AU) développons depuis 2012 des formulations de type nano/microémulsions de perfluorocarbures, stabilisées par des tensioactifs fluorocarbonés biocompatibles dont nous réalisons la synthèse au laboratoire. Ces nano- ou microémulsions sont des suspensions colloïdales de systèmes cœur-coquille de taille nano- ou micrométrique, dont les applications sont variées selon les projets (**seuls les projets en cours sont évoqués ci-dessous**) :

Projet “BubDrop4Glio” (financement ITMO Plan Cancer 2018-2022):

“Combination of perfluorocarbon microbubbles and nanodroplets for Glioblastoma treatment” (Christine Pépin, PI pour AU).

Dans ce projet, nous réalisons la synthèse de tensioactifs fluorocarbonés « à façon » (dont certains ont été brevetés sous l'appellation « Dendri-TAC ») et les utilisons pour stabiliser des nanogouttes de PFC, contenant en leur cœur une phase huileuse dans laquelle est solubilisé un agent anticancéreux (Paclitaxel, Docétaxel). Ces nanogouttes, de taille inférieure à 100 nm, sont capables de traverser la BHE, transitoirement ouverte après activation ultrasonore de microbulles commerciales (Sonovue, Bracco SA), et de délivrer le principe actif qu'elles transportent de façon contrôlée (activation ultrasonore). Le but du projet BubDrop4Glio est d'utiliser ces nanogouttes bioactives, combinées à une ouverture transitoire de la BHE, pour le traitement du glioblastome (cancer du cerveau).

Ce projet, coordonné par Nicolas Taulier (DR CNRS-INSERM, Sorbonne Université, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale), physicien spécialiste d'imagerie et ultrasons, est réalisé en partenariat avec des équipes de biologistes (Marie-Anne Estève, AMU, CNRS, Institut de Neurophysiopathologie, Faculté de Médecine) et des spécialistes de l'imagerie (IRM) et de l'ouverture de la BHE par ultrasons (Benoît Larat, équipe NeuroSpin, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS).

Ces travaux constituent également le sujet de thèse de **Charlotte Bérard**, doctorante à Aix-Marseille Université, codirigée par Marie-Anne Estève (50%) et Christine Pépin (50%) (**soutenance de thèse prévue le 17 Décembre 2021**).

Projet « UCOM » (Actions Marie Skłodowska-Curie (H2020)) : “Ultrasound Cavitation in sOft Materials” (Christine Pépin, PI pour AU).

Ce projet consiste à étudier l'effet d'ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) sur des microgouttes de PFC et leur utilisation possible pour détruire les tumeurs par hyperthermie. Dans ce projet nous préparons les tensioactifs ainsi que les microémulsions de perfluorocarbures et les incluons dans des gels mimant les tissus. L'effet thermique induit par des tirs ultrasonores focalisés de haute intensité sur ces émulsions ou gels chargés en microgouttes de PFC est étudié par l'équipe du Dr Rares Salomir à l'université de Genève. Ces travaux font l'objet de la thèse de Rayan Holman, doctorant recruté dans le cadre de ce financement Marie Curie (AMSC H2020). Ryan Holman a pu effectuer un séjour de 3 mois (Mai-Juillet 2021) dans notre équipe dans le cadre de son « secondment », initialement prévu dans le projet UCOM.

Axe 2 : Formulations Eco-compatibles

De nos jours les consommateurs sont de plus en plus attirés par les produits naturels issus de procédés dits « verts », à la fois éco-compatibles et durables. La chimie verte, avec ses 12 principes, permet de répondre à de nombreuses attentes du consommateur pour la production de produits à haute valeur ajoutée dans les domaines tels que l'alimentation, la cosmétique, les parfums ou la pharmacie.

