

- **Date de la demande** (21/01/2018) :

### **Identification du projet (en langue française)**

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

- **Intitulé du projet** (en langue française) :

Développement et fonctionnalisation de biomatériaux d'origine marine pour l'ingénierie tissulaire

### **Présentation de l'équipe de recherche**

- **Equipe** : PANORAMA-UMR 6539 LEMAR (IUEM, Plouzané)

- **Activités de recherche et points forts de l'équipe**

Cette équipe s'intéresse aux processus physiologiques et aux interactions entre espèces dans le contexte du changement global et valorise ces connaissances en biotechnologie. Notamment via l'utilisation de molécules impliquées dans les interactions, et le développement de matériaux bio-inspirés.

<https://www-iuem.univ-brest.fr/UMR6539/>

- **Ecole Doctorale** : Ecole Doctorale Sciences de la Mer et du Littoral (EDSML)

**Si implication dans un/plusieurs programmes européens ou internationaux, préciser**

Projet INTERREG (2018-2020) VB Atlantic Area (EAPA\_151/2016) BLUEHUMAN (2.5 M€) / Projet Européen EU COST (2016-2019) European Network of Bioadhesion Expertise (ENBA) / Projet Européen H2020 « VIVALDI » (2016-2020) SFS-10b-2015 Preventing and mitigating farmed bivalve diseases

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

- **Nom et prénom** : Le Blay Gwenaelle

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

- **e-mail** : gwenaelle.leblay@univ-brest.fr

- **Téléphone** : +33 (0) 290915565

- **Co-directeur-trice de thèse (éventuellement)** : F Guerard , V Stiger, C Hellio

### **Présentation du projet**

- **Résumé du projet** :

Les ostéomyélites chroniques sont marquées par un taux élevé de récurrences car il n'existe pas de moyen efficace pour les contrôler. Le traitement classique de ces infections qui consiste en une intervention chirurgicale associée à une antibiothérapie prolongée, représente un fort taux de morbidité et un coût important. L'administration d'antibiotiques par voie orale ou parentérale est loin d'être optimale en raison de l'émergence de bactéries résistantes, de leur difficulté à atteindre le site d'infection, et de leur toxicité systémique. Les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans les ostéomyélites sont *Staphylococcus aureus* suivies de *Pseudomonas aeruginosa* et des entérobactéries. Leur capacité à former des biofilms leur offre une forte protection contre le système de défense de l'hôte et les antibiotiques, qui sont parfois incapables de contrôler l'infection et sont des causes courantes de morbidité et de mortalité.

L'administration locale d'antibiotiques est une nouvelle modalité thérapeutique qui permet d'augmenter la quantité d'antibiotiques délivrés dans la zone cible, tout en diminuant les effets secondaires observés avec les stratégies classiques. De la même façon, l'utilisation de biomatériaux possédant des propriétés antibactériennes et ostéogènes est maintenant envisagée pour traiter les défauts osseux afin de maîtriser l'infection osseuse tout en stimulant sa régénération.

Les biomatériaux à base de collagène marin suscitent un intérêt croissant auprès des communautés scientifique et industrielle du secteur de la santé humaine. Comme tous les collagènes, il a la capacité de polymériser sous forme de matrices 3D, sans les inconvénients des collagènes porcine ou bovine, associés à des contraintes religieuses ou à un risque de contamination par l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine. Les végétaux marins (macroalgues et halophytes) quant à eux, produisent un large éventail de composés actifs présentant différentes structures chimiques et possédant un large spectre d'activités biologiques.

Dans ce contexte nous avons émis l'hypothèse qu'un substitut osseux basé sur une matrice de collagène de poisson fonctionnalisée par des composés phénoliques issus d'halophytes et/ou de macroalgues et possédant des activités anti-biofilm ; anti-bactérienne, pro-ostéogénique et/ou pro-minéralogénique pourrait stimuler la régénération osseuse tout en diminuant les risques d'infection.

Ce projet de doctorat s'articulera donc autour de 3 principaux objectifs:

1) Le développement d'une matrice de collagène de poisson ayant des propriétés mécaniques renforcées en améliorant sa stabilité mécanique par réticulation enzymatique. Ces procédés innovants permettront d'agir sur les propriétés rhéologiques et sur la porosité des gels néoformés qui devront accueillir des marqueurs ou de petites molécules bioactives. La compréhension des mécanismes de réticulation et de leur impact sur le réseau tridimensionnel des matrices de collagène seront au cœur des recherches.

