(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
18 avril 2013 (18.04.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/054063 A1

(51) Classification internationale des brevets : *A61K 47/48* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2012/052336

(22) Date de dépôt international : 12 octobre 2012 (12.10.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1159330 14 octobre 2011 (14.10.2011) FR

(71) Déposants : **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA** [FR/FR]; 147 Rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). **UNIVERSITE DU MAINE** [FR/FR]; Avenue Olivier Messiaen, F-72000 Le Mans (FR).

(72) Inventeurs : **LE BAIL, Patricia**; 13Bis Rue de Provence, F-44000 Nantes (FR). **LORENTZ, Cécile**; 16 Rue de Belle Beille, F-49000 Angers (FR). **PENCREAC'H, Gaëlle**; 23 Rue André Bellesort, F-53000 Laval (FR).

(74) Mandataires : **CHAUVIN, Vincent** et al.; Cabinet HARLE et PEHLIP, 14-16 Rue Ballu, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

WO 2013/054063 A1

(54) Title : METHOD FOR PREPARING COMPLEXES COMPRISING AMYLOSE ASSEMBLED WITH AT LEAST ONE ORGANIC MOLECULE OF INTEREST

(54) Titre : PROCEDE POUR LA PREPARATION DE COMPLEXES COMPRENANT DE L'AMYLOSE ASSEMBLE AVEC AU MOINS UNE MOLECULE ORGANIQUE D'INTERET

(57) Abstract : The present invention relates to a method for preparing complexes comprising amylose assembled with at least one organic molecule of interest. This method according to the invention comprises the following steps: (a) a lipophilization step consisting in grafting a fatty aliphatic chain onto said organic molecule of interest, in order to prepare a lipophilic derivative of said organic molecule of interest, (b) a step of bringing into contact (i) said lipophilic derivative of said organic molecule of interest bearing said grafted fatty aliphatic chain, resulting from said lipophilization step (a), and (ii) said amylose, and (c) a step of forming said amylose/lipophilic derivative of the organic molecule of interest complexes, which steps of bringing into contact and of forming the complexes consist of a hydrothermal protocol with stirring. The present invention also relates to the organic chemical compounds in the form of a complex, comprising amylose assembled with at least one organic molecule of interest, in which said organic molecule of interest is in a lipophilic derived form, bearing a grafted fatty aliphatic chain.

(57) Abrégé : La présente concerne un procédé pour la préparation de complexes comprenant de l'amylose assemblé avec au moins une molécule organique d'intérêt. Ce procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes : (a) une étape de lipophilisation consistant à greffer une chaîne aliphatique grasse sur ladite molécule organique d'intérêt, pour la préparation d'un dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt, (b) une étape de mise en contact entre (i) ledit dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt portant ladite chaîne aliphatique grasse greffée, issu de ladite étape de lipophilisation (a), et (ii) ledit amylose, et (c) une étape de formation desdits complexes amylose / dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt, lesquelles étapes de mise en contact et de formation des complexes consistent en un protocole hydro-thermique sous agitation. La présente invention concerne également les composés chimiques organiques sous forme d'un complexe, comprenant de l'amylose assemblé avec au moins une molécule organique d'intérêt, dans lesquels ladite molécule organique d'intérêt se présente sous une forme dérivée lipophilique, portant une chaîne aliphatique grasse greffée.

PROCEDE POUR LA PREPARATION DE COMPLEXES COMPRENANT DE L'AMYLOSE ASSEMBLE AVEC AU MOINS UNE MOLECULE ORGANIQUE D'INTERET

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte aux procédés pour la préparation de complexes dont l'amylose constitue la « molécule hôte », ainsi que les complexes issus de ces procédés.

ART ANTERIEUR

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale. C'est la principale source et réserve glucidique synthétisée par les végétaux supérieurs (céréales, tubercules et légumineuses) au cours de la photosynthèse.

L'amidon se présente à l'état natif sous forme de grains d'une taille variant de un micron à une centaine de microns suivant l'origine botanique.

L'amidon est constitué de deux fractions : une fraction glucidique très majoritaire (98 à 99 %) et une fraction non glucidique très minoritaire (0,1 à 2 %).

La fraction glucidique de l'amidon est principalement constituée d'un mélange de deux polymères α-D glucopyranosyl, à savoir l'amylopectine et l'amylose, en proportions variables en fonction de l'origine de l'amidon.

L'amylose représente environ 20 à 30 % de la partie glucidique des amidons. Mais cette quantité peut atteindre jusqu'à 80 % pour certaines variétés de maïs (*Zea mays*), d'orge (*Hordeum vulgare*), de riz (*Oriza sativa*) ou de pois (*Pisum sativum*).

L'amylose est une molécule essentiellement linéaire, composée de 500 à 6000 unités α-D glucopyranosyl, réparties sur 1 à 20 chaînes différentes d'un degré de polymérisation moyen de 500.

La masse molaire de l'amylose est généralement comprise entre 2.10^5 et 2.10^6 g/mol et dépend de l'origine botanique mais aussi de la méthode de fractionnement utilisée.

Une population d'amylose est hétérogène, avec une polydispersité généralement comprise entre 1,3 et 2,1 mais qui atteint parfois des valeurs plus élevées (5-10).

L'amylose est connu pour son aptitude à former des complexes stables avec d'autres molécules, c'est-à-dire une association moléculaire dans laquelle l'amylose constitue une molécule « hôte » (récepteur ou séquestrant) et la ou les molécules d'intérêt forment des molécules « invitées » (substrat ou agent complexant).

Les liens entre la molécule « hôte » et la molécule « invitée » sont des interactions faibles (en particulier des liaisons non-covalentes).

Les complexes rencontrés consistent très généralement en des complexes dits « d'inclusion » (dits encore tout simplement « clathrate »). La molécule « invitée » est alors encapsulée de façon totale, ou partielle, dans la molécule « hôte ».

Plus précisément, l'amylose est susceptible de se complexer avec les molécules hydrophobes (ou lipophiles) du fait de son caractère essentiellement linéaire, et de la présence quasi-exclusive de liaisons de type α-(1,4).

Cette complexation est fondée sur un réarrangement conformationnel qui est induit par l'agent complexant et qui aboutit à une nouvelle conformation hélicoïdale en simples hélices (6 unités glucose par tour), dans laquelle les groupements hydrophiles de la chaîne sont tournés vers l'extérieur et les groupements hydrophobes vers l'intérieur. Il en résulte la formation d'une cavité hélicoïdale hydrophobe dans la simple hélice d'amylose, pouvant être occupée par les composés hydrophobes.

Ce phénomène de complexation avec l'amylose est employé dans les techniques dites « d'encapsulation moléculaire ».

Les techniques d'encapsulation moléculaire avec l'amylose permettent la protection d'une molécule d'intérêt qui est normalement sensible vis-à-vis de l'oxydation, de l'hygroscopie, de l'interaction avec d'autres composants, de la lumière, de l'acidité et l'alcalinité et/ou encore de l'évaporation.

Elles permettent d'en faciliter l'utilisation, de masquer le goût et l'odeur, d'augmenter la stabilité et de contrôler le mode de libération (thermique, enzymatique, mécanique).

La formation de complexes avec l'amylose permet également d'incorporer et de stabiliser une molécule hydrophobe dans un milieu aqueux.

Cette technique peut être utilisée pour l'encapsulation moléculaire de principes actifs d'intérêt dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire.

Un grand nombre de molécules possède ce type de propriété complexante vis-à-vis de l'amylose, notamment les molécules hydrophobes du genre acides gras et alcools gras.

Mais de nombreuses autres molécules d'intérêt ne sont pas aptes à former de tels complexes avec l'amylose.

C'est notamment le cas pour la plupart des antioxydants, par exemple les composés phénoliques, notamment du fait de leur encombrement, de leur structure et/ou de leur polarité.

Or, parmi les antioxydants naturels, les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques, suscitent un intérêt grandissant. Ces molécules, tout en protégeant de l'oxydation, agissent contre le stress oxydatif (dégâts causés dans l'organisme par l'action des radicaux libres) et contribuent à la prévention de certaines affections comme les maladies cardiovasculaires, les cancers, les problèmes articulaires et les maladies neurovégétatives.

La mise en œuvre de ces composés phénoliques dans les formulations de type émulsions est délicate (molécules fragiles et facilement oxydables) et peut s'accompagner d'une diminution de leur efficacité à protéger les lipides contre l'oxydation, mais aussi contribuer à une perte de leur apport nutritionnel. En effet, dans la phase aqueuse sont souvent produits les premiers radicaux libres (c'est le milieu au travers duquel diffuse l'oxygène en provenance du milieu extérieur).

De plus, après ingestion, le pouvoir antioxydant potentiel des composés phénoliques vis-à-vis des lipides et des protéines du système digestif est susceptible d'être limité ou neutralisé, par la formation de nouvelles interactions avec des protéines ou bien avec la matrice alimentaire, au niveau buccal et gastro-intestinal, et en particulier si les fonctions phénoliques se retrouvent bloquées.

Compte tenu de ce qui précède, il serait particulièrement intéressant de pouvoir complexer l'amylose avec ces molécules d'intérêt, de manière à protéger ces dernières par phénomène d'encapsulation moléculaire.

Le document Lay et al. (Carbohydrate Polymers 83 (2011) 1869 - 1878) étudie la formation de complexes entre l'amylose et des dérivés de composés d'intérêt sous une forme estérifiée : l'ascorbyl palmitate (AP), le rétinyl palmitate (RP) et le phytostérol esters (PE).

Des complexes seraient obtenus dans le cadre d'un protocole nécessitant l'emploi d'un solvant polaire organique, à savoir le diméthylsulfoxyde (noté aussi DMSO), avec chauffage à 90°C durant 1 heure. Une fois les complexes formés, ce solvant polaire organique doit encore être éliminé par lavage à l'éthanol.

Or, l'emploi de solvants polaires organiques et d'éthanol constitue un obstacle dans les applications pharmaceutiques, cosmétiques ou agro-alimentaires.

En outre, ce document Lay et al. ne démontre aucunement que cette démarche permet effectivement l'obtention de complexes d'inclusion, avec l'emprisonnement de la chaîne aliphatique grasse greffée dans la cavité hélicoïdale de la simple hélice d'amylose ainsi formée.

De plus, les complexes obtenus présenteraient une forme cristalline, avec un pourcentage de cristallinité significatif compris entre 20 et 35%.

Du fait de cette forme cristalline, les complexes élaborés se présentent automatiquement sous la forme de poudre. Or, ce phénomène génère une difficulté supplémentaire lors de la réincorporation de ces complexes dans des bases alimentaires, car leur température de fusion relativement élevée (110°C environ) est rarement, voire jamais atteinte, en cuisson alimentaire.

Il existe par conséquent un besoin pour de nouveaux procédés permettant la préparation de complexes entre, d'une part, l'amylose et, d'autre part, des molécules

organiques d'intérêt qui ne sont pas aptes, de façon intrinsèque, à former des complexes avec cette molécule « hôte ».

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention porte sur un procédé pour la préparation de complexes comprenant de l'amylose assemblé avec au moins une molécule organique d'intérêt.

Ce procédé est caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) une étape de lipophilisation consistant à greffer une chaîne aliphatique grasse sur la molécule organique d'intérêt, pour la préparation d'un dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt,

(b) une étape de mise en contact entre (i) ledit dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt portant ladite chaîne aliphatique grasse greffée, issu de ladite étape de lipophilisation (a), et (ii) ledit amylose, et

(c) une étape de formation desdits complexes amylose / dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt.

Ces étapes de mise en contact (b) et de formation des complexes (c) consistent en un protocole hydro-thermique sous agitation.

Cette stratégie consiste à diminuer considérablement la polarité des molécules d'intérêt, par le greffage d'une chaîne aliphatique grasse.

Les inventeurs démontrent que cette démarche permet notamment de lui conférer une action complexante avec l'amylose, avantageusement par l'emprisonnement de la chaîne aliphatique grasse greffée dans la cavité hélicoïdale de la simple hélice d'amylose ainsi formée.

De plus, les inventeurs constatent que, de manière surprenante, les complexes obtenus ne présentent avantageusement aucune forme cristalline (complexe d'inclusion amorphe), ce qui permet notamment d'éliminer une éventuelle précipitation due à la formation de cristallites entraînant alors une forte instabilité dans la phase aqueuse gélifiée d'une émulsion.

De manière intéressante, les complexes obtenus par le procédé hydro-thermique selon l'invention peuvent se présenter soit sous forme de poudre soit sous forme de gel ; tel que développé par la suite, notamment pour l'amylose seul, il suffit pour cela de faire varier la température de solubilisation et la concentration de l'amylose dans la suspension de départ.

Les complexes obtenus sous forme de gel peuvent être directement utilisés comme phase aqueuse d'une émulsion, contribuant à la stabilité physique de l'émulsion et à l'enrichissement en principes actifs de cette émulsion.

Les complexes obtenus sous forme de poudre, avantageusement amorphe, ont l'intérêt de pouvoir être réincorporés par exemple dans des bases alimentaires, car leur température de fusion est relativement faible (environ 80°C) ; une telle température est régulièrement atteinte et

doit permettre la libération des principes actifs piégés dans les complexes lors de la cuisson notamment de pâtes (viennoiserie, pain…) enrichies en principes actifs protégés par l'amylose.

Selon un mode de réalisation préféré, le protocole hydro-thermique sous agitation comprend :

d'une part, pour l'étape de mise en contact (b) :

- la préparation d'une solution aqueuse contenant ledit dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt portant ladite chaîne aliphatique grasse greffée, issu de ladite étape de lipophilisation (a), et d'une solution aqueuse contenant l'amylose,

- le mélange desdites solutions aqueuses pour l'obtention d'une solution mélange, avec ou sans préchauffage desdites solutions aqueuses,

d'autre part, pour l'étape de formation des complexes (c) :

- le maintien de ladite solution mélange sous chauffage et sous agitation, puis

- le refroidissement de ladite solution mélange.

Du fait de leur structure amorphe ou majoritairement amorphe, les complexes obtenus peuvent se présenter sous deux formes différentes, notamment en fonction de la température mise en œuvre pour la solubilisation de l'amylose seul dans sa solution aqueuse, à savoir - un précipité ou - un gel fluide.

La molécule organique d'intérêt est avantageusement choisie parmi les polyphénols, de préférence encore parmi les acides phénoliques.

Dans ce cas la molécule organique d'intérêt est avantageusement choisie parmi les acides hydroxycinnamiques ou les esters d'acides hydroxycinnamiques.

La molécule organique d'intérêt sous forme d'acide hydroxycinnamique est de préférence choisie parmi les acides féruliques, les acides *p*-coumariques, les acides *o*-coumariques, les acides caféiques et les acides sinapiques.

La molécule organique d'intérêt sous forme d'ester d'acide hydroxycinnamique est choisie de préférence parmi les acides caféoylquiniques, les acides *p*-coumaroylquiniques, les acides féruloylquiniques et les acides sinapoylquiniques, ou parmi les acides rosmariniques.

Dans ce dernier cas, l'étape de lipophilisation (a) consiste avantageusement à greffer la chaîne aliphatique grasse sur le groupement quinique de la molécule organique d'intérêt, de préférence encore sur l'une des fonctions hydroxyles du groupement quinique de la molécule organique d'intérêt.

