

Demande de bourse de thèse
Dossier de proposition de sujet
de thèse 2017

Bourse JH FABRE – Ville d'Avignon

à transmettre pour le 5 avril
à claire.blusztajn@univ-avignon.fr

Laboratoires impliqués	Equipe Micronutriments, réactivité & digestion Equipe Qualité et Procédés UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV) Equipe Biomarqueurs et Bioindicateurs Environnementaux, UMR7263 Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE)
Titre de la thèse*	Optimisation du potentiel d'un antioxydant d'origine végétale par complexation avec des sucres naturels
Résumé (10 – 15 lignes)	
<p>Le travail a pour objectif l'étude de particules d'oligo- et polysaccharides naturels issus de l'amidon natif en complexation avec l'acide rosmarinique, antioxydant majoritaire du romarin, plante aromatique emblématique de la Provence.</p> <p>L'enjeu est multiple, le principal étant le remplacement dans le secteur agro-alimentaire des antioxydants de synthèse comme le butylhydroxyanisole (BHA), probablement l'antioxydant le plus utilisé dans l'industrie agro-alimentaire (IAA).</p> <p>Une formulation stable optimisant le potentiel de l'acide rosmarinique sera développée par complexation avec des oligo- et polysaccharides naturels issus de l'amidon de différentes tailles et conformations pour des applications en IAA et dans le secteur de la santé.</p> <p>L'impact de la taille et de la structure des complexes sur les propriétés physico-chimiques et la biodisponibilité de l'acide rosmarinique sera évalué. L'innocuité des nano-/microparticules pour l'environnement sera vérifiée.</p>	
Enjeu structurant pour l'axe Agro&Sciences de l'UAPV	
<p>Ce projet de recherche transdisciplinaire implique 2 équipes de recherche de l'UAPV qui apportent leurs compétences complémentaires: chimie des antioxydants, chimie des polysaccharides (UMR 408), et étude et écotoxicité des matériaux issus de nano-assemblages (UMR 7263).</p> <p>Le projet s'appuie sur les équipements propres aux UMR partenaires et sur les plateformes d'analyse (AMU, UAPV). Ce projet transdisciplinaire est donc fortement structurant pour l'axe Agrosiences de l'UAPV.</p>	

*Le titre doit pouvoir être publié sur le site web de l'ED et de la SFR

Encadrement (Le directeur de thèse doit être rattaché à l'ED 536 de l'UAPV, condition non obligatoire pour le co-directeur)

Responsable(s) de la thèse Noms et labos d'appartenance	- Dr. V. TOMAO Equipe Micronutriments	HDR ? (O/N)	O
	- Pr. A. THIERY Equipe Biomarqueurs et bioindicateurs environnementaux		O
	- Dr. A. ROLLAND-SABATE Equipe Qualité et Procédés		N
Directeur(s) de la thèse (si différent du(des) responsable(s))		HDR ? (O/N)	
Nombre de doctorants dirigés par le(s) responsable(s) de la thèse	1/1/0	Nombre de post-docs ou CDD dirigés par le(s) responsable(s) de la thèse	0/1/0

Description du projet (4 pages maximum)

Enjeux socio-économiques et scientifiques pour l'axe Agro&Sciences de l'UAPV

Les acteurs du secteur industriel agro-alimentaire et en particulier les PME recherchent de nouveaux ingrédients naturels et/ou à base de produits naturels. Sur ce segment d'activité, la fabrication est limitée par les listes positives d'ingrédients autorisées qui ne peuvent que s'enrichir. Les enjeux sont multiples : élargissement des gammes d'ingrédients proposés au consommateur, amélioration de l'efficacité des produits, mais aussi utilisation de technologies de fabrication plus propres compte tenu des enjeux sociétaux et environnementaux.

Un des axes possible s'articule autour de la valorisation de la biomasse végétale locale, en particulier dans le secteur des plantes aromatiques. Face à la demande du public de produits naturels et issus des plantes et au dynamisme de la filière de plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM), le contexte est favorable au développement de produits naturels.