2) La production d'extraits actifs (composés phénoliques) de macroalgues et de plantes halophytes dont nous maîtrisons les techniques d'extraction et de dosages, et dont nous connaissons les périodes de production maximales chez ces végétaux marins. Des procédés d'extraction alternatifs seront également recherchés afin d'obtenir de façon éco-responsable et efficace des composés phénoliques actifs.

3) Le criblage de ces extraits pour la recherche d'activités d'intérêt (anti-bactériennes et anti-biofilm) en ingénierie osseuse, dont nous maîtrisons les méthodologies. D'éventuelles activités synergiques des extraits testés, et l'émergence de résistances bactériennes seront recherchées ainsi que le maintien des activités au sein des matrices de collagène. Les activités ostéogènes et cytotoxiques des extraits seront effectuées en collaboration avec des partenaires du projet INTERREG BlueHuman

## **- Projet :**

Il existe une forte demande de matériaux innovants en ingénierie osseuse. L'utilisation de biomatériaux possédant des propriétés antibactériennes et ostéogènes est envisagée pour traiter les défauts osseux afin de maîtriser l'infection tout en stimulant la régénération osseuse. L'utilisation de collagène de poisson et de polyphénols bioactifs extraits de végétaux marins pourrait combler ce besoin en biomatériaux fonctionnalisés.

Le collagène marin suscite un fort intérêt en santé humaine. Comme tous les collagènes, il a la capacité de polymériser sous forme de matrices 3D, sans les inconvénients associés aux collagènes porcins ou bovins, associés à des contraintes religieuses ou à un risque de contamination par l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine. Ceci le rend très attractif pour des applications à haute valeur ajoutée en ingénierie tissulaire. Les végétaux marins quant à eux, produisent un large éventail de composés actifs avec un large spectre d'activités biologiques.

Ce projet de doctorat s'articulera autour de 3 objectifs principaux, décrit ci-dessous avec leurs points de blocage

1) Développement d'une matrice de collagène de poisson ayant des propriétés mécaniques renforcées grâce à l'utilisation de méthodes innovantes

Le collagène marin extrait des peaux de poissons d'eau froide, a une proportion plus faible en acides aminés apportant une rigidité à la triple hélice de collagène. Il présente donc des propriétés mécaniques faibles et il est plus instable sur le plan thermique que les collagènes de mammifère (Guérard, 2007). Pour y remédier, il est possible de créer des liaisons croisées par des procédés de réticulation enzymatique du collagène de type 1. Ces procédés innovants sont peu exploités pour la réticulation du collagène marin. Ils seront privilégiés ici car ils permettront d'agir sur les propriétés rhéologiques et sur la porosité des gels néoformés. Les matrices en 3D consolidées pourront accueillir des marqueurs ou de petites molécules bioactives d'origine marine au sein du réseau protéique, ce qui est crucial en ingénierie tissulaire. La compréhension des mécanismes de réticulation et de leur impact sur le réseau tridimensionnel des matrices de collagène seront au cœur des recherches.

2) Des extraits seront préparés à partir de végétaux marins

Seuls les composés phénoliques ou polyphénols, qui réunissent une multitude d'activités, seront recherchés ici. Les points de blocage se situent à différents niveaux.

a) Les teneurs en composés phénoliques varient selon l'environnement et la phénologie des végétaux marins (Stiger et al. 2004). Il sera crucial de collecter les végétaux à une période de production maximale et de suivre l'empreinte chimique de leurs composés phénoliques par la technique RMN HR-MAS que nous avons mise au point (Jégou et al. 2015).

b) Nous avons aussi développé une technique simple d'extraction solide/liquide, suivie d'une purification liquide/liquide pour les algues brunes et les végétaux marins (Stiger-Pouvreau et al. 2014). Elle permet d'obtenir une fraction semi-purifiée enrichie en composés phénoliques actifs. Des procédés alternatifs plus éco-responsables seront aussi recherchés.

c) L'identification structurale de ces composés phénoliques reste problématique en raison de l'absence de standards pour leur dosage en HPLC. C'est donc un mélange de composés phénoliques qui sera utilisé pour les tests d'activités. Diverses techniques de purification, comme la chromatographie flash ou la CPC, seront testées pour fractionner les différents composés.

3) Criblages des extraits pour leurs activités anti-microbiennes, anti-biofilm, pro-minéralogénique et/ou pro-ostéogénique.

Un des risques du criblage est de ne retrouver aucune activité d'intérêt. Ceci ne sera pas le cas car des

tests préliminaires ont déjà mis en évidence des composés bioactifs. Pour éviter l'émergence de résistances bactériennes, la combinaison de différents extraits actifs sera testée, ainsi que leur cytotoxicité. Le maintien des activités des extraits sera aussi testé dans les matrices de collagène.