En particulier, la molécule organique d'intérêt consiste avantageusement en du 5-O-caféoylquinique ; l'étape de lipophilisation (a) consiste à greffer la chaîne aliphatique grasse sur le groupement hydroxyle en position 3 ou en position 4 du groupement quinique de ladite molécule organique d'intérêt.

D'autres caractéristiques avantageuses, pouvant être prises indépendamment ou en combinaison, sont développées ci-dessous :

- le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt, issu de l'étape de lipophilisation (a), comporte une chaîne aliphatique grasse greffée comprenant (voir consistant en) un groupement alkyle linéaire (non-ramifié), comportant une longueur de chaîne comprise de préférence entre 12 et 16 atomes de carbone, bornes incluses ;

- l'étape de formation des complexes (c) est mise en œuvre de sorte à obtenir des complexes d'inclusion (avantageusement amorphe), dans lesquels la chaîne aliphatique grasse des dérivés lipophiliques de composés organiques d'intérêt est incluse dans l'une des hélices de l'amylose associé ;

- lors de l'étape de mise en contact (b), la molécule d'amylose consiste en de l'amylose seul ou en de l'amylose sous forme d'amidon.

La présente invention concerne encore un composé chimique organique sous forme d'un complexe, comprenant de l'amylose assemblé avec au moins une molécule organique d'intérêt ; cette molécule organique d'intérêt se présente sous une forme dérivée lipophilique, portant une chaîne aliphatique grasse greffée.

Ce composé chimique organique est avantageusement obtenu par la mise en œuvre du procédé développé ci-dessus.

La molécule organique d'intérêt, portant la chaîne aliphatique grasse greffée, est telle que définie ci-dessus.

En particulier, cette molécule organique d'intérêt est avantageusement choisie parmi les acides caféoylquiniques, les acides *p*-coumaroylquiniques, les acides féruloylquiniques et les acides sinapoylquiniques, ou parmi les acides rosmariniques.

Dans ce cas, le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt porte avantageusement la chaîne aliphatique grasse greffée sur son groupement quinique, de préférence sur l'un des oxygènes lié par liaison covalente au groupe cyclohexyle du groupement quinique.

De préférence, le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt consiste en un 5-O-caféoylquinique, dont la chaîne aliphatique grasse greffée est portée par l'atome d'oxygène en position 3 ou en position 4 du groupement quinique.

La chaîne aliphatique grasse greffée comporte avantageusement (voir consiste en) un groupement alkyle linéaire (non-ramifié), dont la longueur de chaîne est avantageusement comprise entre 12 et 16 atomes de carbone, bornes incluses.

Le composé chimique organique est avantageusement sous forme d'un complexe d'inclusion (avantageusement amorphe ou majoritairement amorphe), dans lesquels la chaîne

aliphatique grasse greffée des dérivés lipophiliques de composés organiques d'intérêt est incluse dans l'une des hélices de l'amylose associé.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Thermogramme analyse enthalpique différentielle (« AED ») de l'amylose seul ;

Figure 2 : Thermogramme AED de l'assemblage amylose / acide chlorogénique : (A) montée 1, (B) descente, (C) montée 2 ;

Figure 3 : Thermogramme AED de l'assemblage amylose / chlorogénate d'hexadécyle : (A) montée 1, (B) descente, (C) montée 2 ;

Figure 4 : Thermogramme AED de l'assemblage amylose / acide 3-O-palmitoyle chlorogénique : (A) montée 1, (B) descente, (C) montée 2 ;

Figure 5 : Thermogramme AED de l'assemblage amylose / acide 4-O-palmitoyle chlorogénique : (A) montée 1, (B) descente, (C) montée 2 ;

Figure 6 : Diagramme de diffraction des rayons X pour (A) l'amylose seul, (B) l'assemblage amylose / acide chlorogénique, (C) l'assemblage amylose/acide 4-O-palmitoyle chlorogénique, (D) l'assemblage amylose/acide 3-O-palmitoyle chlorogénique et (E) l'assemblage amylose / chlorogénate d'hexadécyle ;

Figure 7 : Spectre RMN ^{13}C à l'état solide (CP-MAS) pour (A) l'amylose seul, (B) l'assemblage amylose / acide chlorogénique, (C) l'assemblage amylose/acide 4-O-palmitoyle chlorogénique, (D) l'assemblage amylose/acide 3-O-palmitoyle chlorogénique et (E) l'assemblage amylose / chlorogénate d'hexadécyle ;

Figure 8 : Modèle schématique du complexe amylose / acide 4-O-chlorogénique acide.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention fournit ainsi un nouveau procédé pour la préparation de complexes comprenant l'amylose encapsulant au moins une molécule organique d'intérêt, cette dernière n'étant à l'origine pas apte à former de tels complexes avec l'amylose.

Cette invention concerne en particulier un procédé de préparation de complexes dans lequel les étapes suivantes sont mises en œuvre :

(a) une étape de lipophilisation consistant à greffer une chaîne aliphatique grasse sur ladite molécule organique d'intérêt, pour la préparation d'un dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt,

(b) une étape de mise en contact entre (i) ledit dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt portant ladite chaîne aliphatique grasse greffée, issu de ladite étape de lipophilisation (a), et (ii) ledit amylose, et

(c) une étape de formation desdits complexes amylose / dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt,

lesquelles étapes de mise en contact et de formation consistent en un protocole hydro-thermique sous agitation.

Molécule organique d'intérêt

La molécule organique d'intérêt consiste avantageusement en une molécule bioactive.

Cette molécule organique d'intérêt, à l'état natif (avant l'étape de lipophilisation), n'est pas apte à former un complexe avec l'amylose (molécule à l'état natif non-complexable avec l'amylose).

En particulier, cette molécule organique d'intérêt ne comporte avantageusement pas, de façon intrinsèque, un groupement ou radical (de préférence une chaîne latérale, avantageusement un groupement latéral alkyle linéaire) capable de se loger dans une simple hélice de l'amylose.

La molécule organique d'intérêt est choisie avantageusement parmi les molécules comportant une activité antioxydante, de préférence encore parmi les polyphénols.

Par « activité antioxydant », on entend avantageusement une molécule qui diminue, ou empêche, l'oxydation d'autres substances chimiques. On entend encore avantageusement une molécule capable de neutraliser, ou de réduire, les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme.

Par « polyphénols », ou « composés phénoliques », on entend en particulier les molécules organiques comportant un ou plusieurs cycles aromatiques (ou cycles benzéniques), portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Tous les végétaux contiennent de tels composés phénoliques mais, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques.

Les composés phénoliques sont connus pour différentes actions : anticancérigène pour certains d'entre eux, et antioxydante permettant de lutter contre le vieillissement cellulaire.

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées extrêmement complexes), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, etc.), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.).

Ainsi, dans le cas de tels composés phénoliques, la molécule organique d'intérêt est avantageusement choisie parmi les acides phénoliques.

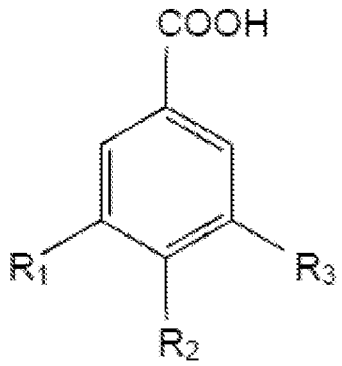
Un acide phénolique (ou « acide-phénol ») est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique.

Par « acide phénolique », on entend notamment :

(i) les composés dérivés de l'acide benzoïque, à savoir les acides hydroxybenzoïques, et

(ii) les composés dérivés de l'acide cinnamique, à savoir les acides hydroxycinnamiques ou les esters d'acides hydroxycinnamiques.

Les acides hydroxybenzoïques ont la formule (I) suivante :



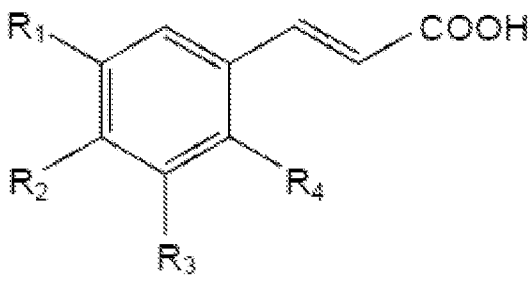
(I)

dans laquelle

$R_1=R_2=R_3=OH$	Acide gallique
$R_1=H$, $R_2=R_3=OH$	Acide protocatéchique
$R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=OCH_3$	Acide vallinique
$R_2=OH$, $R_1=R_3=OCH_3$	Acide syringique
$R_1=R_3=H$, $R_2=OH$	Acide *p*-hydroxybenzoïque

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1, parmi lesquels les plus abondants dans le règne végétal sont les acides gallique, protocatéchique, vanillique et syringique.

Les acides hydroxycinnamiques ont quant à eux la formule (II) suivante :



(II)

dans laquelle

R_1=OCH_3, R_2=OH R_3=R_4=H,	Acide férulique
R_1=R_3=R_4=H, R_2=OH	Acide *p*-coumarique
R_1=R_2=R_3=H, R_4=OH	Acide o-coumarique
R_1=R_2=OH, R_3=R_4=H	Acide caféique
R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH, R_4=H	Acide sinapique

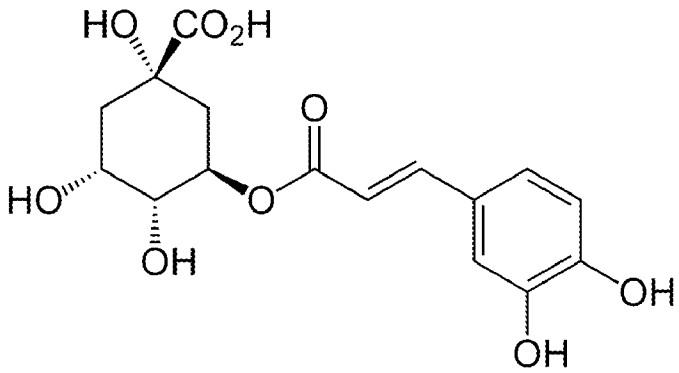
Ces acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Dans cette subdivision, on rencontre en particulier les acides caféique, férulique, *p*-coumarique et sinapique.

Les esters d'acides hydroxycinnamiques (ou hydroxycinnamates) comportent quant à eux généralement un groupe glucose, acide quinique ou acide tartarique.

La famille des hydroxycinnamates regroupe en particulier les esters des acides caféique, férulique et *p*-coumarique avec l'acide quinique, mais également l'acide rosmarinique qui est un ester particulier de l'acide caféique et de l'acide 3-(3,4)-dihydroxyphényl-lactique.

La molécule organique d'intérêt consiste avantageusement en « l'acide chlorogénique » en tant que tel, c'est-à-dire l'ester de l'acide caféique et de l'acide (L)-quinique 3 (désignée encore trans-5-O-caféoyl-D-quinate, ou acide caféylquinique, ou 5-ACQ (ou « 5-CQA » en anglais) ou 5-O-caféylquinique).

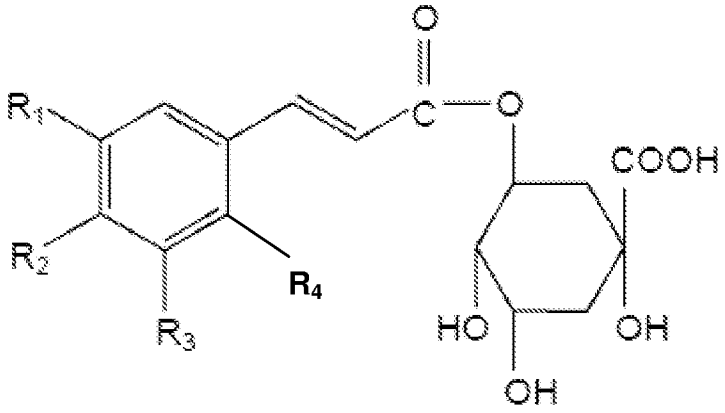
La formule (III) de l'acide chlorogénique est la suivante :



(III)

Par « acide chlorogénique », on désigne aussi la famille des acides dont la structure chimique est similaire à l'acide chlorogénique précité, et qui regroupe les composés formés par un (ou plusieurs) acide hydroxycinnamique conjugué avec l'acide quinique.

La molécule organique d'intérêt englobe ainsi les composés formés d'acides hydroxycinnamiques conjugués à l'acide quinique, formant la « classe (ou famille) des acides chlorogéniques » dont la formule (IV) est la suivante :



(IV)

dans laquelle :

R_1=R_2=OH, R_3=R_4=**H**	Acide caféoylquinique
R_1=R_3=R_4=H, R_2=OH	Acide *p*-coumaroylquinique
R_1=OCH_3, R_2=OH,R_3=H	Acide féruloylquinique
R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH, R_4=H	Acide sinapoylquinique

Ainsi, par « famille des acides chlorogéniques », on entend les mono-esters, notamment l'acide caféylquinique (ACQ), l'acide férulylquinique (AFQ), l'acide *p*-coumarylquinique (APQ), l'acide sinapylquinique, l'acide diméthoxycinnamylquinique.

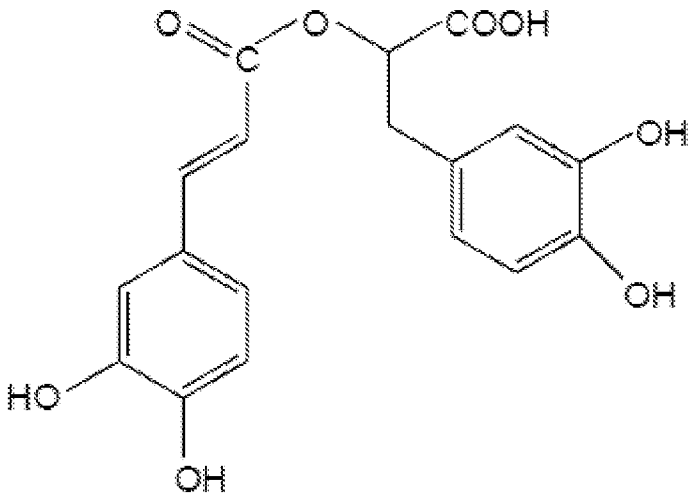
Par « famille des acides chlorogéniques », on entend également les di-esters, à savoir notamment l'acide dicaféylquinique, l'acide caféylférulylquinique, l'acide diférulylquinique, l'acide di-*p*-coumarylquinique, l'acide diméthoxycinnamylquinique.

Par « famille des acides chlorogéniques », on entend enfin les formes isomériques. Par exemple, suivant que la liaison se fait en position 3, 4 ou 5 sur les hydroxyles de l'acide quinique, on englobe :

- les 3-O-caféylquinique, 4-O-caféylquinique et 5-O-caféylquinique, pour les acides caféylquiniques (ACQ) ;
- les 3-O-férulylquinique, 4-O-férulylquinique et 5-O-férulylquinique, pour les acides férulylquiniques ; et
- le 3-O-*p*-coumarylquinique, le 4-O-*p*-coumarylquinique et le 5-O-*p*-coumarylquinique, pour les acides *p*-coumarylquiniques.

