

Table des matières

Remerciements

Travaux relatifs à cette étude

Table des matières

Liste des abréviations

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	11
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
I. Composés phénoliques chez les végétaux	16
I.1. Acides phénoliques	17
I.1.1. Acides hydroxybenzoïques	20
I.1.2. Acides hydroxycinnamiques	20
I.2. Flavonoïdes	20
II. Caractéristiques structurales responsables de l'action antioxydante	23
II.1. Caractéristiques structurales	24
II.2. Phénomène interfacial.....	27
III. Méthodes pour la détermination de l'activité antioxydante.....	31
III.1. Méthodes indirectes ou non compétitives.....	31
III.1.1. Méthode DPPH.....	31
III.2. Méthodes compétitives	32
III.2.1. Mesure de produits d'oxydation.....	32
III.2.1.1. Titrage iodométrique des hydroperoxydes et peroxydes d'hydrogène	32
III.2.1.2. Mesure de diènes conjugués	33
III.2.1.3. Test à l'acide thiobarbiturique (TBA).....	34
III.2.2. Mesure directe de la détérioration du substrat oxydable	35
III.2.2.1. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	35
III.2.2.2. BODIPY	37
III.2.2.3. β -Carotène et Crocin bleaching.....	38
IV. Stratégies de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases.....	41
IV.1. Paramètres clés des réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases	45
IV.1.1. Influence du solvant	46
IV.1.2. Conditionnement de la lipase et activité thermodynamique de l'eau (a_w)	49
IV.1.3. Influence du substrat et types de réactions mises en jeu	52
IV.2. Lipophilisation de dérivés phénoliques catalysée par des lipases	54
IV.2.1. Lipophilisation d'acides chlorogéniques et d'autres acides phénoliques issus d'extraits de café vert	54
IV.2.2. Lipophilisation d'autres acides et dérivés phénoliques.....	58
IV.2.3 Lipophilisation par voie enzymatique de flavonoïdes glycosylés.....	66
V. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques lipophilisés	70
MATÉRIELS ET MÉTHODES	77
I. Matériels	78
II. Méthodes	79
II.1. Synthèse chimique des esters méthyliques des acides chlorogénique et rosmarinique	79

II.2. Suivi qualitatif des synthèses des esters des acides chlorogénique et rosmarinique par chromatographie sur couche mince (CCM)	79
II.3. Suivi quantitatif des synthèses des esters des acides chlorogénique et rosmarinique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	80
II.3.1. Calcul du rendement molaire des réactions d'estéification et de transestéification	83
II.3.2. Calcul de la vitesse initiale des réactions d'estéification et de transestéification	84
II.4. Solubilité des acides et des esters dans les alcools gras	84
II.5. Conditionnement de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w), de la lipase de <i>Candida antarctica</i> B	85
II.6. Lipophilisation enzymatique des acides chlorogénique et rosmarinique et de leurs esters méthyliques	85
II.7. Purification des esters lipophiliés de l'acide chlorogénique et rosmarinique	86
II.8. Identification par spectrométrie de masse des esters des acides chlorogénique et rosmarinique	87
II.9. Mesure de l'activité antiradicalaire des esters lipophiliés des acides chlorogénique et rosmarinique par la méthode DPPH*	88
II.9.1. Détermination par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (CLHP-SM) des produits d'oxydation obtenus après la réduction du DPPH*	90
II.10. Détermination des coefficients de distribution ($\log P$) des acides chlorogénique et rosmarinique ainsi que de leurs esters	91
II.10.1. Détermination théorique des coefficients de distribution octanol/eau	91
II.10.2. Détermination expérimentale des coefficients de distribution octanol/eau	91
II.10.3. Détermination expérimentale du pourcentage d'antioxydant dans la phase continue d'une émulsion huile dans l'eau	92
II.11. Détermination de la capacité antioxydante en utilisant le test des triènes conjugués autooxydables (Conjugated autooxidizable Trienes : CAT)	93
II.11.1. Composition et régiodistribution en acides gras par dérivation en esters méthyliques	94
II.11.1.1. Préparation des réactifs	94
II.11.1.2. Mode opératoire	95
II.11.1.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse	95
II.11.1.4. Régiodistribution des acides gras présents dans l'huile de tung	96
II.11.2. Elimination des tocophérols <i>in situ</i> dans l'huile de tung	97
II.11.3. Protocole du test des triènes conjugués autooxydables	98
II.11.3.1. Expression des résultats	99
RÉSULTATS ET DISCUSSION	101
I. Synthèses des dérivés lipophiliés des acides chlorogénique et rosmarinique	102
I.1. Synthèses des dérivés lipophiliés de l'acide chlorogénique en milieu fondu	102
I.1.1. Synthèses chimique du chlorogenate de méthyle	103
I.1.2. Évaluation de la solubilité de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique	105
I.1.3. Estéification et transestéification de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique en milieu « fondu » catalysée par la lipase de <i>Candida antarctica</i> B	106
I.1.3.1. Effet du caractère hydrophobe de l'accepteur d'acyle sur la vitesse de formation des produits	106
I.1.3.2. Effet de la quantité d'enzyme	108
I.1.3.3. Effet de la polarité du milieu réactionnel (longueur de chaîne de l'alcool)	111
I.1.3.4. Effet de l'activité de l'eau initiale	113
I.1.4. Caractérisation des esters gras de l'acide chlorogénique par spectrométrie de masse d'ionisation par nébulisation opérant en mode de fragmentation négatif (SM-IPN)	117
I.2. Synthèse enzymatique des dérivés lipophiliés de l'acide rosmarinique en milieu fondu	120
I.2.1. Synthèse chimique du rosmarinate de méthyle	120
I.2.2. Estéification et transestéification de l'acide rosmarinique et de son ester méthylique en milieu « fondu »	122

I.2.3. Caractérisation des esters lipophilisés de l'acide rosmarinique par spectrométrie de masse d'ionisation par nébulisation opérant en mode de fragmentation négatif (SM-IPN)....	128
I.3. Estérification chimique des acides rosmarinique et chlorogénique avec l'octadécanol et l'eicosanol.....	131
I.4. Conclusion.....	133
II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique.	134
II.1. Comportement anti-radicalaire de l'acide chlorogénique et de ses esters déterminé par la méthode DPPH•.....	134
II.1.1 Détermination des paramètres cinétiques de l'acide chlorogénique et de ses esters selon l'hypothèse d'un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène.....	135
II.1.2. Détermination des paramètres cinétiques de l'acide chlorogénique et de ses esters selon l'hypothèse d'un mécanisme de transfert d'électrons	141
II.1.3 Analyses par CLHP-SM des produits de réaction obtenus après la réduction du radical DPPH.....	144
II.1.4 Paramètres stationnaires de l'activité antiradicalaire de l'acide chlorogénique et de ses esters	149
II.2 Comportement anti-radicalaire de l'acide rosmarinique et de ses esters déterminé par la méthode DPPH•.....	152
II.2.1 Paramètres stationnaires de l'activité anti-radicalaire de l'acide rosmarinique et de ses esters.....	153
II.3 Influence du nombre de structures catéchol.....	160
II.4 Conclusion	161
III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables.....	163
III.1. Évaluation des propriétés antioxydantes des dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique par la méthode des triènes conjugués autoxydables (CAT).....	166
III.1.1. Évaluation qualitative de la capacité antioxydante de dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique	166
III.1.2. Évaluation de la capacité antioxydante des dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique par la méthode CAT	168
III.1.3. Effet de la concentration en l'émulsifiant sur la distribution des antioxydants dans la phase continue de l'émulsion	177
III.2. Évaluation de la capacité antioxydante des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique par la méthode de triènes conjugués autoxydables (CAT)	180
III.2.1 Evaluation quantitative de la capacité antioxydante des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique.....	180
III.3. Conclusion	184
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	186
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	192

Liste des abréviations

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique
ABTS	Acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
ABTS⁺	Radical cation de l'acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
AG	Acide gras
AOH	Antioxydant
AO[•]	Radical phénoxyle
AUC	Aire sous la courbe
BDE	Bond dissociation energy (énergie de dissociation homolytique)
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluène
CAT	Conjugated autoxidizable triene (triène autoxydable conjugué)
C11-BODIPY^{581/591}	acide 4,4-difluoro-5-(4-phényl-1,3-butadiényl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-undécanoïque
CCM	Chromatographie en couche mince
CLHP	Chromatographie liquide d'haute performance
CMC	Concentration micellaire critique
DPPH[•]	Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DPPH⁻	Anion 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
E⁰	Potentiel d'oxydo-réduction
EC₅₀	Quantité d'antioxydant nécessaire à la réduction de 50 % du signal initial
EDTA	Acide éthylènediamine-tétracétique
ESI	Ionisation de type électro-nébulisation
FL	Fluorescéine
IP	Indice de peroxyde
L[•]	Radical lipidique centré sur le carbone
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LH	Lipide insaturé
LOO[•]	Peroxyradical lipidique
LOO⁻	Anion peroxyde
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
MDA	Malondialdéhyde
MeOH	Méthanol
MM	Masse molaire
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Solution de tampon phosphate
R[•]	Radical centré sur le carbone
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
ROO[•]	Peroxyradical
SM	Spectrométrie de masse
PDA	Détecteur de type photodiode
TAG	Triacylglycérol
TBA	Acide 2-thiobarbiturique
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'origine de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives qui en résultent affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des produits et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. Dans ce contexte, différents moyens de prévention sont disponibles pour limiter ces phénomènes. Parmi eux, l'emploi d'antioxydants, tels que les composés phénoliques d'origine végétale à des fins alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques, représente un enjeu majeur pour la recherche et l'industrie. En effet, leur utilisation en tant que conservateurs naturels pourrait constituer une alternative attractive aux antioxydants synthétiques qui souffrent d'une moindre acceptation par le consommateur. Ces composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant pour leurs propriétés antioxydantes (Kanazawa et Sakakibara, 2000 ; Jiménez-Ecrig *et al.*, 2001 ; Moure *et al.*, 2001 ; Someya *et al.*, 2002 ; Núñez-Sellés *et al.*, 2002 ;), antimicrobiennes (Oluwatuyi *et al.*, 2004 ; Chun *et al.*, 2005), antivirales (Ikken *et al.*, 1999), anticancérigènes (Chung *et al.*, 1999 ; Sawa *et al.*, 1999) et de filtre UV (Edreva, 2005). Ainsi, ces dernières années, de nombreux efforts ont été apportés à la recherche et à la caractérisation des différentes sources végétales riches en ces composés.

Parmi les composés phénoliques identifiés, on peut citer entre autres les acides chlorogénique et rosmarinique. Les acides chlorogéniques, des esters de l'acide caféïque avec l'acide quinique sont très largement répandus dans le règne végétal. Ainsi, par exemple, il se trouvent à des concentrations de l'ordre de 100 g/kg de matière sèche dans les extraits de café vert (Clifford, 1985 et 1999) mais aussi dans les extraits de chèvrefeuille (*Lonicera confusa* DC) du sud de la Chine à une concentration de 62 g/kg de matière sèche (Xiang et Ning, 2008). De plus, ces propriétés biologiques (Morishita et Ohnishi, 2001) antioxydantes (Kono *et al.*, 1997 ; Zang *et al.*, 2003) et antimicrobiennes (Scholz *et al.*, 1994 ; Puupponen-Pimia *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2004) sont largement documentées. Plus particulièrement, il a été rapporté que l'acide chlorogénique aurait un effet inhibiteur sur la carcinogénèse de l'intestin grêle et du foie (Azuma *et al.*, 2000 ; Rodriguez de Sotillo *et al.*, 2002).

L'acide rosmarinique, quant à lui, est présent principalement dans les herbes aromatiques du bassin méditerranéen, comme par exemple dans le romarin et la mélisse citronnelle. Sa structure chimique correspond à celle d'un ester particulier de l'acide caféïque et de l'acide 3-(3,4)-dihydroxyphényl-lactique qui possède deux groupements catécholiques lesquels seraient à la base des propriétés antioxydantes (Zheng et Wang, 2001 ; Petersen et Simmonds, 2003), anti-inflammatoires (Al-Sereiti et al., 1999) et antivirales (Parnham et Kesselring, 1985) de l'acide rosmarinique.

Cependant, la mise en œuvre de ces molécules polaires dans les matrices lipidiques ou dans les formulations de type émulsions est délicate et peut s'accompagner d'une diminution de leur efficacité vis-à-vis de la protection des lipides contre l'oxydation. Pour contourner ce problème, l'une des stratégies suivies par différentes équipes (Guyot et al., 1997 ; Buisman et al., 1998 ; Stamatis et al., 1999 et 2001 ; Compton et al., 2000 ; Giuliani et al., 2001 ; Topakas et al., 2003 ; Figueroa-Espinoza et Villeneuve, 2005 ; Villeneuve, 2007) consiste à diminuer considérablement la polarité de ces molécules par le greffage de chaînes aliphatiques de longueurs différentes, afin d'ajuster la répartition huile/eau dans les matrices multiphasiques alimentaires ou cosmétiques. Le résultat attendu est une facilité d'incorporation accrue et une amélioration significative de leur action antioxydante. Il est en effet postulé que de telles modifications de la balance hydrophile/lipophile permettraient d'obtenir de nouvelles molécules bioactives, dont les propriétés biologiques seraient améliorées par rapport aux molécules initiales. Ces réactions, dites de lipophilisation, sont en général effectuées par des procédés biocatalysés mettant en œuvre plus particulièrement des lipases (EC 3.1.1.3. triacylglycérol ester hydrolases). Leur principal avantage, par rapport aux catalyseurs chimiques classiques, réside dans leur plus grande spécificité vis-à-vis du substrat et leur mise en œuvre dans des conditions réactionnelles modérées (température, pression). De plus, le maintien de leur activité dans les solvants organiques élargit considérablement leur champ d'application (Kaslauskas et Bornscheuer, 1998).

Malgré les nombreux travaux entrepris sur la modification de composés phénoliques par des méthodes répondant aux principes de la « chimie verte », force est de constater que notre connaissance reste parcellaire, notamment au niveau de

la maîtrise des paramètres de la réaction concernant la modification des acides phénoliques par lipophilisation, et sur l'influence de cette hydrophobation sur l'efficacité antioxydante résultante.