***Approche méthodologique et technique envisagée:***

- 1) Développement d'une matrice de collagène de poisson ayant des propriétés mécaniques renforcées
  - Optimisation d'un procédé d'extraction de collagène de peaux de poisson, à basse température, pour conserver au mieux la structure tridimensionnelle du collagène.
  - Mise au point des conditions optimales (pH, température, aw, enzymes..) pour réaliser la réticulation à l'aide d'une préparation enzymatique ou d'une combinaison d'enzymes.
  - Evaluation de l'impact de la réticulation sur les propriétés rhéologiques et structurales des collagènes réticulés (analyses en rhéologie, microscopie, RMN, FTIR, spectrométrie de masse..)
  - Etude des relations structure-fonction selon les méthodes et conditions de réticulation, quantification des liaisons croisées néoformées, de la taille des pores des éponges de collagène lyophilisé...

Les collagènes marins réticulés par traitement enzymatique seront dépourvus de traces de résidus chimiques potentiellement cytotoxiques, souvent incompatibles avec les lignées cellulaires utilisées pour la régénération tissulaire.

- 2) Des extraits seront préparés à partir de macroalgues et d'halophytes
  - Recherche du meilleur procédé d'extraction et de purification des composés phénoliques, permettant l'obtention de fractions enrichies et actives (antioxydantes, pro-minéralogéniques, antimicrobiennes).
  - Identification structurale des composés phénoliques présents dans les fractions enrichies, à l'aide d'analyses chromatographiques et spectrométriques (RMN, LC-MS).
  - Mise au point des conditions optimales de fonctionnalisation des composés phénoliques avec la matrice de collagène.
- 3) Criblages des extraits pour leurs activités anti-microbiennes, anti-biofilm, pro-minéralogéniques et/ou pro-ostéogéniques.
  - Analyse des activités antibactériennes par la méthode de diffusion en puits, et par la technique de micro-dilution en plaque (EUCAST, 2003) pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).
  - Analyse des activités antibiofilm par les méthodes de coloration au cristal violet et au DAPI pour obtenir les IC90 et IC50 (90 ou 50% d'inhibition).
  - Dépistage quantitatif des activités anti-QS par l'inhibition de la production de pigments par *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 et quantification de l'inhibition des AHL par spectrophotométrie.
  - L'apparition de résistances sera évaluée en étudiant l'effet de l'exposition répétée des bactéries à des concentrations sub-CMI des extraits actifs.

La stabilité des résistances éventuellement observées sera évaluée en re-cultivant les bactéries résistantes sans biocide et en testant leur capacité de résistance

- Les différents tests d'activité seront faits sur les extraits seuls, en mélange ou incorporés dans les matrices de collagènes
- Les activités pro-minéralogéniques et cytotoxiques seront testées respectivement en collaboration

avec E Cancela (UALG) et R Fagon (YSLAB) dans la cadre du projet InterReg BLUEHUMAN.

### ***Contexte scientifique et partenarial : éléments généraux***

Malgré la grande variété de traitements disponibles pour lutter contre les infections osseuses, l'ostéomyélite chronique est marquée par un taux élevé de récurrences car il n'existe pas de moyen efficace pour la contrôler (Nandi et al. 2016). Le traitement classique consiste en une intervention chirurgicale associée à une antibiothérapie prolongée et représente un lourd fardeau en termes de morbidité et de coûts. L'administration d'antibiotiques par voie orale ou parentérale est loin d'être optimale en raison de l'émergence de bactéries résistantes (Bidault et al. 2007), de leur difficulté à atteindre le site d'infection, de leur toxicité systémique, sans compter leur impact négatif sur le microbiote intestinal. Les infections osseuses peuvent être dues à un traumatisme, une opération chirurgicale ou des implants; et elles peuvent être compliquées par l'insuffisance vasculaire associée au diabète et/ou aux maladies vasculaires périphériques (Calderini et al., 2014). Les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans l'ostéomyélite sont *Staphylococcus aureus* (80% des cas) suivis de *Pseudomonas aeruginosa* et des entérobactéries. Ces bactéries peuvent adhérer aux tissus et aux matériaux implantés (plaques & vis métalliques). Leur capacité à former des biofilms leur offre une forte protection contre le système immunitaire et les antibiotiques. Ceux-ci sont parfois incapables de contrôler l'infection en raison de la diversité des mécanismes associés à ces bactéries infectieuses qui maintiennent une faible activité métabolique, vivant en état de dormance à l'intérieur des ostéoblastes et/ou qui développent des biofilms (Nandi et al., 2016). Cela réduit leur sensibilité aux antibiotiques par un facteur de 100 (Nandi et al., 2016). Ces biofilms très difficiles à traiter, sont des causes courantes de morbidité et de mortalité.