On rencontre aussi des composés formés de plusieurs acides hydroxycinnamiques conjugués avec un acide quinique, comme les acides 1,3-O-dicaféylquinique, 3,4-O-dicaféylquinique, 3,5-O-dicaféylquinique, etc., ou bien l'acide caféylférulylquinique.

L'acide rosmarinique présente quant à lui la formule (V) suivante :



(V)

Sur l'étape de lipophilisation

L'étape de lipophilisation (a) a pour objectif de fonctionnaliser la molécule organique d'intérêt de sorte à lui conférer des propriétés d'un agent de complexation avec l'amylose.

Par « lipophilisation », on entend la réaction chimique consistant à rapporter, par une liaison covalente, une chaîne aliphatique grasse sur un groupement récepteur de la molécule organique d'intérêt.

La chaîne aliphatique grasse greffée (ou chaîne latérale aliphatique grasse), rapportée sur la molécule organique d'intérêt, comporte (avantageusement consiste en) avantageusement un groupement (ou radical) organique (avantageusement hydrocarboné) acyclique, linéaire non-branché, saturé.

De préférence encore, cette chaîne aliphatique grasse greffée comporte, voire consiste en, une chaîne grasse linéaire saturée non-ramifiée, avantageusement encore un groupement alkyle linéaire non-ramifiée (formule C_nH_{2n+1}).

Cette chaîne aliphatique grasse greffée comporte avantageusement une longueur de chaîne carbone choisie parmi 12, 14, 16, 18, 20 ou 22 atomes de carbone, et de préférence encore choisie parmi 12 (groupe lauryle ou dodécyle), 14 (groupe myristyle ou tétradécyle) ou 16 (groupe palmityle ou hexadécyle) atomes de carbone.

Cette étape de lipophilisation (a) est choisie parmi les protocoles permettant l'obtention d'une molécule organique d'intérêt sur laquelle est rapportée, par une liaison covalente, une unique chaîne aliphatique grasse.

Dans la présente description, le produit issu de cette opération de lipophilisation est désigné sous l'appellation de « dérivé lipophilique » (ou de « dérivé lipophile » ou de « dérivé lipophilisé ») de la molécule organique d'intérêt.

Pour des molécules organiques d'intérêt appartenant aux polyphénols, on parlera ainsi de « dérivés lipophiliques de polyphénols ».

Les procédés de lipophilisation des polyphénols, par greffage de chaînes aliphatiques grasses, sont connus de l'état de la technique. On peut se référer notamment aux documents suivants : Figueroa-Espinoza et Villeneuve, 2005 (J. Agric. Food. Chem., 53 :2779-2787) ; Villeneuve et al. 2007 (Biotechn. Adv. 25 : 515-536), Lopez et al., 2007 (Enz. Microb. Tech., 41 :721-726 ; Ol Corps Gras Lipides, 14 :51-59).

Ces réactions de synthèse de tels dérivés lipophiliques de polyphénols sont avantageusement des réactions d'acylation ou d'alkylation.

La réaction « d'acylation » peut être définie comme l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile telle qu'une fonction hydroxyle.

La réaction « d'alkylation » peut quant à elle être définie comme une réaction chimique constituée du transfert d'un groupement alkyle d'une molécule organique à une autre.

La réaction de synthèse, acylation ou alkylation, est choisie suivant la nature du polyphénol, en particulier s'il présente, ou non, une fonction hydroxyle ou carboxyle (groupe des acides phénoliques ou des flavonoïdes et lignanes).

Ainsi, en pratique :

- si les donneurs d'acyle sont des alcools gras ou des esters d'alcool gras et que la lipophilisation a lieu sur des acides phénoliques, la réaction sera appelée réaction « d'alkylation » ;
- si les donneurs d'acyle sont des acides gras ou des esters d'acides gras et que la lipophilisation a lieu sur d'autres polyphénols et en particulier sur les parties glycosylées des flavonoïdes, la réaction sera appelée réaction « d'acylation ».

La présence d'une partie quinique portant des hydroxyles non phénoliques et un groupement carboxyle (ainsi qu'une partie caféique présentant des hydroxyles phénoliques), fait de l'acide chlorogénique un des rares polyphénols qui permet d'envisager la synthèse de dérivés par alkylation et aussi par acylation.

La réaction d'alkylation est par exemple décrite dans le document Lopez-Giraldo et al., 2007 (OCL 2007, 14 :51-9 ; et Enz. Micro. Tech. 41 :721-6). La réaction de synthèse enzymatique par acylation est quant à elle par exemple décrite dans le document Lorentz et al., 2010 (Biotechnol Lett 32 : 1955-1960).

Ces réactions de lipophilisation de polyphénols sont connues pour permettre la synthèse de molécules présentant non seulement des activités antioxydantes, mais aussi des propriétés pharmacologiques, des activités tensioactives, ou antimicrobiennes, correspondant au concept de composés multifonctionnels.

Cette lipophilisation peut être mise en œuvre par une voie de synthèse chimique ou par une voie de synthèse enzymatique, qui sont classiques en soi.

Le protocole est choisi en fonction de la molécule organique d'intérêt à fonctionnaliser, tenant compte notamment du groupement récepteur souhaité tel que développé après.

- Synthèse par voie chimique

Plusieurs méthodes ont été décrites pour la synthèse par voie chimique de dérivés lipophiliques de composés organiques, notamment de dérivés lipophiliques de polyphénols.

Cette synthèse par voie chimique peut, par exemple, être choisie parmi :

(i) l'acylation de la molécule organique d'intérêt par des chlorures d'acide gras dans des solvants anhydres (Zhong et Shahidi, 2011, J. Agric. Food. Chem 59(12) pp. 6526-6533 ; Fukami et al., 2008, US-20080058409 ; Xiang et Ning, 2008, Swiss. Soc. Food. Sci. Tech, 41 :1189-1203) ;

(ii) l'acylation de la molécule organique d'intérêt par des acides gras et par des alcools gras (saturés, mono-insaturés, ramifiés ou non) sur les fonctions hydroxyles et carboxyles avec ou sans catalyseur (par exemple N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et/ou chlorure de thionyle ($SOCl_2$)).

D'autre part, des réactions de couplage régiosélectif avec des cétones ont aussi été décrites (Poaty et al., 2009, European Food Research and Technology 230 : 111-117).

- Synthèse par voie enzymatique

De façon générale, les principaux inconvénients des méthodes chimiques sont l'obtention de sous-produits, l'utilisation de solvants ou catalyseurs toxiques et la production de mélanges d'esters ou d'isomères portant un nombre variable de chaînes carbonées qu'il faut séparer. De plus, le greffage implique parfois des hydroxyles responsables de l'activité antioxydante (utilisation de chlorure d'acide gras). Les méthodes de protection et de déprotection de groupements hydroxyles sont aussi largement utilisées pour permettre de choisir le site de réaction et le degré d'estérification mais ce sont souvent des étapes complexes et fastidieuses.

Les enzymes sont *a contrario* un outil de synthèse précieux en matière de conditions de réaction douce et de régiosélectivité. De plus, la demande croissante en produits d'intérêt thérapeutique, agroalimentaire ou cosmétique parallèlement aux exigences en matière de procédés de synthèse respectueux de l'environnement, renforce l'intérêt de l'utilisation des biocatalyseurs.

En effet, les enzymes peuvent se substituer aux catalyseurs chimiques et répondre aux exigences du développement industriel durable. Elles peuvent augmenter l'efficacité de production et réduire, pour celles qui agissent à température ambiante, la consommation d'énergie. Beaucoup de procédés industriels fonctionnent à haute température ou haute pression ou dans des conditions hautement acides ou basiques. Au niveau industriel, les avantages de l'utilisation des enzymes, malgré leur coût parfois élevé, sont des étapes de purification simplifiées, ainsi que des conditions expérimentales douces évitant la dégradation des substrats et permettant la réutilisation du biocatalyseur (Villeneuve, 2007). La biocatalyse permet d'envisager la production sélective de structures complexes et originales.

Pour la lipophilisation de molécules organiques d'intérêt appartenant aux polyphénols, différentes enzymes peuvent être mises en œuvre, telles que les lipases, transférases, isomérases, estérases et protéases. Toutefois, les lipases sont les plus fréquemment utilisées pour ce type de biotransformation (Figueroa-Espinoza et Villeneuve, 2005 ; Chebil et al., 2006, J. Agric. Food. Chem. 55 :9496-9502).

Par « lipases », on entend les enzymes triacylglycérol hydrolases, classe EC 3.1.1.3 (selon la classification INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY), appartenant à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques.

La lipase provient avantageusement d'un microorganisme (bactérie ou champignon), tels que *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roquefortii* et *Mucor javanicus*, Cette enzyme peut aussi provenir de plantes ou d'animaux.

L'étape de lipophilisation (a), du procédé selon l'invention, peut en particulier être mise en œuvre avec l'une des enzymes suivantes.

Novozym 435 est une préparation industrielle produite par Novozymes (Dk) et commercialisée par Sigma, résultant de l'immobilisation de l'isoforme B de la lipase de *Candida antarctica* sur une résine acrylique macroporeuse. Cette préparation se présente sous forme de microbilles blanches de diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm. Elle est fournie avec une activité de 7000 U/g (1 unité est définie comme étant la quantité d'enzyme qui permet la transformation d'une µmole d'acide laurique en laurate de propyle par minute en conditions standards et équimolaires). Sa teneur en eau est de 1 à 2 % (p/p) et sa teneur en protéines enzymatiques est comprise entre 1 et 10 %.

Lipozyme RM est une préparation produite et commercialisée par Novozymes (Dk) résultant de l'immobilisation de la lipase de *Mucor miehei* sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions. Cette préparation se présente sous forme de microbilles brunes de diamètre compris entre 0,2 et 0,6 mm. Elle est fournie avec une activité minimale de 42 U/g (1

unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet la libération d'une µmole d'acide oléique par minute à pH 8,0 à 40°C lors de l'hydrolyse de la trioléine).

La lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur terre de diatomée est une préparation produite par Amano Enzymes (UK) et commercialisée par Sigma. Cette préparation se présente sous forme de microbilles beiges et est fournie avec une activité minimale de 500 U/g (1 unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet la libération d'une µmole d'acide oléique par minute à pH 8,0 à 40°C lors de l'hydrolyse de la trioléine).

Lipozyme TL est une préparation produite et commercialisée par Novozymes (Dk) résultant de l'immobilisation de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* sur des billes de silice. Cette préparation se présente sous forme de microbilles blanches.

De manière générale, pour un ester d'acide phénolique, l'étape de lipophilisation (a) du type « alkylation » est avantageusement réalisée par estérification directe à partir d'alcool gras en présence de Novozym 435 (Résine acrylique lipase de *Candida antarctica* - SIGMA), avec ou sans solvant.

La capacité de Novozym 435 à catalyser l'alkylation de l'acide chlorogénique avec des alcools gras saturés et insaturés de longueurs de chaîne variables (C8 à C18) a été étudiée. Des esters d'acide chlorogénique ont en effet été synthétisés par estérification directe (Guyot et al., 2000, Eur. J. Sci. Technol. 102 :93-96) et par transestérification (Lopez-Giraldo et al., 2007) en présence de Novozym 435.

La bioconversion et le temps de réaction sont améliorés au moyen d'une stratégie chemo-enzymatique qui consiste en une méthylation de l'acide chlorogénique suivie d'une transestérification du chlorogénate de méthyle en milieu fondu (Lopez-Giraldo et al., 2007).

Dans le cadre d'une telle réaction d'alkylation, le donneur d'alcool consiste avantageusement en un alcool gras saturé, linéaire (non-ramifié), dont la longueur de chaîne carbone est choisie de préférence parmi C12, C14 ou C16.

Par « réaction d'acylation », on entend notamment (i) une réaction de transacylation ou (ii) une réaction d'acylation directe.

Pour une réaction de « transacylation », le donneur d'acyle est avantageusement choisi parmi les esters d'acides gras, de préférence soit des esters méthylique ou éthylique, soit des esters vinyliques.

De préférence encore, ces esters d'acides gras comprennent un groupement carboxyle consistant en une chaîne grasse linéaire saturée dont la longueur est de préférence choisie parmi C12, C14 ou C16.

Ces esters d'acides gras sont ainsi avantageusement choisis parmi le laurate d'éthyle (C12), le palmitate d'éthyle (C16) et le stéarate d'éthyle (C18).

Pour une réaction « d'acylation directe », le donneur d'acyle est avantageusement choisi parmi les acides gras saturés linéaires, et particulier l'acide laurique (C12), l'acide myristique (C14) et l'acide palmitique (C16).

De telles réactions de biosynthèse sont encore détaillées ci-après dans la partie Exemple, pour l'obtention de trois dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique, à savoir le chlorogénate d'hexadécyle (obtenu par alkylation), et les acides 4-O-palmitoyle chlorogénique et 3-O-palmitoyle chlorogénique (obtenus par acylation).

Sur le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt

Le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt, obtenu à l'issue de l'étape de lipophilisation (a) décrite ci-dessus, comporte un cœur constitué par la molécule organique d'intérêt décrite précédemment, portant une chaîne latérale aliphatique grasse greffée.

Le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt porte ainsi avantageusement une unique chaîne latérale aliphatique grasse.

Par « chaîne latérale », on entend une partie de molécule rattachée au cœur ou à la chaîne principale de la structure, c'est-à-dire à la molécule organique d'intérêt.

La chaîne aliphatique grasse greffée (ou chaîne latérale aliphatique grasse), rapportée sur la molécule organique d'intérêt, comporte avantageusement (éventuellement consiste en) un groupement (ou radical) organique acyclique, linéaire (non-branché), saturé.

De préférence encore, cette chaîne aliphatique grasse greffée comporte, voire consiste en, une chaîne grasse linéaire saturée non-ramifiée, avantageusement un groupement alkyle linéaire.

Cette chaîne aliphatique grasse greffée comporte de préférence une longueur de chaîne carbone choisie parmi 12, 14, 16, 18, 20 ou 22 atomes de carbone, et de préférence encore choisie parmi 12 (groupe lauryle ou dodécyle), 14 (groupe myristyle ou tétradécyle) ou 16 (groupe palmityle ou hexadécyle) atomes de carbone.

Selon un mode de réalisation particulier, la molécule organique d'intérêt sous forme d'ester d'acide hydroxycinnamique est choisie parmi les acides caféoylquiniques, les acides *p*-coumaroylquiniques, les acides féruloylquiniques et les acides sinapoylquiniques, ou parmi les acides rosmariniques.

Pour les molécules organiques comportant un groupement quinique (avantageusement acides caféoylquiniques, acides *p*-coumaroylquiniques, acides féruloylquiniques et acides sinapoylquiniques), le dérivé lipophilique d'une telle molécule organique d'intérêt porte avantageusement la chaîne aliphatique grasse greffée sur son groupement quinique.