En se basant sur les considérations exposées précédemment, les objectifs de ce travail peuvent se résumer comme suit :

- (i) maîtriser les différents paramètres impliqués dans la synthèse enzymatique afin d'améliorer les rendements et vitesses de réaction de la synthèse des esters gras d'acides phénoliques ;
- (ii) évaluer l'activité antiradicalaire des nouvelles molécules afin d'anticiper leur activité antioxydante dans des systèmes plus complexes ;
- (iii) évaluer la capacité antioxydante dans des systèmes plus proches des conditions d'oxydation rencontrées dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Composés phénoliques chez les végétaux

Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques mais, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques. Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes, capacité qui permet à l'homme de les utiliser dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire ou la pharmacologie. Durant les deux dernières décennies, l'intérêt porté sur ce type de composés d'origine végétale a augmenté de façon exponentielle, pour de multiples raisons parmi lesquelles on peut citer :

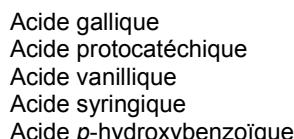
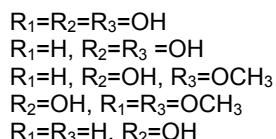
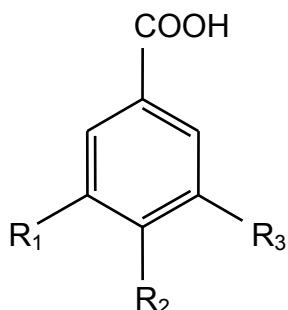
- leur action anticancérigène pour certains d'entre eux et leur action antioxydante permettant de lutter contre le vieillissement cellulaire ;
- une moindre acceptation, de la part du consommateur, des antioxydants synthétiques couramment utilisés pour limiter l'oxydation des produits riches en lipides insaturés. La raison essentielle de cette défiance est le danger potentiel de ces molécules de synthèse. En conséquence et à ce titre, les composés phénoliques issus du règne végétal sont tout à fait à même de présenter une alternative efficace et performante.

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux (Tableaux 1 et 2). Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La désignation « polyphénols » est consacrée par l'usage, et, alors qu'elle ne devrait concerner que les molécules portant plusieurs hydroxyles phénoliques dans la molécule, elle est très fréquemment utilisée pour désigner l'ensemble de ces composés. Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées extrêmement complexes), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, ...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, ...).

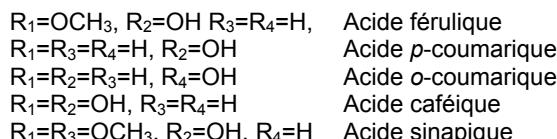
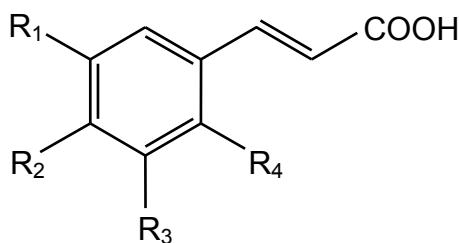
I.1. Acides phénoliques

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Figure 1).

Acides hydroxybenzoïques



Acides hydroxycinnamiques



Esters d'acides hydroxycinnamiques

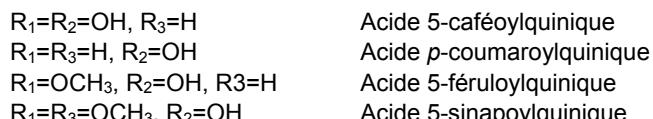
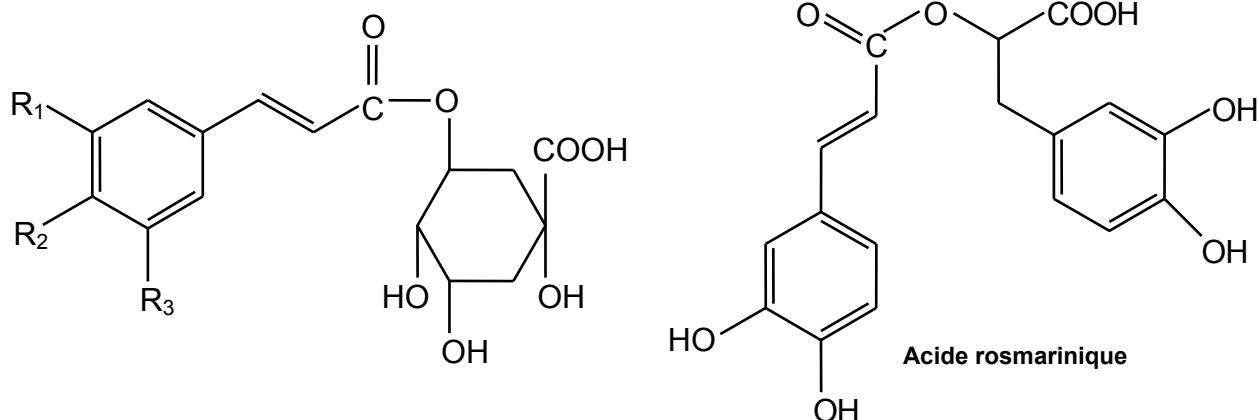


Figure 1. Structures de quelques acides phénoliques d'origine végétale. Adaptée de Robards *et al.* (1999).

Tableau 1. Sources et teneurs de quelques acides phénoliques d'origine végétale.

Classification	Sources	Exemples	Teneur (mg/kg de matière sèche)	Références
Acides phénoliques				
<i>Acides hydroxybenzoïques</i>	Feuilles de banane, myrtilles, mûres	Acide benzoïque Acide vanillique Acide gallique	26 141 36-46	Oliveira et al. (2005) Sellappan et al. (2002)
<i>Acides hydroxycinnamiques</i>	Feuilles de banane, myrtilles, mûres	Acide féulique Acide coumarique Acide caférique	29-283 48-334 36	Oliveira et al. (2005) Sellappan et al. (2002)
<i>Hydroxycinnamates</i>	Tournesol, myrtilles, sorbier, maté, pruneau, pomme, artichaut, pomme de terre, café vert, extrait de chèvrefeuilles (<i>Lonicera confusa</i> DC)	Acides chlorogéniques	400-905300	Clifford (1985, 1999) Xiang et Ning (2008)
<i>Hydroxycinnamate de l'acide caféïque avec l'acide 3-(3,4)-dihydroxyphényl-lactique</i>	Mélisse citronnelle (<i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i>), romarin	Acide rosmarinique	2190-40000	Carnat et al. (1998) Wellwood et Cole (2004)

I. Composés phénoliques chez les végétaux

Tableau 2. Sources et teneurs de quelques flavonoïdes d'origine végétale.

Classification	Sources	Exemples	Teneur (mg/kg de matière sèche)	Références
Flavonoides				
<i>Flavones</i>	Extraits de feuilles d'olive	Lutéoline Apigénine-7-glucoside Diosmétine-7-glucoside Lutéoline Diosmétine	13800 13700 5400 2100 500	Benavente-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Flavanones</i>	Fruits citriques	Hesperidine Naringénine Nariurtine Eriocitrine	80-584 40-481 30-249 47-94	Tomás-Barberán et Clifford (2000)
<i>Flavonols</i>	Manga, myrtilles	Quercétine Quercétine-O-glucoside Myricitine	2700 1800 67	Berardini (2005) Sellappan <i>et al.</i> (2002)
<i>Flavanols</i>	Banane, myrtilles	Gallocatéchine Catéchine	1580 117	Someya (2002) Sellappan <i>et al.</i> (2002)
<i>Anthocyanines</i>	Extrait des marc de raisin rouge	Cyanidine-3-glucoside Pétunidine-3-glucoside Péonidine-3-glucoside	170-180 90-120 350-550	Lu et Foo (1999)

I.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1 (Figure 1) parmi lesquels les plus abondants dans le règne végétal sont les acides gallique, protocatéchique, vanillique et syringique.

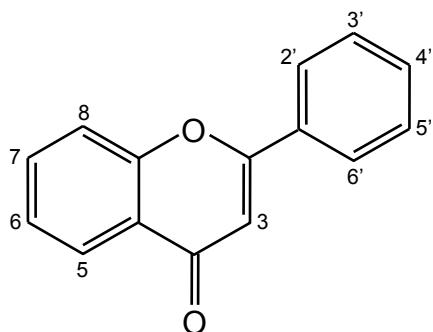
I.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3, Figure 1) dérive de celle de l'acide cinnamique. Dans cette subdivision, se trouvent les acides caféique, férulique, *p*-coumarique et sinapique. De plus, ces acides peuvent se trouver sous forme estérifiée, notamment, avec le glucose, l'acide quinique ou l'acide tartrique. Parmi eux, la famille des hydroxycinnamates regroupe principalement les esters des acides caféique, ferulique et *p*-coumarique avec l'acide quinique, mais également l'acide rosmarinique qui est un ester particulier de l'acide caféique et de l'acide 3-(3,4)-dihydroxyphényl-lactique.

I.2. Flavonoïdes

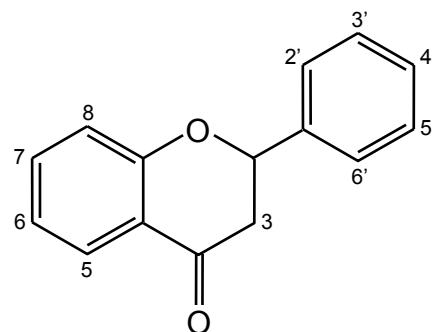
A coté des acides phénoliques, les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques naturels. Les flavonoïdes sont des molécules contenant 15 atomes de carbone organisés en configuration C6-C3-C6 (Figure 2). Le plus souvent, leur structure se compose de 2 cycles aromatiques A et B liés par un hétérocycle central C (Figure 2). C'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation (Figure 2) qui permet de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. L'oxydation maximale de l'hétérocycle correspond aux anthocyanines. En revanche, dans le cas des flavanes (flavanes 3-ols ou 3-flavanols comme la catéchine ; flavane-3,4-diols) le cycle central est très fortement réduit. A l'intérieur de chacune de ces catégories, les variations autour du squelette carboné de base en C15 portent principalement sur trois points : (i) le degré d'hydroxylation des différents cycles, (ii) le niveau de méthoxylation (groupements méthoxy, O-CH₃ en substitution aux groupements hydroxyles) et (iii) le niveau de glycosylation.

Flavones



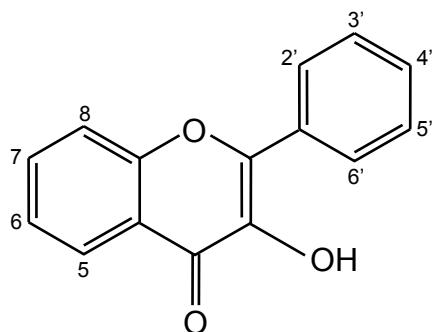
$5=7=3'=4'= \text{OH}$
 $5=7=3'= \text{OH}, 4'= \text{OCH}_3$
 $5=7=4'= \text{OH}$
 $5=3'=4'= \text{OH}, 7= \text{glucose}$
 $5=3'= \text{OH}, 4'= \text{OCH}_3, 7= \text{glucose}$
 $5=4'= \text{OH}, 7= \text{glucose}$
Lutéoline
Diosmétine
Apigénine
Lutéoline-7-glucoside
Diosmétine-7-glucoside
Apigénine-7-glucoside

Flavanones



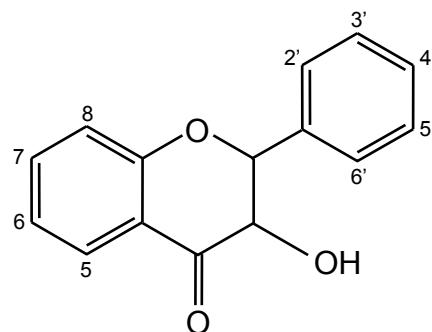
$5=7=4'= \text{OH}$
 $5=7=3'= \text{OH}, 4'= \text{OCH}_3$
 $5=4'= \text{OH}, 7= \text{diglycoside}$
 $5=3'=4'= \text{OH}, 7= \text{diglycoside}$
Naringénine
Héspérítine
Narirutine
Eriocitrine

Flavonols



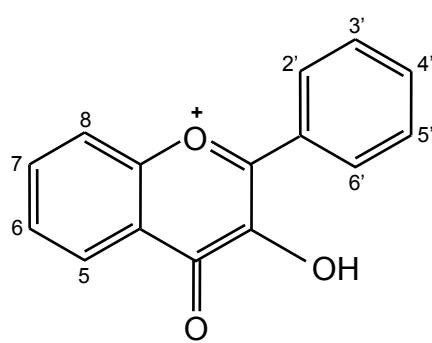
$5=7=3'=4'= \text{OH}$
 $5=7=3'=4'= \text{OH}, 3= \text{glucose}$
 $5=7=3'=4'=5'= \text{OH}$
Quercétine
Quercétine-3-glucoside
Myricétine

Flavanols



$(2R, 3S), 5=7=3'=4'= \text{OH}$
 $(2R, 3S), 5=7=3'=4'=5'= \text{OH}$
Catéchine
Gallocatechicine

Anthocyanines



$5=7=3'=4'= \text{OH}, 3= \text{glucose}$
 $5=7=4'=5'= \text{OH}, 3'= \text{OCH}_3, 3= \text{glucose}$
 $5=7=4'= \text{OH}, 3'= \text{OCH}_3, 3= \text{glucose}$
Cyanidine-3-glucoside
Pétunidine-3-glucoside
Péonidine-3-glucoside

Figure 2. Structures de quelques flavonoïdes trouvés dans le règne végétal.
Adaptée de Robards *et al.* (1999).

En raison des caractéristiques structurales, qui lui sont propres et qui seront décrites dans le paragraphe suivant, chaque famille a une réactivité et un comportement spécifique qui déterminent leur efficacité en tant qu'antioxydant. A titre d'exemple, les composés les plus actifs de la famille des acides phénoliques sont les acides rosmarinique, chlorogénique, gallique, caféïque et dihydrocaféïque.