En matière d'alimentation ou de produits cosmétiques, il est primordial de pouvoir extraire les ingrédients naturels qui les composent en limitant, voire abolissant, l'emploi des solvants organiques issus du pétrole, en réduisant au maximum l'empreinte carbone de ces ingrédients (origine des

matières premières) ou des procédés de fabrication (nombre limité d'étapes, procédés peu énergivores, émission réduite de CO₂...), en limitant les déchets et favorisant le recyclage, tout en garantissant l'efficacité (concentration en actif extrait, rendement) et la rentabilité du procédé.

L'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction des matrices végétales se heurte bien souvent au caractère lipophile de nombreuses molécules bioactives d'intérêt, impossibles à extraire dans l'eau pure. De ce fait, l'utilisation de solvants organiques toxiques même à l'état de traces est incontournable pour les industries chimiques, alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques qui produisent ou utilisent ces extraits végétaux. Or, des réglementations toujours plus nombreuses et contraignantes concernant les normes d'émissions de polluants atmosphériques, la santé humaine ou l'environnement imposent à terme la substitution des solvants interdits ou incriminés par des milieux d'extraction idéalement composés d'eau comme solvant majoritaire et pouvant présenter une capacité de solubilisation large en termes de sélectivité et de polarité.

Dans ce contexte, nous avons développé un procédé d'extraction innovant dans l'eau additionnée d'huiles biocompatibles et de tensioactifs d'origine naturelle ou synthétique permettant d'aboutir, en un nombre limité d'étapes, à des extraits végétaux de type nano- ou microémulsions « huile dans eau » enrichis en molécules bioactives. La conception de formulations sèches à partir de ces extraits a également été réalisée de manière à aboutir à des poudres faciles à stocker et à transporter et prêtes à l'emploi après réhydratation. Ces extraits-émulsions produits en une seule étape combinant extraction et encapsulation d'actifs hydrophobes, dans un milieu essentiellement constitué d'eau, ont été brevetés sous l'appellation « **Extrémulsions** ».

La mise en œuvre de ce procédé pour l'extraction/encapsulation de la curcumine à partir du *Curcuma longa* a fait l'objet des travaux de thèse d'**Alice Dall'armellina** sous la direction de Christine Pépin (encadrement 100 %, financement Région Sud / entreprise Lyofal, **thèse soutenue le 10 Juin 2021**).

Dans le domaine de l'industrie chimique et plus particulièrement dans le domaine de la chimie pharmaceutique, les contraintes de développement durable, bien que moins pesantes que pour les applications précédemment citées, commencent également à s'imposer aux industriels. En effet, la synthèse de produits chimiques implique l'utilisation massive de solvants organiques polluants qu'il faut ensuite retraiter, entraînant un coût financier et écologique important. Adapter les stratégies de synthèse organique à un milieu aqueux constitue donc une alternative industrielle de choix, plus respectueuse de l'environnement et peu coûteuse. Le principal challenge de la chimie en milieu aqueux réside dans la faible solubilité des réactifs. D'autre part, de nombreuses réactions pratiquées dans l'industrie chimique mettent en œuvre des catalyseurs issus de minerais contenant des métaux précieux dont l'extraction est coûteuse et polluante expliquant leurs prix élevés.

Les technologies « **CatInMic** » et « **Nanoréacteurs verts** » que nous avons développées et brevetées en partenariat avec le Dr Frédéric Bihel (DR CNRS, Laboratoire d'innovation thérapeutique, Université de Strasbourg) et le Dr Damien Bourgeois (DR CNRS, Institut de Chimie Séparative de Marcoule) permettent de répondre à ces attentes.

En utilisant des tensioactifs adaptés synthétisés par nos soins, nous avons conçu des nanoréacteurs de type micelles ou nanogouttes permettant d'une part de contre-extraire des métaux précieux (comme le palladium) issus du recyclage des déchets électroniques, et d'autre part de réaliser dans l'eau dans des conditions expérimentales douces (température ambiante, atmosphère non contrôlée) des réactions catalytiques habituellement conduites dans les solvants organiques à reflux sous atmosphère inerte. Le procédé en deux temps consiste ainsi à complexer les métaux issus du recyclage à des nanoobjets qui jouent ensuite le rôle de nanoréacteurs pour réaliser des réactions organo-catalysées entre réactifs peu solubles voire insolubles dans l'eau.

