



l'intelligence du vivant
structure fédérative de recherche

Demande de bourse de thèse

Dossier de proposition de sujet de thèse 2022

à transmettre pour le 30 octobre 2021
à la SFR (Cyril Reboul ou Nadia Bertin, copie à Maryline Sanchez-Joly)

Encadrement

Directeur principal de la thèse, rattaché à l'ED 536 (HDR) <i>Nom et laboratoire de rattachement</i> <i>Taux d'encadrement *</i>	Christine CONTINO-PEPIN, MCF-HDR (AU) Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles (CBSA), Avignon Université. 50%
Codirecteur éventuel <i>Nom et laboratoire de rattachement</i>	Patrick BOREL, DR INRAE C2VN, UMR 1260 INRAE / 1263 INSERM / Aix-Marseille Université. Faculté de médecine de la Timone, Marseille. 25%
Encadrant(s) (Non-HDR) <i>noms et laboratoires de rattachement</i>	Charles DESMARCHELIER, MCU Faculté de Pharmacie. C2VN, UMR 1260 INRAE / 1263 INSERM / Aix-Marseille Université. Faculté de médecine de la Timone, Marseille. 25%

* Selon les règles de l'ED 536, le nombre de thèses encadrées ne peut excéder 3 personnes à 100%

Laboratoires de la SFR impliqués	Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles (CBSA)/Avignon Université. Equipe « Micronutrition Humaine », C2VN, UMR 1263 INSERM/1260 INRAE/Université d'Aix-Marseille.
Titre de la thèse*	<i>Eco-extraction et encapsulation de xanthophylles issus de matrices végétales dans des extrémulsions permettant d'accroître leur stabilité et leur biodisponibilité.</i>
Résumé (10 – 15 lignes)	<p>L'équipe CBSA a récemment mis au point un procédé innovant permettant de simultanément extraire sans solvant des molécules bioactives lipophiles et de les formuler dans un milieu essentiellement constitué d'eau.¹ Ce procédé, répondant aux attentes et exigences de la chimie verte, aboutit à des extraits-émulsions, appelées « extrémulsions », dont les propriétés modulables à façon (nature du tensioactif constituant l'enveloppe, taille des gouttes, polydispersité, concentration en molécule bioactive d'intérêt et stabilité dans le temps) sont particulièrement intéressantes pour des applications dans le domaine de l'alimentation et de la supplémentation. Les extrémulsions sont des nano- ou microémulsions dont la lyophilisation aboutit à des poudres faciles à conserver et à reconstituer à l'identique par simple addition d'eau.² Un travail récent mené en collaboration avec l'équipe de P. Borel au C2VN a montré l'intérêt d'extrémulsions issues du <i>Curcuma longa</i> pour améliorer la bioaccessibilité et le captage entérocytaire de la curcumine.³ Forts de cette preuve de concept, nous souhaitons à présent explorer le potentiel de ce procédé pour la conception d'extrémulsions enrichies en lutéine et en zéaxanthine, deux pigments lipophiles de la famille des caroténoïdes, et plus précisément de la sous-famille des xanthophylles, qui sont impliqués non seulement dans la fonction visuelle et dans la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA),⁴ mais aussi dans la prévention de troubles neurocognitifs. Ces pigments sont présents dans de nombreux légumes et</p>

fruits (brocolis, maïs, épinards...) mais leur biodisponibilité est relativement faible et très variable, notamment à cause des interactions avec les matrices végétales dans lesquelles ils sont présents.⁵⁻⁹ Les aliments riches en ces composés bioactifs étant peu consommés par une part importante de la population, leur consommation via des compléments alimentaires ou via la fortification d'autres aliments plus communément consommés (produits laitiers, farines ou autres) pourrait permettre des apports suffisants aux personnes à risque de développer des pathologies oculaires ou neurodégénératives (antécédents familiaux, faibles consommateurs de fruits et légumes, fumeurs...). Par ailleurs, ces molécules aux propriétés antioxydantes sont, de par leur sensibilité à l'oxydation, relativement labiles et leur incorporation dans les extrémulsions devrait permettre non seulement de les protéger de la dégradation oxydative mais aussi d'améliorer leur biodisponibilité et donc leurs effets santé.¹⁰