II. Caractéristiques structurales responsables de l'action antioxydante

Afin de mieux comprendre comment les caractéristiques structurales des polyphénols conduisent à leur activité antioxydante, il est nécessaire d'examiner en premier lieu les principaux aspects mécanistiques de l'oxydation et plus particulièrement ceux des lipides. A ce sujet, il faut dire que l'oxydation des lipides insaturés est généralement une réaction en chaîne induite par les radicaux libres et comprenant trois étapes : (i) initiation, (ii) propagation et (iii) terminaison.

(i) Initiation

Les lipides insaturés (LH) produisent des radicaux libres (L^\bullet) par perte d'un hydrogène en présence de plusieurs initiateurs, parmi lesquels on peut citer la lumière, la chaleur, les peroxydes ou les hydroperoxydes et les métaux de transition (équation 1).



(ii) Propagation

En présence d'air à pression atmosphérique, les radicaux lipidiques réagissent avec l'oxygène moléculaire pour produire les radicaux lipoperoxydes LOO^\bullet (équation 2).

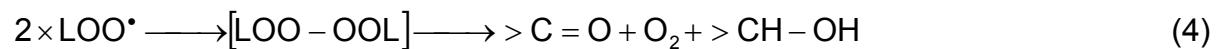


Puis, ces radicaux ainsi formés (équation 2) réagissent avec le substrat lipidique (équation 3), avec pour conséquence la propagation de la réaction en chaîne.



(iii) Terminaison

En absence d'antioxydant les radicaux lipoperoxydes réagissent entre eux selon le mécanisme de Russell (équation 4).



En revanche, en présence d'un antioxydant (AOH), de type phénolique par exemple, la terminaison de la réaction s'effectuera par transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le radical lipoperoxyle (équation 5).



De plus, il est toujours possible que le radical phénoxyle issu de la réaction 5 puisse réagir avec un autre radical lipoperoxyle (équation 6) ou se dimériser (équation 7).



Finalement, les équations précédents montrent que le pouvoir antioxydant d'une molécule phénolique n'est pas lié exclusivement à sa capacité à céder un ou plusieurs atomes d'hydrogène, mais aussi à une très rapide stabilisation du radical phénoxyle, évitant de cette façon, d'éventuelles réactions de pro-oxydation. En conséquence, les questions à se poser par rapport aux caractéristiques intrinsèques de ce type de composés sont :

- quelles sont les propriétés responsables du transfert de l'atome H phénolique vers un radical et comment le radical phénoxyle résultant se stabilise ?
- comment la nature du milieu impliqué dans les réactions d'oxydation influe sur la distribution de ces composés et donc sur leur activité antioxydante ?

Afin de répondre à ces questions, il est nécessaire d'aborder les aspects liés à la structure même des antioxydants et à leur répartition aux interfaces dans les milieux multiphasiques.

II.1. Caractéristiques structurales

D'un point de vue structural, les propriétés des polyphénols sont essentiellement celles du phénol lui-même. Elles sont cependant fortement modulées par les substituants typiques des noyaux phénoliques, en particulier ceux qui sont

capables d'étendre la délocalisation électronique : substituants à effet mésomère donneur d'électrons (+M : parmi eux, les groupements OH et OCH₃) ou attracteur d'électrons (-M : les groupes CO₂H et CH=CH-CO₂H). Ainsi, plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus l'énergie de sa HOMO (orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie) est élevée, et conjointement plus son potentiel d'ionisation est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une dissociation de son groupement hydroxyle qui conduit à la forme phénolate (AO⁻) correspondante. Ce phénolate peut alors subir la perte d'un électron pour conduire au radical phénoxyde AO[•]. (Figure 3).

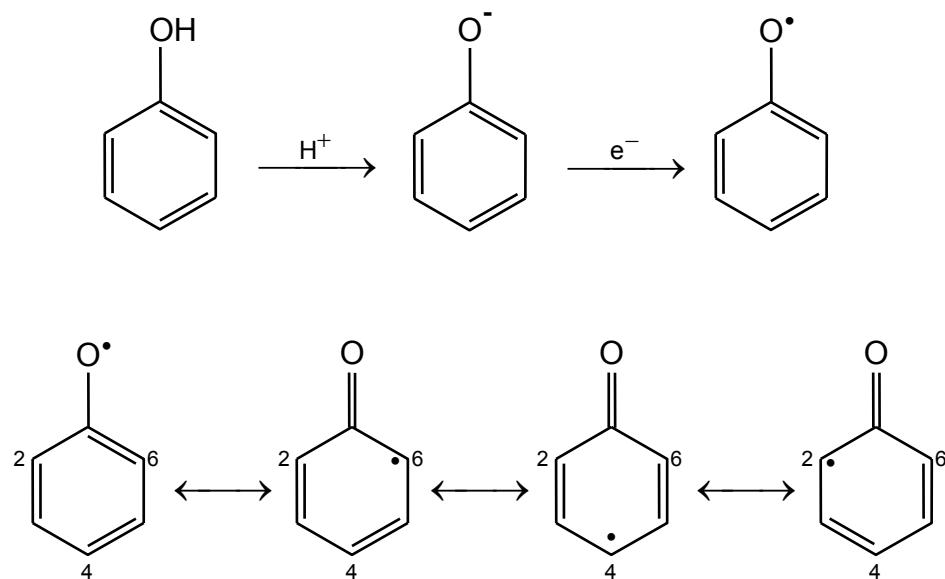


Figure 3. Mécanisme de transfert d'électron d'un phénol et formes mésomères du radical phénoxyde formé. Adaptée de Sarni-Manchado et Cheynier (2006).

Le radical phénoxyde (AO[•]) peut être produit directement par transfert de l'atome H phénolique vers un radical de haute énergie tel que le radical lipopéroxyle (LOO[•]) produit, par exemple, au cours de l'oxydation des lipides (équation 5, page 21). Ces réactions de transfert d'atome H et/ou d'électron avec formation d'un radical radical phénoxyde stabilisé, font partie des principaux mécanismes d'action antioxydante des phénols. Il est à noter cependant, que ces deux mécanismes sont en compétition constante et que les raisons conduisant à la prépondérance de l'un ou de l'autre sont encore sujettes à discussion.

En conséquence, la capacité du phénol à céder un atome H peut être quantifiée

II. Caractéristiques structurales responsables de l'action antioxydante

par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (*bond dissociation energy*, BDE), ou par le potentiel d'ionisation (PI) quand un transfert d'électron est impliqué. L'équivalent en solution du potentiel d'ionisation d'un phénol est le potentiel redox standard E^0 du couple AOH/AO[•]. Plus un phénol est réducteur, plus E^0 est faible. Plus la BDE et le potentiel d'ionisation d'un phénol sont faibles, plus son caractère de donneur d'atome H est fort. Cependant, la corrélation négative entre pouvoir antioxydant et potentiel redox n'est pas toujours étroite, car la conformation stérique de la molécule peut jouer également un rôle dans son activité.

En outre, la stabilisation du radical phénoxyle par délocalisation de l'électron célibataire peut être traduite par l'écriture des trois autres formes mésomères plaçant l'électron sur C₂, C₄ et C₆ (Figure 3). D'une manière générale, un substituant à effet donneur d'électron (+M) en position *ortho* (C₂, C₆) ou *para* (C₄) du groupe OH stabilise le radical par délocalisation de l'électron célibataire vers le groupement OH, d'où une BDE plus faible (Bordwell et Cheng, 1991). Par contre, l'introduction sur le noyau phénolique d'un groupement à effet attracteur d'électron (-M) conduit généralement à une BDE plus élevée pour le groupement OH, ce qui suggère que dans ce cas, la délocalisation électronique vers le substituant est plus forte dans le phénol que dans le radical correspondant. Il existe des éléments solidement établis de la relation structure-activité des acides phénoliques. Ainsi, les acides hydroxycinnamiques ont toujours une activité antiradicalaire supérieure à celle de l'acide benzoïque correspondant. Les acides caféique, sinapique, férulique et *p*-coumarique sont respectivement plus actifs que les acides protocatéchique, syringique, vanillique et *p*-hydroxybenzoïque (Cuvelier *et al.*, 1992 ; Andreasen *et al.*, 2001). Ils sont également plus actifs que les phénols simples : acide *p*-coumarique > phénol et acide caféique > pyrocatechol. L'effet renforçateur serait dû à la participation du groupe cinnamique CH=CH-COOH qui aide à la stabilisation du radical par résonance. Comme dans le cas de phénols simples, l'addition d'un second OH sur le cycle augmente fortement l'activité des acides phénoliques et la position des hydroxyles joue alors un rôle déterminant sur l'efficacité : *para* > *ortho* > *méta* (Rice-Evans *et al.*, 1996). Les groupements méthoxy jouent, dans une moindre mesure, le même rôle que les OH, grâce à la forte densité électronique du groupe O-CH₃ qui augmente la réactivité vis-à-vis des radicaux peroxydiques (Terao *et al.*, 1993).

En ce qui concerne les produits d'oxydation du phénol (radicaux phénoxyles), leur stabilisation peut s'effectuer de différentes façons parmi lesquelles on peut citer :

(i) la formation de liaisons H intramoléculaires

Une substitution de type 1,2-dihydroxy (catéchol) est particulièrement favorable, ce qui suggère que la stabilisation du radical (également appelé semi-quinone dans ce cas) résulte non seulement d'effets électroniques mais aussi de la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire (Pokorny, 1987 ; Zhang *et al.*, 2003). Ces deux phénomènes sont plus importants dans le radical que dans le phénol parent, ce qui se traduit par une baisse globale de la BDE.

(ii) les réactions de dimérisation

De plus, il a également été répertorié le fait que les radicaux phénoxyles peuvent se stabiliser par dimérisation et que le dimère formé conserve les caractéristiques antiradicalaires de la molécule initiale (Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Goupy *et al.*, 2003).

(iii) les réactions de régénération

Deux radicaux phénoliques peuvent également réagir entre eux pour former une quinone d'une part, et régénérer un *ortho*-diphénol d'autre part (Gordon, 1990). Un autre type de mécanisme de régénération consiste en l'attaque nucléophile d'espèces comme l'eau ou le méthanol permettant la régénération du radical phénoyle en sa forme catéchol (Goupy *et al.*, 2003 ; Saito et Kawabata, 2006).

II.2. Phénomène interfacial

La grande majorité des aliments existe en tant que systèmes dispersés, c'est à dire, qu'ils sont constitués de plusieurs phases. Ces multi-phases sont généralement délimitées par une région étroite (l'interface) qui sépare des molécules de polarité très différente. De nombreux processus chimiques et physiques sont influencés par la présence d'une région interfaciale. En raison de l'existence d'une région interfaciale, les composants actifs tels que les radicaux libres ou les antioxydants peuvent être distribués entre différentes phases et, de ce fait, réduire ou augmenter leur concentration dans la phase réactive (interface). Ce phénomène interfacial, qui

II. Caractéristiques structurales responsables de l'action antioxydante

n'est pas lié au potentiel redox des molécules, a été expliqué par l'affinité des antioxydants aux interfaces air-huile dans le cas des systèmes lipidiques homogènes et aux interfaces huile-eau dans le cas des systèmes émulsionnés. En conséquence, l'activité des antioxydants varie en fonction du système mis en jeu (McClements et Decker, 2000).

Ceci est bien illustré par le « Paradoxe Polaire » de Porter, selon lequel les antioxydants polaires sont souvent plus actifs dans les solutions lipidiques homogènes que les antioxydants apolaires, tandis que ces derniers sont plus efficaces dans les milieux émulsionnés que leurs homologues polaires (Pryor *et al.*, 1988 ; Porter, 1993 ; Frankel *et al.*, 1994, 1996 ; Huang *et al.*, 1996 a, b). Ce paradoxe est fondé sur les propriétés interfaciales des antioxydants, sur leur partition dans les milieux multiphasiques et sur le fait crucial que l'oxydation des lipides est initiée aux interfaces du système. Ceci peut se comprendre en simplifiant l'oxydation de la manière suivante : les agents initiant l'oxydation lipidique sont polaires, alors que les cibles de l'oxydation (les lipides insaturés) sont par nature lipophiles et donc préférentiellement orientés vers la phase apolaire. L'interface qu'elle soit de type huile-air ou eau-huile constitue donc le lieu privilégié où se rencontrent ces deux « acteurs » de l'oxydation. Ainsi, dans une solution lipidique homogène, l'oxydation a lieu à l'interface air-huile où les antioxydants hydrophiles sont concentrés, tandis qu'en milieu émulsionné, elle a lieu à l'interface huile-eau, où les antioxydants lipophiles sont localisés en raison de leurs propriétés tensioactives. Ce comportement paradoxal a été confirmé, entre autre, par le fait que l'acide ascorbique, les acides carnosique et rosmarinique issus du romarin, ainsi que le Trolox (un équivalent hydrophile de l' α -tocophérol) sont de meilleurs antioxydants en milieu lipidique homogène que leurs homologues lipophiles (α -tocophérol, ascorbyl palmitate et carnosol).