Dans cette optique, une démarche de recherche mais aussi de développement est engagée dans ce projet.

L'objectif identifié est la mise au point d'une formulation stable optimisant le potentiel de l'acide rosmarinique [1,2] par complexation avec différents types de sucres naturels. Ces oligo- et polysaccharides peuvent être considérés comme des réservoirs de principes actifs susceptibles a) d'apporter une amélioration de leur stabilité dans le temps, notamment en les protégeant contre l'oxydation [3,4], b) de masquer leur goût [5], et c) de permettre une libération contrôlée dans l'organisme. Ces complexes seront mis au point par des procédés simples, peu coûteux et respectueux de l'environnement.

Le projet collaboratif encourage les échanges et les mises en commun des compétences des laboratoires de recherche. L'interaction entre recherche fondamentale, appliquée et le développement favorise la production et le transfert des connaissances.

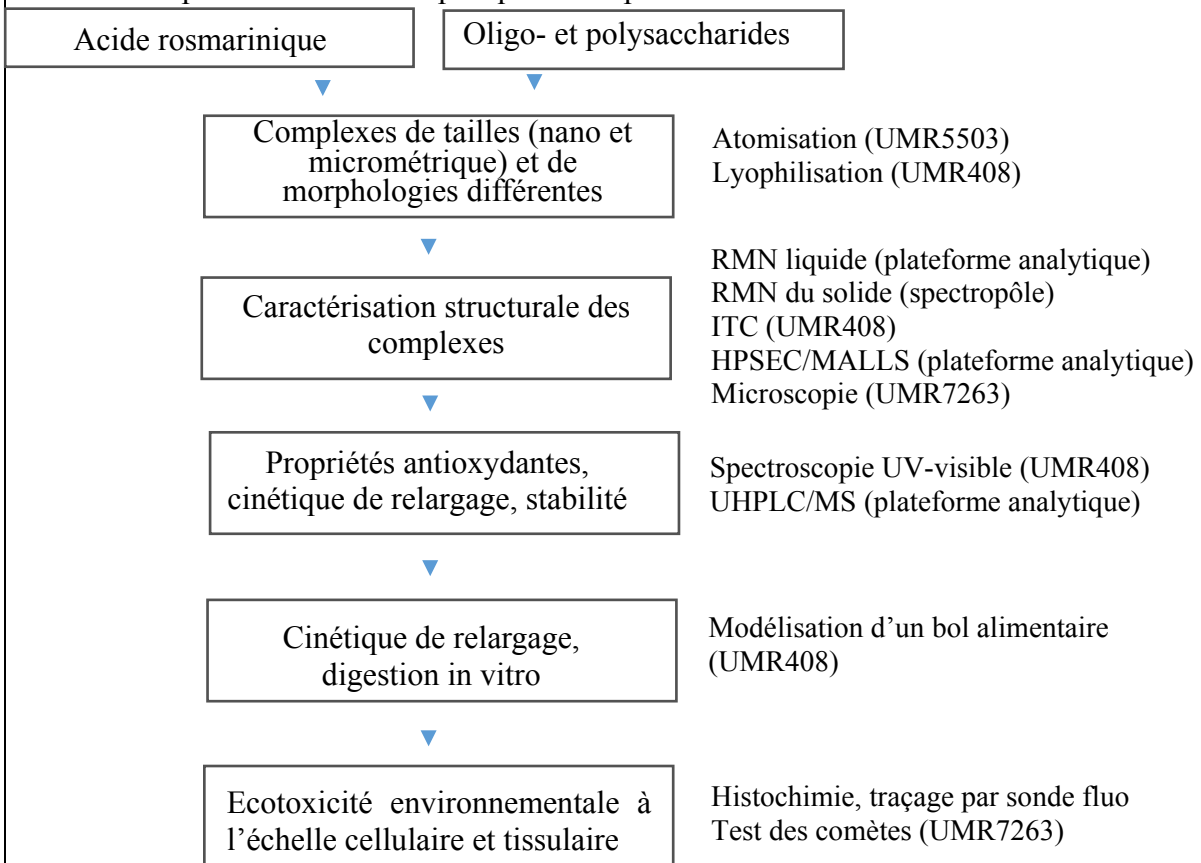
Question de recherche proposée au candidat