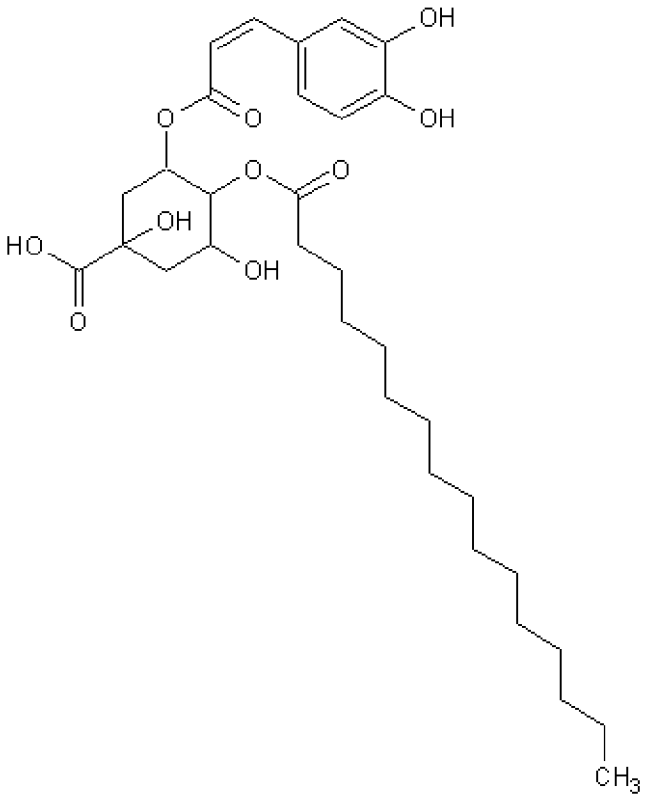
Dans ce cas, la chaîne aliphatique grasse greffée est portée de préférence encore par l'un des oxygènes lié par liaison covalente au groupe cyclohexyle du groupement quinique.

De préférence encore, le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt consiste en un cœur 5-O-caféoylquinique (correspondant à la molécule acide chlorogénique), dont la chaîne aliphatique grasse greffée est portée par l'atome d'oxygène en position 3 ou en position 4 du groupement quinique.

Le dérivé lipophilique d'une telle molécule organique d'intérêt est ainsi choisi parmi l'acide 3-O-lauroyle chlorogénique, l'acide 3-O-myristoyle chlorogénique, l'acide 3-O-palmitoyle chlorogénique, l'acide 4-O-lauroyle chlorogénique, l'acide 4-O-myristoyle chlorogénique ou l'acide 4-O-palmitoyle chlorogénique.

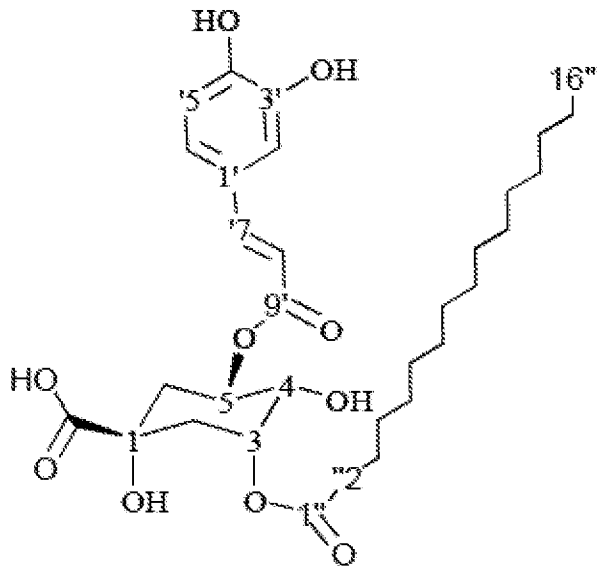
Par exemple, pour une chaîne latérale aliphatique grasse en C16, le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt consiste avantageusement en un acide 3-O-palmitoyle chlorogénique ou un acide 4-O-palmitoyle chlorogénique.

La formule chimique (VI) de l'acide 4-O-palmitoyle chlorogénique est rappelée ci-dessous :



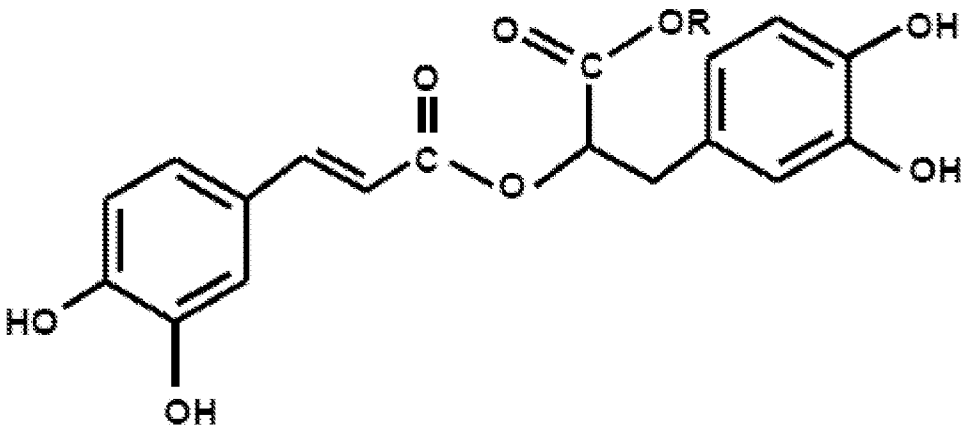
(VI)

La formule chimique (VII) de l'acide 3-O-palmitoyle chlorogénique est quant à elle rappelée ci-dessous :



(VII)

Parmi les acides rosmariniques, les dérivés lipophiliques de telles molécules organiques d'intérêt présentent quant à eux avantageusement la formule (VIII) ci-dessous :

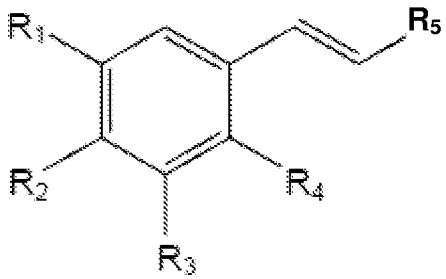


(VIII)

dans laquelle R, correspondant à la chaîne aliphatique grasse greffée, comprend (ou consiste en) un groupement alkyle (formule C_nH_{2n+1}) dont la longueur de la chaîne carbone est avantageusement choisie parmi C12 (rosmarinate de dodécyle), C14 (rosmarinate de tétradécyle) ou C16 (rosmarinate d'hexadécyle).

Les dérivés lipophiliques de l'acide rosmarinique sont par exemple obtenus par catalyse au moyen d'une lipase *Candida antarctica* B (i) estérification directe ou (ii) transestérification par voie chimio-enzymatique.

Selon un autre mode de réalisation particulier, la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les acides hydroxycinnamiques, et son dérivé lipophilique présente avantageusement la formule (IX) ci-dessous :



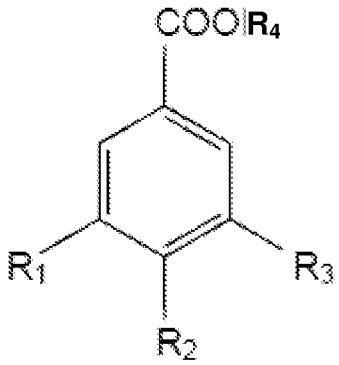
(IX)

dans laquelle la molécule organique d'intérêt consiste :

R_1=OCH_3, R_2=OH R_3=R_4=H,	Acide férulique
R_1=R_3=R_4=H, R_2=OH	Acide *p*-coumarique
R_1=R_2=R_3=H, R_4=OH	Acide *o*-coumarique
R_1=R_2=OH, R_3=R_4=H	Acide caféique
R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH, R_4=H	Acide sinapique

et dans laquelle R_5, correspondant à la chaîne aliphatique grasse greffée, comprend (ou consiste en) un groupement alkyle (formule C_nH_{2n+1}) dont la longueur de la chaîne carbone est avantageusement choisie parmi C12, C14 ou C16.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier, la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les acides hydroxybenzoïques, et son dérivé lipophilique présente avantageusement la formule (X) ci-dessous :



(X)

dans laquelle la molécule organique d'intérêt consiste :

R_1=R_2=R_3=OH	Acide gallique
R_1=H, R_2=R_3 =OH	Acide protocatéchique
R_1=H, R_2=OH, R_3=OCH_3	Acide vallinique
R_2=OH, R_1=R_3=OCH_3	Acide syringique
R_1=R_3=H, R_2=OH	Acide *p*-hydroxybenzoïque

et dans laquelle R_4, correspondant à la chaîne aliphatique grasse greffée, comprend (ou consiste en) un groupement alkyle (formule C_nH_{2n+1}) dont la longueur de la chaîne carbone est avantageusement choisie parmi C12, C14 ou C16.

Sur l'amylose

Les complexes selon l'invention peuvent être directement préparés à partir de l'amidon.

Dans ce cas, l'amidon est avantageusement issu d'organes de réserve de plantes, par exemple :

- les graines (en particulier les céréales tels que le maïs, le froment, le blé), ou les légumineuses (tels que le pois), ou

- les tubercules et rhizomes (pomme de terre, patate douce, manioc, etc.).

Cependant, les complexes selon l'invention sont avantageusement préparés à partir d'amylose seul, notamment si l'on souhaite s'affranchir de la présence de l'amylopectine.

L'amylose peut être extrait à partir de grains d'amidons dispersés dans l'eau par reprécipitation sélective en présence d'alcool (butanol par exemple).

L'amylose peut également être synthétisé *in vitro* par voie enzymatique soit à partir d'ADP-glucose avec la 1,4-α-D-glucan 4- α-D-glucosyltransferase (Granule Bound Starch Synthase, GBSS), soit à partir de saccharose avec une amylosaccharase recombinante qui permet d'obtenir de l'amylose de DP de 35-58 hautement cristalline.

La 1,4-α-D-glucan : ortophosphate, α-glucosyl transferase (starch phosphorylase) est aussi utilisée pour produire de l'amylose à partir de glucose-1-phosphate.

L'amylose peut encore être obtenu à partir d'amidon avec une enzyme débranchant : isoamylase ou pullulanase.

Les caractéristiques de l'amylose pour la formation de tels complexes sont encore précisées dans le document Godet et al., 1995 (Carbohydrate Polymers 27 :47-52).

Etape de mise en contact et étape de formation des complexes

Les étapes de mise en contact et de formation des complexes consistent en un protocole hydro-thermique sous agitation, tel que décrit par exemple dans la partie Exemple ci-après.

Par « protocole hydro-thermique », on entend un procédé mis en œuvre à partir d'une ou plusieurs solutions aqueuses, soumises à un chauffage.

Un tel protocole hydro-thermique s'effectue ainsi à l'exclusion de tout solvant polaire organique, tel que le diméthylsulfoxyde (noté aussi DMSO).

Selon un mode de réalisation préféré, ce protocole hydro-thermique comprend tout d'abord, pour l'étape de mise en contact (b), la préparation deux solutions aqueuses :

(i) une solution aqueuse contenant ledit dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt portant ladite chaîne aliphatique grasse greffée, issu de ladite étape de lipophilisation (a), et

(ii) une solution aqueuse contenant l'amylose.

Par « solution aqueuse », on entend une solution dont le solvant est avantageusement constitué par l'eau.

Cette solution aqueuse est avantageusement dégazée pour éviter les phénomènes d'oxydation.

La solution aqueuse contenant l'amylose (ii) peut être obtenue à partir de l'amidon, destiné à subir une gélatinisation pour former un amidon gélatinisé.

Par « amidon gélatinisé », on entend un amidon dont l'amylose est sortie hors du grain d'amidon lors du chauffage de l'amidon en excès d'eau.

La température de gélatinisation de l'amidon est généralement inférieure à 90°C, avantageusement comprise entre 60°C et 80°C.

Ainsi, au cours du refroidissement qui suit la gélatinisation, l'amylose dispersé de l'amidon gélatinisé est destiné à former des complexes avec le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt.

La solution aqueuse contenant l'amylose (ii) peut encore être préparée à partir de l'amylose seul.

Dans ce second cas, la formation d'un grand nombre de complexes d'amylose nécessite une dispersion préalable de l'amylose dans une phase aqueuse (avantageusement pour former un hydrocolloïde) suivi de l'ajout du dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt.

La dispersion de l'amylose peut être réalisée à chaud et sous pression (Biais et al., 2006 ; Doublier et al., Progr Colloid Polym Sci 90 :61-65 (192)). Notamment en fonction de la température de dissolution, la solution aqueuse obtenue contient :

- un amylose dit « gélifié », avantageusement pour une température de dissolution inférieure à 160°C, par exemple comprise entre 140°C et 160°C, ou

- un amylose solubilisé (dit encore « solution d'amylose »), avantageusement pour une température supérieure à 160°C, par exemple comprise entre 160°C et 170°C.

La dispersion de l'amylose peut encore être réalisée à froid dans une solution d'hydroxyde de sodium suivie d'une dialyse contre de l'eau ou une neutralisation (Buléon et al., 1990).

Les deux solutions aqueuses sont ainsi mélangées pour l'obtention d'une solution mélange.

Les deux solutions aqueuses (i) et (ii) peuvent être préchauffées préalablement à ce mélange, indépendamment l'une de l'autre, notamment pour assurer une dispersion optimale

de l'amylose dans sa solution aqueuse (ii) ; cette approche est en particulier adaptée pour l'amylose seul faisant l'objet d'une dispersion à chaud comme indiqué ci-dessus, et pour un dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt qui serait thermosensible.

De manière alternative, les deux solutions aqueuses (i) et (ii) peuvent être mélangées, sans préchauffage préalable ; cette démarche est en particulier adaptée pour une solution aqueuse contenant de l'amidon dont la température de gélatinisation a l'intérêt d'être moins élevée que la température de dispersion de l'amylose seul.

Ce protocole hydro-thermique comprend ensuite, pour l'étape de formation des complexes (c), le maintien de ladite solution mélange sous chauffage et sous agitation.

En particulier, cette solution mélange est avantageusement maintenue à une température comprise entre 60°C et 100°C, de préférence entre 70°C et 100°C, de préférence encore entre 70°C et 90°C.

Ce maintien à chaud s'effectue pendant une période d'au moins 5 minutes, de préférence de l'ordre de 10 minutes.

Par « agitation », on entend en particulier une agitation magnétique d'au moins 200 tours par minutes, de préférence de l'ordre de 220 tours par minutes.

Dans le cas d'une solution aqueuse contenant de l'amidon et en l'absence de préchauffage préalable au mélange des solutions aqueuses, ce chauffage est de préférence destiné également à assurer la transformation de l'amidon sous sa forme d'amidon gélatinisé.

A l'arrêt de l'agitation, du fait de leur structure amorphe ou majoritairement amorphe, les complexes se constituent soit par gélification sous une forme d'un gel fluide (en particulier pour l'amylose gélifié), soit par précipitation sous une forme de précipités (en particulier pour l'amylose solubilisé).

Pour cela, la solution mélange est avantageusement refroidie jusqu'à une température comprise entre 15°C et 25°C, avantageusement au moins pendant 24 heures, de préférence pendant 48 heures, et

Dans le cas de complexes sous une forme de précipités, la solution mélange est ensuite avantageusement soumise à une centrifugation (par exemple d'au moins 2000 g, de préférence d'au moins 3500 g, pendant au moins 5 minutes et de préférence pendant au moins 30 minutes), pour la récupération du précipité constitué par lesdits complexes.

Avantageusement, ce précipité est placé sous une atmosphère de séchage jusqu'à équilibration de la masse, pour l'obtention d'une poudre.