Cependant, le paradoxe polaire de Porter ne prend pas en compte l'influence du type et de la quantité de l'émulsifiant présent dans le système, lequel peut modifier drastiquement la distribution des espèces. En effet, la charge électrique des antioxydants et de l'interface est un paramètre d'importance cruciale pour la distribution de l'antioxydant dans l'émulsion et, en conséquence, de son efficacité pour inhiber l'oxydation lipidique. Un exemple de ce type d'interaction a été montré

par Mei *et al.* (1999). Dans leur système, la vitesse d'oxydation lipidique en présence de fer des émulsions de type huile de saumon-eau stabilisées par un émulsifiant anionique (dodécylsulfate de sodium, (SDS)) ou non ionique (Brij 35) a été mesurée, afin de déterminer l'influence de l'addition d'un antioxydant chargé négativement (acide gallique), non chargé (gallate de méthyle) et chargé positivement (gallamide). A pH 7, l'ordre d'efficacité des antioxydants à inhiber l'oxydation lipidique dans des systèmes où l'interface est négativement chargée a été observé comme étant : gallamide > gallate de méthyle > acide gallique. Cela suggère que les antioxydants qui sont attirés à l'interface de l'éulsion par les forces électrostatiques sont plus efficaces pour inhiber l'oxydation lipidique que ceux qui en sont repoussés. L'antioxydant non chargé a été quant à lui également efficace compte tenu de sa faible solubilité dans l'eau ce qui en conséquence, l'a probablement conduit à se concentrer à l'interface. A pH 3, dans un système stabilisé avec le SDS, l'ordre d'efficacité est en revanche : gallate de méthyle > acide gallique > gallamide. La raison la plus probable de ce comportement est que la solubilité du Fe^{3+} dans l'eau est plus élevée à pH bas et par conséquent, l'antioxydant est capable de régénérer le fer dans sa forme la plus active ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). En outre, à ce pH, il y a une quantité suffisante de Fe^{3+} et de gallamide concentrée à l'interface pour que la régénération décrite précédemment puisse aussi avoir lieu. L'efficacité des antioxydants dans des systèmes où l'interface est non chargée se produit selon l'ordre : gallate de méthyle > gallamide > acide gallique. Dans ce dernier cas, l'antioxydant non chargé s'avère le plus performant probablement pour deux raisons : sa plus faible solubilité dans l'eau et/ou ses propriétés tensioactives qui l'amènent à se localiser à l'interface du système éulsionné.

Concernant la quantité d'émulsifiant à mettre en œuvre, il faut noter que au-dessus de sa concentration micellaire critique (CMC), seule une fraction va se trouver présente à l'interface, le reste étant localisé dans la phase aqueuse sous forme de micelles. En conséquence, en fonction de leur polarité, les antioxydants vont s'associer non seulement avec les tensioactifs présents à l'interface, mais également avec les micelles présentes dans la phase aqueuse (Yuji *et al.*, 2007), ce qui se traduit par une modification de leur distribution et donc de leur capacité protectrice.

II. Caractéristiques structurales responsables de l'action antioxydante

Il faut également avoir à l'esprit que la capacité d'une molécule antioxydante à protéger un substrat lipidique peut varier de manière significative selon que ce substrat oxydable soit sous forme de triacylglycérols, d'esters méthyliques, d'acides gras libres ou encore incorporés au sein de différentes particules biologiques, telles que les lipoprotéines de basse densité (LDL) ou les structures membranaires de type liposomes ou microsomes de foie.

En résumé nous venons de montrer au travers de tout ce qui précède, que les composés phénoliques présents de façon ubiquitaire dans le règne végétal possèdent, entre autres, de réelles propriétés antioxydantes capables d'inhiber les réactions d'oxydation, par exemple, dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Leur activité globale est cependant, directement et fortement liée à la structure et à la composition physique du système modèle. En conséquence, l'activité relative d'antioxydants de différentes polarités varie significativement en systèmes multiphasiques. Pour toutes ces raisons, le choix de la méthodologie à mettre en œuvre afin d'évaluer l'effet antioxydant dans les systèmes alimentaires et biologiques est crucial, car il implique le contrôle précis des paramètres qui régissent l'oxydation. Ainsi, nous nous proposons, dans la suite de cet exposé, de passer en revue les principales méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante et d'en faire une analyse critique au regard des conditions réactionnelles et des mécanismes mis en jeu et, par conséquent, de la nature des informations qui en découlent.

III. Méthodes pour la détermination de l'activité antioxydante.

L'activité antioxydante de composés phénoliques dans les systèmes alimentaires peut être évaluée par une grande variété de méthodes qui ont reçu une attention considérable ces dernières années. Malheureusement, les résultats obtenus sont variables, parfois inconsistants et sont fortement dépendants de la méthode et des conditions de l'essai (Laguerre *et al.*, 2007 ; Frankel et Finley, 2008).

III.1. Méthodes indirectes ou non compétitives

La stratégie la plus simple consiste à mesurer, en absence de substrat oxydable, la capacité d'un antioxydant à réduire un radical artificiel stable (*via* un transfert d'hydrogène ou électron) ou un métal de transition (simplement par transfert d'électron). Ces méthodes appelées non compétitives ou indirectes sont généralement plus faciles à développer que d'autres où un substrat oxydable est présent. Elles ont cependant le désavantage de ne pas offrir un schéma de réaction compétitif entre l'antioxydant, les espèces radicalaires et le substrat oxydable. Parmi elles, la méthode DPPH[•] est la plus souvent utilisée.

III.1.1. Méthode DPPH[•]

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]) est un des radicaux artificiels les plus utilisés pour des essais sans substrat, afin d'étudier les effets structuraux des composés phénoliques sur l'activité antiradicalaire (Blois, 1958 ; Brand-Williams *et al.*, 1995). Sa réaction avec un antioxydant (AOH) s'établit comme suit :



L'effet que l'antioxydant a sur le DPPH[•] peut être mesuré par spectrophotométrie grâce à la diminution de l'absorbance à 515 nm en raison de la décoloration du DPPH[•] (pourpre) au profit de celle de sa forme réduite DPPH-H (jaune). Les essais sont normalement effectués en solution méthanolique jusqu'à ce que l'absorbance atteigne un stade stable. L'efficacité antiradicalaire se base en principe sur la quantité d'antioxydant nécessaire pour atteindre une chute de 50 % du signal initial de DPPH[•]. En raison de sa simplicité, cet essai est utilisé de façon courante pour la détermination de la capacité antiradicalaire des composés phénoliques.

III.2. Méthodes compétitives

Contrairement aux méthodes non compétitives, il existe des méthodes compétitives qui impliquent un substrat oxydable et mesurent la capacité d'un antioxydant à inhiber leur oxydation. D'un point de vue cinétique, deux différentes approches de mesure peuvent être utilisées. Elles mettent en œuvre soit la mesure de produits d'oxydation résultants de l'oxydation artificielle d'un substrat, soit le suivi direct de la détérioration du substrat oxydable.

III.2.1. Mesure de produits d'oxydation

Parmi les méthodes utilisées afin de mesurer ces produits, on peut citer les suivantes : le titrage iodométrique des hydroperoxydes et peroxyde d'hydrogène (Lea, 1931), la mesure dans l'UV de diènes conjugués (Gillam *et al.*, 1931 ; Pryor *et al.*, 1993), et l'essai de l'acide thiobarbiturique (TBA, Kohn et Liversedge, 1944).

III.2.1.1. Titration iodométrique des hydroperoxydes et peroxydes d'hydrogène

L'une des méthodes classiques et normalisées, pour quantifier les hydroperoxydes totaux et le peroxyde d'hydrogène, correspond à leur titrage iodométrique (Lea, 1931). Il s'agit de la méthode la plus ancienne et la plus communément utilisée pour suivre l'oxydation d'un substrat lipidique. En milieu acide, les hydroperoxydes (ROOH, réaction 9) et les peroxydes internes (ROORs, réaction 10) réagissent avec l'ion iodure, pour générer de l'iode qui est titré par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'un empois d'amidon (réaction 11).



L'indice de peroxyde (IP) est alors défini comme étant la quantité d'oxygène actif, exprimée en mg, contenue dans 1 g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. L'IP atteindra un maximum durant la phase de propagation, puis diminuera lors de la phase de terminaison pour laquelle la cinétique de décomposition des hydroperoxydes est plus importante que celle de leur formation.

III.2.1.2. Mesure de diènes conjugués

En 1931, Gillam *et al.* démontrent que les graisses naturelles développent un pic d'absorption proche de 230-235 nm durant le stockage. En fait, plus de 90 % des hydroperoxydes formés par lipoperoxydation présentent un système diénique conjugué résultant d'une stabilisation de l'état radicalaire par réarrangement des doubles liaisons. Ces composés relativement stables absorbent dans le spectre ultraviolet (absorbance (A) = 234 nm) et sont donc quantifiables par spectrophotométrie d'absorption. Seules les substances contenant des acides gras polyinsaturés peuvent servir de substrat oxydable pour cette méthode puisque les diènes conjugués ne peuvent se former qu'à partir d'acides gras comportant au moins deux doubles liaisons.

En conséquence, la méthode se base sur l'oxydation artificielle d'un substrat lipidique contenant des insaturations comme par exemple l'acide linoléique ou la lipoprotéine de basse densité (LDL). L'oxydation de ces composés est induite en général dans un milieu contenant du Cu^{+2} ou un azo-initiateur de radicaux libres tel que par exemple le 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH, 4 mM, Pryor *et al.*, 1993), d'un substrat (en général acide linoléique), d'un antioxydant à tester et finalement d'oxygène dissous. Le comportement typique de la cinétique de la formation des diènes conjugués est montré dans la figure 4.

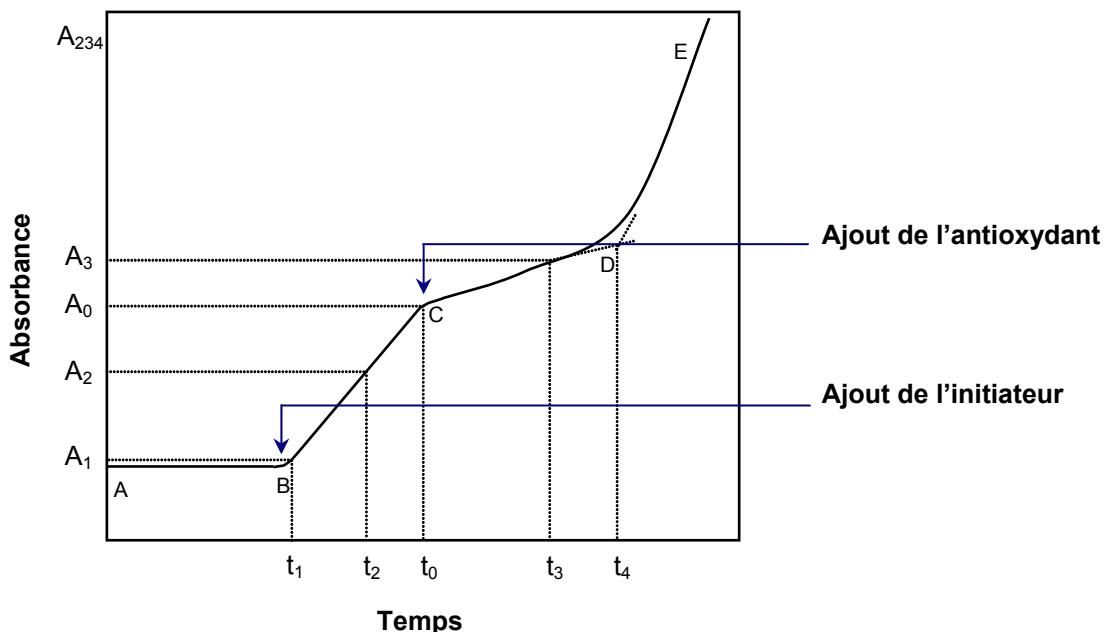


Figure 4. Représentation du comportement cinétique de l'oxydation de l'acide linoléique ou de la LDL. AB : sans initiateur ; BC : avec ajout d'un initiateur ; CD : avec l'ajout d'un antioxydant ; DE : sans antioxydant. Adaptée de Pryor et al. (1993).

A partir de la figure on peut voir différentes régions : en absence d'un initiateur, la réaction d'oxydation est négligeable (segment AB). Quand l'initiateur est ajouté au milieu, cette réaction s'initie et en conséquence une rapide augmentation de l'absorbance est mesurée, absorbance due à la formation des diènes (segment BC). L'addition d'un antioxydant retarde de façon considérable la formation de ces produits d'oxydation jusqu'à sa consommation complète (segment CD). Puis, la réaction retrouve à nouveau sa cinétique initialement observée en milieu non inhibé (segment DE). La durée de la phase CD est fonction de la concentration et des caractéristiques de l'antioxydant utilisé. En conséquence, les auteurs définissent le pouvoir antioxydant d'une molécule déterminée à partir de la pente résultante de la vitesse d'inhibition contre la concentration d'antioxydant.

III.2.1.3. Test à l'acide thiobarbiturique (TBA)

En 1944, Kohn et Liversedge ont observé que les tissus animaux incubés en aérobiose se colorent en rouge en présence d'acide 2-thiobarbiturique (TBA). Par la suite, Bernheim et al. (1947) associent cette coloration à la formation d'un complexe entre les produits d'oxydation des acides gras insaturés et le TBA. En 1951, Patton et Kurtz, ont identifié le malondialdéhyde (MDA) comme étant le principal réactant

avec le TBA. Plus précisément, ce complexe coloré présentant un maximum d'absorbance à 532 nm résulterait de la condensation de deux moles de TBA et d'une mole de malondialdéhyde (MDA) sous l'effet conjoint de la température et de l'acidité du milieu. La valeur de TBA est définie comme étant la quantité de MDA, exprimée en mg, présente dans 1 kg d'échantillon. De nombreux substrats oxydables ont été utilisés avec cette méthode, dont les acides gras libres, les huiles végétales, le LDL, les fluides corporels (urine, sérum) et les cellules ou les tissus animaux.

Bien que les méthodes basées sur une mesure de la formation de produits d'oxydation présentent de nombreux avantages, elles sont néanmoins limitées par le fait qu'il n'y a pas de marqueur universel de l'oxydation. En effet, dans le cas particulier des lipides polyinsaturés, l'oxydation conduit à la formation de produits d'oxydation primaires (hydroperoxydes, diènes conjugués) qui sont ensuite oxydés en produits d'oxydation secondaires (malondialdéhyde, composés volatiles, ...). De plus, ces produits d'oxydation sont généralement très instables amenant la formation d'intermédiaires avec de fortes différences en polarité et de masse molaire. Il est donc essentiel d'évaluer à la fois les produits d'oxydation primaires et secondaires, afin d'obtenir une vue d'ensemble fiable de l'état d'oxydation, ce qui semble être laborieux.

III.2.2. Mesure directe de la détérioration du substrat oxydable

A l'inverse, l'autre approche cinétique est basée sur la mesure de la perte des substrats oxydables (lipides ou autres), au lieu de produits d'oxydation. Parmi les méthodes plus utilisées fondées sur cette stratégie, on peut citer les suivantes : « oxygen radical absorbance capacity » (ORAC) (Glazer, 1988, 1990 ; Cao *et al.*, 1993 ; Ou *et al.*, 2001), « β -carotène ou crocin bleaching » (Bors *et al.*, 1984 ; Tubaro *et al.*, 1996) et BODIPY (Naguib, 1998).