- ✓ Quelles sont les conditions optimales de préparation des complexes ?
- ✓ Quelles sont les dimensions et la structure des complexes ?
Les différents complexes formés apportent-ils :
- ✓ Une protection contre la dégradation de l'antioxydant (sensibilité à l'oxydation) et le développement de couleurs brunes non souhaitées ?
- ✓ Une libération contrôlée de l'acide rosmarinique (cinétique de relargage en modèle in vitro de digestion) ?
- ✓ Une meilleure biodisponibilité ?
- ✓ Quelle est la génotoxicité des nano-/microparticules ainsi générées?

Hypothèses de travail

Ce travail fait suite à un projet collaboratif soutenu par TERSYS (2015) « Encapsulation d'antioxydants naturels dans des nanoparticules de cyclodextrines pour des applications agro-alimentaires » pour un montant accordé de 2000 €. Les premiers résultats obtenus ont permis de mettre en exergue le potentiel de l'acide rosmarinique par la caractérisation du complexe en solution [6], ce qui nous encourage à approfondir et élargir l'étude.

L'étude comporte différentes étapes qui sont représentées sur le schéma ci-dessous :



L'objectif est d'évaluer l'impact de la complexation de cet antioxydant naturel sur sa protection contre l'oxydation, sa stabilité dans le temps, sur la possibilité d'être relargué progressivement pour une action prolongée, et son comportement en modèle in vitro de digestion [7-8]. L'aspect toxicologique sera également étudié d'un point de vue environnemental par des tests d'écotoxicité à l'échelle cellulaire et tissulaire.

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

Les équipements disponibles pour mener cette étude sont présentés ci-dessous :

- **Atomisateur** (collaboration avec UMR5503, Toulouse)

L'atomisation est une méthode de séchage à chaud à partir d'un milieu aqueux qui permettra l'obtention des formulations à l'état solide des différents complexes.

- **Lyophilisateur** (UMR408)

La lyophilisation est une méthode de séchage à froid à partir d'un milieu aqueux qui permettra l'obtention des formulations à l'état solide des différents complexes.

- **RMN liquide** (plateforme analytique UAPV)

La RMN du liquide ou spectroscopie de résonance nucléaire est une méthode de caractérisation des complexes formés en termes de stœchiométrie et conformation.

- **RMN du solide** (spectropôle, AMU)

Ce type de technique va nous permettre vérifier la complexation entre l'acide rosmarinique et les oligo- et polysaccharides à l'état solide.

- **Microscopie** (UMR7263)

La microscopie électronique à balayage par observation directe des solides va nous informer sur la structure des complexes en termes de tailles et de formes.

- **ITC** (UMR 408)

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une méthode de caractérisation d'interactions entre biomolécules. Elle permettra de quantifier l'affinité de liaison, la stœchiométrie et d'approcher le mécanisme de liaison. En outre les observations de RMN pourront ainsi être corroborées.

- **Spectroscopie UV-visible** (UMR408)

La spectroscopie UV-visible nous permettra de déterminer le pouvoir antioxydant des différents complexes et d'étudier la cinétique de relargage de l'acide rosmarinique.

- **UHPLC/MS** (plateforme analytique, UAPV)

La chromatographie liquide à ultra haute performance permettra d'affiner l'étude de relargage (quantification de l'acide rosmarinique, recherche de produits d'oxydation...) estimer le taux de complexation et nous permettra de faire le suivi des tests de cytotoxicité.

- **HPSEC-MALLS-DAD** (plateforme analytique)

La chromatographie d'exclusion stérique à haute performance permettra la caractérisation de taille des complexes et l'estimation également du taux de macromolécule complexées.

- **Electrophorèse sur gel** (IMBE)

L'électrophorèse sur gel sera le support de séparation pour le test des comètes permettant d'estimer l'impact des complexes sur le matériel génétique.

