

(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
22 mai 2014 (22.05.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/076432 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A23D 9/05 (2006.01) A61K 8/36 (2006.01)
A23D 7/005 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01)
A23D 9/007 (2006.01) A23C 9/152 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2013/052754

(22) Date de dépôt international :

15 novembre 2013 (15.11.2013)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1260928 16 novembre 2012 (16.11.2012) FR

(71) Déposant : INSTITUT NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE AGRONOMIQUE - INRA [FR/FR]; 147
Rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs : ANTON, Marc; 23 Rue de Coulongé, F-
44300 Nantes (FR). GENOT, Claude; 17 Rue Kerfon-
taine, F-44300 Nantes (FR). CASTELLANI, Oscar; 55
Rue Barjot, F-49300 Cholet (FR). BRETILLON, Lionel;
28 Rue Nicolas Jacquemard, F-21560 Arc Sur Tille (FR).
CHARDIGNY, Jean-Michel; 14 Chemin de Marigny, F-
21250 Villy Le Moutier (FR).

(74) Mandataires : ORSINI, Fabienne et al.; Cabinet HARLE
et PHELIP, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA,
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), eurasién (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,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues (règle 48.2.h))

(54) Title : PROCESS FOR THE PRODUCTION OF A POWDERED DRY EMULSION CONTAINING AT LEAST ONE LIPOPHILIC ACTIVE INGREDIENT, INTENDED FOR IMPROVING THE BIOAVAILABILITY OF SAID LIPOPHILIC ACTIVE INGREDIENT, AND DRY EMULSION OBTAINED BY THIS PROCESS

(54) Titre : PROCÉDÉ POUR LA FABRICATION D'UNE ÉMULSION SÈCHE EN POUDRE CONTENANT AU MOINS UN PRINCIPE ACTIF LIPOPHILE, DESTINÉE À AMÉLIORER LA BIODISPONIBILITÉ DUDIT PRINCIPE ACTIF LIPOPHILE, ET ÉMULSION SÈCHE OBTENUE PAR CE PROCÉDÉ

(57) Abstract : The present invention relates to a process for the production of a powdered dry emulsion containing at least one lipophilic active ingredient, intended for improving the bioavailability of said lipophilic active ingredient, which comprises the following steps: (a) a step of providing an aqueous phase containing at least one emulsifying compound which is protein in nature, chosen from whey proteins, and a lipid phase containing said lipophilic active ingredient(s), (b) a step of forming an oil-in-water emulsion, (c) a step of incorporating at least one saccharide compound into said oil-in-water emulsion resulting from step (b), and (d) a step of eliminating said aqueous phase in order to obtain said powdered dry emulsion.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre contenant au moins un principe actif lipophile, destinée à améliorer la biodisponibilité dudit principe actif lipophile, qui comprend les étapes suivantes : (a) une étape de fourniture d'une phase aqueuse contenant au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines du lactosérum, et une phase lipidique contenant ledit ou lesdits principes actifs lipophiles, (b) une étape de formation d'une émulsion huile-dans-eau, (c) une étape d'incorporation d'au moins un composé saccharidique, dans ladite émulsion huile-dans-eau issue de l'étape (b), et (d) une étape d'élimination de ladite phase aqueuse pour l'obtention de ladite émulsion sèche en poudre.



WO 2014/076432 A1

PROCÉDE POUR LA FABRICATION D'UNE EMULSION SECHE EN POUDRE CONTENANT
AU MOINS UN PRINCIPE ACTIF LIPOPHILE, DESTINEE A AMELIORER LA
BIODISPONIBILITE DUDIT PRINCIPE ACTIF LIPOPHILE, ET EMULSION SECHE OBTENUE
PAR CE PROCÉDE

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé pour l'obtention d'émulsions sèches en poudre dont les particules contiennent au moins un principe actif lipophile. L'invention concerne également les émulsions sèches ainsi obtenues, mais aussi les produits dans lesquels elles sont incorporées.

ART ANTERIEUR

Une émulsion est du genre « huile-dans-eau » lorsque (i) la phase dispersante est une phase aqueuse et (ii) la phase dispersée est une phase lipidique.

Ces émulsions huile-dans-eau sont couramment utilisées, notamment dans l'industrie alimentaire.

Le document *Güzey et al.* (FOBI, 2006, 1 :30-40) décrit un procédé pour la fabrication d'une émulsion huile-dans-eau en plusieurs étapes, impliquant une interaction entre de fortes concentrations de β -lactoglobuline, avec de la pectine, avant la formation d'une émulsion tertiaire par ajout de chitosane.

Aucun principe actif n'est incorporé dans ces émulsions, qui restent sous forme liquide (sans opération finale de séchage).

Au final, le produit est une émulsion à double couche ou à triple couche interfaciale, et il ne possède pas plus de 5% d'huile (v/v).

Cette construction de l'enrobage des particules lipidiques par couches successives (« Layer by layer » ou « LBL ») est en pratique relativement complexe, nécessitant notamment un ajustement du pH pour générer des phénomènes d'attraction électrostatique entre lesdites couches.

De plus, les formulations sous forme d'émulsion présentent certains inconvénients.

Tout d'abord, ces émulsions sont sujettes à des problèmes de stabilité physique, et même chimique, lors de leur conservation.

En effet, il est courant de constater une séparation de phases plus ou moins importantes des constituants de l'émulsion ; on peut aussi être confronté à des problèmes de dégradation du ou des principes actifs contenus dans l'émulsion, sous l'influence de l'environnement.

En outre, la présence d'eau favorise le développement de germes, bactéries et champignons. Ces micro-organismes sont généralement responsables de l'altération des produits dans un temps plus ou moins bref. De plus, certains d'entre eux peuvent synthétiser les toxiques pathogènes conduisant ainsi un risque élevé pour la santé du consommateur.

Les industriels additionnent alors des agents conservateurs qui inhibent le développement des micro-organismes et permettent d'accroître la durée de conservation des produits. Cependant, l'innocuité de ces conservateurs n'est pas certaine.

Compte tenu de ces problèmes de stabilité et de sécurité, une approche consiste à transformer ces émulsions huile-dans-eau en des émulsions dites « sèches ».

Les émulsions sèches consistent en des formulations solides dont les particules lipidiques (généralement des gouttelettes lipidiques) sont séparées de l'air par une interface formée par un film interfacial (ou une couche interfaciale) et recouverte d'une zone protectrice secondaire solide. Elles sont capables de redonner une émulsion huile-dans-eau après réhydratation.

Ces émulsions sèches ont l'intérêt de pouvoir être stockées et transportées plus aisément, ce qui optimise la phase de distribution/transport du cycle de vie du produit (en diminuant son volume et sa masse jusqu'à 80%). Cette forme sèche a en plus l'intérêt d'assurer une stabilité accrue sur le plan physico-chimique et microbiologique.

Par exemple, le document WO-2007/045488 décrit un procédé de fabrication d'émulsion sèche en poudre dans lequel un composé actif lipophile, par exemple des acides gras polyinsaturés ou des caroténoïdes, et un composé protecteur colloïde sont mélangés, pour former une nano-émulsion aqueuse transformée ensuite en une émulsion sèche.

Le document WO-2009/090249 décrit quant à lui un procédé consistant tout d'abord à préparer une émulsion comprenant un lipide apolaire et un émulsifiant lipidique. Des composés, comme la maltodextrine ou une protéine du lactosérum, peuvent ensuite être ajoutés à l'émulsion avant séchage.

Ces procédés d'obtention d'émulsion sèche préconisent ainsi d'incorporer un ou plusieurs composés stabilisateurs dans l'émulsion huile-dans-eau, soit avant soit après sa formation.

Cette incorporation s'effectue de manière relativement arbitraire, sans optimisation particulière à cet égard.

Le document Gharsallaoui et al. (Food Chemistry 122, 2010, 447 – 454) et le document WO-98/19652 décrivent tous deux des émulsions sèches stabilisées notamment par des protéines de pois.

Le document Hogan et al. (International Dairy Journal 11, 2001, 137-144) décrit un procédé consistant tout d'abord à préparer une émulsion d'huile de soja par addition

de caséinates de sodium (qui sont bien différentes des protéines de lactosérum), à laquelle sont ensuite ajoutés différents types de composés saccharidiques avant séchage.

L'émulsion obtenue comprend ainsi des gouttelettes qui sont stabilisées par une combinaison caséinates de sodium / composés saccharidiques.

Or dans les documents de l'art antérieur, l'interface des particules lipidiques n'est pas contrôlée de manière à assurer la stabilité de l'émulsion sèche ou la biodisponibilité du principe actif lipophile d'intérêt.

Il existe ainsi un besoin pour des procédés alternatifs d'obtention d'émulsions sèches, permettant d'améliorer la biodisponibilité de principes actifs lipophiles et mettant en œuvre des matières premières sécurisées, tout en garantissant la stabilité chimique des nutriments protégés.

Il est en outre souhaitable de pouvoir préparer des émulsions sèches présentant une bonne stabilité physique dans le temps et facile à incorporer dans des compositions plus complexes.

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention concerne ainsi un procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre contenant au moins un principe actif lipophile, destinée à améliorer la biodisponibilité dudit principe actif lipophile (avantageusement par une administration orale), lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) une étape de fourniture de deux phases : (i) une phase aqueuse contenant au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum (en particulier la β -lactoglobuline), et (ii) une phase lipidique contenant ledit ou lesdits principes actifs lipophiles,

(b) une étape de formation d'une émulsion huile-dans-eau comprenant (i) une phase continue constituée par ladite phase aqueuse et (ii) une phase discontinue constituée par ladite phase lipidique, dispersée sous forme de particules lipidiques présentant une taille maximale inférieure à 3 μ m, l'interface desdites particules lipidiques avec la phase continue aqueuse comportant au moins ledit ou lesdits composés émulsifiants de nature protéique,

(c) une étape d'incorporation d'au moins un composé saccharidique, dans ladite émulsion huile-dans-eau issue de l'étape (b), et

(d) une étape d'élimination de ladite phase aqueuse dans ladite émulsion huile-dans-eau issue de l'étape (c), pour l'obtention de ladite émulsion sèche en poudre comprenant lesdites particules lipidiques contenant ledit ou lesdits principes actifs lipophiles et dont l'interface est recouverte d'une zone protectrice secondaire

(éventuellement sous la forme d'une couche, d'un film ou d'un gel), ladite interface et ladite zone protectrice secondaire comportant, respectivement, ledit ou lesdits composés émulsifiants de nature protéique et/ou ledit ou lesdits composés saccharidiques.

Le produit ainsi obtenu est facile à manipuler et à conserver avec, de manière inattendue, une meilleure biodisponibilité (vectorisation) du ou des principes actifs.

Ce produit peut être utilisé comme ingrédient dans la formulation par exemple de produits alimentaires plus complexes, notamment pour la vectorisation du ou des principes actifs lipophiles dans une matrice aqueuse de manière à obtenir une libération contrôlée et ciblée du ou des principes actifs lipophiles lors du passage dudit produit alimentaire dans un tractus digestif.

Selon l'invention et sans être limité par une quelconque théorie, le composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum et le composé saccharidique constituent des agents de protection.

Le procédé selon l'invention préconise une incorporation séquentielle particulière de ces deux composés, avec un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum suivi du composé saccharidique.

Toujours sans être limité par aucune théorie, ce procédé séquentiel selon l'invention permet :

- une adsorption des composés émulsifiants de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum sur la surface des particules lipidiques pendant l'étape de formation de l'émulsion huile-dans-eau, produisant ainsi une émulsion contenant des particules lipidiques dont la couche d'interface est constituée par ces composés émulsifiants de nature protéique, puis

- un positionnement des composés saccharidiques à la surface des particules lipidiques pour former la zone protectrice secondaire.

L'ajout séquentiel de ces deux agents de protection permettrait ainsi la conservation de la structure de l'émulsion, au cours et après la technique de séchage.

Sans être limité par une quelconque théorie, les particules lipidiques présenteraient une couche interfaciale constituée d'une couche primaire protéique, laquelle couche primaire serait entourée par une zone secondaire protectrice saccharidique

Encore sans être limité par aucune théorie, l'étape d'élimination de la phase aqueuse permet un réarrangement du composé émulsifiant et du composé saccharidique à la surface des particules lipidiques.

Toujours sans être limité par aucune théorie, ce réarrangement permet une modification des propriétés rhéologiques des interfaces, susceptibles de modifier les cinématiques de libération des nutriments ; l'interaction avec les polysaccharides

introduit une zone d'enclassement qui devrait modifier la diffusion des enzymes de la digestion vers les gouttelettes d'huiles enrichies en nutriments.