Complexe amylose/dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt

Le composé chimique organique sous forme de complexe, obtenu à l'issue du procédé de préparation développé ci-dessus, comprend de l'amylose assemblé avec le dérivé

lipophilique de la molécule organique d'intérêt ou avec le dérivé lipophilique d'au moins deux molécules organiques d'intérêt différentes.

Ce composé chimique organique consiste ainsi en un complexe dans lequel l'amylose constitue une « molécule hôte » (récepteur ou séquestrant), et les dérivés lipophiliques associés correspondent aux « molécules invitées » (substrat ou agent complexant). L'amylose assure ainsi l'encapsulation moléculaire du dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt.

Le composé chimique organique obtenu consiste avantageusement en un complexe d'inclusion (dit encore tout simplement « clathrate »), dans lequel la chaîne aliphatique grasse greffée des dérivés lipophiliques de la molécule organique d'intérêt est incluse dans l'une des hélices de l'amylose associé.

De préférence, ce complexe d'inclusion est amorphe, ou majoritairement amorphe. L'absence, ou la quasi-absence, de forme cristalline permet notamment d'éliminer le risque d'une éventuelle précipitation due à la formation de cristallites entraînant alors une forte instabilité dans la phase aqueuse gélifiée d'une émulsion.

Par « amorphe » ou « majoritairement amorphe », on entend avantageusement une absence de signature en diffraction des rayons X (DRX) (avantageusement aucun pic de diffraction correspondant à des complexes de type V), tout en mettant en évidence des complexes par l'analyse enthalpique différentielle (AED) et par RMN du solide tel que précisé ci-dessous.

Par « amorphe » ou « majoritairement amorphe », on entend avantageusement encore un pourcentage de cristallinité inférieur à 5%.

La caractérisation des assemblages amylose / dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt, s'effectue avantageusement par trois techniques différentes que sont l'analyse enthalpique différentielle (AED), la diffraction des rayons X (DRX) et la RMN du solide.

La formation d'un complexe d'inclusion est avantageusement mise en évidence, d'une part, par la présence de l'endotherme de fusion en analyse enthalpique différentielle et par le caractère réversible de la formation au cours du refroidissement et, d'autre part, par la présence d'un singulet intense à 102,6ppm en RMN du solide.

En pratique, l'exemple ci-après démontre que les dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique sont aptes à former de tels complexes (avantageusement des complexes d'inclusion), avec l'amylose.

Ces résultats sont tout à fait transposables à toute autre molécule organique d'intérêt tel que défini précédemment.

Pour chacune de ces molécules organiques d'intérêt, il suffit de déterminer le groupement récepteur optimal pour la fixation de la chaîne aliphatique grasse, et

éventuellement la longueur de cette dernière, qui permet la complexation de ce dérivé lipophilisé avec l'amylose.

Tel qu'abordé précédemment, le composé chimique organique sous forme de complexe peut être isolé sous une forme solide, par exemple une poudre (si précipitation) ou un film (pour un gel).

Ces formes solides sont par exemple décrites dans le document Doublier et al., 1989 (Carbohydrate Research 193 :215-226).

Le protocole hydro-thermique mis en œuvre pour élaborer les complexes amylose / dérivé lipophilique peut ainsi être adapté afin d'obtenir des complexes sous la forme de poudre, avantageusement une poudre amorphe. Le précipité obtenu permet notamment l'étude structurale des complexes avec les méthodes de caractérisation usuelles (RMN du solide, DRX et DSC).

Mais, selon la présente invention, les conditions de dispersion de l'amylose, notamment la variation de la température de solubilisation de l'amylose seul dans la phase aqueuse ainsi que la concentration de départ de la suspension d'amylose dans l'eau, autorisent l'obtention soit d'un gel d'amylose soit d'un précipité (Doublier et al., Progr Colloid Polym Sci 90 :61-65, 1992).

Les complexes obtenus sont amorphes ou cristallisés à petite échelle (pas de signature propre de la structure V en DRX), ce qui limite la précipitation due en grande partie à la cristallisation des complexes après la phase de nucléation.

Ces complexes formés peuvent ainsi être conservés sous la forme de gel aqueux (plus ou moins fluide) en faisant varier la concentration d'amylose et la température de solubilisation de l'amylose seule ; il est ainsi possible de se servir de cette phase aqueuse gélifiée, contenant des molécules d'intérêt piégées par l'amylose, pour former une émulsion (huile dans eau).

Les molécules d'intérêt greffées présentent un caractère antioxydant bien marqué (Laguerre et al., J. Agric. Food.Chem, 2009, 57, 11335-11342). Les complexes formés sous la forme solide (poudre) pourront donc être introduits directement dans des pâtes (viennoiserie ou autre) avant cuisson ; les complexes amorphes ayant une température de fusion nettement plus faible (80°C) que celle des complexes cristallins (110°C), les molécules d'intérêt pourront être libérées lors de la cuisson (température atteignant en général 90°C au cœur du produit).

Composition intégrant le composé chimique organique

Le composé chimique sous forme de complexe, selon l'invention, est avantageusement destiné à être intégré dans une composition, par exemple une composition alimentaire, une composition pharmaceutique ou une composition cosmétique.

Le composé chimique sous forme de complexe peut être (i) préparé préalablement puis introduit dans la composition ou (ii) préparé directement au sein de cette composition.

Cette composition consiste par exemple en une émulsion (le composé chimique sous forme de complexe se retrouve alors avantageusement dans la phase aqueuse), en une solution aqueuse ou en un hydrogel.

Cette composition peut également consister en un milieu solide, par exemple un produit alimentaire.

Par exemple, la composition selon l'invention, contenant le composé organique sous forme complexe, peut être introduite dans un aliment ou peut consister en un aliment. L'invention est en particulier applicable aux compositions contenant de l'amylose, éventuellement sous forme d'amidon, par exemple les pâtes ou les produits de panification. Le composé organique sous forme de complexe peut être incorporé à un moment approprié au cours de la préparation de la composition. De manière alternative, le composé organique peut être formé directement au sein et au cours du procédé de préparation de la composition alimentaire (en particulier pour les compositions contenant de l'amidon).

Le composé chimique selon l'invention peut également être employé dans une application pharmaceutique ou une application cosmétique, seul ou dans une composition contenant notamment tout autre substance active souhaitée et/ou excipent approprié.

Intérêt de la formation de complexes avec l'amylose

La formation de complexes avec l'amylose permet d'assurer l'encapsulation moléculaire des molécules organiques d'intérêt associées.

Une telle encapsulation moléculaire permet notamment :

- de protéger les molécules organiques d'intérêt contre l'oxydation,
- d'envisager une libération des molécules organiques d'intérêt, tout en conservant la chaîne aliphatique grasse au sein de l'hélice d'amylose, par digestion enzymatique, en particulier sous l'action des amylases pancréatiques ou des lipases intestinales, ou par attaque acide (lors de la digestion ou de la prédigestion),
- de masquer le goût des molécules organiques d'intérêt,
- de garantir la stabilité des molécules organiques d'intérêt, ou
- d'augmenter la biodisponibilité de ces molécules organiques d'intérêt.

En particulier, l'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'origine de l'altération des produits alimentaires. Les dégradations oxydatives qui en résultent affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des produits et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. La valorisation d'antioxydants d'origine végétale à des fins alimentaires représente ainsi un enjeu majeur pour la recherche et pour l'industrie.

L'encapsulation moléculaire de l'acide chlorogénique, voire d'autres composés phénoliques, par l'amylose présente la particularité d'assurer, d'une part, la protection du ligand contre l'oxydation et, d'autre part, d'envisager une libération ciblée de la molécule organique d'intérêt par digestion enzymatique (sous l'action des amylases pancréatiques ou des lipases intestinales) ou sous l'action d'une attaque acide.

EXEMPLE

Matériels et méthodes

Matériels biologique et chimique

La lipase utilisée est Lipozym RM issue de *M. miehei* immobilisée sur une résine échangeuse d'ion et acheté auprès de la société NOVOZYMES (Dk).

Tous les solvants et les réactifs utilisés ont été obtenus de sources commerciales et étaient soit de qualité HPLC ou analytique.

Le palmitate de vinyle et des plaques de gel de silice ont été achetés chez Sigma-Aldrich, France.

L'acide chlorogénique a été acheté chez Acros, en France, avec une pureté de 99%.

L'amylose de pomme de terre (type III), essentiellement libre d'amylopectine, a été obtenu auprès de Sigma (France) et utilisé tel que reçu.

Synthèse enzymatique des dérivés lipophiliques acylés de l'acide chlorogénique

Deux dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique, à savoir l'acide 3-O-palmitoyle chlorogénique et l'acide 4-O-palmitoyle chlorogénique, ont été synthétisés par voie enzymatique selon un procédé similaire à celui décrit dans le document Lorentz et al., 2010, précité, moyennant quelques modifications.

Pour cela, l'acide chlorogénique, le palmitate de vinyle et le Lipozym RM ont été séchés pendant au moins deux jours sous P_2O_5, avant utilisation.

L'activité de l'eau (a_w) du milieu réactionnel a été déterminée en utilisant un dispositif AqualabLite® (Decagon Devices Inc, Etats-Unis). L'activité de l'eau initiale de tous les milieux réactionnels ont été en dessous de 0,2.

Les réactions d'acylation ont été réalisées dans des tubes Eppendorf de 50 mL dans l'obscurité.

Le mélange réactionnel présente un rapport molaire (palmitate de vinyle/acide chlorogénique) de 40 dans 10 mL de 2-méthyl-2-butanol (2M2B). La concentration initiale de l'acide chlorogénique était de 28 mM.

Le palmitate de vinyle et l'acide chlorogénique ont d'abord été solubilisés pendant 12 h dans 1 mL de 2M2B et agités à 1000 rpm à 60 °C dans un dispositif Eppendorf Thermomixer (Roucaire, Courtabeuf, France).

La réaction a été initiée par addition de 40 g/L d'enzyme et 200 g/L de tamis moléculaires (3Å), préalablement séché pendant une nuit à 200°C. 2M2B a également été préalablement séché sur tamis moléculaires (3Å).

Des échantillons ont été retirés à différents moments pour surveiller la réaction par chromatographie sur couche mince (« CCM » ou « TLC » en anglais) et chromatographie en phase liquide à haute performance (« HPLC »), et purifié comme décrit dans Lorentz et al. (2010).

En fin de synthèse, l'enzyme immobilisée est séparée du milieu de synthèse par filtration à travers un filtre en verre (1,6 µm). La purification des produits est réalisée par chromatographie, soit sur couche mince préparative (CCM) ou sur colonne soit sur gel de silice ou bien de Sephadex.

Par exemple, les milieux réactionnels, préalablement filtrés afin d'éliminer l'enzyme, sont concentrés par évaporation sous pression réduite puis déposés sur une plaque de silice préparative 20 x 20 cm. La plaque est développée à l'aide d'un l'éluant puis révélée aux UV ou aux vapeurs d'iode afin de localiser la zone de migration du composé synthétisé. La silice localisée dans cette zone est alors décollée du support, puis le composé est désorbé dans 5 mL d'un mélange méthanol/chloroforme (50/50 v/v) sous agitation à 250 rpm pendant 10 min, ceci à deux reprises. Le mélange est alors filtré puis évaporé à sec.

Synthèse enzymatique du dérivé lipophilique alkylé de l'acide chlorogénique

La synthèse enzymatique du chlorogénate d'hexadécyle a été réalisée d'après les conditions mises au point par Lopez-Giraldo et al. (2007).

A l'abri de la lumière, 1,5 g d'acide chlorogénique et 260 g d'hexadécanol sont introduits dans un ballon pendant 2 h dans un bain marie à 55°C et sous agitation à 250 rpm, afin de permettre la solubilisation de l'acide chlorogénique dans l'hexadécanol. La réaction est démarrée par l'addition de Novozym 435, préalablement équilibré pendant 15 jours avec une solution de sel saturé de NaOH à une valeur théorique d'a_w de 0,05. La quantité de catalyseur employée est de 5 % (p/p) (calculée sur une base pondérale prenant en compte la totalité des substrats impliqués). Dans le but d'orienter les réactions vers la synthèse, l'eau produite par la réaction est adsorbée sur tamis moléculaire 4 Å (30 mg/mL de milieu réactionnel).

La purification du chlorogénate d'hexadécyle a été réalisée par chromatographie sur colonne sur gel de silice. La méthode est celle décrite par Lopez-Giraldo et al. (2007). Une première étape de séparation par extraction liquide-liquide est effectuée à l'aide de 500 mL d'un

mélange hexane/acétonitrile (1/3 v/v). La phase hexanique, qui contient la majorité de l'alcool gras, est éliminée, tandis que la phase acétonitrile, contenant principalement l'ester, est lavée encore 3 fois par 100 mL d'hexane. Après ces lavages, la phase acétonitrile est évaporée à 40°C sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est dissous dans 60 mL d'un mélange toluène/acétate d'éthyle (70/30, v/v) et déposé sur une colonne en verre (40 x 2,5 cm) de silice (préalablement séchée à 100°C pendant 48 h).

L'élution est réalisée avec 1,5 L de mélange toluène/acétate d'éthyle (70/30, v/v). Les fractions contenant l'ester sont recueillies et le solvant évaporé à 40°C sous pression réduite.

Préparation des assemblages avec l'amylose

Les différentes solutions (acide chlorogénique, dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique sous forme acylée et alkylée) sont mélangées avec l'amylose pour déterminer leur éventuelle activité complexante envers ce dernier.

Les assemblages amylose/acide chlorogénique (ou avec chlorogénate d'hexadécyle ou dérivés acylés en C16 de l'acide chlorogénique) ont été réalisés à partir de gels d'amylose à 1%.

Le protocole de construction des assemblages est initialement adapté de celui de Biais et a., 2006 (Carbohydrate Polymers 66(3) : 306-315).

Cinq millilitres d'une solution d'acide chlorogénique (ou de dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique) sont préparés comme suit : 10 mg de « molécule d'intérêt » (acide chlorogénique, chlorogénate d'hexadécyle ou dérivés acylés en C16 de l'acide chlorogénique) sont introduits dans un volume de 5 mL d'eau préalablement dégazée (15 min pour éviter les phénomènes d'oxydation).

Cette solution est ensuite placée dans un flacon hermétique et chauffée à 90°C pendant 30 min (dans un bain d'huile de silicone) avec agitation magnétique, puis retour à température ambiante.

Deux cents milligrammes d'amylose sont introduits dans un flacon hermétique contenant 20 mL d'eau préalablement dégazée à l'azote. Cette solution est chauffée à 160°C pendant 45 minutes avec une forte agitation magnétique, puis refroidit à 90°C.

En parallèle 2,5 mL du filtrat de la solution d'acide chlorogénique (ou de dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique) sont chauffés à 90°C.

Lorsque les deux solutions sont à 90°C, la solution d'amylose est introduite dans le flacon contenant la solution d'acide chlorogénique (ou de dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique). Cette solution est maintenue à 90°C pendant 10 min avec une forte agitation magnétique, puis refroidie à température ambiante et conservée dans le flacon pendant 48H.