III.2.2.1. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

L'ORAC est une méthode fluorimétrique qui mesure la capacité d'un antioxydant à inhiber l'oxydation, induite par un générateur de radicaux peroxyyles, d'un probe fluorescent. Les premiers essais ont été développés par Glazer (1988, 1990) utilisant comme probe la β -phycoérythrine (BP), une protéine isolée des algues rouges (*Porphyridium cruentum*). Cependant, l'utilisation de la BP est

rapidement abandonnée à cause de la grande variabilité des résultats et de l'instabilité de la protéine dans le milieu, qui conduit à une sous estimation des résultats. Afin de résoudre ces problèmes, Cao *et al.* (1993) ont remplacé la BP par la fluorescéine qui est plus stable, éliminant ainsi les problèmes de sous estimation. Cependant, les conditions du milieu développées par Cao *et al.* (1993) limitent cette méthode à l'évaluation d'antioxydants de caractère polaire, laissant de côté la famille des antioxydants apolaires, qui en théorie, ont un rôle plus important contre l'oxydation lipidique dans les systèmes alimentaires et physiologiques. Afin de surmonter ce facteur limitant, Huang *et al.* (2002) ont modifié la méthode en utilisant une solution de β -cyclodextrine/acétone (50/50 v/v) qui permet la solubilisation des antioxydants de polarité très variable. La figure 5, montre le comportement cinétique de l'oxydation de la fluorescéine provoquée par l'attaque des radicaux hydroperoxydes. Afin d'évaluer les effets inhibiteurs des antioxydants, les résultats de cette méthode sont exprimés comme étant l'aire sous la courbe (ASC) obtenue entre l'essai sans et avec antioxydant (AOH). Finalement, ces ASC sont exprimées par rapport à celle du Trolox, choisi comme référence standard, afin d'avoir une unité de comparaison universelle.

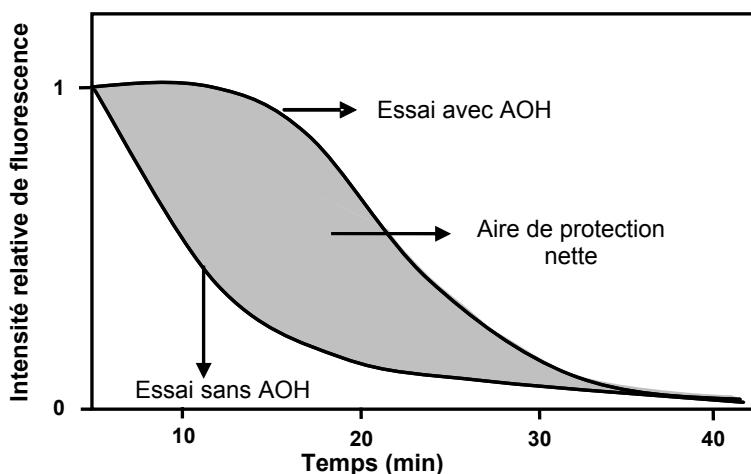


Figure 5. Exemple du comportement cinétique de l'oxydation de fluorescéine dans la méthode ORAC. AOH : antioxydant. Adaptée de Prior *et al.*, (2005).

Cette façon d'exprimer les résultats est avantageuse, car elle prend en considération les différentes phases impliquées pendant l'oxydation de la fluorescéine.

III.2.2.2. BODIPY

Cette méthode fluorimétrique a initialement été développée en utilisant comme substrat oxydable, l'acide 4,4-difluoro-5-(4-phényl-1,3-butadiényl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-undécanoïque ($\text{C11-BODIPY}^{581/591}$) (Naguib, 1998). Cet analogue d'acide gras fluorescent (Figure 6) au sein duquel le motif BODIPY est connecté au groupement phényle par l'intermédiaire d'un diène conjugué – qui agit comme un pont de résonnance – exhibe une fluorescence rouge, caractérisée par une émission maximale dans la gamme spectrale de 591-595 nm. Le nombre de doubles liaisons conjuguées rend ce substrat particulièrement oxydable par les peroxyradicaux. Il a été mesuré que la vitesse de réaction entre le $\text{C11-BODIPY}^{581/591}$ et les peroxyradicaux est environ deux fois plus élevée que celle entre les lipides polyinsaturés et ces radicaux.

L'oxydation du $\text{C11-BODIPY}^{581/591}$ se traduit par l'extinction progressive du signal fluorescent. Le principe de la méthode, tel qu'il a été développé par Naguib (1998), consiste à évaluer la capacité de molécules antioxydantes à protéger le $\text{C11-BODIPY}^{581/591}$ de l'attaque des peroxyradicaux générés par l'AMVN à une température avoisinant les 40°C. La capacité antioxydante se traduit alors par l'apparition d'une phase de latence plus ou moins marquée en fonction de la quantité d'antioxydants briseurs de chaînes. Pour cela, Naguib (1998) a utilisé deux approches complémentaires : soit le $\text{C11-BODIPY}^{581/591}$ est directement solubilisé dans un milieu organique apolaire constitué d'octane et de butyronitrile (9 : 1, v : v), soit cette sonde est incorporée dans des liposomes de dioléoylphosphatidylcholine mis en suspension aqueuse. Dans les deux cas, le Trolox a été utilisé comme molécule antioxydante de référence et l'information est extraite des données analytiques par l'intermédiaire du calcul de l'aire sous la courbe. Aldini *et al.* (2001) ont par la suite adaptée la méthode à la détermination de l'oxydabilité des compartiments aqueux et lipidiques du plasma. Pour suivre l'oxydation dans ce dernier cas, le 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile) (MeO-AMVN) et le $\text{C11-BODIPY}^{581/591}$ ont été utilisés, tandis que pour le plasma aqueux l'étendue de l'oxydation a été déterminée en utilisant l'AAPH et la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine.

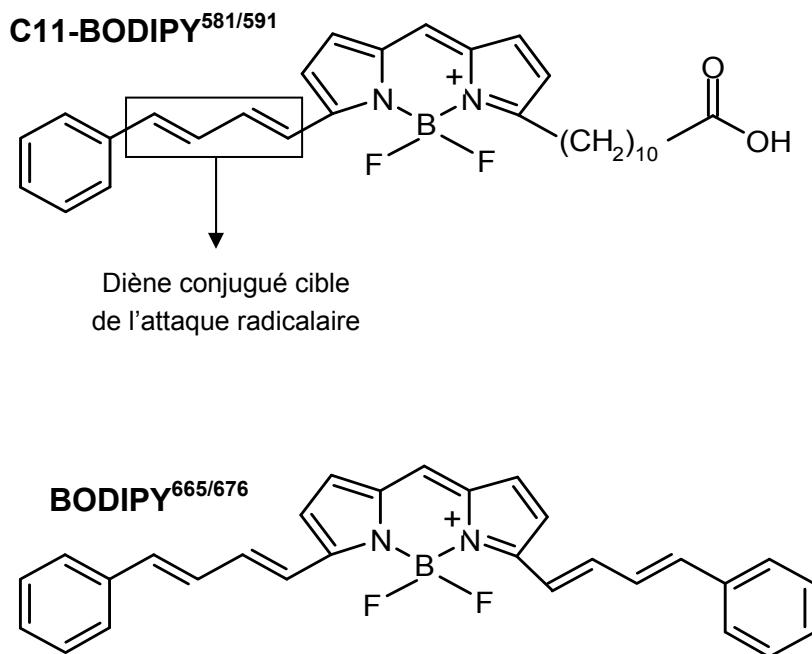


Figure 6. Structure chimique des sondes fluorescentes C11-BODIPY^{581/591} et BODIPY^{665/676}.

Notons enfin que d'autres dérivés du BODIPY ont été utilisés. Ainsi, Naguib (2000) a testé la faisabilité de la méthode en remplaçant le C11-BODIPY^{581/591} par le BODIPY^{665/676} (Figure 6). En effet, le BODIPY^{665/676} présentent d'autres avantages, il est plus facilement oxydable que le C11-BODIPY^{581/591} en raison de l'extension du système polyénique conjugué, ce qui nécessite moins d'AMVN. De plus, son déplacement de Stockes (15 nm) est légèrement supérieur à celui du C11-BODIPY^{581/591} (10 nm).

III.2.2.3. β -Carotène et Crocin bleaching

La décoloration du β -carotène est une technique qui initialement a été développée par Marco (1968), puis légèrement modifiée par Miller (1971). Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. Bien que le β -carotène soit utilisé de façon courante comme cible, sa décoloration est non spécifique et en conséquence les résultats obtenus sont très difficiles à interpréter. Afin de surmonter cette difficulté, Bors *et al.* (1984) ont utilisé pour la première fois le crocin (Figure 7), lequel est oxydé uniquement pour les radicaux hydroperoxydes mis en jeu dans un système contrôlé (équations 12 et 13). De cette façon, Bors *et al.*

(1984) ont amélioré la spécificité de l'analyse et ont facilité l'interprétation des résultats.

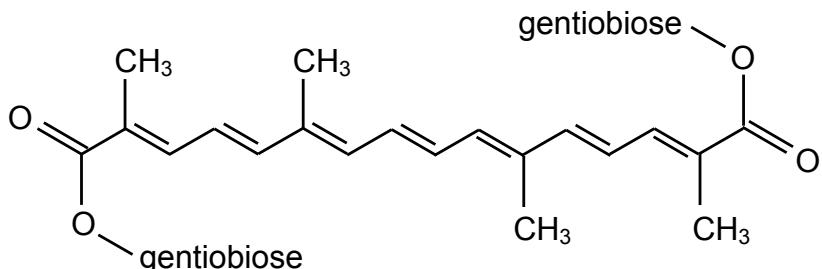
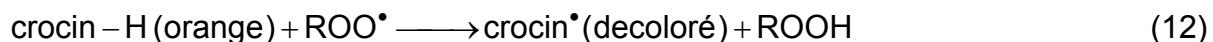


Figure 7. Structure chimique du chromophore « crocin ».

La décoloration est suivie par spectrométrie à 443 nm et l'expression des résultats est faite comme dans le cas du DPPH[•] en EC₅₀.

Cependant, ces tests présentent aussi quelques inconvénients. Le premier est qu'ils utilisent des concentrations d'antioxydants similaires ou supérieures par rapport à la concentration de substrat oxydable, ce qui n'est pas une condition réaliste du phénomène d'oxydation dans un milieu biologique naturel. En effet, ces tests ne mesurent pas une activité antioxydante telle qu'elle est définie par Halliwell et Gutteridge (1995). Selon eux, un antioxydant est « une substance qui lorsqu'elle est présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche de manière significative l'oxydation de ce substrat ». Deuxièmement, le substrat oxydable utilisé dans ces tests doit être facilement suivi, généralement par des mesures spectrales. Nonobstant, cela est rarement le cas avec des substrats oxydables d'origine naturelle, en particulier pour les lipides. Cette limitation a conduit à utiliser comme substrats, des fluorophores (sel disodique de fluorescéine, BODIPY, ...) ou des chromophores (crocin, ...), qui sont non représentatifs des substrats oxydables dans les industries alimentaires. Ceci limite la pertinence des résultats obtenus par ces méthodes et, par conséquent, leur transposition dans d'autres contextes.

Conformément à ces considérations, Laguerre *et al.* (2008) ont développé une nouvelle méthode de dosage spectrophotométrique, appelée test de « trienes conjugués autoxydables » (CAT de l'abréviation en anglais), en adoptant la même stratégie fondée sur l'évaluation directe de la perte de substrat oxydable. Dans cette méthode, l'antioxydant est environ 100 fois moins concentré que le substrat oxydable, éliminant de cette façon la tendance irréaliste mentionnée ci-dessus. De plus, ce test *in vitro* se basé sur les caractéristiques spectrales des triacylglycérols (TAG) naturellement présents dans l'huile commercialement obtenue à partir des graines de l'arbre de bois de Chine (*Aleurites fordii*, et nomé par la suite huile de tung), substrat particulièrement adapté pour mettre en évidence un procédé d'oxydation. Ces TAGs contiennent en effet environ 86 % d'un mélange d'isomères de l'acide eleostéarique, à très forte majorité de l'isomère α -($\Delta 9c, \Delta 11t, \Delta 13t$), qui est un acide octadecatriènoïque avec un triène conjugué présentant une très haute sensibilité oxydative et une forte absorption dans le domaine de l'ultraviolet à 273 nm.

Sous conditions d'oxydation induites par un générateur hydrophile des radicaux peroxydes (2,2 '-azobis (2-amidinopropane) dichlorhydrate, AAPH) à 37°C et dans un système émulsionné (pH 7,2), la dégradation du triène conjugué présent dans les TAGs s'accompagne d'une diminution de l'absorbance à 273 nm. L'addition des composés phénoliques conduisent à un délai du procédé d'oxydation qui peut être mesuré spectrométriquement. En conséquence, cet essai semble être particulièrement bien adapté pour l'évaluation de la capacité antioxydante dans le contexte de l'oxydation lipidique.

IV. Stratégies de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

Dans le chapitre II, nous avons abordé les principales caractéristiques qu'un antioxydant doit posséder afin de piéger de façon efficace les radicaux libres impliqués dans les réactions en chaîne d'oxydation des lipides. Les principales conclusions montrent que l'activité antioxydante est fortement liée aux caractéristiques structurales des composés et parmi elles, nous avons trouvé qu'une structure *ortho* dihydroxylphénolique (connue sous le nom de structure catécholique) est d'importance capitale dans le rôle du piégeage des radicaux, auparavant décrits comme responsables de l'initiation de la réaction en chaîne de l'oxydation lipidique. De plus, leurs produits oxydés sont facilement stabilisés par l'intermédiaire des mécanismes qui impliquent des liaisons H intramoléculaires (Pokorny, 1987 ; Zhang et al., 2003), la dimérisation entre deux radicaux phénoxyles (Brand-Williams et al., 1995 ; Goupy et al., 2003) et finalement, des réactions de régénération, soit par la conjugaison de deux radicaux phénoxyle (Gordon, 1990), soit par l'attaque d'un nucléophile présent dans le milieu (Goupy et al., 2003 ; Saito et Kawabata, 2006).