Des caractéristiques avantageuses de ce procédé selon l'invention, pouvant être prises indépendamment ou en combinaison, sont précisées ci-dessous :

5 - le ou les composés émulsifiants de nature protéique représentent entre 1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la phase aqueuse lors des étapes (a) et/ou (b) ;

10 - au moins un principe actif lipophile est choisi parmi les acides gras polyinsaturés présentant une chaîne de 14 à 24 carbones, de préférence de 18 à 22 carbones, y compris notamment leurs dérivés sous forme de glycéride ; dans ce cas, le ou les acides gras polyinsaturés sont choisis avantageusement parmi les acides gras essentiels, de préférence parmi les acides gras oméga-3 ou parmi les acides gras oméga-6, de préférence encore parmi l'acide docosahexaénoïque, l'acide docosapentaénoïque ou l'acide eicosanoïque, leurs dérivés sous une forme glycéride (ou glycéridique), et leurs mélanges ; encore dans ce cas, le ou les acides gras
15 polyinsaturés représentent entre 1 et 25 % en poids, par rapport au poids total de la phase lipidique ou des particules lipidiques.

20 - au moins un principe actif lipophile est choisi parmi les agents antioxydants lipophiles ; ce ou ces agents anti-oxydants lipophiles sont de préférence choisis parmi les α -carotènes, β -carotènes, β -cryptoxanthines, canthaxanthines, lutéines, lycopènes, zéaxanthines, et leurs mélanges ;

25 - la phase lipidique, ou le cas échéant les particules lipidiques, contiennent au moins un composé lipidique choisi parmi les acides gras saturés présentant une chaîne de 6 à 12 carbones, y compris notamment les dérivés desdits acides gras sous forme de glycéride ;

- les particules lipidiques ont une taille moyenne comprise entre 100 nm et 2 μ m (de préférence entre 150 et 500 nm, de préférence encore entre 330 et 360 nm), 90% des particules ayant une taille inférieure à 800 nm ;

30 - à l'issue de l'étape (b), la phase lipidique représente entre 1 et 30 % en poids par rapport au poids total de l'émulsion huile-dans-eau ;

- l'étape (b) se compose de deux opérations successives : (i) une opération de pré-homogénéisation au moyen d'un homogénéisateur rotor-stator, puis (ii) une opération d'homogénéisation proprement dite au moyen d'un homogénéisateur à haute pression ;

35 - l'opération d'homogénéisation est réalisée sous atmosphère azote et/ou avec maintien de la température inférieure à 25°C en sortie de l'homogénéisateur ;

- le ou les composés saccharidiques, introduits au cours de l'étape (c), sont choisis parmi le saccharose, le lactose, le fructose, le tréhalose, les dextrines, les

maltodextrines, les dextrines jaunes, les sucres invertis, le sorbitol, le polydextrose, le sirop d'amidon, le sirop de glucose et leurs mélanges ;

- le ou les composés saccharidiques sont choisis parmi les composés saccharidiques adaptés à générer un réseau saccharidique (avantageusement un réseau gélifié) apte à contenir les particules lipidiques ;

- à l'issue de l'étape (c), le ou les composés saccharidiques représentent entre 12% et 25%, de préférence entre 19% et 25%, en poids par rapport au poids total de l'émulsion huile-dans-eau ;

- l'étape (d), au cours de laquelle la phase aqueuse est éliminée, est mise en œuvre dans des conditions visant à maintenir l'émulsion huile-dans-eau, ou le cas échéant les particules lipidiques, à une température qui est inférieure à 50°C, de préférence encore inférieure à 30°C ;

- les étapes sont mises en œuvre de sorte à maintenir l'émulsion huile-dans-eau, ou le cas échéant les particules lipidiques, à une température qui est inférieure à 30°C.

La présente invention concerne encore l'émulsion sèche susceptible d'être obtenue par le procédé de fabrication selon l'invention.

L'invention porte plus généralement sur l'émulsion sèche en poudre, pour améliorer la biodisponibilité d'au moins un principe actif lipophile, caractérisée par le fait qu'elle comprend des particules lipidiques contenant au moins un principe actif lipophile et dont l'interface est recouverte d'une zone protectrice secondaire, ladite interface et ladite zone protectrice secondaire comportant, respectivement, au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum et/ou au moins un composé saccharidique.

De préférence, l'émulsion sèche comporte :

(i) le ou les composés émulsifiants de nature protéique, localisés (de préférence majoritairement, voire quasi-totalement ou totalement) à l'interface des particules lipidiques, et

(ii) le ou les composés saccharidiques, localisés (de préférence majoritairement, voire quasi-totalement ou totalement) au niveau de la zone secondaire protectrice.

Des caractéristiques avantageuses de telles émulsions sèches, pouvant être prises indépendamment ou en combinaison, sont précisées ci-dessus :

- le ou les principes actifs lipophiles sont choisis parmi les acides gras polyinsaturés présentant une chaîne de 14 à 24 carbones, de préférence de 18 à 22 carbones, y compris notamment leurs dérivés sous une forme glycéride ; les acides gras polyinsaturés peuvent être choisis parmi les acides gras essentiels, de préférence parmi les acides gras oméga-3 ou parmi les acides gras oméga-6, de préférence encore parmi l'acide docosahexaénoïque, l'acide docosapentaénoïque ou l'acide eicosanoïque, leurs dérivés sous une forme glycéride (ou glycéridique), et leurs mélanges ; le ou les acides gras polyinsaturés, le cas échéant sous une forme

glycéride, représentent par exemple entre 1% et 25% en poids, par rapport au poids total des particules lipidiques ;

- le ou l'un au moins des principes actifs lipophiles est choisi parmi les agents antioxydants lipophiles et/ou les acides gras saturés présentant une chaîne de 6 à 12 carbonés y compris notamment leurs dérivés sous une forme glycéride ;

- les particules lipidiques contiennent une combinaison d'au moins deux principes actifs : (i) au moins un premier principe actif choisi parmi acides gras essentiels, de préférence l'acide docosahexaénoïque, et (ii) au moins un second principe actif choisi parmi les agents antioxydants lipophiles, de préférence la lutéine et/ou la zéaxanthine ;

- les particules lipidiques ont une taille moyenne comprise entre 100 nm et 2 µm, 90% des particules ayant une taille inférieure à 800 nm ;

- le ou les composés saccharidiques sont choisis parmi le saccharose, le lactose, le fructose, le tréhalose, les dextrines, les maltodextrines, les dextrines jaunes, les sucres invertis, le sorbitol, le polydextrose, le sirop d'amidon, le sirop de glucose et leurs mélanges ;

- les particules lipidiques ont une interface monocouche constituée par le composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum et lesquelles particules lipidiques sont contenues (autrement dit « enchâssées » ou « incrustées ») dans un réseau saccharidique (avantageusement un réseau gélifié).

L'invention porte encore sur le produit dans lequel est incorporée une émulsion sèche en poudre selon l'invention.

Le produit correspondant est choisi avantageusement parmi les compositions alimentaires, les compositions cosmétiques ou les compositions médicamenteuses.

Les compositions alimentaires comportent avantageusement une matrice complexe du type base lactée gélifiée, c'est-à-dire encore une matrice à seuil d'écoulement.

L'invention a encore trait à une utilisation d'une émulsion sèche en poudre selon l'invention, pour l'incorporation d'un principe actif lipophile dans le produit précité.

L'invention concerne également un procédé pour accroître/améliorer la biodisponibilité d'au moins un principe actif lipophile, comprenant une opération d'incorporation dudit ou desdits principes actifs dans une émulsion sèche en poudre dont les particules lipidiques contiennent ledit ou lesdits principes actifs lipophiles.

FIGURES

Figure 1 : Distribution de taille de gouttelettes pour une émulsion huile/eau (20 % p/p) avant et après lyophilisation, et en présence et en absence de maltodextrine.

Homogénéisation : 5 min à 500 bars + 10 min à 1000 bars. Phase aqueuse : lactosérum (4,1 % p/p) tampon phosphate pH 7,0.

Légende : Fréquence de distribution volumique en fonction de la taille des gouttelettes en μm

5 a – avant lyophilisation ; b – après lyophilisation et en absence de maltodextrine ; c – après lyophilisation et en présence de maltodextrine

Figure 2 : Taille moyenne des gouttelettes (nm) pour une émulsion huile/eau sèche reconstituée dans l'eau.

Stockées pendant 7 ou 30 jours à + 4°C (a) ou + 20°C (b).

10 **Figure 3** : Distribution de taille de gouttelettes pour une émulsion huile/eau en poudre reconstituée dans l'eau. Stockées pendant 30 jours à + 4°C (A) et -20°C (B)

Fréquence de distribution volumique en fonction de la taille des gouttelettes en μm

Légende : (a) reconstitution à 50°C, (b) reconstitution à 20°C et (c) témoin avant stockage

15 **Figure 4** : Taux plasmatique de DHA ($\mu\text{g/mL}$) après 3 mois de supplémentation nutritionnelle (641 mg/j de DHA ; mini-porcs, Souche Ellegaard, modèle Goetingen)

Légende : a – T0 vectorisé ; b – 1 mois vectorisé ; c – 2 mois vectorisé ; d – 3 mois vectorisé ; e – 3 mois vectorisé postprandial ; f – T0 non-vectorisé ; g – 1 mois non-vectorisé ; h – 2 mois non-vectorisé ; i – 3 mois non-vectorisé ; j – 3 mois non-vectorisé postprandial

20 **Figure 5** : Taux plasmatique de lutéine (ng/mL) après 3 mois de supplémentation nutritionnelle (5,1 mg/j de lutéine ; mini-porcs, Souche Ellegaard, modèle Goetingen)

Légende : a – T0 vectorisé ; b – 1 mois vectorisé ; c – 2 mois vectorisé ; d – 3 mois vectorisé ; e – 3 mois vectorisé postprandial ; f – T0 non-vectorisé ; g – 1 mois non-vectorisé ; h – 2 mois non-vectorisé ; i – 3 mois non-vectorisé ; j – 3 mois non-vectorisé postprandial

25 **Figure 6** : Dosage du DHA dans les tissus, en pourcentage de DHA dans les acides gras totaux, après 3 mois de supplémentation nutritionnelle (641 mg/j de DHA ; mini-porcs, Souche Ellegaard, modèle Goetingen)

30 Légende : a – témoin (n=2) ; b – non-vectorisé (n=4) ; c – vectorisé (n=4) ; 1 – rétine ; 2- foie (lipides totaux) ; 3- foie (phospholipides) ; 4- foie (acides gras libres)

Figure 7 : Dosage du DHA dans les tissus, en pourcentage de DHA dans les acides gras totaux après 3 mois de supplémentation nutritionnelle (641 mg/j de DHA ; mini-porcs, Souche Ellegaard, modèle Goetingen)

35 Légende : a – témoin (n=2) ; b – non-vectorisé (n=4) ; c – vectorisé (n=4) ; 1 – tissu adipeux ; 2- muscle BF (acides gras totaux) ; 3- muscle BF (phospholipides) ; 4- muscle SM (acides gras totaux) ; 5- muscle SM (phospholipides) ; 6-muscle SM (triglycérides)

Figure 8 : Dosage de la lutéine dans le foie, exprimé en ng de lutéine par gramme de foie, après 3 mois de supplémentation nutritionnelle (5,1 mg/j de lutéine ; mini-porcs, Souche Ellegaard, modèle Goettingen)

Légende : a – contrôle (n=2) ; b – non-vectorisé (n=4) ; c – vectorisé (n=4)

5

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente invention fournit un nouveau procédé pour la préparation d'émulsions sèches en poudre.

10 La présente invention fournit un nouveau procédé pour améliorer la biodisponibilité d'au moins un principe actif lipophile contenu dans une émulsion sèche en poudre.

Une émulsion sèche en poudre peut être définie comme une formulation solide, comportant des gouttes d'huile présentant une surface protégée par un film interfacial et
15 une zone protectrice secondaire, et capable de redonner une émulsion après réhydratation.

Avantageusement, l'émulsion sèche est obtenue par élimination de la phase aqueuse d'une émulsion huile-dans-eau ; la structure de l'émulsion après réhydratation est alors avantageusement identique ou similaire à la structure de l'émulsion huile-
20 dans-eau, avant élimination de la phase aqueuse.

En particulier, l'invention concerne un procédé pour l'obtention d'une telle émulsion sèche en poudre comprenant des particules lipidiques contenant le ou les principes actifs lipophiles.