Le matériel nécessaire à acquérir est

- Un **autoclave de paillasse** pour solubiliser les polysaccharides à chaud.

- Une **colonne de chromatographie d'exclusion stérique** pour l'HPSEC.

Programme de recherches

Dans cette étude, le composé phénolique choisi est l'acide rosmarinique, antioxydant majoritaire du romarin, autorisé comme conservateur dans le secteur de l'IAA mais peu utilisé en raison de facteurs limitant qui feront l'objet de ce travail. Actuellement, les antioxydants synthétiques comme le BHA ou le BHT couvrent très largement le secteur des antioxydants alimentaires bien que de plus en plus controversés.

Des inquiétudes ont par exemple été exprimées par la FDA (Food and Drug Administration) quant aux propriétés enzymatiques possibles de la BHT dans les tissus extra-hépatiques [9].

D'autre part, ces molécules ont été répertoriées comme substances chimiques potentiellement préoccupantes par la commission Européenne pour la protection du milieu marin du fait de leur toxicité sur les organismes aquatiques et de leur potentiel de bioaccumulation [10].

Le choix du support pour l'encapsulation s'est porté sur des oligo- et polysaccharides de tailles nanométriques et micrométriques, la β -cyclodextrine naturelle et l'amylose issus de l'amidon voire l'amidon qui pourra conférer selon son origine (maïs, blé, pois, pomme de terre), les propriétés fonctionnelles nécessaires à notre application de par son pourcentage variable en amylose (20 à 35%).

La cyclodextrine est un oligosaccharide cyclique composé de sept unités de glucose reliées par des liaisons α -(1,4). Il est produit par hydrolyse enzymatique de sirops d'amidon. Son profil toxicologique et son statut réglementaire sont établis, et sa capacité à former des composés d'inclusion est reconnue.

L'amidon est un biopolymère de réserve composant majeur des céréales et des plantes de grande culture qui trouve de nombreuses applications agro-industrielles. Il renferme deux homopolysaccharides de masses molaires très élevées (11), en pourcentage variable : l'amylose, polysaccharide quasi-linéaire constitué d'unités glucosyl reliées par des liaisons α (1,4), et l'amylopectine qui est majoritaire et ramifiée avec 5-6% de liaisons α (1,6) correspondant aux points de ramification.

L'acide rosmarinique doté d'une forte capacité antioxydante, n'est que peu incorporé dans les denrées alimentaires en remplacement d'antioxydants synthétiques. Ceci est essentiellement dû à son instabilité chimique liée à sa sensibilité à l'oxydation et au brunissement non souhaité qui en résulte. L'encapsulation est une voie potentielle pour maîtriser ces facteurs limitant.

Ce travail se décline en plusieurs étapes :

1^{ère} année :

- Bibliographie de l'état de l'art, acquisition des connaissances sur l'amidon et ses dérivés
- Préparation des différents complexes en solution et à l'état solide

2^{ème} année :

- Caractérisation des complexes d'un point de vue structural et physico-chimique (stabilité, activité antioxydante) avec sélection des complexes les plus appropriés
- Valorisation des résultats

3^{ème} année :

- Tests de digestibilité, tests d'écotoxicité environnementale à l'échelle cellulaire et tissulaire
- Valorisation des résultats
- Rédaction du manuscrit

Publications envisageables

La valorisation scientifique sera menée par la publication des résultats dans des revues internationale de rang A et des communications dans des manifestations scientifiques. Le potentiel de valorisation industrielle sera également évalué.

La vulgarisation des résultats sera aussi envisagée par la participation à des conférences grand public comme « Midisciences ».

Compétences cognitives et techniques acquises par le doctorant

Les compétences cognitives et techniques acquises par le doctorant concerneront la chimie des antioxydants, la chimie des nanomatériaux, la chimie des sucres et une diversité de méthodes telles que l'encapsulation, la RMN, la chromatographie et la formulation.

Partenariat scientifique et industriel dans lequel s'inscrit le travail

Ce projet de recherche implique 4 équipes de recherche de 3 UMR. Ces équipes apportent chacune leurs compétences complémentaires en termes de chimie des antioxydants, chimie des polysaccharides (UMR 408), physico-chimie & atomisation (UMR 5503), toxicologie (UMR7263).