En conséquence, la première condition pour la sélection d'un composé phénolique afin de l'utiliser comme antioxydant, est la présence de cette fonctionnalité dans sa structure. Parmi les composés phénoliques trouvés dans le règne végétal avec une structure catécholique on peut citer, entre autres, les acides protocatéchique, caféïque, chlorogénique et rosmarinique, mais également les flavonoïdes comme la catéchine, la lutéoline et la cyanidine. Parmi ces composés, nous avons porté notre attention sur l'acide chlorogénique (5-cafeoylquinique) et rosmarinique (Figure 1), dont quelques caractéristiques seront détaillées ci-dessous.

L'acide chlorogénique, un ester de l'acide caféïque avec l'acide quinique, est très largement répandu dans le règne végétal. Ainsi, par exemple, il se trouve à des concentrations de l'ordre de 100 g/kg de matière sèche dans les extraits de café vert (Clifford, 1985 et 1999), mais aussi dans les extraits de chèvrefeuille (*Lonicera confusa* DC) du sud de la Chine à une concentration de 62 g/kg de matière sèche (Xiang et Ning, 2008). De plus, ses propriétés biologiques (Morishita et Ohnishi, 2001), antioxydantes (Kono et al., 1997 ; Zang et al., 2003) et antimicrobiennes

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

(Scholz *et al.*, 1994 ; Puupponen-Pimia *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2004) ont été documentées de façon exhaustive. Plus particulièrement, il a été rapporté que l'acide chlorogénique a un effet inhibiteur sur la carcinogénèse de l'intestin grêle et du foie (Azuma *et al.*, 2000 ; Rodriguez de Sotillo *et al.*, 2002).

L'acide rosmarinique, quant à lui, est un composé principalement présent dans les herbes aromatiques du bassin méditerranéen, comme par exemple le romarin et la mélisse citronnelle. C'est un ester particulier de l'acide caféïque et de l'acide 3-(3,4)-dihydroxyphényl-lactique, qui possède deux structures catécholiques, lesquelles peuvent être à la base de ses propriétés antioxydantes (Zheng et Wang, 2001 ; Petersen et Simmonds, 2003), anti-inflammatoires (Al-Sereiti *et al.*, 1999) et antivirale (Parnham et Kesselring, 1985).

Bien que du point de vue structural ces acides aient les qualités requises afin d'agir de manière efficace en piégeant les radicaux libres, leur caractère polaire peut empêcher leur utilisation dans des applications impliquant un milieu lipidique hétérogène. En effet, dans ce type de système, et à cause de leur caractère hydrophile, ces acides se solubilisent dans l'environnement aqueux de l'émulsion, loin du véritable site d'oxydation, « l'interface » (Pryor *et al.*, 1988 ; Porter, 1993 ; Frankel *et al.*, 1994, 1996 ; Huang *et al.*, 1996 a, b). Pour contourner ce problème, l'une des stratégies consiste à diminuer considérablement la polarité de ces molécules par le greffage de chaînes aliphatiques grasses (Figueroa-Espinoza et Villeneuve, 2005 ; Villeneuve 2007), afin d'ajuster leur positionnement dans les matrices alimentaires ou cosmétiques. Le résultat attendu est une facilité d'incorporation accrue et une amélioration significative de leur action antioxydante. Il est en effet postulé que de telles modifications de la balance hydrophile/lipophile permettraient d'obtenir de nouvelles molécules bioactives, dont les propriétés biologiques seraient améliorées par rapport aux molécules initiales. Ces réactions, dites de lipophilisation, sont en général effectuées par des procédés biocatalysés mettant en œuvre plus particulièrement les lipases.

Les lipases, (triacylglycérol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) sont une classe d'enzymes qui catalysent la digestion hydrolytique des lipides. On les retrouve de façon ubiquitaire chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux.

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

Les lipases sont très largement utilisées dans des domaines aussi divers et variés tels que par exemple, le biofaçonnement et les modifications structurales des corps gras (Macrae, 1983 ; Quinlan et Moore, 1993 ; Bornscheuer, 1995 ; Balcao *et al.*, 1996 ; Foglia et Villeneuve, 1997 ; Gandhi, 1997 ; Yahya *et al.*, 1998 ; Xu, 2000) ou encore, lors de la synthèse de matériaux biopolymériques (Gross *et al.*, 2001 ; Kim et Dordick, 2001). Elles sont également employées dans les domaines des arômes et de la chimie fine (Athawale *et al.*, 2001 ; Kiyota *et al.*, 2001) et dans l'industrie pharmaceutique pour la résolution de mélanges racémiques (Zhu et Panek, 2001 ; Ono *et al.*, 2001 ; Kato *et al.*, 2001). L'avantage principal de ce type de biocatalyseur réside dans la plus grande spécificité vis-à-vis du substrat et la mise en œuvre dans des conditions réactionnelles modérées (température, pression). De plus, le maintien le plus souvent de leurs activités biocatalytiques dans les solvants organiques élargit considérablement leur champ d'application (Kaslauskas et Bornscheuer, 1998). Parmi les lipases, nous avons centré notre intérêt plus particulièrement sur la lipase de *Candida antarctica*.

La lipase de *Candida antarctica* est une protéine constituée de 317 acides aminés avec un poids moléculaire de 33 kDa. Deux lipases (A et B), différentes d'un point de vue structural, sont synthétisées par la levure *Candida antarctica*. La forme B de la lipase de *Candida antarctica* a été clonée et immobilisée sur une résine macroporeuse par Novo Nordisk (Danemark). C'est sous cette forme, qu'elle est le plus souvent utilisée pour les réactions de lipophilisation. Le site catalytique de cette lipase est tout au fond (dans le nucléo) de l'enzyme. L'adsorption des substrats sur le site actif, est faite après que ces derniers traversent un canal hydrophobique en forme d'entonnoir de dimensions $9,5 \times 4,5 \text{ \AA}$. Afin de parcourir ce canal, les substrats sont orientés parallèlement à l'axe le plus long du canal. La partie droite de ce tunnel, d'une longueur de $10,5 \text{ \AA}$, correspond au volet tandis que la partie gauche, avec une longueur de 6 \AA , est formée par la liaison labile de l'acide tridécanoïque avec le site actif. La machinerie catalytique, placée au fond du site actif, est constituée d'une triade catalytique (responsable de la catalyse basique) et d'un trou oxyanionique (responsable de la catalyse acide) formé pendant les états de transition. La triade catalytique est formée par la Ser105, His224 et Asp187, tandis que le trou oxyanionique est formé par le Gly106 et le Thr40 (Figure 8).

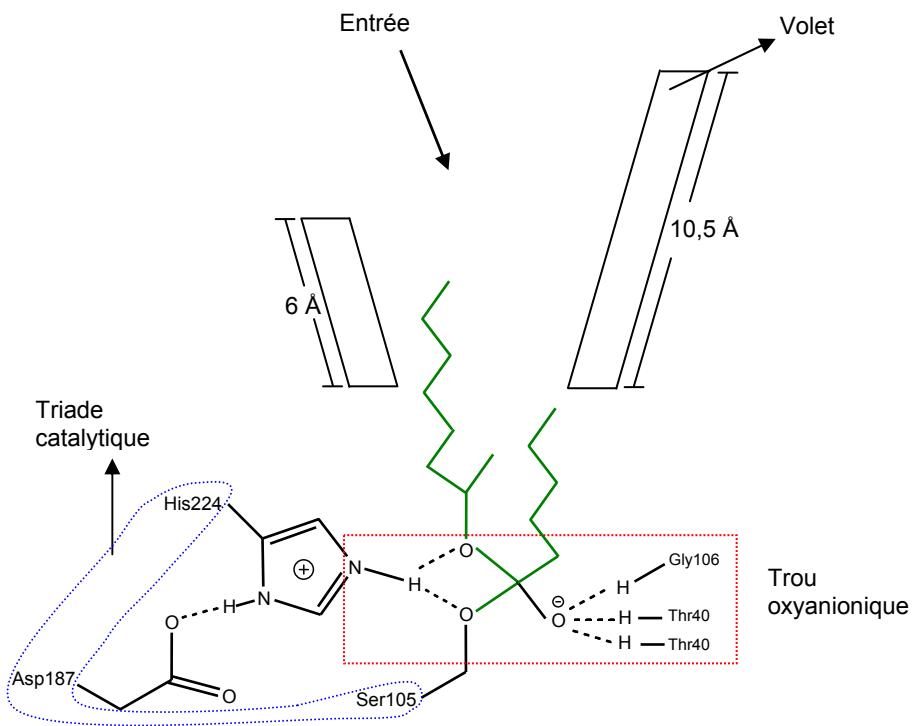


Figure 8. Vue latérale du site actif de la lipase de *Candida antarctica* B dans son état de transition avec l'hexanoate de 2-octyle (en vert), Adaptée de Rotticci (2000).

De plus, le mécanisme de réaction a été caractérisé et il est accepté qu'il suive un mécanisme bi-bi ping-pong. La réaction a lieu en deux étapes (Figure 9). Au début, le premier substrat (acide ou ester) est adsorbé sur le site catalytique de la lipase (état de transition 1) qui est désorbé aussitôt afin de former le produit 1 et un intermédiaire acyle-lipase. Le processus continue avec la désacylation de la forme intermédiaire acyle-lipase par l'action d'un nucléophile, qui conduit à un état de transition 2, qui après désorption, conduit au produit final de la réaction et à la forme active de la lipase qui peut ainsi continuer le processus catalytique.

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

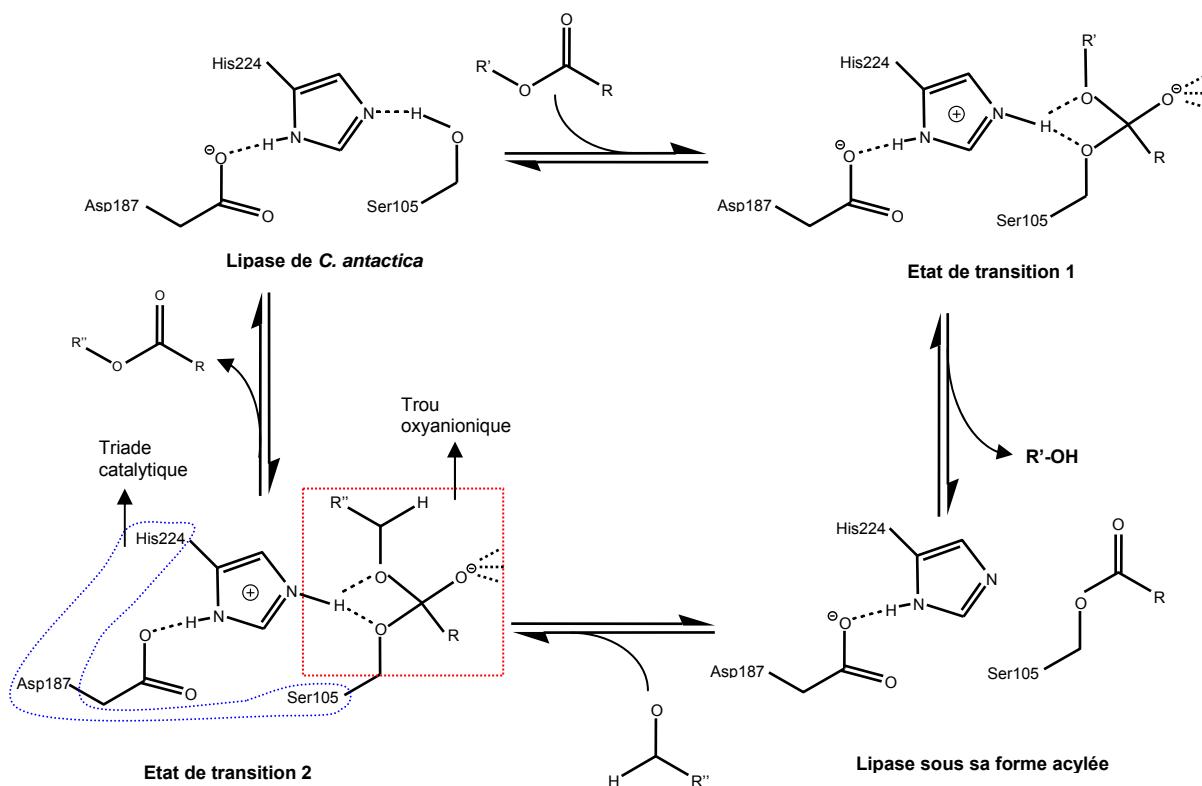


Figure 9. Mécanisme de réaction de la lipase de *Candida antarctica* B dans des procédés impliquant des réactions d'estérification et de transestérification. $R' = H$ ou CH_3 ; $R'' = (CH_2)_n-CH_3$. Adaptée de Rotticci (2000).

En vue des potentialités des lipases dans les processus de synthèse de nouveaux dérivés lipophiliques des composés phénoliques, cette section abordera dans un premier temps les principaux paramètres à contrôler afin d'obtenir les meilleurs rendements et vitesses de réaction en utilisant ce type de biocatalyseur. Ensuite, quelques synthèses conduites avec des lipases seront décrites et discutées, et pour finir, nous détaillerons également les nouvelles propriétés antioxydantes des composés obtenus.

IV.1. Paramètres clés des réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

Plusieurs paramètres clés doivent être considérés afin de garantir une cinétique et un rendement satisfaisants lors de la biocatalyse.