Ce procédé selon l'invention comprend en substance les étapes successives
25 suivantes :

(a) une étape de fourniture d'une phase aqueuse contenant au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines du lactosérum, et une phase lipidique contenant ledit ou lesdits principes actifs lipophiles,

(b) une étape de formation d'une émulsion huile-dans-eau comprenant
30 notamment une phase discontinue constituée par ladite phase lipidique, dispersée sous forme de particules lipidiques dont l'interface comporte au moins ledit ou lesdits composés émulsifiants de nature protéique,

(c) une étape d'incorporation d'au moins un composé saccharidique dans ladite émulsion huile-dans-eau, et

(d) une étape d'élimination de ladite phase aqueuse dans ladite émulsion huile-
35 dans-eau, pour l'obtention de ladite émulsion sèche en poudre.

Les étapes successives (a) à (d) de ce procédé de fabrication sont étudiées ci-dessous plus en détails.

De manière générale et selon une forme de réalisation préférée, les différents composants de l'émulsion, et en particulier les composants de l'émulsion sèche, sont non toxiques et physiologiquement acceptables.

Ces différents composants de l'émulsion, et en particulier les composants de l'émulsion sèche, sont adaptés pour une application alimentaire, en particulier pour la nutrition animale et de préférence pour la nutrition humaine.

A cet égard, l'émulsion sèche, en particulier sa phase lipidique, est de qualité alimentaire.

Par « qualité alimentaire », on entend notamment que la nature et les caractéristiques physico-chimiques des substances permettent leur ingestion par un être humain ou un animal sans provoquer de conséquences délétères sur sa santé. Cette innocuité leur confère un statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe : généralement reconnue comme sûre) pour une utilisation en tant qu'aliment, selon les définitions du règlement CE 178/2002.

Une telle émulsion sèche est ainsi avantageusement utilisable dans une denrée alimentaire.

On entend par « denrée alimentaire » (ou « aliment »), toute substance ou produit, transformé, partiellement transformé ou non transformé, destiné à être ingéré ou raisonnablement susceptible d'être ingéré par l'être humain et/ou par un animal (en particulier par une administration par voie orale).

L'étape (a) de fourniture de la phase aqueuse et de la phase lipidique

La phase aqueuse

Dans la présente description, les termes « phase aqueuse » et « phase hydrophile » peuvent être utilisés indifféremment pour désigner le milieu liquide utilisé pour la préparation d'une émulsion du genre huile-dans-eau.

Par « phase aqueuse », on entend un liquide immiscible avec une phase hydrophobe, mais miscible avec l'eau.

La phase aqueuse est avantageusement de l'eau, comme cela est illustré dans la partie Exemple ci-après.

La phase aqueuse peut aussi consister en un solvant hydrophile, de préférence un solvant portant des groupes hydroxyles, tels que des glycols.

Les « glycols » englobent le glycérol et les polyéthylènes glycols.

La phase aqueuse peut encore être constituée, en partie, par un liquide organique choisi parmi un alcool tel que l'éthanol.

La phase aqueuse peut être constituée par un unique liquide, ou un mélange intime d'au moins deux de ces liquides.

L'homme du métier peut aisément adapter la constitution de la phase aqueuse, notamment en fonction de l'application envisagée et de la facilité de son élimination ultérieure.

5 *Composé émulsifiant*

Selon l'invention, cette phase aqueuse contient au moins un composé émulsifiant de nature protéique, ou un mélange de tels composés.

10 Par composé émulsifiant, on entend un composé capable d'augmenter la stabilité dans le temps d'une émulsion, en particulier en diminuant la tension de surface à l'interface entre une phase hydrophobe et une phase hydrophile.

15 Le composé « émulsifiant » de nature protéique convenant à la mise en œuvre de l'invention est ainsi choisi parmi les composés améliorant la stabilité d'une émulsion huile-dans-eau par ses propriétés tensioactives, notamment de fait de sa capacité à réduire la tension de surface à l'interface eau/huile et de son aptitude à former un film interfacial stable.

Ce composé émulsifiant de nature protéique peut être incorporé indépendamment dans la phase aqueuse, ou peut être présent dans l'un des liquides rapportés pour constituer cette phase.

20 Par « composé de nature protéique », on entend une macromolécule biologique qui est formée d'acides aminés assemblés par des liaisons peptidiques.

Le composé de nature protéique peut être une protéine en tant que telle, mais aussi un polypeptide formé d'au moins 10 acides aminés qui est avantageusement généré par hydrolyse ménagée d'une protéine d'intérêt.

25 De tels composés émulsifiants de nature protéique comportent à cet effet généralement des régions hydrophiles pouvant s'organiser spatialement en boucle ou en queues dans la phase polaire, tandis que les régions hydrophobes peuvent constituer des trains ou séquences situées dans le plan de l'interface au contact de la phase hydrophobe.

30 Le ou les composés de nature protéique peuvent être d'origine naturelle, par exemple isolés/extraits d'une plante ou d'un animal, purifiés et/ou concentrés, ainsi que ceux obtenus par synthèse chimique et/ou par voie microbiologique.

35 Le ou les composés de nature protéique sont avantageusement sous une forme native ; mais ils peuvent également être fonctionnalisés par greffage de groupements hydrophobes pour modifier leur balance hydrophile/hydrophobe ou accroître leur amphiphilie, par exemple par acylation ou sulfonylation.

Selon l'invention, le composé émulsifiant de nature protéique est choisi parmi les protéines issues du lactosérum.

Le lactosérum, ou « petit lait » ou « sérum », est le liquide qui reste après la coagulation du lait et qui renferme les éléments solubles du lait (lactose, protéines solubles et sels minéraux).

Ces protéines de lactosérum sont avantageusement issues d'un lait produit par un mammifère domestique, par exemple vache, brebis, chèvre ou jument.

Parmi ces protéines issues du lactosérum, il sera choisi de préférence la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, la sérum albumine bovine et leurs mélanges.

Une protéine du lactosérum, ou un mélange d'au moins deux de ces protéines du lactosérum, est utilisé dans le cadre de l'invention.

Ces protéines de lactosérum sont avantageusement utilisées sous une forme native.

Par « forme native », on entend en particulier un ou des composés de nature protéique dont la forme est identique à celle présente dans le lait, sans modifications physico-chimiques post-extraction.

Par exemple, le composé émulsifiant de nature protéique est un isolat de protéines de lait, consistant avantageusement en une protéine de lait concentré, naturellement en micelles de caséines natives.

De préférence, le ou les composés émulsifiants de nature protéique sont choisis exclusivement parmi les protéines issues du lactosérum.

Ces protéines de lactosérum peuvent être combinées avec un ou plusieurs autres composés émulsifiants de nature protéique.

Un tel composé émulsifiant de nature protéique complémentaire peut encore être choisi parmi différentes sources animales (jaunes d'œuf ou blanc d'œuf de poule, organes ou muscles d'animaux terrestres tels que le poulet, ou organes ou muscles d'animaux marins tels que le poisson) ou végétales (légumineuses, protéagineux, céréales).

Le composé émulsifiant complémentaire est encore par exemple choisi parmi l'ovalbumine ou le lysozyme.

Le ou les composants émulsifiants de nature protéique représentent avantageusement entre 1 et 10 % en poids, de préférence encore entre 3 et 4 % en poids, par rapport au poids total de la phase aqueuse.

La phase aqueuse peut comprendre encore diverses substances additionnelles, ou combinaisons de substances additionnelles, utiles pour l'application industrielle qui est recherchée pour l'émulsion sèche.

La phase lipidique

Les termes « phase lipidique », « phase huileuse » et « phase hydrophobe » peuvent être indifféremment utilisés pour désigner le liquide huileux utilisé pour la préparation d'une émulsion du genre huile-dans-eau.

La phase lipidique comprend avantageusement un milieu choisi parmi les huiles végétales, les huiles animales, les huiles de synthèse et les polymères liquides hydrophobes, mais aussi les différents antioxydants lipidiques ou lipophiles.

La phase lipidique peut comprendre une seule huile, ou un mélange d'au moins deux de ces huiles.

L'homme du métier peut aisément adapter la constitution de la phase lipidique, notamment en fonction de l'application envisagée.

Selon l'invention, cette phase lipidique contient au moins un principe actif lipophile, ou un mélange de tels principes actifs.

Ce principe actif lipophile peut être incorporé indépendamment dans cette phase lipidique. Il peut également constituer l'un des composants de l'une des huiles formant la phase lipidique.

Le ou les principes actifs lipophiles sont avantageusement choisis parmi les composants présentant un effet pharmacologique et/ou un bénéfice pour l'humain ou l'animal.

Ce ou ces principes actifs lipophiles sont ainsi de préférence choisis parmi les nutriments, de préférence encore parmi les micronutriments ou les microconstituants d'intérêt nutritionnel.

Le ou les principes actifs lipophiles peuvent être d'origine naturelle, par exemple isolés/extraits d'une plante, d'une microalgue ou d'un animal, purifiés et/ou concentrés, ainsi que ceux obtenus par synthèse chimique et/ou par voie microbiologique.

Ce ou ces principes actifs lipophiles sont avantageusement choisis parmi les acides gras.

Ces acides gras peuvent être sous forme acide, ou sous forme de sel, ou encore sous forme de dérivés, notamment d'ester(s) d'acide(s) gras y compris sous une forme glycéride.

De tels acides gras possèdent avantageusement une chaîne carbonée de 4 à 36 atomes de carbone, avantageusement de 4 à 24 atomes de carbones, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations.

On entend par « acide gras insaturé » au sens de la présente invention, un acide gras comprenant au moins une double liaison.

Il s'agit notamment d'acides gras à longues chaînes insaturées, c'est-à-dire pouvant posséder au moins 14 atomes de carbone, de préférence au moins 18 atomes de carbone.

Les acides gras peuvent être monoinsaturés à l'image de l'acide lauroléique (en C12), de l'acide myristoléique (en C14), de l'acide palmitoléique (en C16) ou de l'acide

oléique (en C18) ou polyinsaturés, c'est-à-dire présentant au moins deux doubles liaisons.

Les acides gras polyinsaturés présentent une chaîne de 14 à 24 carbones, de préférence de 18 à 22 atomes de carbones.

5 Les acides gras polyinsaturés correspondants englobent avantageusement les chaînes de 18, 20 et 22 carbones.

Ces acides gras polyinsaturés sont avantageusement choisis parmi les acides gras essentiels, par exemple issus d'algues, de poissons, d'animaux, de microalgues et/ou de plantes.

10 Les acides gras essentiels incluent des acides gras de la famille des oméga-3, oméga-6 et oméga-9.

Les acides gras polyinsaturés comprennent notamment les acides gras oméga-3 et les acides gras oméga-6, caractérisés par la position de l'insaturation la plus proche du groupe méthyle terminal, et leurs mélanges.

15 Conviennt tout particulièrement à l'invention les acides gras insaturés comportant de 18 à 22 atomes de carbone, en particulier les acides gras polyinsaturés, notamment les acides gras oméga-3 et oméga-6.

20 Parmi les acides gras polyinsaturés de la série oméga-6, on peut citer en particulier l'acide linoléique à 18 atomes de carbone et deux insaturations (18:2, oméga-6), l'acide γ -linolénique à 18 atomes de carbone et trois insaturations (18:3, oméga-6), l'acide dihomogama-linolénique à 20 atomes de carbone et 3 insaturations (20:3, oméga-6), l'acide arachidonique ou acide 5, 8, 11, 14 éicosatétraénoïque (20:4, oméga-6) et l'acide docosatétraénoïque (22:4, oméga-6).

25 Les acides gras polyinsaturés de la série oméga-3 peuvent notamment être choisis parmi l'acide α -linolénique (18:3, oméga-3), l'acide stéaridonique (18:4, oméga-3), l'acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque ou EPA (20:5, oméga-3), et l'acide docosahéxaénoïque (ou 4,7,10,13,16,19-docosahéxaénoïque ou DHA, 22:6, oméga-3), l'acide docosapentanoïque (22:5, oméga-3), l'acide n-butyl-5,11,14-eicosatriénoïque.

30 Conviennt tout particulièrement à l'invention, l'acide α -linolénique, l'acide γ -linolénique, l'acide stéaridonique, l'acide éicosapentaénoïque, l'acide docosahéxaénoïque, leurs mélanges ou les extraits les comportant.

Le ou les acide(s) gras considéré(s) est (sont) utilisé(s) avantageusement sous une forme isolée, c'est-à-dire après extraction de sa (leur) source(s) d'origine.

35 Les sources d'acide γ -linolénique peuvent être choisies parmi les huiles végétales comme par exemple les huiles d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis, d'echium et de chanvre, et les extraits de la microalgue spiruline (*Spirulina maxima* et *Spirulina platensis*).