Axe(s) de la SFR TERSYS concerné(s)

Notre projet s'inscrit dans l'axe 3 de la SFR Tersys : « Effets des procédés sur la qualité des produits végétaux conservés, transformés ou extraits ». Il concerne plus particulièrement le domaine « Procédés d'extraction innovants » et il répond parfaitement au 3^{ème} enjeu qui précise que « La transformation peut être utilisée comme un levier pour augmenter la biodisponibilité et l'assimilabilité d'un certain nombre de phytomicronutriments, comme les caroténoïdes. La transformation peut donc contribuer à améliorer le niveau nutritionnel de populations consommant peu de fruits et légumes ».

Enjeu structurant pour la SFR

Ce projet va permettre de renforcer et de pérenniser pour le moyen et long terme la collaboration récemment créée (grâce à une rencontre informelle dans le cadre du CS de la SFR Tersys) entre deux équipes de la SFR Tersys qui ne se seraient jamais rencontrées sans la SFR et qui n'auraient donc jamais travaillé ensemble tant leurs domaines de recherches sont différents. En effet, l'une est composée de chimistes travaillant sur les tensioactifs et émulsions à applications diverses (formulations bioactives) et n'a aucune expertise sur la nutrition, l'autre est composée de biochimistes/nutritionnistes et n'a aucune expertise sur l'extraction des composés bioactifs et leur nano-encapsulation. Par ailleurs, la présence de pharmaciens dans l'équipe du C2VN permettra de faire le lien entre ces deux expertises relativement éloignées.

*Le titre sera publié sur le site web de l'ED et de la SFR

Description du projet (4 pages maximum)

Enjeux socio-économiques et scientifiques pour la SFR TERSYS

La recherche d'alternatives à l'utilisation des solvants organiques et/ou de procédés d'extraction consommateurs d'énergie, parfois dénaturants pour les molécules bioactives d'origine végétale, est un enjeu à la fois écologique, économique et scientifique majeur pour la SFR Tersys. Malgré le caractère ubiquitaire de l'eau chez le végétal, de nombreuses molécules bioactives d'origine végétale (caroténoïdes, phytostéroïdes, phylloquinone, curcuminoïdes...) sont peu solubles voire insolubles dans l'eau ce qui limite les rendements d'extraction et la qualité (intégrité, stabilité) des extraits produits.¹¹ Dans ce contexte, l'équipe CBSA a récemment mis au point un procédé innovant pour des molécules bioactives lipophiles permettant leur extraction dans l'eau, additionnée d'huiles et de tensioactifs biocompatibles, d'origine naturelle ou synthétique. Ce procédé permet d'aboutir, en un nombre limité d'étapes, à des extraits végétaux de type nano- ou microémulsions « huile dans eau » enrichis en molécules bioactives d'intérêt. Ces extraits-émulsions, brevetés sous l'appellation « extrémulsions »,¹ subissent une étape finale de lyophilisation aboutissant à des formulations sèches, conservables plusieurs mois sous forme de poudres, faciles à échanger au sein d'un consortium (faciles à stocker et à transporter) et à reconstituer par simple addition d'eau sans changement notable de leurs caractéristiques (taille nanométrique des gouttelettes, composition de l'émulsion). Ce procédé a été mis en œuvre lors des travaux de thèse d'Alice Dall'armellina (thèse soutenue en Juin 2021), portant sur l'extraction et la formulation de la curcumine issue du *Curcuma longa* et a donné lieu à une publication qui vient de paraître dans le journal Green Chemistry² et à trois autres articles (2 en cours de soumission et 1 en cours de rédaction en collaboration avec l'équipe C2VN)³. Depuis la fin des travaux de thèse d'Alice Dall'armellina, le projet continue notamment au travers d'une pré-maturation de brevet (financement Satt-SE) en collaboration avec une entreprise montpelliéraine (Société Dynveo) spécialisée dans les compléments alimentaires, qui parmi d'autres acteurs industriels (Société Seppic, ou encore le groupe PiLeje, premier acteur du complément alimentaire en Europe) a montré un intérêt pour cette technologie et a signé un NDA avec l'équipe CBSA.