### ***Stratégies novatrices pour la guérison osseuse***

L'administration locale d'antibiotiques via des matériaux biodégradables est une nouvelle modalité thérapeutique qui permet d'augmenter la quantité d'antibiotiques délivrés dans la zone cible, tout en diminuant les effets secondaires observés avec les stratégies classiques (Nandi et al., 2016). L'addition de composés inhibant les molécules du quorum sensing impliquées dans la formation de biofilms a également été proposée. Ceci a été efficace dans un modèle de souris avec ou sans antibiotiques (Balaban et al. 2007).

### ***Utilisation d'antimicrobiens associés aux biomatériaux en reconstruction osseuse***

De la même façon, l'utilisation de substituts osseux associés à des antimicrobiens pourrait être développée en ingénierie osseuse afin de limiter les infections osseuses lors de chirurgies ouvertes de longue durée (Nair et al. 2011). L'utilisation de biomatériaux possédant des propriétés antibactériennes et ostéogènes est maintenant envisagée pour traiter les défauts osseux afin de maîtriser l'infection osseuse tout en stimulant sa régénération (Lu et al., 2016).

### ***Retombées économiques et sociétales***

Les résultats de cette recherche permettront :

- 1) de trouver des voies innovantes de valorisation pour les coproduits marins, notamment les peaux de poisson actuellement sous-valorisées, pour offrir aux entreprises la possibilité de diversifier leurs activités et de conquérir de nouveaux marchés à haute valeur ajoutée dans un secteur en développement, celui des matériaux biocompatibles pour l'ingénierie tissulaire. Une combinaison d'enzymes appropriée pour la réticulation du collagène devrait permettre de proposer toute une gamme de collagènes marins «à façon» couvrant ces champs d'applications très innovants.
- 2) établir des preuves de concept qui seront applicables à l'ensemble de la filière de valorisation des coproduits marins riches en collagène.

3) exploiter la biodiversité marine bretonne en identifiant de nouveaux champs d'application pour les actifs extraits de végétaux marins, avec leur application dans le domaine de la santé

*Profil du candidat (compétences scientifiques et techniques requises) :*

Le/la candidat(e) recherché(e) aura une formation académique de niveau master 2 ou équivalent en biotechnologie marine. Il ou elle devra avoir des compétences avérées en biochimie et en microbiologie. Finalement le candidat devra avoir une bonne maîtrise de l'anglais car il/elle pourra être amené(e) à présenter ses résultats dans le cadre du projet européen BLUEHUMAN et lors des collaborations avec des partenaires étrangers.

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

Ce doctorat s'intègre dans le projet européen projet Européen INTERREG VB BLUEHUMAN (2017-2020). Ce projet international incluant 5 pays Européens (Portugal, Espagne, France, Irlande et Royaume Uni) est un consortium constitué de 16 partenaires (dont l'UBO), réunissant des unités de recherches de pointe dans les domaines de l'ingénierie tissulaire, l'ostéogénèse et la régénération osseuse, associées à des acteurs privés apportant ainsi des expertises complémentaires pour le succès de cette thématique :

- Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR (Espagne)
- Centro Interdisciplinar de InvestigaçãO Marinha e Ambiental (Espagne)
- Instituto de Investigaciones Marinas – Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- SAS YSLAB
- Universidade do Algarve
- Universidad de Vigo
- Royal College of Surgeons in Ireland
- Universidade da Madeira
- JELLAGEN PTY LTD
- SURGACOLL Technologies Limited
- Agrupación Europea de Cooperación Territorial Galicia
- Axencia Galega de Innovación
- Agência Nacional de Inovação
- Agencia Estatal de Investigación (MINECO)
- Facultad de ciencias da universidade do Porto

Le/la doctorant(e) bénéficiera donc d'un réseau collaboratif international. Tous les coûts de ses missions ainsi que les frais de fonctionnement seront couverts par le projet INTERREG BLUEHUMAN.

#### **Projet de thèse en cotutelle internationale**

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

#### **Financement du projet de thèse**

**- Part de l'enveloppe financière régionale affectée au projet (part exprimée en ETP) : 50%**

**- 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.) : Financement déjà acquis dans le cadre du Projet INTERREG (2018-2020) VB Atlantic Area (EAPA\_151/2016) BLUEHUMAN**