Les huiles végétales de noix, noisettes, pépins de kiwi, amandes (*Juglans regia*), de coriandre et de soja (*Glycina max*), de colza (*Brassica napus*), de chia, de lin, de

rosier muscat et les huiles de poisson, par exemple, sont riches en acides gras polyinsaturés de la série oméga-3.

Les acides gras polyinsaturés oméga-3 peuvent également se trouver dans le zooplancton, les crustacés/mollusques et les poissons. Les huiles de poissons constituent la principale source industrielle d'EPA et de DHA. Les biomasses de microalgues peuvent aussi constituer une matière première d'extraction des acides gras insaturés oméga-3.

Ainsi, l'acide gras insaturé peut être mis en œuvre dans la composition sous forme d'au moins une huile choisie parmi les huiles d'onagre, de bourrache, de pépins de cassis, de pépins de kiwi, de noix, de soja, de poissons, de tournesol, de germes de blé, de chanvre, de fénugrec, de rosier muscat, d'échium, d'argan, de baobab, de son, de riz, de sésame, d'amande, de noisette, de chia, de lin, d'olive, d'avocat, de carthame, de coriandre et/ou d'extrait de microalgues (par exemple spiruline), ou d'extraits de zooplancton.

Ces acides gras polyinsaturés représentent avantageusement entre 1 et 25 % en poids par rapport au poids total de la phase lipidique (ou le cas échéant des particules lipidiques).

Le ou les principes actifs lipophiles peuvent également être choisis parmi les acides gras saturés à chaîne moyenne, c'est-à-dire présentant une chaîne de 6 à 12 carbones.

Les acides gras saturés « à chaîne moyenne » englobent les chaînes de 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12 carbones.

Ces acides gras saturés à chaîne moyenne sont avantageusement incorporés en combinaison avec les acides gras essentiels précités.

Ces acides gras saturés à chaîne moyenne représentent avantageusement entre 10 et 30 % en poids par rapport au poids total de la phase lipidique (ou le cas échéant des particules lipidiques).

Au sens de l'invention, par « acide gras », on entend également les formes dérivées physiologiquement acceptables de ces acides gras, notamment sous une forme glycéride.

Les glycérides couvrent d'une manière générale les monoglycérides, les diglycérides, les triglycérides et leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, il s'agit plus particulièrement de triglycérides, le cas échéant en mélange avec des monoglycérides et/ou des diglycérides.

Les glycérides mis en œuvre dans le cadre de la présente invention se présentent d'une manière générale sous la forme de mélanges.

Les glycérides considérés selon l'invention peuvent être composés d'un unique type d'acide gras, ou, dans le cas des diglycérides et triglycérides, dérivés de

l'estérification du glycérol par des molécules d'acide gras de longueur de chaînes différentes.

Ainsi, selon l'invention, les acides gras englobent (i) les acides gras polyinsaturés précités, notamment les acides gras essentiels, sous une forme estérifiée à un glycérol (sous une forme glycéride), et (ii) les acides gras saturés à chaîne moyenne sous une forme estérifiée à un glycérol (sous une forme glycéride).

Le ou les principes actifs lipophiles peuvent encore être choisis parmi les vitamines lipophiles ou liposolubles (vitamine A, vitamine E, vitamine K, vitamine D, co-enzyme Q10), ainsi que leurs dérivés physiologiquement acceptables.

Le ou les principes actifs lipophiles peuvent également être choisis parmi les agents antioxydants lipophiles, de préférence parmi les caroténoïdes ou parmi les composés polyphénoliques.

Les caroténoïdes intéressants sont avantageusement choisis parmi le β -carotène, α -carotène, astaxanthine, lutéine, zéaxanthine, cryptoxanthine, 8'-apo- β -caroténale, acides 8'-apo- β -caroténoïque ester, tel que l'éthyl ester, canthaxanthine, lycopène, crocethine, α ou β -zéacarotène et citranaxanthine, ainsi que leurs dérivés acceptables physiologiquement, et leurs mélanges.

Ces agents antioxydants représentent avantageusement entre 0,1 et 2 % en poids par rapport au poids total de la phase lipidique (ou le cas échéant des particules lipidiques).

Selon une forme de réalisation préférée, les principes actifs lipophiles consistent en une combinaison de :

(i) au moins un premier principe actif choisi parmi les acides gras essentiels, de préférence les acides docosahexaénoïques, et

(ii) au moins un second principe actif choisi parmi les agents antioxydants lipophiles, de préférence la lutéine et/ou la zéaxanthine.

L'étape (b) de formation d'une émulsion huile-dans-eau

Partant des deux phases fournies à l'étape (a), une émulsion huile-dans-eau est fabriquée.

Emulsion huile-dans-eau

L'émulsion huile-dans-eau obtenue au cours de cette étape (b) comprend :

(i) une phase continue, constituée par la phase aqueuse précitée fournie lors de l'étape (a) et contenant le ou les composants émulsifiants de nature protéique (au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum), et

(ii) une phase discontinue, constituée par la phase lipidique fournie à l'étape (a) et le ou les principes actifs lipophiles.

Une émulsion huile-dans-eau peut être ainsi désignée par le sigle « H/E » dans la présente description.

Les termes « phase continue », « phase continue hydrophile » et « phase continue aqueuse » peuvent être indifféremment utilisés pour désigner la phase aqueuse dispersante d'une émulsion huile-dans-eau.

Les termes « phase interne », « phase interne hydrophobe », « phase dispersée » et « phase dispersée hydrophobe » peuvent être indifféremment utilisés pour désigner la phase huile dispersée d'une émulsion du genre huile-dans-eau.

La phase lipidique est ainsi dispersée sous forme d'une pluralité de particules lipidiques, avantageusement de gouttelettes, dans la phase aqueuse.

Ces particules lipidiques contiennent le ou les principes actifs lipophiles.

L'émulsion selon l'invention peut être définie par les caractéristiques dimensionnelles de ces particules lipidiques.

Ces caractéristiques dimensionnelles sont par exemple déterminées par une technique de granulométrie laser standardisée (ISO 13320 :2009, Particle Size Analysis - Laser Diffraction Methods. Part 1 : General Principles (2009)).

A cet égard, les particules lipidiques dispersées présentent une taille maximale inférieure à 3 µm, de préférence inférieure à 2 µm.

La « taille maximale » correspondant avantageusement à une population de particules lipidiques dont moins de 2 % ont une taille supérieure au seul indiqué.

Cette émulsion est encore avantageusement caractérisée par le fait que 90 % des particules lipidiques ont une taille inférieure à 0,8 µm.

La taille moyenne des particules en surface, ou « diamètre de Sauter » $d_{3,2}$, est définie par la formule (I) suivante :

$$d_{3,2} = \Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2 \quad (I)$$

où n_i est le nombre de gouttelettes lipidiques de diamètre d_i .

La taille moyenne des particules en volume $d_{4,3}$ est définie par la formule (II) suivante :

$$d_{4,3} = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3 \quad (II)$$

où n_i est le nombre de gouttelettes lipidiques de diamètre d_i .

Dans ce cadre, les particules lipidiques de l'émulsion selon l'invention ont une taille moyenne (exprimée de préférence en $d_{4,3}$ ou en $d_{3,2}$) comprise entre 100 nm et 2 µm, de préférence entre 150 et 500 nm, de préférence encore entre 330 et 360 nm.

De plus, les particules lipidiques obtenues présentent une interface avec la phase continue aqueuse comportant au moins le ou les composés émulsifiants de nature protéique renfermés initialement dans cette phase aqueuse.

L'interface des particules lipidiques obtenues présente ainsi des caractéristiques contrôlées, notamment sur le plan de la composition, la charge électrique et la concentration.

Ces caractéristiques peuvent être mesurées par des techniques physico-chimiques classiques.

En d'autres termes, l'interface « protéique » des particules lipidiques possède une composition, une charge électrique, une viscosité, une morphologie et une épaisseur qui sont déterminées par lesdits composés émulsifiants de nature protéique rapportés.

La formation de l'émulsion huile-dans-eau

En pratique, les phases aqueuse et lipidique sont avantageusement mélangées, dans des proportions appropriées, afin de préparer l'émulsion.

De manière générale, la phase lipidique représente avantageusement entre 1 et 30 % en poids, de préférence encore entre 15 et 25 % en poids, par rapport au poids total de l'émulsion huile-dans-eau.

La formation de l'émulsion s'effectue ensuite par une technique connue de l'homme du métier dans des conditions adaptées pour l'obtenir de particules telles que définies ci-dessus.

Par exemple, l'émulsion est avantageusement obtenue par deux opérations successives :

- une opération de pré-homogénéisation au moyen d'un homogénéisateur rotor-stator, puis
- une opération d'homogénéisation proprement dite au moyen d'un homogénéisateur à haute pression.

Par « homogénéisation », on entend une opération conduisant à une formation et une réduction de la taille des gouttelettes lipidiques dans le milieu soumis à ladite opération.

L'homogénéisateur rotor-stator permet d'obtenir une première émulsion grossière, par exemple une agitation des deux phases à 20 000 tours / min pendant 5 minutes avec un rotor-stator Heidolph (tête de 12 mm).

L'homogénéisateur à haute pression va permettre la finition dimensionnelle à l'égard de la population recherchée de particules lipidiques.

L'homme du métier connaît les caractéristiques générales des installations d'homogénéisation, et, si besoin est, il peut encore se reporter notamment au document

« Homogénéisation à haute pression des dispersions alimentaires liquides », rédigé par Sébastien Roustel, Technique de l'Ingénieur (2010) ou « The high pressure dairy homogenizer », L.W Phipps, Technical Bulletin, Ed NIRD (1985).

L'homogénéisateur consiste avantageusement en un appareil permettant de projeter le mélange sous une très forte pression dans une tubulure à l'extrémité de laquelle s'applique une valve (par exemple un clapet conique en agate ou en acier, associé à un siège). Le mélange se trouve soumis à des gradients de cisaillement intenses en passant au travers de cette valve, ce qui conduit à une réduction de la taille des particules lipidiques.

La pression appliquée est avantageusement comprise entre 500 bars et 1000 bars. La durée et/ou le nombre de passages seront adaptés par l'homme du métier en fonction de l'appareillage et du résultat recherché. La durée pourra par exemple varier de 5 à 15 minutes, notamment de 5 à 10 minutes, pour 3 passages en batch.

L'opération d'homogénéisation est avantageusement réalisée sous atmosphère azote et/ou avec maintien de la température inférieure à 25°C en sortie de l'homogénéisateur, en particulier de manière à limiter les dégradations du ou des principes actifs contenus dans la phase lipidique.

L'étape (c) d'incorporation d'au moins un composé saccharidique

Une fois l'émulsion formée à l'issue de l'étape (b), au moins un composé saccharidique est incorporé dans la phase aqueuse de l'émulsion huile-dans-eau.

Par « composé saccharidique », on englobe les polysaccharides.

Le ou les composés saccharidiques introduits sont avantageusement choisis parmi :

- les dérivés de l'amidon (amidon cireux), ou
- le saccharose, le lactose, le fructose, le tréhalose, les dextrines, les maltodextrines, les dextrines jaunes, les sucres invertis, le sorbitol, le polydextrose, le sirop d'amidon, le sirop de glucose et leurs mélanges.

De préférence, le ou les composés saccharidiques sont choisis parmi les composés saccharidiques adaptés à générer un réseau saccharidique (avantageusement un réseau gélifié), dans lequel les particules lipidiques sont destinées à s'incruster / s'enchâsser.

A cet effet, le ou les composés saccharidiques sont choisis avantageusement parmi les composés saccharidiques issus de l'hydrolyse de l'amidon, par exemple la maltodextrine ou le sirop de glucose.

Ces composés saccharidiques présentent avantageusement une valeur de « dextrose équivalent », ou « D.E », compris entre 26 et 30%.

Ce composé saccharidique constitue un stabilisateur, ou support, car après séchage de l'émulsion huile-dans-eau, il contribue à la stabilité et à la pérennité de la structure de l'émulsion sèche ; ainsi, lors de la reconstitution de l'émulsion dans une phase aqueuse, on obtient une émulsion avec la même structure que l'émulsion huile-dans-eau avant séchage.

Le ou les composés saccharidiques sont introduits de sorte à représenter entre 12 % et 25 %, de préférence entre 19 % et 25 %, en poids par rapport au poids total de l'émulsion huile-dans-eau.

L'étape (d) d'élimination de la phase aqueuse

A partir de l'émulsion huile-dans-eau issue de l'étape (c), la phase aqueuse est éliminée pour l'obtention de l'émulsion sèche en poudre selon l'invention.