Grâce au réseau de la SFR Tersys, l'équipe C2VN est apparue comme un partenaire de choix pour montrer l'aptitude de ces extrémulsions à améliorer la biodisponibilité de la curcumine, une molécule très peu biodisponible. En effet, l'équipe de Patrick Borel au C2VN possède un modèle de digestion *in vitro* permettant de mesurer la stabilité et la répartition de molécules alimentaires dans les différentes phases coexistant lors de la digestion de différents aliments¹². Ce modèle permet notamment de calculer la bioaccessibilité de ces molécules, c'est à dire la quantité relative disponible pour l'absorption par les cellules entérocytaires, qui est considérée comme une bonne estimation de leur biodisponibilité. De plus, l'équipe possède un modèle de cellules entérocytaires, les cellules Caco-2, qui permet d'étudier le captage et l'absorption de molécules d'intérêt incorporées dans des formulations ou issues de fluides de digestions *in vitro* (micelles mixtes). De récents travaux ont ainsi permis de montrer que la curcumine d'extrémulsions était significativement plus bioaccessible (37% de bioaccessibilité) que la curcumine de formulations commerciales (ex : Sipernat 2200, curcumine adsorbée sur silice, bioaccessibilité <1% ; Cavamax, curcumine encapsulée dans de la cyclodextrine, bioaccessibilité ~12%), quel que soit l'aliment utilisé (publication en cours de rédaction)³.

Forts de la complémentarité et du savoir-faire de nos deux équipes, nous proposons à présent d'explorer conjointement le potentiel de cette technologie innovante pour la mise au point de formulations sèches de xanthophylles utilisables comme compléments alimentaires ou pour la fortification d'aliments communément consommés. Notre objectif est d'aboutir, selon un procédé éco-compatible, à des formulations sèches enrichies en lutéine et/ou en zéaxanthine. Les conditions d'éco-extraction et de préparation des poudres seront optimisées pour maximiser la stabilité et la bioaccessibilité des xanthophylles (approche par plan d'expériences). En cas de résultats positifs, ces travaux pourraient ouvrir le champ d'utilisation de ces extrémulsions à d'autres domaines que l'agroalimentaire, notamment à celui des compléments alimentaires, de par le potentiel démontré de ces deux xanthophylles pour lutter contre la DMLA et les troubles neurocognitifs.

Questions de recherche proposées au candidat

La 1^{ère} question à laquelle le candidat devra répondre est : peut-on aboutir à des extraits de types nano- ou microémulsions, enrichis en molécules lipophiles impossibles à extraire dans l'eau pure, telles que la lutéine ou la zéaxanthine, par extraction sous ultrasons pratiquée dans un mélange ternaire eau-tensioactif-huile (E/TA/H) ?

Pour répondre à cette question, le candidat procèdera à une étude de type relation structure-activité afin de comprendre, pour un couple matrice végétale/caroténoïde, l'impact de la nature du tensioactif, et de l'huile sur les caractéristiques physico-chimiques des extraits produits (taille des gouttes, vieillissement des extrémulsions...) et sur leur teneur en molécules cibles. En fonction de la matrice végétale étudiée (par exemple : épinards, maïs, brocolis, choux vert), l'ajout d'huile exogène sera-t-il toujours nécessaire pour obtenir une émulsion stable et dans quelles proportions ? Quel sera l'impact des molécules amphiphiles naturellement présentes dans ces différentes matrices (protéines, phospholipides) sur l'extrémulsion finale ? Le cas échéant y aura-t-il besoin d'ajouter des molécules amphiphiles exogènes ?