La mise en œuvre du procédé « CatInMic » pour la conception et « l'étude physico-chimique d'amphiphiles auto-assemblés pour l'extraction de métaux et la catalyse en milieu aqueux » a fait l'objet des travaux de thèse de **Valentin Lacanau**, thèse codirigée par Damien Bourgeois (50%) et Christine Pépin (50%) (financement Labex CheMISys, **thèse soutenue le 29 Novembre 2019**).

Comme pour l'axe 1, seuls les projets toujours en cours sont détaillés ci-dessous :

Projet « Extrémulsions » (maturation de brevet, financement SattSE - Sept. 2019-Déc. 2021)

Cette maturation de brevet a permis (i) d'étendre le brevet Extrémulsion à l'international (**WO 2020/109418**) par de nombreux exemples d'application du procédé venus renforcer le brevet français initialement déposé (**FR 1871961**) (ii) et d'autre part de présenter cette technologie à de nombreux industriels (près de 10 accords de confidentialité signés avec des entreprises de l'industrie cosmétique et de l'alimentation animale) et de relever certains défis proposés par ces mêmes industriels (notamment par les sociétés l'Occitane ou Dynvéo) afin d'élargir le champs d'application du procédé. Un projet de création de start-up a également émergé durant cette maturation (validé par le comité d'investissement de la SattSE) mais n'ayant pas encore abouti.

3) Porteur (voir CV détaillé du porteur)

Production Scientifique

32 Publications dans des revues avec comité de lecture (+ **1** soumise/ *Small Journal*, + **2** en cours de soumission, + **1** en cours de rédaction)

9 Brevets (1 maturation de brevet en cours)

6 Actes de Congrès

3 Conférences Invitées, **12** Conférences lors de séminaires, **5** Conférences de vulgarisation

34 Communications orales (dont 7 présentées personnellement) et **63** Communications par affiches

Responsabilités Scientifiques

Impliquée (responsable scientifique (PI) ou coordinatrice) dans plusieurs projets de recherche :

- Projet ANR- nUCA (Nano ultrasound contrast agents for imaging and therapeutic applications) **2012-2016**: PI pour AU
- Projet Européen EuroNanoMed –Sonotherag (Sonoactivable Nanotheragnostics for Cancer Treatment) **2014-2017**: **coordinatrice du projet**.
- Projet Institut Carnot Star – MUSEM (Molecular UltraSonography for an Emerging Medicine) **2015**: PI pour AU
- Projet Swiss National Science Foundation – CAMUS (Cascade-AMplified UltraSound focal ablation) **2016-2018**: PI pour AU
- Projet Marie Skłodowska-Curie Actions (H2020) – Ultrasound Cavitation in sOfT Materials (UCOM project) **2018-2022**: PI pour AU
- Projet InCa (ITMO Plan Cancer) – BubDrop4Glio (Combination of perfluorocarbon microbubbles and nanodroplets for Glioblastoma treatment) **2018-2022**: PI pour AU
- Projets de maturation de brevets (financements Satt Sud-Est) : responsable scientifique de la maturation du brevet DendriTAC (**2018-2019**) et du brevet Extrémulsions (**2019-2021**).

- Co-Responsable de l'axe « La cavitation dans les applications médicales » du **GDR Cavitation** (co-pilotage de l'axe avec N.Taulier) (**2019- présent**).