Elimination de la phase aqueuse

L'étape (d) est mise en œuvre dans des conditions visant à maintenir l'émulsion huile-dans-eau, ou le cas échéant les particules lipidiques, à une température qui est généralement inférieure à 50°C, de préférence encore inférieure à 30°C.

Cette étape (d) consiste avantageusement en une opération de lyophilisation (dessiccation par sublimation du produit préalablement congelé ou « Freeze-drying »).

En pratique, ce séchage est réalisé en évitant de passer par l'état liquide, c'est-à-dire par passage direct de l'état de glace à l'état de vapeur d'eau (sublimation).

Cette technique est réalisée sous vide avec une température de l'émulsion inférieure avantageusement à -10°C.

Pour cela et sans être limitatif, l'émulsion est par exemple versée sur des plateaux à petites parois pour autoriser le maximum de surface de contact avec l'extérieur. L'émulsion congelée est placée dans la chambre de dessiccation à vide. En l'état de fonctionnement, la température du condenseur est inférieure à -50°C et la pression est inférieure à 0,12 mbar.

L'emploi de la lyophilisation est intéressant pour assurer la stabilité des composés thermolabiles (notamment des principes actifs), et la conservation de la qualité nutritionnelle des particules lipidiques.

Le ou les composés saccharidiques introduits à l'étape (c) sont alors utiles pour maintenir la structure de l'émulsion pendant l'étape de séchage, et le cas échéant l'étape de refroidissement pour la lyophilisation.

L'émulsion sèche obtenue

L'émulsion sèche obtenue comprend des particules lipidiques, avec une interface recouverte d'une zone protectrice secondaire.

La zone protectrice secondaire forme ainsi une épaisseur ou un enrobage, qui se présente éventuellement sous la forme d'une couche, d'un film ou d'un gel.

L'interface comporte ainsi au moins le composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum et/ou au moins le composé saccharidique ; et la zone protectrice secondaire comporte également au moins le composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum et/ou au moins le composé saccharidique.

De préférence, l'émulsion sèche comporte :

(i) le ou les composés émulsifiants de nature protéique (au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum), localisés (de préférence majoritairement, voire quasi-totalement ou totalement) à l'interface desdites particules, et

(ii) le ou les composés saccharidiques, localisés (de préférence majoritairement, voire quasi-totalement ou totalement) au niveau de la zone secondaire protectrice.

De manière alternative, l'émulsion sèche peut encore comporter :

(i) le ou les composés émulsifiants de nature protéique, localisés à l'interface desdites particules et au niveau de la zone secondaire protectrice, et

(ii) le ou les composés saccharidiques, localisés (de préférence majoritairement) au niveau de la zone secondaire protectrice.

Sans être limité par aucune théorie, le procédé selon l'invention apporterait un résultat bénéfique inattendu dans la mesure où le ou les composés saccharidiques vont former une zone secondaire protectrice autour du ou des émulsifiants de nature protéique (au moins un composé émulsifiant de nature protéique parmi les protéines issues du lactosérum) formant une couche primaire entourant elles-mêmes les particules lipidiques.

Le ou les principes actifs lipophiles sont ainsi microencapsulés.

Lors de la mise en œuvre de composés saccharidiques adaptés à générer un réseau saccharidique, sans être limité par aucune théorie, les particules lipidiques ont une interface « monocouche » constituée par les protéines du lactosérum ; les particules recouvertes sont enchâssées dans ledit réseau saccharidique.

Les particules lipidiques de cette émulsion sèche présentent, après re-dissolution dans une phase aqueuse, des caractéristiques dimensionnelles identiques ou similaires par rapport aux particules de l'émulsion huile-dans-eau avant séchage.

Ces particules lipidiques ont ainsi une taille moyenne comprise entre 100 nanomètres et 2 μm (de préférence entre 150 et 500 nanomètres, de préférence encore entre 330 et 360 nanomètres) ; 90% des particules ont une taille inférieure à 800 nanomètres.

L'émulsion sèche présente avantageusement la composition suivante (exprimé en pourcentage de poids par rapport au poids total de ladite émulsion sèche) :

(i) les particules lipidiques représentent entre 10 et 30% ;

(ii) le ou les composés émulsifiants de nature protéique représentent entre 1 et 5% ;

(iii) le ou les composés saccharidiques représentent entre 48 % et 63%.

Applications industrielles d'une émulsion sèche selon l'invention

Comme cela a déjà été mentionné précédemment dans la présente description et illustré dans les exemples ci-après, une émulsion sèche selon l'invention peut être obtenue dans l'objectif de pouvoir être intégrée dans un produit choisi avantageusement parmi les compositions alimentaires, les compositions cosmétiques ou les compositions médicamenteuses.

L'émulsion sèche obtenue permet notamment, de manière inattendue, d'accroître/améliorer la biodisponibilité du ou des principes actifs.

Le produit peut être utilisé comme un ingrédient pour la vectorisation des principes actifs lipophiles dans une matrice aqueuse.

Le produit selon l'invention est avantageusement adapté à une administration orale.

Dans le contexte de l'invention, « accroître/améliorer » la biodisponibilité signifie avantageusement que le ou les principes actifs lipophiles pris oralement par un animal et dosés dans son plasma sanguin (par exemple un système de mini-porcs, souches Ellegaard, modèle Goetingen) présentent une concentration augmentée d'au moins 50 %, de préférence encore d'au moins 100 %, de préférence encore d'au moins 150 %, par rapport au(x) même(s) principe(s) actif(s) lipophile(s) sans vectorisation.

Par « vectorisation », on entend la modulation et le contrôle de la distribution d'un principe actif vers une cible.

Un tel vecteur assure avantageusement les actions suivantes :

- il véhicule les micronutriments jusqu'au site d'action désiré (absorption),
- il protège les micronutriments des dégradations chimiques (oxydation/réactivité) et physique tout au long de la vie de l'aliment (formulation, fabrication, pasteurisation, stockage, déstructuration),
- il permet un contrôle de la libération des micronutriments, et
- il est compatible avec la matrice dans laquelle il est incorporé sans réduire ses qualités organoleptiques (apparence, texture, goût, etc.).

Pour une application alimentaire, l'émulsion sèche selon l'invention offre une protection des nutriments au niveau moléculaire (au sein des particules lipidiques) et au niveau supramoléculaire (notamment au sein de matrices alimentaires).

Cette émulsion sèche selon l'invention permet une protection du ou des principes actifs lipophiles associés, afin de garantir leur stabilité, leurs qualités organoleptiques (texture, arôme) et leur biodisponibilité, en particulier une fois intégrés dans un aliment.

Selon l'invention, la vectorisation permet le cheminement, le long du tractus digestif d'un animal, des principes actifs administrés oralement, cela sans dégradation, ou avec une dégradation réduite, dans l'étape gastrique du tractus gastro-intestinal supérieur, tout en favorisant une libération dans le compartiment d'absorption physiologique desdits principes actifs (milieu intestinal).

Cette approche permet d'améliorer la biodisponibilité du ou des principes actifs pour le ou les tissus cibles (à savoir avantageusement le muscle, le foie ou le tissu adipeux).

Le produit peut ainsi être utilisé comme un ingrédient dans la formulation d'un produit ou composition alimentaire plus complexe.

L'émulsion sèche selon l'invention peut être incorporée dans une composition alimentaire au cours de sa préparation. L'émulsion sèche selon l'invention peut également être mélangée avec un ou plusieurs ingrédients destinés à la préparation de la composition alimentaire.

Dans le cas d'une utilisation conforme à l'invention par voie orale, on privilégie l'utilisation d'un support ingérable.

Convienent notamment comme supports alimentaires ou pharmaceutiques, le lait, le yaourt, le fromage, les laits fermentés, les produits fermentés à base de lait, des glaces, des produits à base de céréales fermentées, des poudres à base de lait, des formules pour enfants et nourrissons, des produits alimentaires de type confiserie, chocolat, céréales, des aliments pour animaux en particulier domestiques, des comprimés, gélules ou tablettes, des suppléments oraux sous forme sèche et les suppléments oraux sous forme liquide.

Pour l'ingestion, de nombreuses formes de réalisation de compositions orales et notamment de compléments alimentaires sont possibles. Leur formulation est réalisée par les procédés usuels pour produire des dragées, gélules, gels, émulsions, comprimés, capsules. En particulier, le(s) actif(s) selon l'invention peuvent être incorporés dans toute autre forme de compléments alimentaires ou d'aliments enrichis, par exemple des barres alimentaires, ou des poudres compactées ou non. Les émulsions sèches peuvent être diluées à l'eau, dans du soda, des produits laitiers ou dérivés du soja, ou être incorporées dans des barres alimentaires.

Parmi les compositions alimentaires, le produit est avantageusement choisi parmi les matrices complexes de type base lactée gélifiée.

Cette composition consiste avantageusement en un gel mixte obtenu par chauffage puis refroidissement, constitué de deux types de polysaccharide (amidon et

carraghénane par exemple), en présence de l'émulsion sèche introduite sous forme de poudre.

5 **EXEMPLES :** *Encapsulation de nutriments et micronutriments thermosensibles à l'intérieur de gouttelettes d'huile submicroscopiques*

Exemple 1 : Obtention d'une émulsion sèche

10 Phase aqueuse/phase lipidique

La phase lipidique est constituée de :

- 63% p/p d'huile riche en acide docosahéxaénoïque (DHASCO® de MARTEK), issue de microalgue contenant approximativement 40% de DHA,
- 26% p/p d'huile à base d'acides gras saturés à chaîne moyenne (Miglyol® de Sasol),
- 15 et
- 1% p/p de caroténoïdes (FLORAGLO® de PFANNENSCHMIDT, contenant respectivement 21,7% de lutéine et 1,9 % de zéaxanthine).

La phase aqueuse se compose d'une solution de protéines de lactosérum (4,16% p/p, PROMILK 852 FP1 de IDI), comme composant pour assurer le contrôle de
20 l'interface huile-eau et favoriser la vectorisation des nutriments jusqu'au compartiment d'absorption des composants.

Formation de l'émulsion huile-dans-eau

L'émulsion huile-dans-eau est destinée à être constituée de 20 % p/p de phase
25 lipidique et 80% p/p de phase aqueuse.

Dans un premier temps, une pré-homogénéisation par rotor - stator dans un dispositif rotor stator Heildolph (tête 12 mm) à 20 000 tours / min pendant 5 minutes, en mélangeant la phase aqueuse et les différents composants de la phase huile, permet d'obtenir une première émulsion grossière.

30 Dans un second temps, cette première émulsion est traitée par homogénéisation à haute pression entre 500 bars (5 minutes ou 3 passages en batch) et 1000 bars (10 minutes ou 3 passages en batch), avec refroidissement en sortie de produit.

La distribution en volume ($d_{4,3}$) des particules des émulsions a été mesurée avec un granulomètre Micromeritics (Staurn DigiSizer™ 5200).

35 Les émulsions ont été analysées de deux façons différentes, soit diluées dans de l'eau distillée, soit diluées dans une solution aqueuse de SDS 1% p/v ; dans les deux cas, la dilution employée était 1:10.

La présence de SDS permet de remplacer les molécules présentes à l'interface par des molécules de SDS et de séparer les gouttelettes floculées par répulsion électrostatique.

Ainsi par comparaison avec les échantillons en absence et en présence de SDS, il est possible d'analyser l'état d'agrégation du système. Généralement les mesures ont été réalisées dans les 30 minutes suivant la formation ou la reconstitution de l'émulsion, à l'exception des cas avec traitements des émulsions comme les traitements thermiques ou l'incorporation dans les crèmes.

Le produit obtenu présente des vecteurs enrichis avec une taille moyenne de 350 nm, comprise entre 150 et 500 nm, la taille des 90% des gouttelettes étant inférieure à 750 nm (Figure 1 – courbe (a)).

Le tableau 1 ci-dessous précise la composition de cette émulsion huile-dans-eau.

Composant	% base humide exprimé en poids
MIGLYOL®	7,279
HUILE DHASCO	12,500
FLORAGLO	0,221
LACTOSERUM IDI	3,296
K(PO ₄ H ₂)	0,330
K ₂ (PO ₄ H)	0,634
eau (qsp)	75,740

Tableau 1

Formation de l'émulsion sèche

Pour une stabilisation à long terme du produit (au moins 12 mois à -20°C) et avec l'intention de pouvoir l'utiliser comme un ingrédient dans des formulations alimentaires (ou cosmétiques ou autres) complexes, l'émulsion a été séchée par lyophilisation et transformée en poudre.