*UMR 7263 IMBE

- Equipe Biomarqueurs et bioindicateurs environnementaux, Marseille, **Pr. A. Thiéry**
Ecotoxicité environnementale à l'échelle cellulaire et tissulaire
Génotoxicité humaine (test des comètes)

*UMR5503

- Equipe génie chimique, INP-ENSIACET, Toulouse, **Dr. M. Tourbin**
Mise au point des nanocomplexes par atomisation

*UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Avignon

- Equipe Qualité et Procédés, **Dr. A. Rolland-Sabaté**

Etude des interactions entre micronutriments et polysaccharides

- Equipe Micronutriments, **Dr. HDR V. Tomao, Pr. O. Dangles**

Screening des matières premières, études de stabilité, cinétiques de relargage, tests antioxydants, formulation.

Références bibliographiques

1. Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121–125.
2. Furtado, M. A., de Almeida, L. C. F., Furtado, R. A., Cunha, W. R., & Tavares, D. C. (2008). Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research*, 657, 150–154.
3. Cravotto, G., Binello, A., Baranelli, E., Carraro, P., & Trotta, F. (2006). Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Current Nutrition and Food Science*, 2, 343–350.
4. Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds. *Pharmaceutics*, 3, 793–829.
5. Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23, 1631–1640.
6. 1. Aksamija A., Polidori A., Plasson R., Dangles O., Tomao V. (2016) The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 208, 258–263.
7. Achat S., Rakotomanomana N., Madani K., Dangles O. (2016) Antioxidant activity of olive phenols and other dietary phenols in model gastric conditions: scavenging of the free radical DPPH and inhibition of the haem-induced peroxidation of linoleic acid. *Food Chemistry*, 213, 135–142.
8. Nkhili E., Loonis M., Mihai S., El Hajji H., Dangles O. (2014) Reactivity of food phenols with iron and copper ions: binding, dioxygen activation and oxidation mechanisms. *Food & Function*, 5, 1186-1202.
9. US Food and Drug Administration, Committee on Generally Recognized as Safe (GRAS) Substances Substances Database
10. Study on Enhancing the Endocrine Disrupter Priority List with a Focus on Low Production Volume Chemicals, Revised Report to DG Environment (Hersholm, Denmark : DHI Water and Environment, 2007),
11. Rolland-Sabaté A., Guilois S., Jaillais B., Colonna P. (2011) Molecular size and mass distributions of native starches using complementary separation methods: Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (A4F) and Hydrodynamic and High Performance Size Exclusion Chromatography (HDC-HPSEC), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 1493-1505.

Autres informations (1/2 page maximum)

--

Avis du directeur d'unité / laboratoire

Avis des directeurs de laboratoires

UMR408 SQPOV :

Avis très favorable, des questions de science claires, des expertises complémentaires et une utilisation des moyens analytiques disponibles ou bientôt acquis par la plateforme analytique. Ce projet de thèse permettra des synergies interlaboratoires et contribuera à renforcer les interactions entre les équipes de l'axe Agro-science, Il repose essentiellement sur les activités d'équipes avignonaises dont il permettra une montée en compétences, tout en mobilisant à bon escient des compétences et équipements externes.

L'enjeu (nouvel antioxydant incorporable dans les aliments) est pertinent pour les filières agro-alimentaires, et relève bien de la notion de « naturalité » défendue dans le cadre de la SFR TERSYS. Un point fort est l'intégration ab initio de la caractérisation d'éventuels risques liés à ce nouvel additif.

Catherine Renard

Directrice de l'UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale

UMR 408 SQPOV
INRA
DOMAINE ST PAUL
CS 40509
84914 AVIGNON CEDEX 9

Je soussigné, Thierry Dutoit, directeur délégué de l'IMBE sur Avignon, donne un avis favorable au dépôt de ce projet de candidature à la bourse de la Fondation de l'UAPV.
Thierry Dutoit, directeur délégué IMBE