La solution est centrifugée à 2000g pendant 5 min ; une partie du précipité est récupérée, pesée dans une boîte à tare, et placée sous atmosphère saturée en NaCl (activité de l'eau a_w = 0,75 à température ambiante) jusqu'à équilibration de la masse (environ 72h).

Une solution d'amylose, sans ajout d'acide chlorogénique (ou de dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique), est préparée dans les mêmes conditions de façon à pouvoir comparer les résultats obtenus à une référence.

Caractérisation des complexes amylose/ acide chlorogénique (ou de dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique) et du gel d'amylose de référence

Pour caractériser les assemblages amylose/acide chlorogénique (ou de dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique), on utilise les assemblages obtenus à partir du gel amylose/acide chlorogénique (ou de dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique) après un conditionnement sous NaCl.

Les molécules de départ (acide chlorogénique, les dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique) sont également étudiés.

La caractérisation des assemblages amylose/ acide chlorogénique (ou de dérivés alkylé ou acylé de l'acide chlorogénique), et du gel d'amylose de référence, a nécessité trois techniques différentes que sont l'analyse enthalpique différentielle (AED), la diffraction des rayons X (DRX) et la RMN du solide.

- *Diffractométrie de rayons X ou « DRX »*

Vingt milligrammes d'échantillon, équilibrés à a_w = 0,75, sont placés dans une rondelle en cuivre entre deux feuilles de ruban adhésif, pour empêcher tout changement de teneur en eau.

L'échantillon a été examiné par diffractométrie des rayons X ou DRX.

Les mesures ont été effectuées en utilisant un spectromètre D8 Discover avec détecteur GADDS et croisé avec des miroirs de Bruker-AXS, travaillant à 40 kV et 40 mA, avec un monochromateur cuivre (λ = 1,54059 Å) et un alignement de l'échantillon par vidéo microscopique et laser.

Les données ont été collectées au moyen d'un détecteur de courbe à 120° pendant 10 minutes et normalisées entre 3 et 30° (2θ).

- *Calorimétrie différentielle à balayage Q100*
  (analyse enthalpique différentielle « AED » - « DSC ou Differential Scanning Calorimetry »)

Le thermogramme AED est enregistré au moyen d'un automate pour calorimétrie différentielle à balayage T.A Instruments Q100.

Huit milligrammes d'échantillon et 12 µl d'eau préalablement dégazée à l'azote sont introduits dans une capsule en inox (T.A. Instruments). La référence est une capsule contenant 12 µl d'eau.

Les capsules sont ensuite fermées hermétiquement avec un joint thermorésistant puis placées dans le four de l'appareil.

La cinétique choisie comprend un premier cycle avec une augmentation de 3°C/min de 1°C jusqu'à 140°C, suivi d'un refroidissement de 3°C/min jusqu'à 1°C. Un second cycle de température a été effectuée à 3°C/min jusqu'à 160°C. Ensuite l'échantillon est rééquilibré à température ambiante à vitesse rapide, sans enregistrement des données.

- *Spectrométrie RMN du solide*

Cette étude a été réalisée sur des échantillons préalablement équilibrés sous solution saline saturée NaCl.

Les spectres RMN ^{13}C à l'état solide (CP-MAS) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Wide Bore 400 MHz équipé d'une sonde CP-MAS (cross-polarization-magic-angle-spinning) double résonance 4 mm H/X.

La séquence CP-MAS a été réalisée avec une rotation de 7 KHz, une impulsion 90° sur les protons de 3,75 µs, un délai de recyclage de 7s et un temps d'acquisition de 30ms pendant lequel un découplage dipolaire était appliqué. Le temps de contact était de 1 ms.

Les déplacements chimiques des carbones ont été calibrés par rapport au déplacement chimique du groupement carbonyle de la glycine à 176,03 ppm (21°C).

Résultats et discussion

<u>Propriétés thermiques des suspensions d'amylose</u>

La capacité de complexation avec l'amylose de l'acide chlorogénique, et de ses dérivés lipophiliques, est déterminée par calorimétrie différentielle à balayage, en comparaison avec l'amylose sans ligand.

- *L'amylose seul (sans ligand) - référence*

La suspension d'amylose seul (sans ligand) a été obtenue en suivant le même protocole que celui utilisé pour les suspensions amylose/ligands.

Le thermogramme obtenu (Figure 1), lors de l'étude en analyse enthalpique différentielle (AED), sert de référence pour la suite de l'étude.

Lors du premier cycle, il est observé un endotherme à 108°C. Au cours de l'expérimentation, la solution d'amylose a été chauffée à 145°C afin de solubiliser l'amylose, or la température de fusion de l'amylose utilisé est de 148°C, ce qui a été vérifié par AED en excès d'eau (thermogramme non présenté). A 145°C, une partie seulement de l'amylose fusionne (la moins bien organisée) puis rétrograde rapidement lors du refroidissement. L'endotherme à 108°C correspondrait à de l'amylose mal rétrogradé ayant une mauvaise organisation cristalline.

Lors du second cycle, deux endothermes sont observés : à 120°C et 145°C.

Ces deux endothermes correspondent respectivement à la fusion de l'amylose rétrogradé au cours de la descente en température effectuée entre les deux cycles et à la fusion de l'amylose initial, ayant une bonne organisation cristalline.

- *Acide chlorogénique et dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique*

L'analyse enthalpique différentielle a été menée sur les ligands, en excès d'eau, dans la gamme de température allant de 20°C à 140°C avec une cinétique de 3°C/min.

Les thermogrammes obtenus (non représentés) montrent un endotherme, respectivement, à : 65°C pour l'acide chlorogénique, 51°C pour l'acide 4-O-palmitoyle chlorogénique, 91°C pour l'acide 3-O-palmitoyle chlorogénique, et 84°C pour le chlorogénate d'hexadécyle.

- *Assemblage avec l'amylose*

Les thermogrammes obtenus pour les différents assemblages sont illustrés par les Figures 2 à 5.

Les endothermes sont identiques pour les quatre assemblages, avec :

- lors du premier cycle, un endotherme à 108°C, et
- lors du second cycle, un endotherme à 120°C et à 148°C.

Ces endothermes sont similaires à ceux de l'amylose seul (Figure 1).

Pour l'assemblage amylose/dérivés acylés de l'acide chlorogénique, un endotherme à 82°C est visible au premier cycle et au second cycle (Figures 4 et 5). Cet endotherme ne peut pas correspondre aux dérivés lipophiliques seuls (température de fusion à 51°C et à 91°C pour l'acide 4-O- palmitoyle chlorogénique et l'acide 3-O- palmitoyle chlorogénique, respectivement).

Le fait que cet endotherme soit visible lors du second cycle, montre que cette réaction est réversible. Tout laisse penser que cet endotherme correspond à la fusion de complexes amylose/ acide 4-O-palmitoyle chlorogénique et amylose/acide 3-O-palmitoyle chlorogénique.

Il faut cependant noter la faible température de fusion (82°C) de ces complexes.

Dans la littérature, la température des complexes amylose/lipides est aux alentours de 110°C (par exemple pour l'acide palmitique, la température de fusion des complexes est de 112°C).

Pour l'assemblage amylose/chlorogénate d'hexadécyle, un endotherme aux alentours de 83°C est également visible, mais il disparaît au second cycle (Figure 3). La température de fusion de ce dérivé alkylé étant de 84°C, l'endotherme semble correspondre au dérivé alkylé pur et non complexé.

Aucun endotherme supplémentaire à ceux de l'amylose n'est apparent sur le thermogramme des assemblages amylose/acide chlorogénique (Figure 2).

En conclusion, l'analyse enthalpique différentielle semble conclure qu'il n'y a pas interaction entre, d'une part, l'amylose et l'acide chlorogénique et, d'autre part, l'amylose et le dérivé alkylé (chlorogénate d'hexadécyle).

En revanche, il existe des interactions entre, d'une part, l'amylose et l'acide 4-O-palmitoyle chlorogénique et, d'autre part, l'amylose et l'acide 3-O-palmitoyle chlorogénique.

Structure cristalline des assemblages *in vitro*

Une étude en diffraction des rayons X a été menée sur l'amylose seul (Figure 6A) et les quatre assemblages (amylose/acide chlorogénique - Figure 6B, amylose/chlorogénate d'hexadécyle - Figure 6E, amylose/acide 3-O-palmitoyle chlorogénique - Figure 6D et amylose/acide 4-O-palmitoyle chlorogénique - Figure 6C).

Tous les échantillons ont préalablement été placés sous atmosphère saturée de NaCl durant une semaine.

Les diagrammes de diffraction des rayons X obtenus sont représentés sur la Figure 6.

Le diagramme de diffraction des rayons X obtenu pour l'amylose seul et utilisé comme référence présente une structure caractéristique de type B (Figure 6A). Dans ce cas les réflexions obtenues montrent que l'amylose a rétrogradé en doubles hélices selon un empilement hexagonal.

En présence de l'acide chlorogénique ou des dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique, la diffraction des rayons X montre également une structure de type B (Figures 6B à 6E).

Cette structure s'explique par la présence d'amylose rétrogradé due à la solubilisation incomplète de cette dernière lors du protocole de formation des assemblages. Néanmoins il est curieux de ne pas observer également des raies caractéristique du type V, c'est-à-dire caractéristique des complexes cristallins formés avec l'amylose pour les assemblages amylose/dérivés acylés.

En conclusion, les réflexions obtenues sont identiques pour tous les assemblages et sont caractéristiques du type cristallin B qui s'explique par la présence d'amylose rétrogradé.
Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en AED pour les assemblages amylose/acide chlorogénique et amylose/chlorogénate d'hexadécyle, mais cette technique ne nous permet pas de conclure sur la complexation de l'amylose et des dérivés acylés de l'acide chlorogénique.

RMN du solide

Les spectres RMN ^{13}C CP/MAS obtenus sont illustrés par la Figure 7.

Un spectre de type B est caractérisé par un doublet de raies d'égales intensités autour de 100ppm. Ce multiplet s'explique en considérant que l'unité répétitive qui génère la double hélice est le maltose. Or tous les spectres pour l'amylose seul (Figure 7A) ou les assemblages (amylose/acide chlorogénique - Figure 7B, amylose/dérivés lipophiliques de l'acide chlorogénique - Figures 7C à 7E) présentent un doublet à 100ppm. Ceci confirme la présence d'amylose rétrogradé en type B dans tous les échantillons.

Pour les assemblages amylose/dérivés acylés de l'acide chlorogénique (acide 3-O-palmitoyle chlorogénique et acide 4-O- palmitoyle chlorogénique), on observe encore une raie intense à 102,6ppm (Figures 7D et 7C).
Or, cette raie est caractéristique des spectres d'amylose de type V (simple hélice). Ceci est en accord avec l'unicité des conformations α-(1-4) dans les mailles de simples hélices.

De plus pour ces deux assemblages amylose/dérivés acylés de l'acide chlorogénique, le pic à 61ppm présente un épaulement important qui correspond à la présence de deux types d'orientations gauche-gauche et gauche-*trans* (Figures 7C et 7D).

Pour les structures de type B, la largeur du pic est faible, l'orientation gauche-*trans* est très largement prédominante, l'orientation gauche-gauche étant quasi inexistante et de ce fait non détectée, alors que dans le cas d'une structure de type V les deux types d'orientations gauche-gauche et gauche-*trans* sont clairement exprimées.

Dans le cas des deux assemblages amylose/dérivés acylés de l'acide chlorogénique (Figures 7C et 7D), la présence des deux types cristallins V et B explique l'orientation gauche-*trans* comme étant majoritaire mais pas unique.
On est donc dans ce cas en présence de simples hélices (type V) et de doubles hélices avec un arrangement cristallin de type B.

En conclusion, cette étude nous permet d'affirmer la présence de simples hélices dans le cas des dérivés acylés de l'acide chlorogénique complexés avec l'amylose, et de confirmer l'absence d'interaction entre, d'une part, l'amylose et l'acide chlorogénique et, d'autre part, l'amylose et le chlorogénate d'hexadécyle.

Conclusion générale

Dans la présente étude, les différents assemblages, et leurs signatures respectives du type calorimétrique, rayons X et RMN à l'état solide, ont été observés et comparés à la référence constituée par l'amylose sans ligand.

Les techniques utilisées montrent une excellente complémentarité dans la détermination des caractéristiques structurelles importantes telles que le type cristallin, la conformation hélicoïdale ou la nature de l'inclusion.

Les données de diffraction des rayons X montrent uniquement des spectres de structure de type B, quelles que soit les assemblages formés avec l'amylose (acide chlorogénique, dérivés acylés ou alkylés) ; ces résultats ne permettent pas de déterminer la nature des interactions possibles, notamment la présence de simples hélices caractéristiques de la formation de clathrates.

Pour les assemblages amylose / acide chlorogénique et amylose / dérivés alkylés, les résultats d'analyse enthalpique différentielle et de RNM du solide confirment l'absence de complexes.

Pour les assemblages amylose / dérivés acylés, la présence des complexes est montrée, d'une part, par la présence de leurs endothermes de fusion en analyse enthalpique différentielle et par le caractère réversible de leur formation au cours du refroidissement et, d'autre part, par la présence d'un singulet intense à 102,6ppm en RMN du solide.

Ces données permettent la mise en évidence de la présence de simples hélices et d'affirmer l'absence d'un espace inter-hélice permettant la capture de molécules encombrantes.

Ces résultats associés à la diffraction des rayons X permettent de conclure que les complexes obtenus sont des complexes d'inclusion amorphes et/ou structurés à très faible échelle (température de fusion faible, pas de signature en diffraction des rayons X), et que seul le greffon (chaîne aliphatique) est capturé dans la cavité hélicoïdale de l'amylose.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence la difficulté à piéger, par l'amylose, une molécule imposante comme l'acide chlorogénique et de ce fait à la protéger de l'oxydation.

La synthèse de dérivés lipophiles d'acide chlorogénique en C16 par acylation, a permis de montrer que l'amylose pouvait piéger la chaîne grasse greffée en l'emprisonnant dans sa cavité hélicoïdale.

Cette étude a montré également l'importance de la position de la chaîne aliphatique greffée sur le cycle, au regard de la meilleure complexation de l'acide 4-O-palmitoyle chlorogénique par rapport à l'acide 3-O-palmitoyle chlorogénique.

Les présents résultats montrent notamment que l'acide 4-O-palmitoyle chlorogénique forme un complexe amorphe avec l'amylose, avec seulement la chaîne latérale greffée incluse

dans la cavité d'amylose. Ces résultats permettent de déduire le modèle schématique complexe tel qu'illustré sur la Figure 8.

Sans être limité par aucune théorie, le greffage d'une chaîne aliphatique plus longue pour le dérivé alkylé, par exemple en C18 ou en C20, devrait permettre d'obtenir un effet complexant suffisant avec l'amylose, pour la formation d'un complexe (l'encombrement stérique étant le seul facteur limitant la complexation de la chaîne greffée par alkylation).

Par ailleurs, un inconvénient majeur dans l'ajout d'assemblages protecteurs dans la phase aqueuse d'une émulsion est le déphasage de la phase aqueuse dû à la nucléation puis à la précipitation des cristaux de complexes.

Or dans notre cas, nous obtenons des complexes d'inclusion amorphes et/ou structurés à très faible échelle, l'encombrement stérique de la molécule ne permettant pas un arrangement cristallin plus important.