En pratique, ce séchage est réalisé en évitant de passer par l'état liquide, c'est-à-dire par passage direct de l'état de glace à l'état de vapeur d'eau (sublimation). Ceci est réalisé sous vide avec une température de l'émulsion inférieure à -10°C. L'émulsion est versée sur des plateaux à petites parois pour autoriser le maximum de surface de contact avec l'extérieur. L'émulsion congelée est placée dans la chambre de dessiccation à vide. En l'état de fonctionnement, la température du condenseur est inférieure à -50°C et la pression est inférieure à 0,12 mbar.

L'utilisation de maltodextrine comme stabilisant dans la phase aqueuse (entre 12,5 et 25 % p/p dans la re-formulation de l'émulsion avant lyophilisation) s'avère

nécessaire lors de ce procédé pour maintenir la structure de l'émulsion pendant les étapes de refroidissement et séchage par lyophilisation (Figure 1 – courbe (b) et (c)).

La formation du produit en poudre est précisée ci-dessous dans le tableau 2.

Composant	% en p/p
MIGLYOL®	9,2
HUILE DHASCO	15,7
FLORAGLO®	0,278
LACTOSERUM IDI	3,9
K(PO ₄ H ₂)	0,4
K ₂ (PO ₄ H)	0,6
EAU	7
MALTODEXTRINE	62,9

Tableau 2

Stabilité de l'émulsion sèche

Les émulsions en poudre ont été reconstituées à 10 % p/p avec de l'eau distillée (concentration finale d'huile 2,4 % p/p) à température ambiante, sauf indication contraire.

Après reconstitution, la stabilité des émulsions en poudre a été étudiée au cours de leur stockage à + 4°C ou à - 20°C pendant une période de 30 jours.

Les tailles moyennes des émulsions reconstituées sont stables (autour de 0,39 µm) entre 7 et 30 jours, indépendamment de la température de stockage (Figure 2).

Cette taille est comparable à celle de l'émulsion en poudre à la fin de la lyophilisation.

En revanche, dans les préparations étudiées, la lyophilisation a produit une légère augmentation de la taille moyenne originale de l'émulsion liquide qui était de 0,33 µm.

Avec d'autres échantillons, il a été obtenu une stabilité sur une période plus longue (11 mois).

Dans tous les cas, l'évolution de la taille pendant le stockage est très faible, voire négligeable, et ceci est d'autant plus remarquable quand on le compare avec l'évolution de cette même émulsion conservée à l'état liquide.

En même temps, la reconstitution de l'émulsion dans l'eau à 50 °C, au lieu de 20 °C, a été étudiée puisque dans certains cas l'incorporation d'un ingrédient pendant la préparation d'un produit peut se faire à une température plus élevée que la température ambiante. Dans la Figure 3, les profils de taille des émulsions ((A) stockées à + 4°C et

(B) stockées à -20°C) indiquent aussi une stabilité structurale remarquable face à une reconstitution à 50 °C.

Dans la plupart, des produits l'émulsion une fois reconstituée dans une matrice alimentaire peut être amenée à subir des traitements thermiques pendant une certaine durée de temps (pasteurisation, stérilisation). Par exemple pendant son incorporation à une crème dessert, elle restera 30 minutes à 55 °C. La structure des gouttelettes est maintenue après les traitements thermiques étudiés. Une seule différence a été observée, à savoir l'augmentation de la dispersion de la taille des gouttelettes. Selon ces résultats, et sans prendre en compte un effet de la matrice, l'émulsion submicroscopique serait capable de résister aux traitements thermiques imposés lors de son incorporation dans des matrices alimentaires portées à cette température (crème dessert avant sa gélification par exemple).

La stabilité chimique des nutriments et la stabilité physique des gouttelettes d'huile qui sont obtenues après la reconstitution dans l'eau de cette émulsion en poudre ont ainsi été confirmées.

De manière générale, la poudre est stable physiquement et chimiquement à 4 °C pour des périodes supérieures à 3 mois, et se reconstitue facilement en contact avec de l'eau ou dans un milieu aqueux à des pH entre 2,5 et 7,0.

L'émulsion reconstituée n'est pas affectée par des traitements thermiques jusqu'à 100 minutes à 60-65°C.

Exemple 2 : Incorporation d'une émulsion sèche dans une matrice alimentaire

L'émulsion sous forme de poudre issue de l'Exemple 1 a été incorporée dans une matrice alimentaire complexe du type base lactée gélifiée non-fermentée selon le protocole suivant :

a) SOLUTION PROTEIQUE DE CASEINES :

Pesée : 6,44 g de caséines IDI PROMILK 852B et 10,2 g de perméat de lait IDI ;

Compléter à 200 g avec de l'eau millipore (soit 183,36 g) ;

Agitation pendant 1 heure à 60 °C. Refroidir à 20°C(bain-marie pendant 30 min).

b) PHASE AQUEUSE POUR 200 G DE PREPARATION :

Pesée : 5,00 g de sucre, 7,02 g d'amidon, 0,05 g de carraghénane kapa ;

Compléter à 180 g (soit 167,93 g) avec la solution protéique de caséines.

c) PREPARATION DE LA CREME :

Phase aqueuse mélangée avec le système d'homogénéisation par palettes à 70 tours par minutes (tpm) pendant 15 minutes à température ambiante ;

Agitation et chauffage de la phase aqueuse dans un bain-marie :

Chauffage à (i) 90°C pendant 30 min (montée en température), puis laisser 30 min à 90°C, agitateur avec palettes à 70 tpm, puis (ii) à 60°C, et stabilisation pendant 20 minutes, toujours avec la même agitation ;

Pesée de 24,3 g d'émulsion en poudre (ou la quantité désirée selon la teneur en nutriments désirée) ;

Ajout de l'émulsion en poudre à la phase aqueuse chauffée ;

Agitation 15 minutes dans le bain-marie à 60 °C (100 tpm).

Pour déterminer la taille des gouttelettes dans la crème dessert :

- mélange de 2 g de crème dessert avec 8 g d'eau millipore (tube flacon de 15 ml),

- mélange jusqu'à dispersion totale de la crème,

- centrifugation pendant 20 minutes à 20°C et 1920 x g, pour obtenir un ensemble surnageant jaunâtre, phase intermédiaire (turbide), culot avec des morceaux de gel (amidon + carraghénanes + d'autres choses),

- récupération du surnageant et mesure de la taille des particules par diffraction de la lumière statique ou dynamique,

- récupération de la phase inférieure, puis ajout de l'eau et mesure de la taille des particules.

Les stabilités chimiques des nutriments et physiques des gouttelettes d'huile ont été confirmées.

Exemple 3 : Biodisponibilité

Deux groupes de 4 mini-porcs ont été supplémentés pendant trois mois avec :
- 641 mg par jour de DHA et 5,1 mg par jour de lutéine vectorisés sous forme d'émulsion sèche obtenue selon la méthode de l'Exemple 1, ou

- 641 mg par jour de DHA et 5,1 mg par jour de lutéine non vectorisés.

Deux animaux non supplémentés ont été sacrifiés pour servir de témoins.

Le choix du modèle animal mini-porc a été dicté par la nécessité de se rapprocher de la physiologie humaine de l'absorption intestinale.

Huit mini-porcs (Souche Ellegaard modèle Goettingen) de 8 - 10 mois d'âge, ont été maintenus en stabulation durant une période de 3 mois au cours de laquelle les produits ont été testés.

La formulation de l'alimentation des mini-porcs a été réalisée par incorporation dans la ration habituelle des produits à tester.

Les taux circulants dans le sang, en DHA et en lutéine, ont été déterminés mensuellement chez les animaux traités.

Les taux dans certains tissus ont également été évalués à l'issue des trois mois d'essai.

Dosage plasmatique de DHA :

Les taux de DHA plasmatiques sont significativement supérieurs dans le groupe ayant reçu la lutéine et le DHA vectorisés. Il y a donc un effet court terme plus important de la vectorisation (Figure 4 - (a) à (e) vectorisé et (f) à (j) non-vectorisé).

Dosage plasmatique de la lutéine:

La vectorisation de la lutéine permet d'augmenter significativement les teneurs circulantes en lutéine par rapport à une situation nutritionnelle dans laquelle la lutéine n'est pas vectorisée ; l'effet est encore plus marqué en condition postprandiale (Figure 5 - (a) à (e) vectorisé et (f) à (j) non-vectorisé).

Dosage du DHA dans les tissus

Les résultats de dosages de DHA dans les tissus montrent :

- une absence d'amélioration de la teneur en DHA dans la rétine (Figure 6(1)),
- un effet significatif de la vectorisation pour la teneur en DHA dans le foie (rapportés aux acides gras totaux, dans les phospholipides et dans les acides gras libres) (figure 6(2) à (4)), le tissu adipeux (lipides totaux) (figure 7(1)) et les muscles biceps fémoris (BF, considéré comme gras) et semi-membraneux (SM, maigre) (figure 7(2) à (6)).

Dosage de la lutéine dans les tissus

Les résultats de dosage de la lutéine dans les tissus montrent :

- une absence d'incorporation de la lutéine dans la rétine, le tissu adipeux et les muscles (non quantifiable), et
- une augmentation de la teneur en lutéine dans le foie (figure 8).

Conclusion

Les résultats obtenus pour la biodisponibilité des acides gras et des caroténoïdes dans un système de mini-porcs (Souche Ellegaard modèle Goettingen) indiquent une augmentation significative par rapport au nutriment sans vectorisation.

- REVENDICATIONS -

1.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre contenant au moins un principe actif lipophile, destinée à améliorer la biodisponibilité dudit principe actif lipophile, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) une étape de fourniture de deux phases : (i) une phase aqueuse contenant au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum, et (ii) une phase lipidique contenant ledit ou lesdits principes actifs lipophiles,

(b) une étape de formation d'une émulsion huile-dans-eau comprenant (i) une phase continue constituée par ladite phase aqueuse et (ii) une phase discontinue constituée par ladite phase lipidique, dispersée sous forme de particules lipidiques présentant une taille maximale inférieure à 3 μm , l'interface des particules lipidiques avec la phase continue aqueuse comportant au moins ledit ou lesdits composés émulsifiants de nature protéique,

(c) une étape d'incorporation d'au moins un composé saccharidique, dans l'émulsion huile-dans-eau issue de l'étape (b), et

(d) une étape d'élimination de ladite phase aqueuse dans ladite émulsion huile-dans-eau issue de l'étape (c), pour l'obtention de ladite émulsion sèche en poudre comprenant lesdites particules lipidiques contenant ledit ou lesdits principes actifs lipophiles et dont l'interface est recouverte d'une zone protectrice secondaire, ladite interface et ladite zone protectrice secondaire comportant, respectivement, ledit ou lesdits composés émulsifiants de nature protéique et/ou ledit ou lesdits composés saccharidiques.

2.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les composés émulsifiants de nature protéique représentent entre 1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la phase aqueuse lors des étapes (a) et/ou (b).

3.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'au moins un principe actif lipophile est choisi parmi les acides gras polyinsaturés présentant une chaîne de 14 à 24 carbones.

4.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'au moins un principe actif lipophile est choisi parmi les agents antioxydants lipophiles et/ou les acides gras saturés présentant une chaîne de 6 à 12 carbones.

5.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les particules lipidiques ont

une taille moyenne comprise entre 100 nm et 2 μ m, et en ce que 90% des particules ont une taille inférieure à 800 nm.

6.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le ou les composés saccharidiques, introduits au cours de l'étape (c), sont choisis parmi le saccharose, le lactose, le fructose, le tréhalose, les dextrines, les maltodextrines, les dextrines jaunes, les sucres invertis, le sorbitol, le polydextrose, le sirop d'amidon, le sirop de glucose et leurs mélanges.

7.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le ou les composés saccharidiques, introduits au cours de l'étape (c), sont choisis parmi les composés saccharidiques adaptés à générer un réseau saccharidique apte à contenir les particules lipidiques.

8.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que, à l'issue de l'étape (c), le ou les composés saccharidiques représentent entre 12% et 25% en poids par rapport au poids total de l'émulsion huile-dans-eau.

9.- Procédé pour la fabrication d'une émulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les étapes sont mises en œuvre de sorte à maintenir l'émulsion huile-dans-eau, ou le cas échéant les particules lipidiques, à une température qui est inférieure à 30°C.

10.- Emulsion sèche en poudre susceptible d'être obtenue par le procédé de fabrication selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

11.- Emulsion sèche en poudre caractérisée en ce qu'elle comprend des particules lipidiques, contenant au moins un principe actif lipophile et dont l'interface est recouverte d'une zone protectrice secondaire, ladite interface et ladite zone protectrice secondaire comportant, respectivement, au moins un composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum et/ou au moins un composé saccharidique.