Collaborations

- Nicolas TAULIER (DR CNRS) Sorbonne Université, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale
- Rares SALOMIR (Prof.) Université de Genève,
- Marie-Anne ESTEVE (MCU-PH) AMU, Inst. de NeuroPhysiopath., CNRS UMR7051
- Benoît LARAT (CR CEA) NeuroSpin, CEA, CNRS, Université Paris Saclay
- Jean-Michel ESCOFFRE (CR-INSERM) UMR 1253 iBrain, Université de Tours

- Wladimir URBACH (Prof.) Laboratoire de physique, ENS, Paris.
- Samir CHERKAOUI (Dir. R&D) BRACCO Genève SA.
- Qian PENG (Prof.) Oslo University Hospital
- Damien BOURGEOIS (DR CNRS), Institut de Chimie Séparative de Marcoule
- Frédéric BIHEL (DR CNRS), Lab. d'innovation thérapeutique, Université de Strasbourg

Encadrement

8 Doctorants :

- **Sylvain Jasseron**, (co-direction à **50%** avec B. Pucci) Sept. **2000**-Dec. **2003**
- **Sandrine Périno**, (co-direction à **50%** avec B. Pucci) Sept. **2000**-Dec. **2003**
- **Audrey Parat**, (co-direction à **50%** avec B. Pucci) Nov. **2004**-Avril **2008**
- **Cindy Patinote**, (direction à **100%**) Oct.**2008**-Janv.**2012**
- **Valentin Lacanau**, (co-direction à **50%** avec D. Bourgeois, ICSM) Oct **2016**-Nov.**2019**
- **Emilie Grousseau**, (co-direction à **50%** avec G. Durand) Oct **2017**-Avr.**2021**
- **Alice Dall'armellina**, (direction à **100%**) Nov. **2017**-Juin **2021**
- **Charlotte Bérard**, (co-direction à **50%** avec M.A. Estève, AMU) Nov. **2018**-Dec. **2021**

26 Encadrements de stagiaires de Master, DEA, Élèves ingénieurs

4) Perspectives

A/ Recherche et innovation

Axe 1 :

Au travers des différents *projets de recherche* auxquels nous avons participé depuis 2012, nous avons pu mettre au point et optimiser des formulations de perfluorocarbures suffisamment stables (sous forme de poudres prêtes à l'emploi) et de taille adaptée à de nombreuses applications médicales. Ce savoir-faire nous a permis d'occuper une place centrale dans de nombreux projets de recherche pluridisciplinaires et d'établir de solides collaborations de recherche avec de nombreux collègues d'expertise complémentaire à la nôtre :

- **Nicolas Taulier** (Sorbonne Université), spécialiste des ultrasons, en charge notamment de l'activation ultrasonore des nanogouttes de PFC pour la délivrance contrôlée de principes actifs.
- **Rares Salomir** (Université de Genève), spécialiste de l'ablation tumorale, qui étudie l'élévation de température liée à l'activation des microgouttes de PFC, sous HIFU,
- **Marie-Anne Estève** (Université d'AMU), spécialiste du glioblastome et de nanomédecine, qui a révélé le potentiel de nos nanogouttes, pour le traitement de maladies du cerveau après ouverture de la BHE,
- **Benoît Larat** (Université Paris-Saclay), spécialiste d'IRM et d'utilisation des ultrasons pour ouvrir la BHE, qui a mis au point les séquences de tirs ultrasonores permettant d'ouvrir la BHE sans induire d'hémorragies cérébrales lors du projet BubDrop4Glio.

Ces différents collègues ont été nos partenaires dans plusieurs projets financés par l'ANR (ANR *nUCA* **2012-2016**) ; par l'Europe (Projet Sonotherag **2014-2018**, AAP EuroNanoMed II ; Projet UCOM **2018-2022**, H2020 - Marie Skłodowska-Curie Actions) ; par la SattSE (maturation brevet DendriTAC **2018-2019**) ou par la Suisse (Projet CAMUS **2016-2018**, Swiss National Science Foundation).