IV.1.1. Influence du solvant

Dans les réactions de lipophilisation, l'association de deux substrats de polarité très différentes (lipophile/hydrophile) constitue la principale difficulté. Bien entendu, la stratégie la plus intéressante consiste à réaliser la réaction en milieu dit « fondu », c'est-à-dire en absence de solvant. Cependant, lorsque cela n'est pas possible, le choix d'un solvant adéquat s'avère crucial. Ce dernier doit être inerte vis-à-vis de l'enzyme et ne doit pas altérer son activité. Ceci est généralement le cas pour les solvants possédant une valeur de log P supérieure à 3, comme l'hexane ou l'heptane par exemple. La valeur de log P correspond au coefficient de partition d'un solvant entre l'octanol et l'eau. Ces solvants sont couramment utilisés dans des réactions de type biofaçonnement des huiles et des graisses, catalysées par des lipases. Or, de manière générale, il n'existe pas de milieu approprié aux réactions qui mettent en jeu des substrats dont les polarités diffèrent radicalement. Le meilleur exemple pour illustrer cette difficulté est probablement la synthèse enzymatique de sucro-esters aliphatiques (Plou *et al.*, 2002 ; Riva, 2002 ; Adachi et Kobayashi, 2005) pour laquelle une molécule hydrophile (glucide) doit être combinée à une molécule lipophile (acide gras). Dans ce cas, les solvants possédant une valeur de log P supérieure à 3 ne conviennent pas (Tableau 3), dans la mesure où la solubilité du glucide dans ce milieu est très faible, voire nulle.

Les solvants avec de faibles valeurs de log P peuvent être employés et plusieurs exemples sont trouvés dans la littérature avec l'acétonitrile (Ljunger *et al.*, 1994 ; Bagi et Simon, 1999), le *tert*-butanol (Ku et Hang, 1995 ; Degn *et al.*, 1999), le 2-méthyl-2-butanol (Khaled *et al.*, 1991 ; Coulon *et al.*, 1999) et l'éthylméthyl cétone (Yan *et al.*, 1999). Un bon contact entre les deux substrats doit être recherché et le solvant sélectionné doit pouvoir les solubiliser, tout du moins partiellement. A cet égard, les alcools tertiaires sont de bons candidats, notamment parce qu'ils n'entrent pas en compétition avec les substrats mis en œuvre vis-à-vis des lipases. Qui plus est, leur élimination en fin de réaction n'est généralement pas problématique.

Tableau 3. Valeurs de Log P de différents solvants utilisés dans les réactions catalysées par des lipases. Adaptée de Villeneuve (2007).

Solvant	Log P	Solvant	Log P
Heptane	+ 4,0	Tétrahydrofurane	+ 0,5
Hexane	+ 3,5	Acétone	- 0,3
Toluène	+ 2,5	Acétonitrile	- 0,4
Benzène	+ 2,0	Éthylméthyl cétone	- 0,8
2-Méthyl-2-butanol	+ 1,3	Diméthylformamide	- 1,0
<i>tert</i> -Butanol	+ 0,8	Dioxane	- 1,1
Pyridine	+ 0,7	Diméthylsulfoxyde	- 1,3

Lors du choix d'un solvant, il est essentiel d'examiner aussi sa toxicité. A titre d'exemple, on peut citer la pyridine, un des premiers solvants à avoir été utilisé comme solvant pour la biocatalyse des lipases en milieu organique (Therisod et Klibanov, 1986 ; Mutua et Akoh, 1993 ; Chopineau *et al.*, 1998 ; Sin *et al.*, 1998). Toutefois, même si ce moyen peut parfois conduire à de meilleurs rendements et cinétiques de réaction, son usage devrait être évité en raison de sa forte toxicité.

Plusieurs auteurs ont essayé de trouver des stratégies originales pour améliorer l'activité enzymatique dans les solvants organiques. Par exemple, Persson *et al.* (2002 a) ont comparé l'activité des préparations de lipase lyophilisées contenant des quantités différentes de tampon phosphate. La lyophilisation de la lipase *Thermomyces lanuginosus*, en présence d'une teneur importante de sels de phosphate (200 mM), a quadruplé son activité spécifique. Le phosphate de sodium, jouant le rôle d'une matrice d'immobilisation pour la lipase, a amélioré le transfert de masse.

D'autres auteurs ont travaillé sur la conception de systèmes homogènes par solubilisation de la lipase dans des solvants organiques. Cette solubilisation peut être obtenue en systèmes micellaires réversibles d'isooctane stabilisé par le sodium bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate (Larsson *et al.*, 1990). Similairement, diverses techniques ont été proposées où un surfactant est greffé à la lipase afin d'obtenir un

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

« surfactant-coated lipase » (SCL), qui présente une amélioration de la solubilité dans des milieux organiques. Par exemple, Okahata et Ijiro (1988) ont proposé pour la première fois la production de SCL et ont montré une réelle amélioration de l'activité catalytique par rapport à la lipase native pour des réactions d'estérification dans un milieu organique. De façon similaire, Goto *et al.* (1994), ont préparé différents SCL avec les lipases de *Pseudomonas* sp, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* et *Candida rugosa*. Les SCL ont présenté des vitesses de réaction jusqu'à 100 fois supérieures à celles des enzymes natives. La solubilisation des lipases en milieu organique peut également être augmentée après greffage sur des polymères comme le polyéthylène glycol (Koops *et al.*, 1999 ; Persson *et al.*, 2002 b).

En outre, l'activité de l'enzyme dans un solvant choisi, peut être améliorée grâce à l'emploi d'additifs. Les premiers exemples font mention des sels, principalement le chlorure de potassium, comme facteurs d'amélioration de l'activité lipasique en milieux organiques (Khmelniski *et al.*, 1994 ; Ru *et al.*, 1999). Des additifs plus sophistiqués ont été également utilisés. Ghanem (2003) a notamment étudié l'effet des cyclodextrines et a montré que la vitesse et la sélectivité de la réaction étaient significativement améliorées, lorsque la lipase de *Pseudomonas cepacia* était lyophilisée en présence de cyclodextrines. Dans ce cas, l'effet de la cyclodextrine peut être expliqué par la formation d'un complexe « *host-guest* », améliorant ainsi la flexibilité de l'enzyme et favorisant sa résistance au solvant et aux produits d'inhibition. D'autres auteurs ont montré que les éthers couronne pouvaient avoir également un effet bénéfique sur l'activité catalytique de la lipase dans les solvants organiques (Tagaki *et al.*, 1996 ; Itoh *et al.*, 1997 ; Mine *et al.*, 2003). A titre d'exemple, Van Unen *et al.* (2002), ont montré que l'effet des éthers couronne de type 18-crown-6 pouvait être attribué à des interactions macrocycliques, c'est-à-dire, à la complexation des groupes ammonium des résidus lysine du biocatalyseur, réduisant ainsi la formation de liaisons inter- et intramoléculaires entre acides aminés. Il en résulte une diminution des obstacles de mise en conformation, ce qui permet à l'enzyme d'atteindre une conformation plus active. L'activation par les éthers couronnes a été également observée dans des environnements plus apolaires et secs.

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

Récemment, un grand intérêt a été porté sur les liquides ioniques (c'est-à-dire, des paires d'ions liquides à température ambiante) comme moyen de solubilisation des substrats dans les réactions catalysées par des lipases (Kragl *et al.*, 2002 ; Sheldon *et al.*, 2002 ; Park et Kaslauskas, 2003). Parmi les principaux avantages de leur utilisation, on peut citer les suivants :

- ce sont des composés non volatiles et thermiquement stables ;
- leur balance hydrophile/lipophile peut être facilement ajustée en fonction des substrats à solubiliser grâce à une simple modification de leurs anions et cations ;
- ils ont été catalogués comme non toxiques (Jarstoff *et al.*, 2003).

En conséquence, les liquides ioniques présentent l'avantage de solubiliser des substrats de polarité très différente comme c'est souvent le cas dans les réactions entre composés phénoliques et substrats gras. De plus l'activité et la sélectivité des enzymes qui sont généralement utilisées à cette fin, sont améliorées dans ce type de milieux (Kaar *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2003 ; De Diego *et al.*, 2005). De ce fait, leur utilisation dans ce genre de réactions a explosé dans la dernière décennie et à titre d'exemple, nous pouvons citer les synthèses des sucro-esters (Kim *et al.*, 2003 ; Ganske et Bornscheuer, 2005) et la lipophilisation des composés phénoliques (Kim *et al.*, 2003 ; Katsoura *et al.*, 2006). Cependant, à ce jour, leur utilisation à une échelle industrielle semble compromise due à leur prix excessif. Nous pensons qu'ils sont pour le moment seulement envisageables pour la synthèse de produits à haute valeur ajoutée.

IV.1.2. Conditionnement de la lipase et activité thermodynamique de l'eau (a_w)

L'autre paramètre important dans ce type de réaction concerne l'enzyme elle-même, et plus particulièrement son conditionnement. Durant ces vingt dernières années, les différentes techniques de conditionnement des lipases ont grandement amélioré, le champ de l'ingénierie moléculaire a permis leur immobilisation sur un support inerte. Dans ce cadre, l'objectif est d'améliorer certaines de leurs propriétés, telles que l'activité catalytique, la spécificité vis-à-vis du substrat, la stabilité (pH, température) ou leur aptitude à être recyclées.

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

Cependant, le paramètre le plus important à maîtriser en synthèse enzymatique est sans conteste le micro-environnement aqueux de l'enzyme, qui se traduit par l'activité thermodynamique de l'eau (a_w). La conduite de réactions d'estérification et de transfert d'acyles en phase aqueuse limitée, telles que l'interestérification ou la transestérification biocatalysées par les lipases, requiert l'étude préalable de l'influence de l' a_w de l'enzyme sur la cinétique et le rendement de la réaction. En effet, ce paramètre détermine la quantité d'eau liée à l'enzyme qui lui est nécessaire pour assurer sa structure active optimale. *A contrario*, un excès d'eau donnerait lieu à des réactions d'hydrolyse compétitives. Il est donc primordial de maîtriser l' a_w et en conséquence la teneur en eau, pour définir les conditions réactionnelles optimales favorisant les transferts d'acyles au détriment des réactions compétitives d'hydrolyse. Les a_w optimales pour la majorité des préparations lipasiques sont généralement comprises entre 0,25 et 0,45, ce qui correspond le plus souvent à des teneurs en eau comprises entre 0,5 et 1 % (Muderhwa *et al.*, 1988 ; Villeneuve *et al.*, 2000).

Lorsque l'on étudie l'effet du niveau d'hydratation et *de facto* celui de la teneur en eau d'une lipase sur sa capacité à catalyser un transfert d'acyle, une courbe gaussienne similaire à celle présentée en Figure 10 est généralement obtenue. Dans cet exemple relatif à l'aptitude des lipases du latex de *Carica papaya* à biocatalyser la réaction d'alcoolysis entre la trilaurine et le butanol, plusieurs essais ont été conduits avec diverses préparations enzymatiques, pré-équilibrées à différentes valeurs d' a_w comprises entre 0 et 1 (Caro *et al.*, 2002). La courbe en cloche obtenue montre clairement l'effet de l' a_w sur l'activité catalytique des lipases dans des réactions de synthèse d'esters. Dans ce cas particulier, la formation optimale des esters a été obtenue avec un biocatalyseur pré-équilibré à une valeur d' a_w de 0,22, ce qui correspond à une teneur en eau de 2 %. Pour les valeurs d' a_w supérieures à 0,22, une décroissance graduelle dans les rendements est observée, approchant une valeur nulle pour une estérification conduite avec une a_w de 0,7. Il est également primordial, lors d'une étude de l'influence de l' a_w sur la réaction, de tracer la courbe de sorption d'eau du biocatalyseur (Figure 10) afin de définir ses différents niveaux d'hydratation.

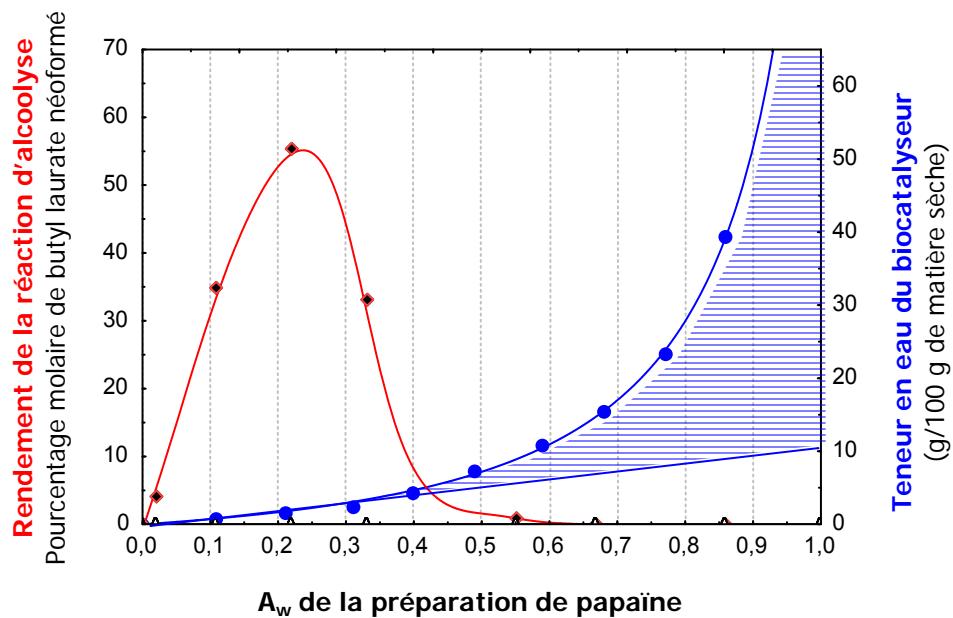


Figure 10. Influence de la variation du taux d'hydratation du biocatalyseur (a_w et teneur en eau) sur le rendement de la réaction d'alcoolyse de la trilaurine avec du butanol, en présence de la lipase brute de latex de *Carica papaya* (conditions réactionnelles : 55°C, 10 % m/m d'enzyme brute, milieu fondu). a_w optimale de la lipase pour la synthèse : 0,22 (correspondant à une teneur en eau du biocatalyseur de 2 %) (Caro *et al.*, 2002).