D'autre part, est-il possible de transformer ces extrémulsions en formulations sèches sans altérer les molécules bioactives extraites ? Quelles combinaisons tensioactif-huile permettront de retrouver, après réhydratation, une formulation dont la composition et les caractéristiques (taille, stabilité des gouttes) seront voisines voire identiques à celles de l'extrait liquide de départ ?

Quelle formulation permettra le meilleur compromis entre teneur en xanthophylles et stabilité dans le temps (en termes de vieillissement de l'émulsion, ou murissement d'Ostwald, ou de stabilité chimique, thermique ou photochimique des molécules encapsulées) ?

Les xanthophylles incorporés dans les extrémulsions seront-ils bioaccessibles et absorbés par les cellules intestinales ?

Pour répondre à ces deux dernières questions le candidat utilisera dans un premier temps un modèle de digestion *in vitro* présent au C2VN. Il mesurera la bioaccessibilité des xanthophylles des extrémulsions, c'est à dire leur concentration dans la phase aqueuse micellaire, obtenue par centrifugation et filtration du digestat. Il comparera cette bioaccessibilité avec celle des xanthophylles présents dans les matrices végétales d'origine, e.g. maïs, brocolis... Dans un deuxième temps, il utilisera un modèle de cellules entérocytaires humaines en culture, la lignée Caco-2, pour mesurer l'efficacité de captage des xanthophylles de la phase aqueuse issue de digestions comprenant les extrémulsions. Il comparera ce captage à celui des xanthophylles de la phase aqueuse issue de digestions comprenant les matrices végétales d'origine (voie d'absorption classique des xanthophylles présents dans les végétaux).

Hypothèses de travail

Ce projet repose sur l'hypothèse que l'on peut extraire, sans les dénaturer et avec de bons rendements, des molécules bioactives liposolubles d'origine végétale (des xanthophylles dans le cas de cette thèse), sous ultrasons, dans un milieu aqueux additionné d'huile et de tensioactifs synthétiques ou naturels.

Nous partons également de l'hypothèse que les extrémulsions ainsi produites (sous forme liquide ou de poudres) permettront d'améliorer la bioaccessibilité et le captage entérocytaire des xanthophylles extraits tout en limitant leur dégradation au cours du temps de conservation et durant la digestion.

Matériel nécessaire (disponible et/ou à produire), et méthodes envisagées

Les deux équipes disposent du matériel nécessaire à la réalisation des différents volets de ce projet :

- L'équipe CBSA dispose de tout l'équipement nécessaire pour la synthèse et la caractérisation des extrémulsions : disperseur-homogénéiseur (par exemple de type Ultraturrax®), sonde (sonotrode) ou bain à ultrasons, réacteur ultrasonore de type « cup-horn », chromatographes «Combi-Flash», CLHP (analytique et préparative), appareil de Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS), tensiomètre, Spectromètre de RPE.
- L'équipe C2VN possède les équipements pour effectuer des digestions *in vitro* et pour mesurer le captage des xanthophylles par les cellules Caco-2 (salle de culture cellulaire notamment). Elle possède aussi tout l'équipement nécessaire à l'extraction et au dosage des xanthophylles (parc de 3 CLHP avec différents détecteurs notamment).

La caractérisation des émulsions ainsi que des formulations sèches produites sera complétée par une étude en Microscopie Electronique à Transmission (pour les extraits liquides) ou à Balayage (pour les poudres) réalisables au sein de la plateforme analytique (plateforme 3A) de l'INRAE d'Avignon.