Ils sont pour la plupart nos partenaires dans les nombreux AAP auxquels je réponds chaque année. Cette année, j'ai participé ou porté les projets suivants, qui pourraient donc devenir les futurs objectifs de recherche de l'équipe SAFE en cas de succès :

- **Pré-proposition ANR, Octobre 2021**, projet soumis « SonoCocktail » pour « Cocktail of sonosensitive droplets for BBB-opening and brain therapy », Christine Pépin (PI pour AU) ; (coordinateur N. Taulier)
- **Pré-proposition ANR, Octobre 2021**, projet soumis « Caps-Release » pour « Release under ultrasonic stimulation of microdroplets and microcapsules containing active substances », Christine Pépin (PI pour AU) ; (coordinateur A. V. Salsac, DR CNRS, Université de Technologie de Compiègne)
- **Projet Européen Horizon-MSCA-DN-2021, Novembre 2021**, projet soumis « Aspire » pour « Ultrasound activation of nanobubbles and nanodroplets for anticancer treatment resistance associated to fibrin clot shields », Christine Pépin (coordinatrice).
- **Projet ITMO Plan Cancer (PCSI 2022), en cours de préparation, Décembre 2021**, projet « GlioSonoDrop » pour « Treatment of glioblastoma using nanodroplets that take advantage of blood brain barrier opening » Christine Pépin (PI pour AU); (coordinateur N. Taulier).

En matière d'innovation, nous travaillons en collaboration avec l'un des leaders mondiaux des agents de contraste, la **société Bracco**. Cette collaboration, initiée en 2019, fait l'objet d'un MTA entre le groupe Bracco et AU, et a donné lieu à une demande de brevet conjointe (EP20207039.7) en novembre 2020 dont l'**extension PCT** vient d'être déposée en **novembre 2021**. Un avenant au MTA initial est en cours de signature entre AU et le groupe Bracco afin de poursuivre la collaboration.

Le groupe Bracco est par ailleurs l'un des 15 partenaires du Projet européen ASPIRE soumis en novembre 2021 dans le cadre de l'APP H2021 et porté par Christine Pépin.

Axe 2 :

Dans le cadre de la thèse d'Alice Dall'armellina, une collaboration fructueuse a pu être initiée avec l'équipe du Dr Patrick Borel (DR INRAE, équipe C2VN, INSERM-AMU), spécialiste en micronutrition humaine. Cette équipe a notamment étudié la bioaccessibilité et l'absorption des extrémulsions de curcumine mis au point à Avignon (travaux en cours de publication) qui se sont révélées bien meilleures que celles de formulations commerciales de la curcumine utilisées en nutrition animale.

Forts de cette complémentarité entre nos deux équipes, nous avons essayé de poursuivre la collaboration en construisant un sujet de thèse en codirection portant sur « L'Eco-extraction et encapsulation de xanthophylles issus de matrices végétales dans des extrémulsions permettant d'accroître leur stabilité et leur biodisponibilité ». Ce sujet présenté devant le conseil scientifique de la **SFR Tersys** a été **retenu pour financement le 22 novembre 2022**. Nous avons donc bon espoir de pouvoir recruter un doctorant qui démarrera sa thèse dès septembre 2022. Les deux premières années de la thèse seront effectuées au sein de l'équipe SAFE.

En matière d'innovation, le brevet « Nanoréacteurs verts » (FR2005610, « Formulations pour la catalyse métallique dans l'eau ») déposé en **Mai 2020**, intéresse une société spécialisée dans la dépollution des sols par des plantes phyto-accumulatrices (Société Biomed). Différentes voies de collaborations (bourse Cifre, AAP Graine de l'ADEME) sont en cours de réflexion. Un partenariat avec une équipe du CEREGE (Centre Européen de Recherche et d'Enseignement en Géosciences de l'Environnement, Technopôle de l'Arbois-Méditerranée, Aix-en Provence) pourrait s'avérer très utile dans cette thématique (prise de contact récente avec Blanche Collin, MCF AMU-CEREGE).

B/ Intégration membres associés

Nicolas Taulier portera sa candidature auprès du conseil scientifique de l'UPRI dès sa création, pour devenir membre associé de l'équipe SAFE.