12.- Emulsion sèche en poudre selon l'une quelconque des revendications 10 ou 11, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un principe actif lipophile choisi parmi les acides gras polyinsaturés présentant une chaîne de 14 à 24 carbones, les agents antioxydants lipophiles, les acides gras saturés présentant une chaîne de 6 à 12 carbones, et leurs mélanges.

13.- Emulsion sèche en poudre selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un acide gras polyinsaturé choisi parmi les acides gras essentiels, de préférence parmi les acides gras oméga-3 ou parmi les acides gras oméga-6, de préférence encore parmi les acides docosahexaénoïque ou eicosanoïque, et leurs mélanges.

14.- Emulsion sèche en poudre selon l'une quelconque des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que le ou les acides gras polyinsaturés, le cas échéant sous une forme glycéride, représentent entre 1% et 25% en poids, par rapport au poids total des particules lipidiques.

5 15.- Emulsion sèche en poudre selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, caractérisée en ce que les particules lipidiques contiennent une combinaison d'au moins deux principes actifs : (i) au moins un premier principe actif choisi parmi acides gras essentiels, de préférence l'acide docosahexaénoïque, et (ii) au moins un second principe actif choisi parmi les agents antioxydants lipophiles, de préférence la lutéine
10 et/ou la zéaxanthine.

16.- Emulsion sèche en poudre selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisée en ce que les particules lipidiques ont une taille moyenne comprise entre 100 nm et 2 μ m, et en ce que 90% des particules ont une taille inférieure à 800 nm.

15 17.- Emulsion sèche en poudre selon l'une quelconque des revendications 10 à 16, caractérisée en ce que le ou les composés saccharidiques sont choisis parmi le saccharose, le lactose, le fructose, le tréhalose, les dextrines, les maltodextrines, les dextrines jaunes, les sucres invertis, le sorbitol, le polydextrose, le sirop d'amidon, le sirop de glucose et leurs mélanges.

20 18.- Emulsion sèche en poudre, selon l'une quelconque des revendications 10 à 17, caractérisée en ce que les particules lipidiques ont une interface monocouche constituée par le composé émulsifiant de nature protéique choisi parmi les protéines issues du lactosérum, et en ce que lesdites particules lipidiques sont contenues dans un réseau saccharidique.

25 19.- Composition comprenant une émulsion sèche en poudre selon l'une quelconque des revendications 10 à 18 et un support physiologiquement acceptable.

20.- Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les compositions alimentaires, les compositions cosmétiques ou les compositions médicamenteuses.

30 21.- Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il est choisi parmi les compositions alimentaires comportant une matrice complexe du type base lactée gélifiée.

35 22.- Procédé pour améliorer la biodisponibilité d'au moins un principe actif lipophile, caractérisé en ce qu'il comprend une opération d'incorporation dudit ou desdits principes actifs dans une émulsion sèche en poudre selon l'une quelconque des revendications 10 à 18.

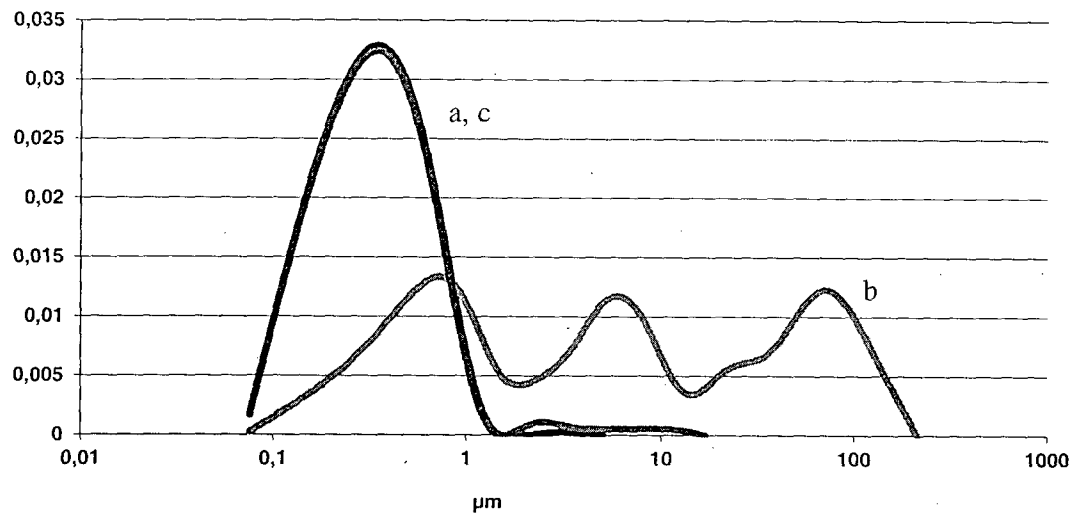


Figure 1

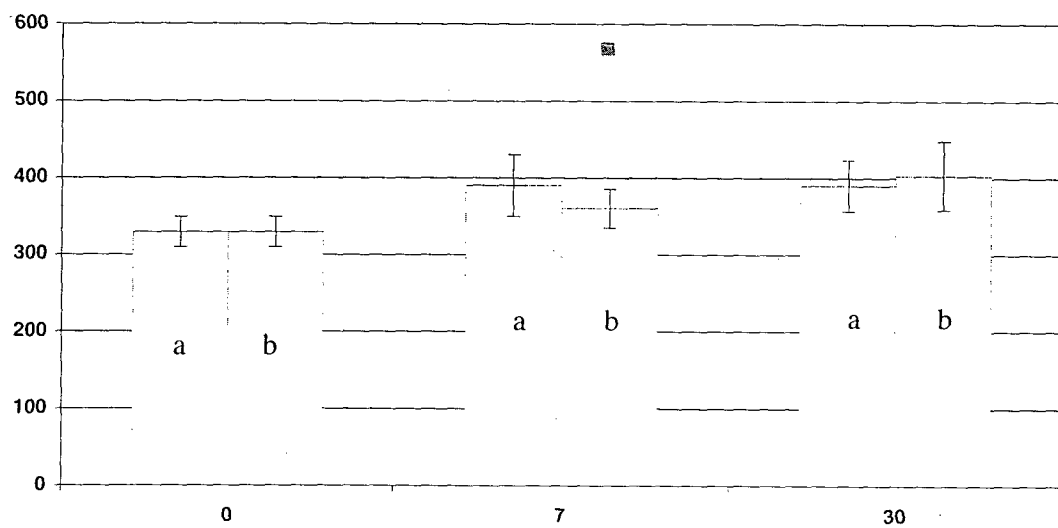


Figure 2

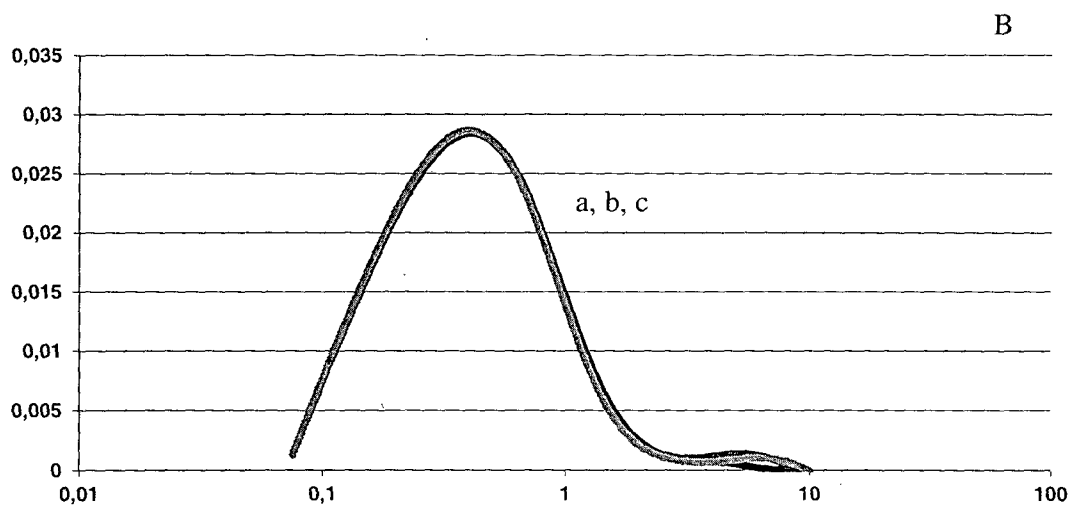
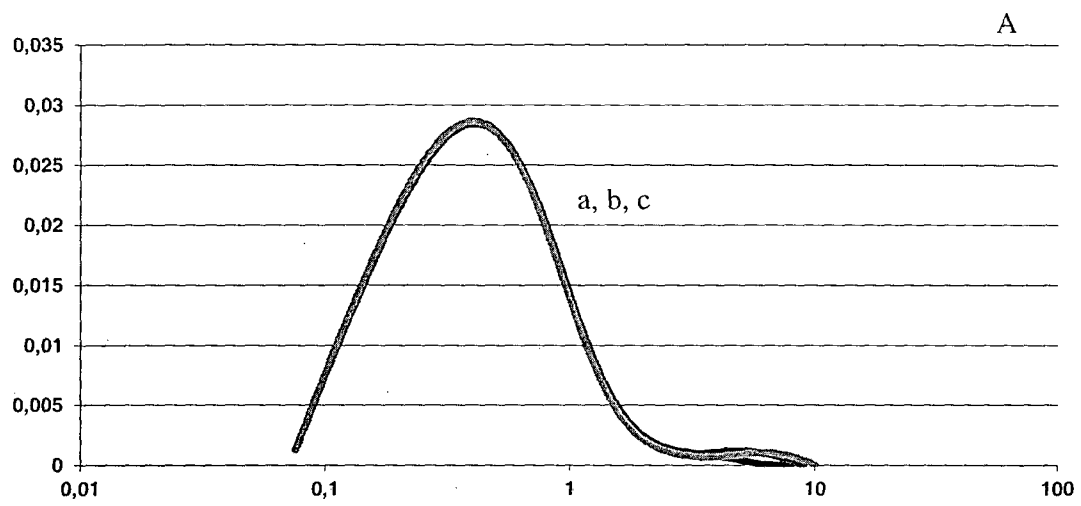
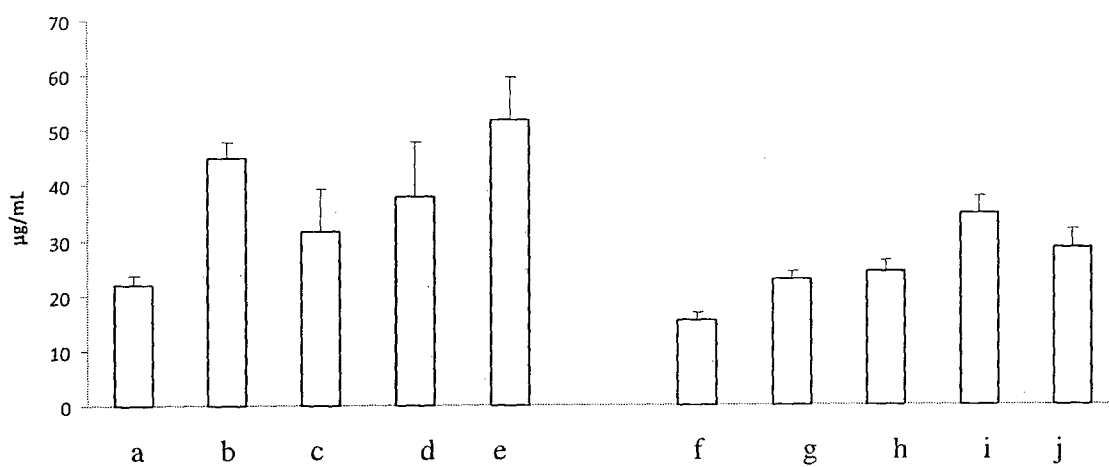
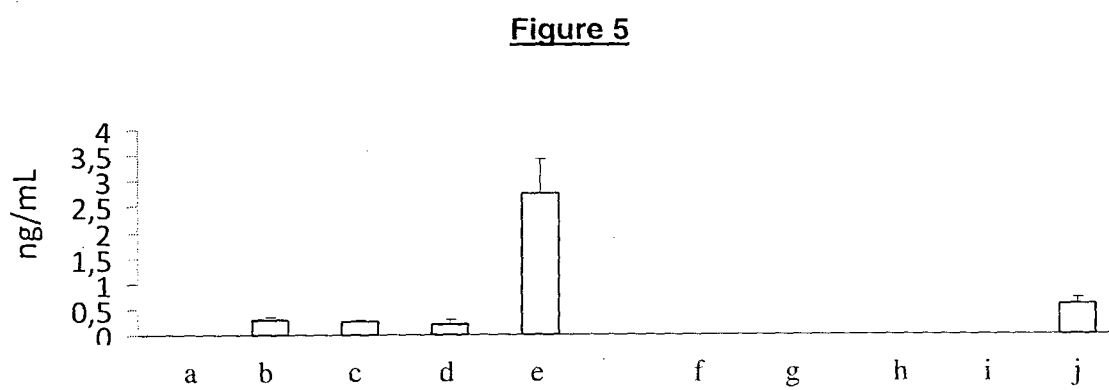
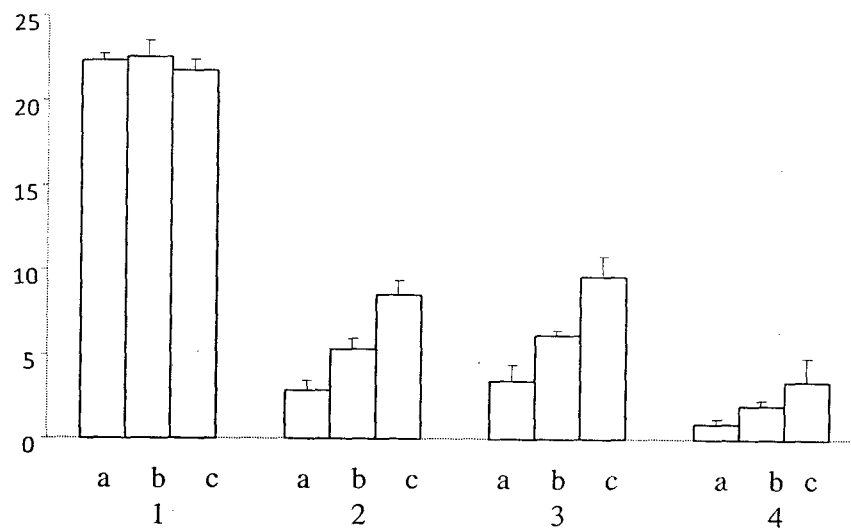
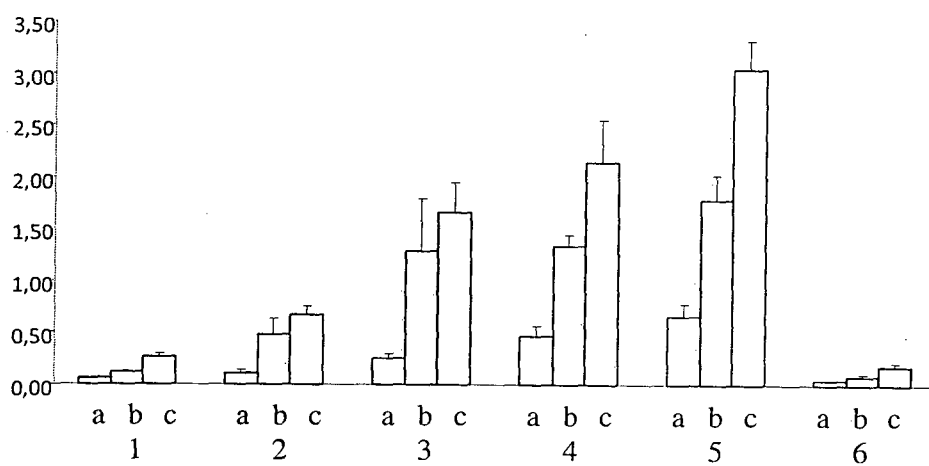
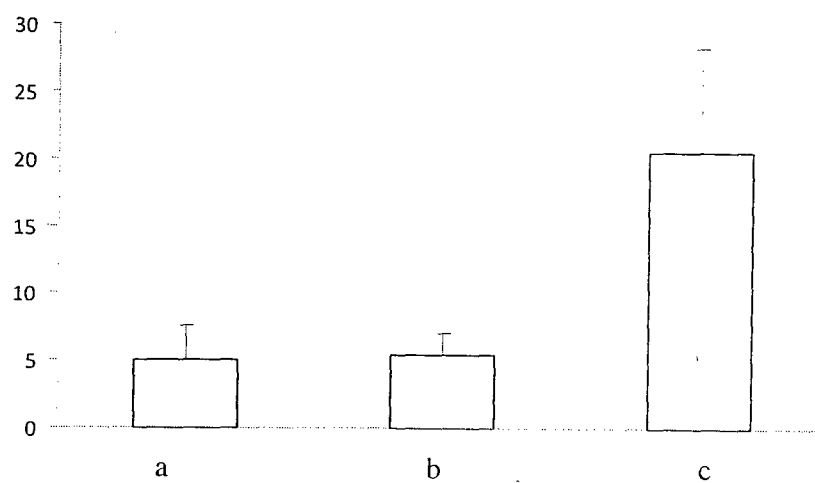