Programme de recherches

Notre programme de recherche s'articule autour de plusieurs volets :

- 1) *Préparation d'extrémulsions riches en xanthophylles à partir de différentes matrices végétales.*
- 2) *Caractérisation de ces extrémulsions (taille, composition, stabilité...).*
- 3) *Préparation de formulations sèches (poudres) à partir de ces extrémulsions.*
- 4) *Mesure de la stabilité des xanthophylles dans les poudres d'extrémulsions.*
- 5) *Mesure de la bioaccessibilité des xanthophylles présents dans les extrémulsions et comparaison avec celle des xanthophylles présents dans leurs matrices végétales originelles.*
- 6) *Mesure de l'efficacité de captage des xanthophylles présents dans les extrémulsions par les cellules Caco-2 et comparaison avec celle des xanthophylles présents dans les micelles mixtes issues de digestion in vitro des matrices végétales originelles.*

Calendrier

Année 1 et 2 : volets 1 à 4

Année 3 : volets 5 et 6

Publications envisageables

Les travaux de thèse devraient aboutir à au moins deux publications dans des journaux à haut facteur d'impact (ex : *Ultrasonics Sonochemistry, Food Hydrocolloids, Food Chemistry, Molecular Nutrition and Food Research, Journal of Nutrition, Nutrients, Journal of Green Chemistry, Chem. Sus. Chem. Journal*). Une publication sur la préparation des extrémulsions riches en xanthophylles et sur leur stabilité, et une autre sur la bioaccessibilité et le captage entérocytaire des xanthophylles incorporés dans les extrémulsions vs des xanthophylles incorporés dans leurs sources végétales d'origine. Il y aura bien évidemment aussi des communications orales ou par affiche dans des congrès nationaux ou internationaux.

Compétences cognitives et techniques acquises par le doctorant

Vu le caractère pluridisciplinaire et appliqué de ces travaux de thèse, le doctorant acquerra des compétences dans le domaine de la chimie des systèmes colloïdaux appliqué aux procédés d'éco-extraction. Il acquerra également des compétences en chimie analytique (CLHP en particulier) et en culture cellulaire. Il acquerra également des compétences en nutrition humaine, et plus particulièrement sur la digestion et la biodisponibilité des caroténoïdes.

Partenariat scientifique et industriel dans lequel s'inscrit le travail

Compte tenu du caractère très appliqué de ce projet dans le domaine de l'agroalimentaire, la prospection de collaborations industrielles devrait être productive et pourra s'appuyer sur la prospection déjà active dans le cadre de la pré-maturation du brevet « Extrémulsions ». Le champ d'application visé devrait intéresser des entreprises adossées aux pôles de compétitivité régionaux (Innov'Alliance, Eurobiomed) ou nationaux (Cosmetic Valley) vers lesquels nous pourrions nous tourner pour trouver de nouveaux partenaires industriels.

Références bibliographiques

1- C. Contino-Pépin et al, *patents* FR 1871961 (2018) ; WO 2020/109418A1 (2020).

2- A. Dall'armellina, M. Letan, C. Duval, C. Contino-Pépin, "One-pot solvent-free extraction and formulation of lipophilic natural products: from curcuma to dried formulations of curcumin", *Green Chemistry* 2021, DOI 10.1039/D1GC00587A.