Les complexes d'inclusion sont pris dans le réseau désorganisé des chaînes d'amylose non complexées, ce qui doit permettre une nette diminution du risque de précipitation dans la phase aqueuse.

Ces travaux permettent d'envisager notamment la protection de molécules sensibles à l'oxydation lors de leur incorporation dans une émulsion ou simplement dans une phase aqueuse ou un milieu aqueux. L'autre point intéressant de ce travail est le fait que les complexes amylose/acide gras en C16 (acide palmitique) sont bien connus dans la littérature pour leur grande stabilité face aux hydrolyses acides et enzymatiques, laissant penser que lors de la libération de l'acide chlorogénique, l'acide gras saturé ne sera pas relargué, mais restera prisonnier de l'amylose jusqu'à la fin de la digestion.

- REVENDICATIONS -

1.- Procédé pour la préparation de complexes comprenant de l'amylose assemblé avec au moins une molécule organique d'intérêt, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) une étape de lipophilisation consistant à greffer une chaîne aliphatique grasse sur ladite molécule organique d'intérêt, pour la préparation d'un dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt,

(b) une étape de mise en contact entre (i) ledit dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt portant ladite chaîne aliphatique grasse greffée, issu de ladite étape de lipophilisation (a), et (ii) ledit amylose, et

(c) une étape de formation desdits complexes amylose / dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt,

lesquelles étapes de mise en contact (b) et de formation des complexes (c) consistent en un protocole hydro-thermique sous agitation.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le protocole hydro-thermique sous agitation comprend :

d'une part, pour l'étape de mise en contact (b) :

- la préparation d'une solution aqueuse contenant ledit dérivé lipophilique de ladite molécule organique d'intérêt portant ladite chaîne aliphatique grasse greffée, issu de ladite étape de lipophilisation (a), et d'une solution aqueuse contenant l'amylose,

- le mélange desdites solutions aqueuses pour l'obtention d'une solution mélange,

d'autre part, pour l'étape de formation des complexes (c) :

- le maintien de ladite solution mélange sous chauffage et sous agitation,

- le refroidissement de ladite solution mélange.

3.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les molécules organiques comportant une activité antioxydante.

4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les polyphénols.

5.- Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les acides phénoliques.

6.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les acides hydroxycinnamiques ou les esters d'acides hydroxycinnamiques.

7.- Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt sous forme d'acide hydroxycinnamique est choisie parmi les acides féruliques, les acides *p*-coumariques, les acides *o*-coumariques, les acides caféiques et les acides sinapiques.

8.- Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt sous forme d'ester d'acide hydroxycinnamique est choisie parmi les acides caféoylquiniques, les acides *p*-coumaroylquiniques, les acides féruloylquiniques et les acides sinapoylquiniques, ou parmi les acides rosmariniques.

9.- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de lipophilisation (a) consiste à greffer la chaîne aliphatique grasse sur le groupement quinique de la molécule organique d'intérêt.

10.- Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'étape de lipophilisation (a) consiste à greffer la chaine aliphatique grasse sur l'une des fonctions hydroxyles du groupement quinique de la molécule organique d'intérêt.

11.- Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt consiste en du 5-O-caféoylquinique, et en ce que l'étape de lipophilisation (a) consiste à greffer la chaîne aliphatique grasse sur le groupement hydroxyle en position 3 ou en position 4 du groupement quinique de ladite molécule organique d'intérêt.

12.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt, issu de l'étape de lipophilisation (a), comporte une chaîne aliphatique grasse greffée comprenant un groupement alkyle linéaire.

13.- Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la chaîne aliphatique grasse greffée comporte une longueur de chaîne comprise entre 12 et 16 atomes de carbone, bornes incluses.

14.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'étape de formation des complexes (c) est mise en œuvre de sorte à obtenir des complexes d'inclusion, dans lesquels la chaîne aliphatique grasse des dérivés lipophiliques de composés organiques d'intérêt est incluse dans l'une des hélices de l'amylose associé.

15.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que, lors de l'étape de mise en contact (b), la molécule d'amylose consiste en de l'amylose seul ou en de l'amylose sous forme d'amidon.

16.- Composé chimique organique sous forme d'un complexe, comprenant de l'amylose assemblé avec au moins une molécule organique d'intérêt, caractérisé en ce que ladite molécule organique d'intérêt se présente sous une forme dérivée lipophilique, portant une chaîne aliphatique grasse greffée.

17.- Composé chimique organique selon la revendication 16, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt, portant la chaîne aliphatique grasse greffée, est choisie parmi les molécules organiques comportant une activité antioxydante.

18.- Composé chimique organique selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les polyphénols.

19.- Composé chimique organique selon la revendication 18, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les acides phénoliques.

20.- Composé chimique organique selon la revendication 19, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt est choisie parmi les acides hydroxycinnamiques ou les esters d'acides hydroxycinnamiques.

21.- Composé chimique organique selon la revendication 20, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt sous forme d'acide hydroxycinnamique est choisie parmi les acides féruliques, les acides *p*-coumariques, les acides *o*-coumariques, les acides caféiques et les acides sinapiques.

22.- Composé chimique organique selon la revendication 20, caractérisé en ce que la molécule organique d'intérêt sous forme d'ester d'acide hydroxycinnamique est choisie parmi les acides caféoylquiniques, les acides *p*-coumaroylquiniques, les acides féruloylquiniques et les acides sinapoylquiniques, ou parmi les acides rosmariniques.

23.- Composé chimique organique selon la revendication 22, caractérisé en ce que le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt porte la chaîne aliphatique grasse greffée sur son groupement quinique.

24.- Composé chimique organique selon la revendication 23, caractérisé en ce que la chaîne aliphatique grasse greffée est portée par l'un des oxygènes lié par liaison covalente au groupe cyclohexyle du groupement quinique.

25.- Composé chimique organique selon la revendication 24, caractérisé en ce que le dérivé lipophilique de la molécule organique d'intérêt consiste en un 5-O-caféoylquinique, dont la chaîne aliphatique grasse greffée est portée par l'atome d'oxygène en position 3 ou en position 4 du groupement quinique.

26.- Composé chimique organique selon l'une quelconque des revendications 16 à 25, caractérisé en ce que la chaîne aliphatique grasse greffée comprend un groupement alkyle linéaire.

27.- Composé chimique organique selon la revendication 26, caractérisé en ce que la chaîne aliphatique grasse greffée comporte une longueur de chaîne comprise entre 12 et 16 atomes de carbone, bornes incluses.

28.- Composé chimique organique selon l'une quelconque des revendications 16 à 27, caractérisé en ce que ledit composé chimique organique est sous forme d'un complexe

d'inclusion, dans lequel la chaîne aliphatique grasse greffée des dérivés lipophiliques de composés organiques d'intérêt est incluse dans l'une des hélices de l'amylose associé.

29.- Composition intégrant le composé chimique organique selon l'une quelconque des revendications 16 à 28.

5

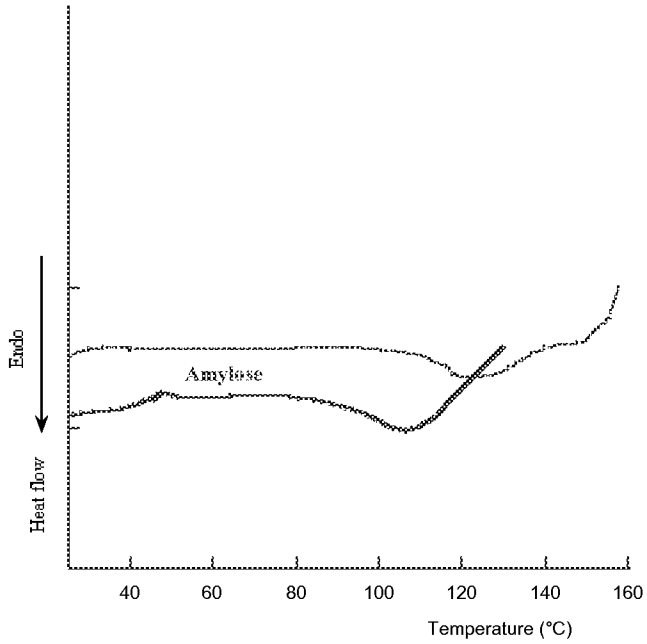


Figure 1

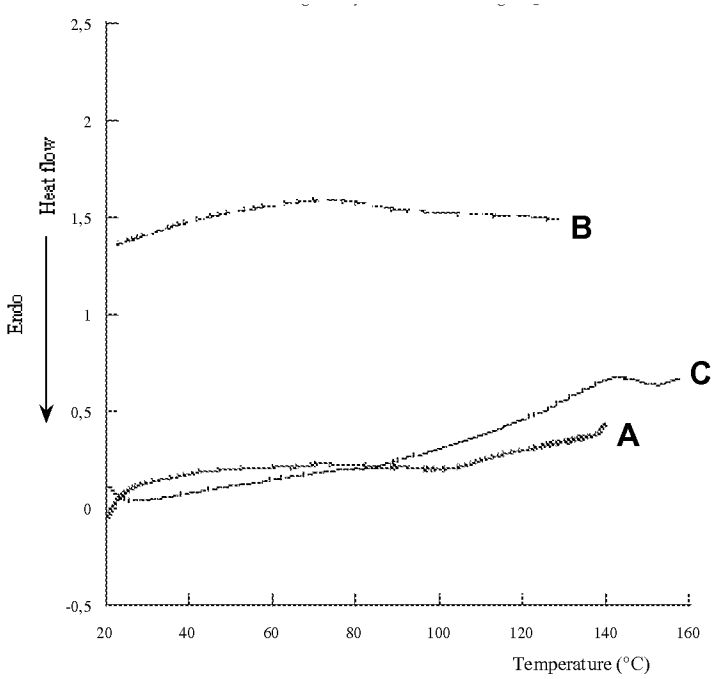


Figure 2

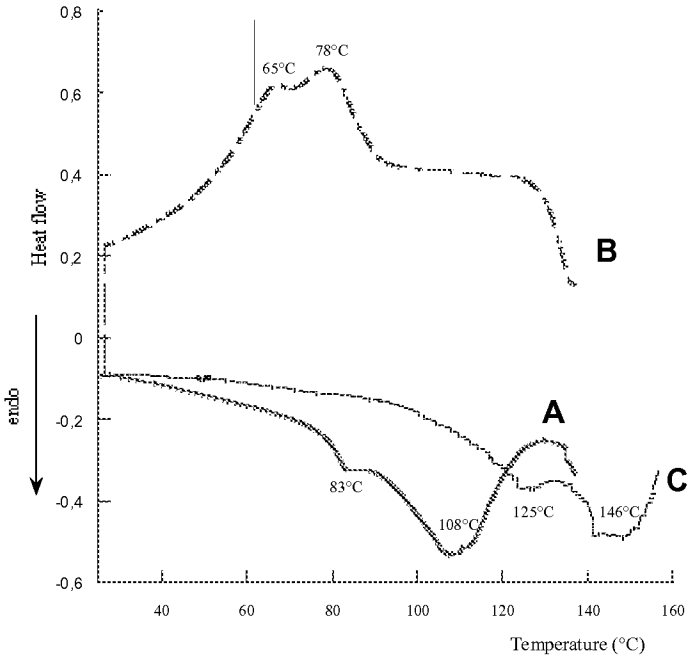


Figure 3

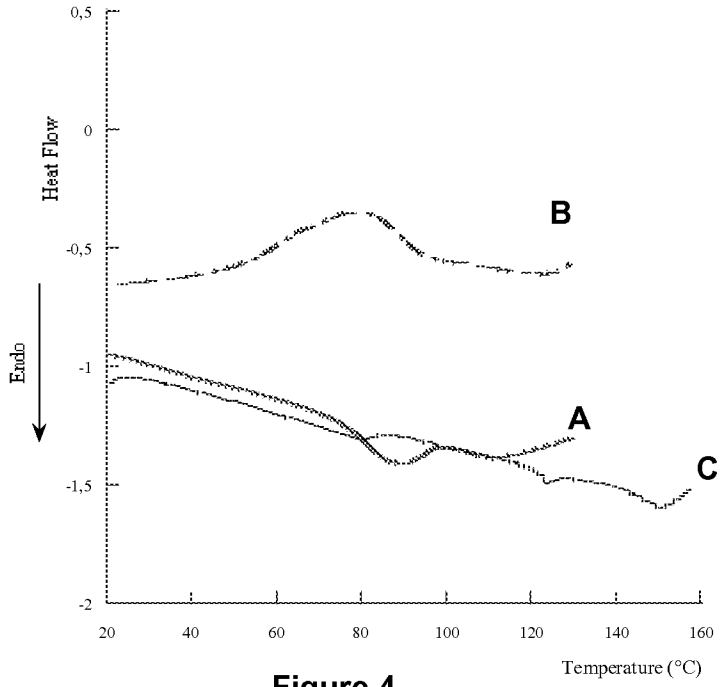


Figure 4

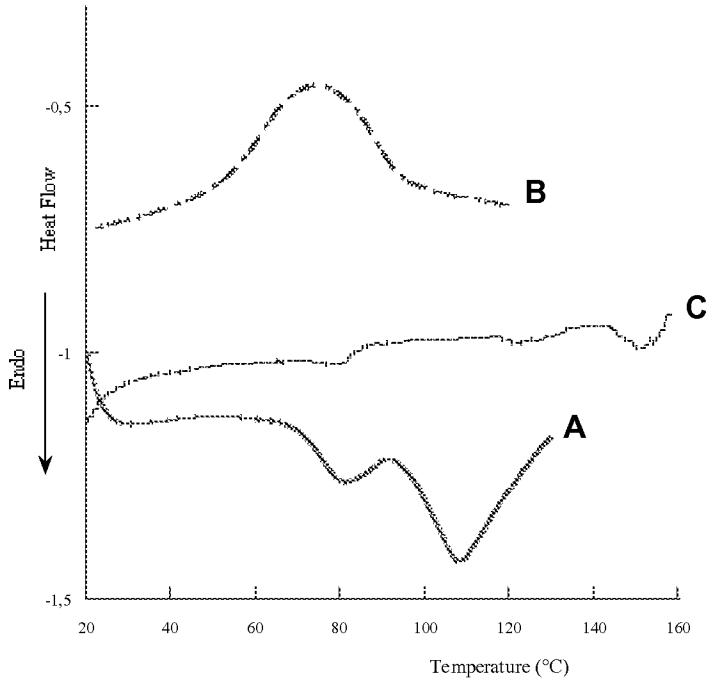

-0,5
Heat Flow
B
C
Endo
-1
A
-1,5
20
40
60
80
100
120
140
160
Temperature (°C)