Figure 3

**Figure 4****Figure 5**

**Figure 6****Figure 7****Figure 8**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2013/052754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A23D9/05 A23D7/005 A23D9/007 A23L1/30 A61K8/36 A61K9/107 A23C9/152 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) A23D A23L A61K A23C		
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, BIOSIS, COMPENDEX, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/066380 A2 (FRIESLAND BRANDS BV [NL]; BASTIAANS JOHANNES ADRIANUS HE [NL]; POORTIN) 5 June 2008 (2008-06-05) page 7, line 26 - line 29; claims; examples page 10, line 3 - line 19 -----	1-22
X	WO 2009/070010 A1 (NIZO FOOD RES B V [NL]; ALTING AART CORNELIS [NL]; FLORIS THEODORUS AR) 4 June 2009 (2009-06-04) page 10, line 6 - line 27; examples 1,A,2 page 12, line 23 - page 13, line 6 -----	10-20
X	WO 2005/048998 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORG [AU]; AUGUSTIN MARY ANN [AU]; SANGUANSRI LUZ) 2 June 2005 (2005-06-02) page 3, line 28 - page 6, line 28; claims ----- -/--	1-22
☒ 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 15 April 2014		Date of mailing of the international search report 24/04/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Saettel, Damien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2013/052754

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAGAMI T ET AL: "Oxidative stability, structure and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of the fish oil with protein and dextrin wall materials", JOURNAL OF FOOD SCIENCE, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 68, no. 7, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 2248-2255, XP008095284, ISSN: 0022-1147, DOI: 10.1111/J.1365-2621.2003.TB05755.X the whole document	1-22
A	----- DEMET GÜZEY ET AL: "Influence of Environmental Stresses on O/W Emulsions Stabilized by [beta]-Lactoglobulin-Pectin and [beta]-Lactoglobulin-Pectin-Chitosan Membranes Produced by the Electrostatic Layer-by-Layer Deposition Technique", FOOD BIOPHYSICS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 1, no. 1, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 30-40, XP019292764, ISSN: 1557-1866 page 31, right-hand column, paragraph 2 - page 32, left-hand column, paragraph 1 page 39, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2	1-22
A	----- GUZEY D ET AL: "Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry", ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ELSEVIER, NL, vol. 128-130, 21 December 2006 (2006-12-21), pages 227-248, XP027908829, ISSN: 0001-8686 [retrieved on 2006-12-21] the whole document ----- -/--	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2013/052754

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GHARSALLAOUI A ET AL: "Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 122, no. 2, 15 September 2010 (2010-09-15), pages 447-454, XP027011770, ISSN: 0308-8146 [retrieved on 2010-04-15] page 448, right-hand column, paragraph 4 - page 449, left-hand column, paragraph 1; figure 2 abstract page 448, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 page 450, right-hand column, paragraph 2 -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2013/052754

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 2008066380	A2	05-06-2008	AU	2007326137	A1	05-06-2008
			CA	2670772	A1	05-06-2008
			EP	2117339	A2	18-11-2009
			NZ	577316	A	29-04-2011
			US	2010074986	A1	25-03-2010
			WO	2008066380	A2	05-06-2008

WO 2009070010	A1	04-06-2009	AU	2008330337	A1	04-06-2009
			CA	2707461	A1	04-06-2009
			EP	2214507	A1	11-08-2010
			US	2011045147	A1	24-02-2011
			WO	2009070010	A1	04-06-2009

WO 2005048998	A1	02-06-2005	AT	525066	T	15-10-2011
			AU	2004290456	A1	02-06-2005
			CA	2545399	A1	02-06-2005
			CN	1893930	A	10-01-2007
			EP	1684733	A1	02-08-2006
			ES	2373937	T3	10-02-2012
			JP	5008980	B2	22-08-2012
			JP	2007511541	A	10-05-2007
			KR	20060096508	A	11-09-2006
			NZ	546974	A	30-06-2008
			US	2007218125	A1	20-09-2007
			WO	2005048998	A1	02-06-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/052754

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A23D9/05 A23D7/005 A23D9/007 A23L1/30 A61K8/36 A61K9/107 A23C9/152 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) A23D A23L A61K A23C		
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, BIOSIS, COMPENDEX, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2008/066380 A2 (FRIESLAND BRANDS BV [NL]; BASTIAANS JOHANNES ADRIANUS HE [NL]; POORTIN) 5 juin 2008 (2008-06-05) page 7, ligne 26 - ligne 29; revendications; exemples page 10, ligne 3 - ligne 19 -----	1-22
X	WO 2009/070010 A1 (NIZO FOOD RES B V [NL]; ALTING AART CORNELIS [NL]; FLORIS THEODORUS AR) 4 juin 2009 (2009-06-04) page 10, ligne 6 - ligne 27; exemples 1,A,2 page 12, ligne 23 - page 13, ligne 6 ----- -/--	10-20
☒ 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 15 avril 2014		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24/04/2014
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Saettel, Damien

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	WO 2005/048998 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORG [AU]; AUGUSTIN MARY ANN [AU]; SANGUANSRI LUZ) 2 juin 2005 (2005-06-02) page 3, ligne 28 - page 6, ligne 28; revendications	1-22
A	----- KAGAMI T ET AL: "Oxidative stability, structure and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of the fish oil with protein and dextrin wall materials", JOURNAL OF FOOD SCIENCE, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 68, no. 7, 1 janvier 2003 (2003-01-01), pages 2248-2255, XP008095284, ISSN: 0022-1147, DOI: 10.1111/J.1365-2621.2003.TB05755.X le document en entier	1-22
A	----- DEMET GÜZEY ET AL: "Influence of Environmental Stresses on O/W Emulsions Stabilized by [beta]-Lactoglobulin-Pectin and [beta]-Lactoglobulin-Pectin-Chitosan Membranes Produced by the Electrostatic Layer-by-Layer Deposition Technique", FOOD BIOPHYSICS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 1, no. 1, 1 mars 2006 (2006-03-01), pages 30-40, XP019292764, ISSN: 1557-1866 page 31, colonne de droite, alinéa 2 - page 32, colonne de gauche, alinéa 1 page 39, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 2	1-22
A	----- GUZEY D ET AL: "Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry", ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ELSEVIER, NL, vol. 128-130, 21 décembre 2006 (2006-12-21), pages 227-248, XP027908829, ISSN: 0001-8686 [extrait le 2006-12-21] le document en entier ----- -/--	1-22

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GHARSALLAOUI A ET AL: "Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 122, no. 2, 15 septembre 2010 (2010-09-15), pages 447-454, XP027011770, ISSN: 0308-8146 [extrait le 2010-04-15] page 448, colonne de droite, alinéa 4 - page 449, colonne de gauche, alinéa 1; figure 2 abrégé page 448, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 2 page 450, colonne de droite, alinéa 2 -----	1-22

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2013/052754

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008066380 A2	05-06-2008	AU 2007326137 A1 CA 2670772 A1 EP 2117339 A2 NZ 577316 A US 2010074986 A1 WO 2008066380 A2	05-06-2008 05-06-2008 18-11-2009 29-04-2011 25-03-2010 05-06-2008
WO 2009070010 A1	04-06-2009	AU 2008330337 A1 CA 2707461 A1 EP 2214507 A1 US 2011045147 A1 WO 2009070010 A1	04-06-2009 04-06-2009 11-08-2010 24-02-2011 04-06-2009
WO 2005048998 A1	02-06-2005	AT 525066 T AU 2004290456 A1 CA 2545399 A1 CN 1893930 A EP 1684733 A1 ES 2373937 T3 JP 5008980 B2 JP 2007511541 A KR 20060096508 A NZ 546974 A US 2007218125 A1 WO 2005048998 A1	15-10-2011 02-06-2005 02-06-2005 10-01-2007 02-08-2006 10-02-2012 22-08-2012 10-05-2007 11-09-2006 30-06-2008 20-09-2007 02-06-2005