- 3- C. Desmarchelier, A. Dall'Armellina, L. Lecourt, G. Marconot, G. Gillet, P. Borel, C. Contino-Pépin, "The incorporation of curcuminoids from *Curcuma longa* into extremulsions increases their bioaccessibility and intestinal cell uptake in vitro" (*réduction en cours*)
- 4- J. Mares, "Lutein and Zeaxanthin Isomers in Eye Health and Disease", *Annual Review of Nutrition*, 36 (2016) 571-602.
- 5- C. Tudor, A. Pinte, "A Brief Overview of Dietary Zeaxanthin, Occurrence and Bioaccessibility", *Molecules*, 25 (2020) 4067.
- 6- B. M. Steiner, D. J. McClements, G. Davidov-Pardo, "Encapsulation systems for lutein: A review", *Trends in Food Science & Technology*, 82 (2018) 71-81.
- 7- C. Desmarchelier & P. Borel, "Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations", *Trends in Food Science & Technology*, 69 (2017) 270-280.
- 8- P. Borel, « Les matrices végétales : leurs effets sur la biodisponibilité des caroténoïdes », *Cahiers de Nutrition et Diététique*, 53 (2018) 114-122.
- 9- C. Desmarchelier, « Effets de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des micronutriments et phytomicronutriments lipidiques », *Cahiers de Nutrition et Diététique*, 55 (2020) 240-248.
- 10- D. J. McClements, L. Saliva-Trujillo, R. Zhang, Z. Zhang, L. Zou, M. Yao, H. Xiao, « Boosting the bioavailability of hydrophobic nutrients, vitamins, and nutraceuticals in natural products using excipient emulsions », *Food Research International*, 88 (2016) 140–152.
- 11- A. Filly, A. S. Fabiano-Tixier, C. Louis, X. Fernandez, F. Chemat, "Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers", *Comptes Rendus Chimie*, 19 (2016) 707-717.
- 12- C. Desmarchelier, F. Tourniaire, D.P. Preveraud, C. Samson-Kremser, I. Crenon, V. Rosilio, P. Borel. "The distribution and relative hydrolysis of tocopheryl acetate in the different matrices coexisting in the lumen of the small intestine during digestion could explain its low bioavailability." *Molecular Nutrition & Food Research*, 57 (2013) 1237-1245.

Autres informations (1/2 page maximum)

Merci d'indiquer si le projet a été soumis à un autre appel d'offre et/ou s'il bénéficie d'un autre financement partiel

Ce projet a fait l'objet de deux demandes de financement en 2019/2020 :

- 1) à la SFR Tersys (projet classé 2^{ème}),
- 2) à l'AAP de l'EUR Implanteus, (projet classé 1er ex-aequo, non retenu après audition des candidats).

En cas de sélection, ce projet bénéficiera du support financier des deux équipes :

- équipe C2VN : financement sur ressources propres qui seront consolidées du fait de l'obtention d'un projet ANR, le projet XanthoVision, qui est coordonné par P. Borel et dont l'objectif est par ailleurs en lien avec ce projet soumis à la SFR Tersys. L'objectif de ce projet ANR est en effet de démontrer le rôle de la lutéine et de la zéaxanthine dans la fonction visuelle.
- équipe CBSA : financement sur ressources propres si aucun partenaire industriel ne donne suite à la pré-maturation de brevet en cours.

Avis des directeurs d'unité / laboratoire

Dans le cas où l'un des laboratoires est impliqué dans plusieurs demandes, le directeur concerné devra donner un classement en plus de son avis.

Avis de Christine Contino-Pépin (directrice de l'équipe CBSA) :

AVIS TRES FAVORABLE

Ce projet, outre le défi scientifique qu'il propose, est en parfaite adéquation avec les axes identitaires de l'université d'Avignon et les problématiques de la SFR Tersys. Pour l'équipe CBSA, ce financement de thèse serait une belle opportunité de consolider ses acquis dans le domaine des émulsions appliquées à l'extraction et la formulation des produits naturels et pour renforcer sa complémentarité et la collaboration avec l'équipe « micronutrition humaine » du C2VN.

Avis de Marie Christine Alessi (directrice de l'UMR C2VN) :

AVIS TRES FAVORABLE

Ce projet est en parfaite adéquation avec les objectifs de l'équipe « micronutrition humaine » dirigée par P. Borel. Il est également en adéquation avec les objectifs du département AlimH de INRAE. Il offre aussi la possibilité de renforcer les collaborations entre AMU et l'UAPV.

Pour rappel :

L'appel à proposition est ouvert **aux étudiants selon les règles de l'ED 536 Sciences et Agrosciences**. Ils sont ouverts aux étudiants de **toute nationalité ; de tout âge avec une possibilité de co-tutelle**.

La **qualité des candidats** représente un **critère majeur** de sélection des dossiers.