Figure 5

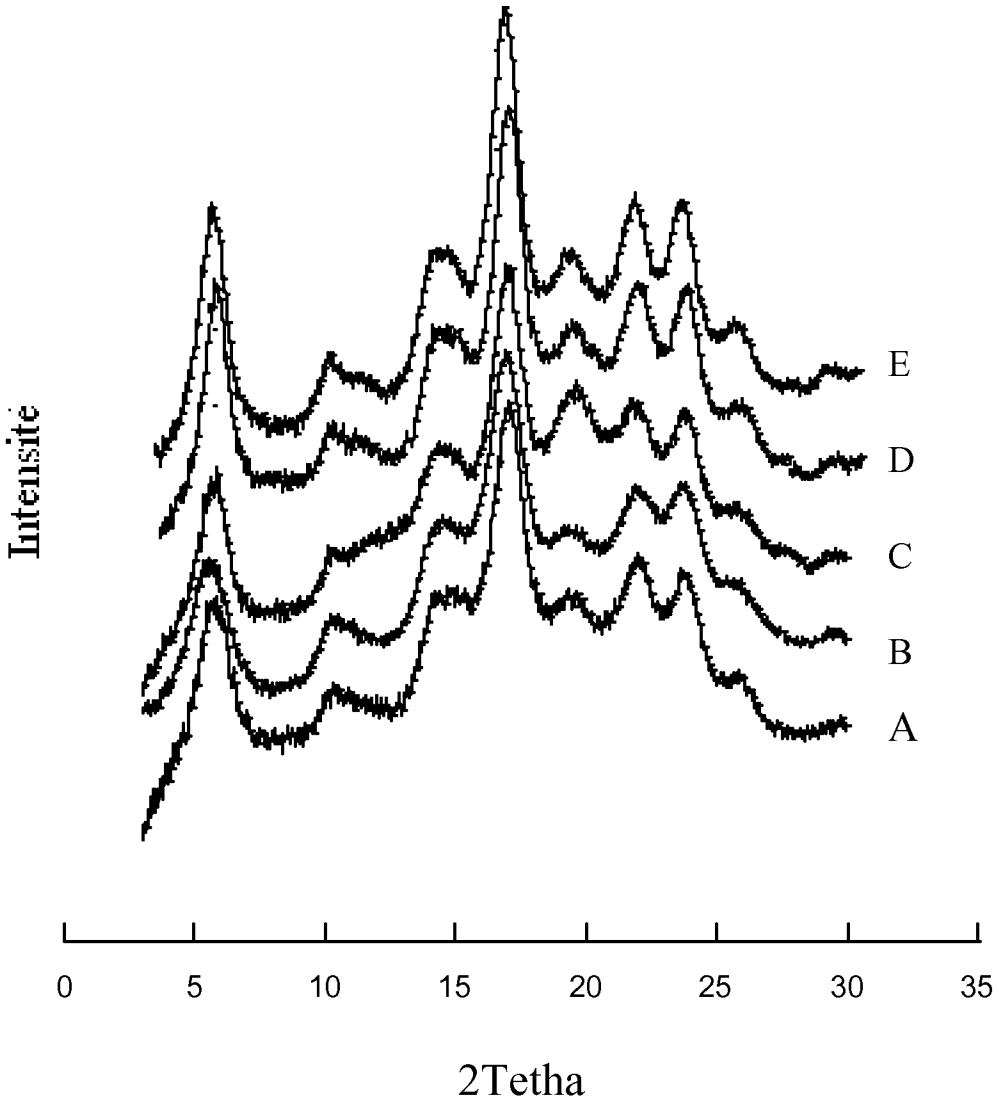


Figure 6

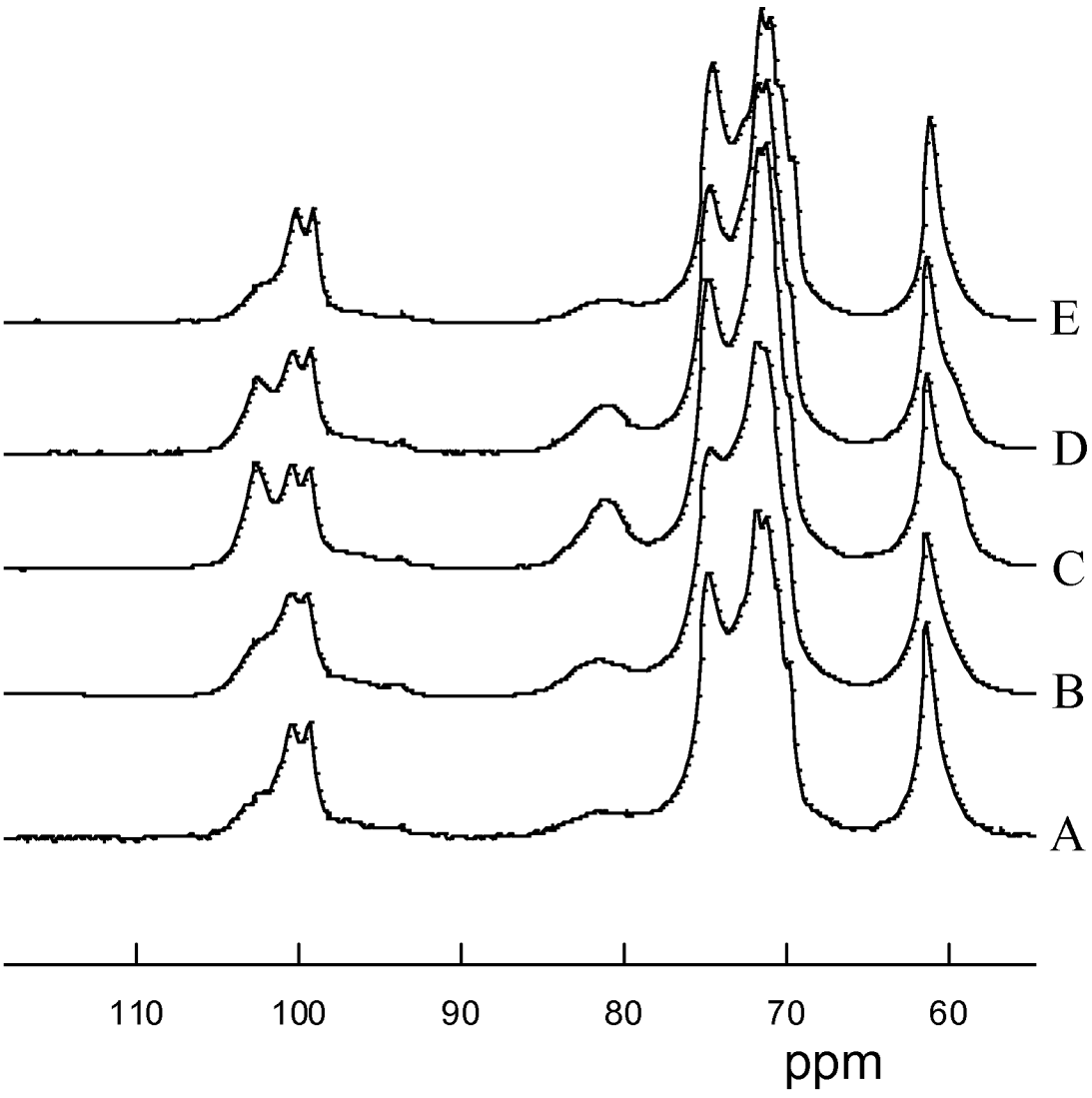


Figure 7

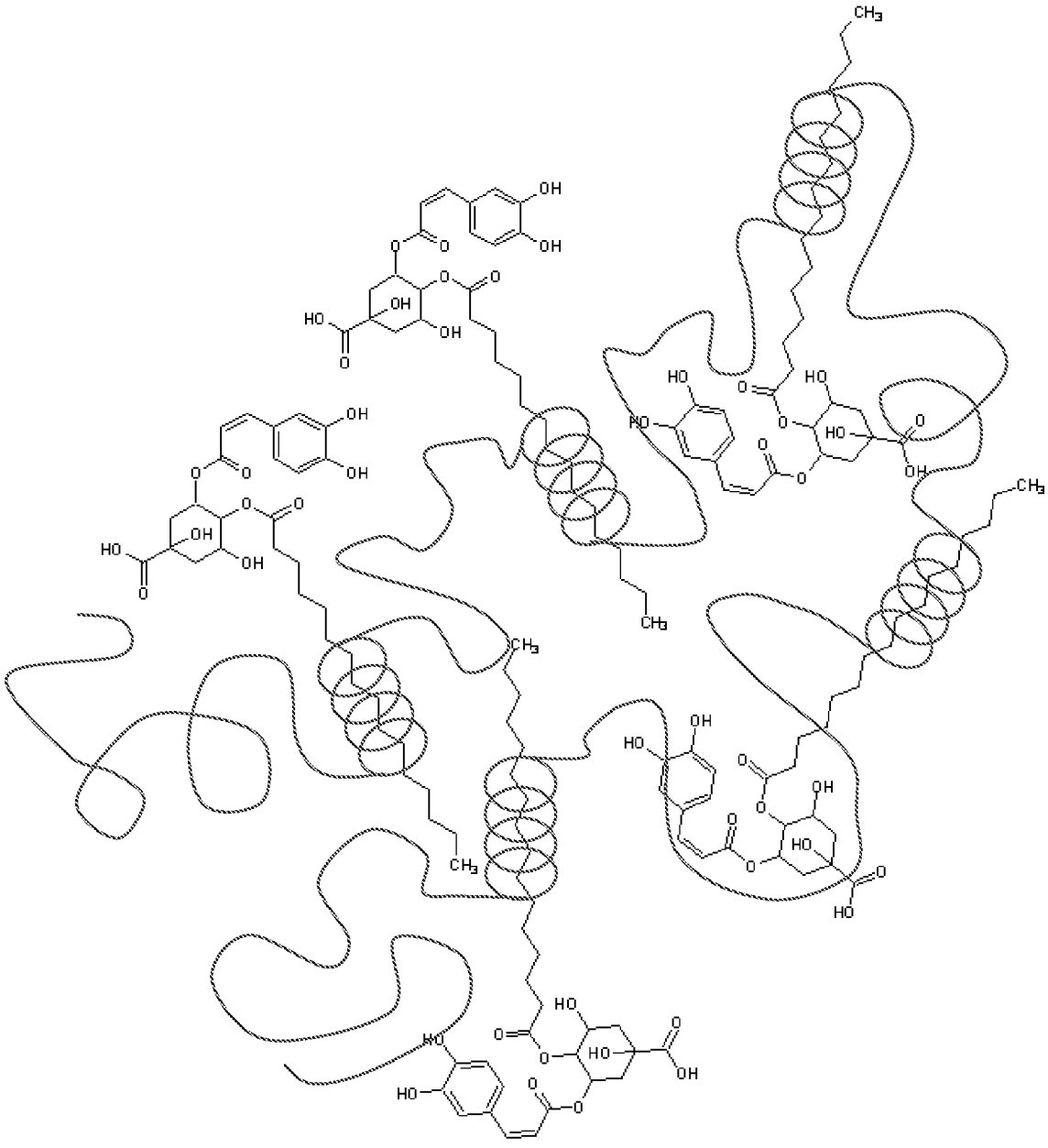


Figure 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/052336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAY MA U V ET AL: "Formation of inclusion complexes of starch with fatty acid esters of bioactive compounds", CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 83, no. 4, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 1869-1878, XP027568219, ISSN: 0144-8617 [retrieved on 2010-10-30]	16,17, 26-29
Y	abstract page 1870, column 1, paragraph 7 - column 2, paragraph 2 page 1877, column 2, paragraph 2	18-25

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 January 2013	18/01/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Monami, Amélie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LORENTZ C ET AL: "Lipase-catalyzed synthesis of two new antioxidants: 4-- and 3--palmitoyl chlorogenic acids", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 32, no. 12, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 1955-1960, XP019859041, ISSN: 1573-6776, DOI: 10.1007/S10529-010-0386-6 cited in the application abstract figure 1 page 1956, column 2, paragraph 2 - paragraph 3	18-25
Y	LOPEZ GIRALDO ET AL: "Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 41, no. 6-7, 5 September 2007 (2007-09-05), pages 721-726, XP022231127, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2007.06.004 cited in the application abstract figure 1 page 722, column 2, paragraph 2 - page 723, column 1, paragraph 1	18-25
Y	XIANG Z N ET AL: "Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle", LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 41, no. 7, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 1189-1203, XP022650038, ISSN: 0023-6438, DOI: 10.1016/J.LWT.2007.08.006 [retrieved on 2008-05-08] abstract figure 1 page 1191, column 2, paragraph 2 - paragraph 3	18-25

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	LORENTZ C ET AL: "Coupling lipophilization and amylose complexation to encapsulate chlorogenic acid", CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 90, no. 1, 4 May 2012 (2012-05-04), pages 152-158, XP028432001, ISSN: 0144-8617, DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2012.05.008 [retrieved on 2012-05-11] abstract page 153, column 2, paragraph 2 - paragraph 6 figures 1, 6	1-29
A	PUTSEYS J A ET AL: "Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties", JOURNAL OF CEREAL SCIENCE, ACADEMIC PRESS LTD, XX, vol. 51, no. 3, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 238-247, XP027058778, ISSN: 0733-5210 [retrieved on 2010-02-19] abstract figure 1 page 244, column 2, paragraph 2	1-29

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2012/052336

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K47/48
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LAY MA U V ET AL: "Formation of inclusion complexes of starch with fatty acid esters of bioactive compounds", CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 83, no. 4, 1 février 2011 (2011-02-01), pages 1869-1878, XP027568219, ISSN: 0144-8617 [extrait le 2010-10-30]	16,17, 26-29
Y	abrégé page 1870, colonne 1, alinéa 7 - colonne 2, alinéa 2 page 1877, colonne 2, alinéa 2	18-25

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[ ] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11 janvier 2013	18/01/2013

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Monami, Amélie

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	LORENTZ C ET AL: "Lipase-catalyzed synthesis of two new antioxidants: 4-- and 3--palmitoyl chlorogenic acids", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 32, no. 12, 1 septembre 2010 (2010-09-01), pages 1955-1960, XP019859041, ISSN: 1573-6776, DOI: 10.1007/S10529-010-0386-6 cité dans la demande abrégé figure 1 page 1956, colonne 2, alinéa 2 - alinéa 3	18-25
Y	LOPEZ GIRALDO ET AL: "Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 41, no. 6-7, 5 septembre 2007 (2007-09-05), pages 721-726, XP022231127, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2007.06.004 cité dans la demande abrégé figure 1 page 722, colonne 2, alinéa 2 - page 723, colonne 1, alinéa 1	18-25
Y	XIANG Z N ET AL: "Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle", LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 41, no. 7, 1 septembre 2008 (2008-09-01), pages 1189-1203, XP022650038, ISSN: 0023-6438, DOI: 10.1016/J.LWT.2007.08.006 [extrait le 2008-05-08] abrégé figure 1 page 1191, colonne 2, alinéa 2 - alinéa 3	18-25

-/--

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	LORENTZ C ET AL: "Coupling lipophilization and amylose complexation to encapsulate chlorogenic acid", CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 90, no. 1, 4 mai 2012 (2012-05-04), pages 152-158, XP028432001, ISSN: 0144-8617, DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2012.05.008 [extrait le 2012-05-11] abrégé page 153, colonne 2, alinéa 2 - alinéa 6 figures 1, 6	1-29
A	PUTSEYS J A ET AL: "Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties", JOURNAL OF CEREAL SCIENCE, ACADEMIC PRESS LTD, XX, vol. 51, no. 3, 1 mai 2010 (2010-05-01), pages 238-247, XP027058778, ISSN: 0733-5210 [extrait le 2010-02-19] abrégé figure 1 page 244, colonne 2, alinéa 2	1-29