Dans l'exemple cité, il convient de signaler que l' a_w optimale de la lipase est située sur la section linéaire de la courbe de sorption ($0,05 < a_w < 0,35$), pour laquelle les molécules d'eau peuvent former des couches mono- ou multi-moléculaires avec le réseau protéique. Pour des valeurs d' a_w supérieures à l'optimum de 0,22, une quantité excessive d'eau est adsorbée par l'intermédiaire de forces osmotiques et capillaires, ce qui favorise la réaction d'hydrolyse au détriment de la synthèse. Il est particulièrement intéressant de noter qu'une valeur d' a_w supérieure à 0,35 correspond à la limite entre l'eau fortement liée au matériel sec et l'eau de solvatation adsorbée par les forces osmotiques et capillaires.

En outre, il est primordial de contrôler l' a_w au cours de la réaction. Pour ce faire, il existe diverses méthodes dont la plus employée est basée sur l'utilisation de solutions salines saturées au dessus desquelles l'humidité relative est déterminée par la nature du sel. Grâce à ces solutions salines, il est possible d'ajuster l' a_w des enzymes et des substrats aussi bien au début (Svensson *et al.*, 1994) qu'en cours de

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

réaction (Dudal et Lortie, 1995). Cependant, le contrôle de l' a_w par ce moyen n'est pas aisé, car il nécessite la conception de chambres d'équilibration. Pour surmonter cet inconvénient, certains auteurs ont proposé d'utiliser des membranes en silicium contenant des sels saturés, ce qui permet d'optimiser le contact avec le milieu de réaction organique (Wehtje *et al.*, 1993 ; Kaur *et al.*, 1997) ou d'utiliser des tubes de silicium semipermeables (Rosell *et al.*, 1996 ; Wehtje *et al.*, 1997). D'autres auteurs ont suggéré d'équilibrer le milieu réactionnel avec de l'air préalablement équilibré avec une solution saline saturée (Ujang et Vaidya, 1998). Cependant, cette méthode semble avoir une moindre efficacité en raison des limitations de transferts de masse d'eau entre les différentes phases. Plus récemment, sont apparus de nouveaux systèmes de contrôle *in situ* de l' a_w basés sur l'incorporation d'un débit d'air ou d'azote (sec ou humide) dans le réacteur (Won et Lee, 2001 ; Won *et al.*, 2002). Citons, en particulier le travail très récent de Petersson *et al.* (2007) décrivant la conception d'un dispositif dans lequel un capteur d' a_w placé dans la tête du réacteur est couplé avec un ordinateur et une unité de contrôle. Ce système peut être programmé pour laisser passer un débit d'air sec ou humide afin d'ajuster l' a_w .

IV.1.3. Influence du substrat et types de réactions mises en jeu

Nous venons de voir que l'environnement de l'enzyme, au travers notamment du solvant utilisé, mais également de son activité thermodynamique de l'eau, avaient un effet déterminant sur son activité. Cependant, à côté de ces deux facteurs essentiels, bien d'autres paramètres peuvent directement influencer les cinétiques et les rendements de réaction.

Dans la nature, les lipases ont une action hydrolytique sur divers types d'esters, notamment les triacylglycérols, dont elles assurent le catabolisme. En présence d'eau, les lipases sont donc capables de catalyser l'hydrolyse d'un ester en l'alcool et l'acide correspondants. Or, cette réaction étant réversible, il peut être avantageux d'opérer dans des conditions réactionnelles permettant le déplacement de l'équilibre vers la synthèse. Dans cette optique, diverses stratégies peuvent être adoptées avec, en premier lieu, l'ajustement du ratio molaire entre les substrats. Il est ainsi possible de favoriser l'estérification par un excès de l'un des deux substrats, en général le substrat lipidique. La nature du donneur d'acyle influence également

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

l'efficacité de la réaction. Par exemple, l'utilisation d'acides gras libres dans une procédure d'estérfication directe génère la formation d'eau qu'il est préférable d'éliminer en continu, de manière à déplacer l'équilibre de la réaction vers la formation d'esters, tout en limitant l'hydrolyse inverse. Ceci est généralement rendu possible, entre autres, grâce à l'utilisation de tamis moléculaires ou en travaillant sous pression réduite. De manière alternative, d'autres donneurs d'acyles peuvent être employés, comme les esters méthyliques, éthyliques ou vinyliques. Dans ce cas, une réaction de transestérfication a lieu. L'utilisation de tels esters est généralement avantageuse par rapport aux acides gras libres, puisque l'élimination des alcools formés est thermiquement plus aisée que l'élimination de l'eau. Dans le cas des esters vinyliques, la réaction est particulière dans la mesure où ces composés sont des donneurs d'acyles irréversibles. Par tautomérie, l'alcool vinylique obtenu par transestérfication est transformé en acétaldéhyde, lequel est facilement retiré du milieu réactionnel en raison de son faible point d'ébullition. Par conséquent, l'équilibre est rapidement déplacé vers la synthèse et les esters vinyliques sont donc considérés comme de très bons donneurs d'acyles pour ce type de réactions. Il a toutefois été montré que la formation d'une base de Schiff, par l'addition de l'acétaldéhyde sur les groupes aminés libres (lysine, arginine) de l'enzyme, pouvait conduire à sa dénaturation et à une perte significative d'activité (Björkling, 1989).

Dans d'autres stratégies le substrat le plus hydrophile est chimiquement modifié lors d'une étape préliminaire. Ces modifications visent principalement à abaisser la polarité du substrat, ce qui a pour conséquence d'augmenter sa solubilité dans les solvants sélectionnés et donc d'améliorer son contact avec l'enzyme et l'autre substrat. La plus commune de ces modifications consiste en une alkylation préalable du composé hydrophile. Les dérivés méthyliques, éthyliques, propyliques ou butylalkyliques de glucides sont également intéressants pour certaines réactions de lipophilisation biocatalysée, bien que cette stratégie nécessite une étape supplémentaire de déprotection (Sarney *et al.*, 1994 ; Bisht *et al.*, 1999 ; Bousquet *et al.*, 1999). Les groupes protecteurs de type isopropylidène, benzylidène ou cyclohexylidène sont fréquemment employés pour l'hydrophobation et l'amélioration de la solubilité du substrat dans les solvants apolaires. De nombreux exemples peuvent être trouvés dans la littérature dans lesquels les substrats hydrophiles modifiés sont acylés par un synthon lipophile, puis déprotégés dans des conditions

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

douces (Schlotterbeck *et al.*, 1993 ; Redmann *et al.*, 1997 ; Gridley *et al.*, 1998 ; Gao *et al.*, 1999). Une autre voie de modification préliminaire des substrats hydrophiles consiste en une complexation par un dérivé organique (phényl ou butyl) de l'acide boronique (Clifford, 1985 ; Oguntiemein *et al.*, 1993). Ces composés sont connus pour former des complexes de type boronates avec les diols et les glucides, s'accompagnant d'une amélioration significative de la solubilité de ces derniers dans les solvants organiques. Cependant, un effet inhibiteur de l'acide boronique a quelquefois été observé sur l'activité lipasique, notamment lorsque ce réactif est utilisé en excès (Lang *et al.*, 2000). Notons cependant que ces stratégies d'hydrophobation chimique du substrat hydrophile, avant la catalyse enzymatique, sont très peu employées pour la lipophilisation de dérivés phénoliques. Enfin, il faut bien avoir présent à l'esprit que l'efficacité réelle de la réaction enzymatique est multifactorielle. Ainsi, l'influence des conditions expérimentales telles que la température, la pression, la quantité d'enzyme ainsi que la nature du bio-réacteur (batch, lit catalytique, ...) est très importante.

IV.2. Lipophilisation de dérivés phénoliques catalysée par des lipases

De nombreux types de substrats peuvent être soumis à l'action des lipases dans des réactions d'estérification par les alcools ou les acides gras. Ainsi, la lipophilisation de molécules complexes comme les polyphénols et leurs dérivés, pour en ajuster les propriétés physico-chimiques, a été particulièrement étudiée et fait l'objet d'une abondante littérature.

IV.2.1. Lipophilisation d'acides chlorogéniques et d'autres acides phénoliques issus d'extraits de café vert

En fonction de la variété, *Coffea arabica* ou *Coffea robusta*, les acides phénoliques représentent de 5,5 à 12 % de la matière sèche du café vert (Tableau 1). Ces acides phénoliques sont des dérivés hydroxylés (acide caféïque) ou méthoxylés (acide férulique) de l'acide cinnamique. Ils se présentent soit sous forme libre, soit sous forme d'esters ou de diesters de l'acide quinique et constituent un groupe de composés appelés acides chlorogéniques (Clifford, 1985), parmi lesquels l'acide 5-caféoylquinique est le constituant majoritaire (Figure 1). Ces composés, partiellement solubles dans l'eau, montrent de puissantes activités antioxydantes

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

assorties de propriétés bactéricides (Scholz *et al.*, 1994 ; Maruta *et al.*, 1995 ; Kono *et al.*, 1997 ; Puupponen-Pimia *et al.*, 2001 ; Zang *et al.*, 2003 ; Zhu *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, notre équipe a envisagé la possibilité de lipophiliser les acides chlorogéniques en vue d'obtenir ainsi de nouvelles bio-molécules multifonctionnelles combinant des propriétés émulsifiantes, antioxydantes et antimicrobiennes (Guyot *et al.*, 1997, 2000). Ainsi, notre équipe a étudié la capacité de la lipase de *Candida antarctica* B à catalyser l'estérification de quelques acides phénoliques issus du café vert avec des alcools gras de longueur de chaîne variables (C₄ à C₁₈) (Figure 11).

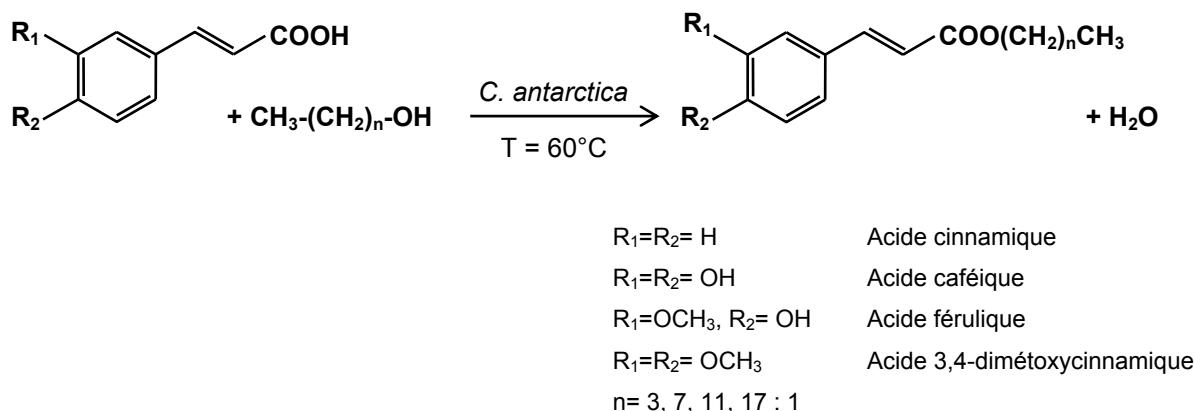


Figure 11. Estérification par voie enzymatique d'acides phénoliques de café vert avec différents alcools gras. Adaptée de Guyot *et al.*, 1997.

Typiquement, les réactions sont réalisées à 60°C en absence de solvant, avec une quantité d'enzyme représentant 2,5 % de la masse totale des substrats. Dans un premier temps, la faisabilité de cette réaction a été évaluée avec le butanol et les acides cinnamique, cafïique, férulique et diméthoxycinnamique. Les résultats ont montré que l'estérification catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B était possible pour les séries issues de l'acide cinnamique, à condition que le cycle aromatique ne soit pas *para*-hydroxylé. En effet, tandis que l'acide cinnamique et l'acide 3,4-diméthoxycinnamique ont été estérifiés avec des rendements satisfaisants de 97 et 60 % respectivement, la formation d'esters n'a pas été observée dans le cas des acides cafïique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) et férulique (acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique). De plus, il a été constaté qu'en présence d'une

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

chaîne carboxylique saturée sur l'acide phénolique (acide dihydroxycaféique), la *para*-hydroxylation n'exerçait aucun effet.

Ainsi, il semblerait que la présence simultanée d'une double liaison sur la chaîne carboxylique conjuguée avec le cycle aromatique et l'hydroxyle en *para*, inhibe totalement la lipase de *Candida antarctica* B. Ce phénomène semble davantage lié à un effet électronique qu'à un simple encombrement stérique, dans la mesure où l'acide 3,4-diméthoxycinnamique était convenablement estérifié, alors que les acides caféique et férulique ne l'étaient pas. L'effet de la longueur de la chaîne de l'alcool sur le taux d'estérification a ensuite été évalué avec le butanol, l'octanol, le dodécanol et l'alcool oléique. Là encore, il a été montré que l'estérification de l'acide caféique n'était pas possible, et ce, quel que soit l'alcool employé.

Afin de comprendre ces divers phénomènes et mettre en évidence des différences significatives de réactivité entre tous ces acides phénoliques, la réaction par voie enzymatique a été effectuée sur deux familles de composés, à savoir les isomères des acides hydroxycinnamiques et benzoïques et les isomères de l'acide dihydroxybenzoïque, en appliquant la même procédure utilisant l'octanol comme alcool. Il a été constaté que l'estérification des isomères de l'acide hydroxycinnamique était possible, mais lente. Le meilleur rendement a été obtenu avec les isomères en *méta*, tandis que ceux en *ortho* et *para* se comportaient de manière similaire. Ce résultat a été partiellement confirmé par l'estérification des isomères de l'acide hydroxybenzoïque, avec toutefois de faibles rendements. Par contre, les réactions impliquant les acides dihydroxybenzoïques n'ont conduit qu'à l'obtention d'esters à l'état de traces, et cela même, après plusieurs jours de réaction. A partir de ces résultats, on peut également conclure que la présence de deux fonctions hydroxyles sur le cycle aromatique inhibe l'estérification biocatalysée de la fonction acide, si cette dernière est conjuguée avec le cycle, soit par une liaison sigma directe sur le cycle (acide benzoïque), soit par l'intermédiaire d'une double liaison sigma-pi (acide cinnamique).

In fine, ce constat a été extrapolé à la synthèse enzymatique d'esters gras de l'acide 5-caféoylquinique. La réaction d'estérification a été étudiée avec différents alcools (C_8 , C_{12} , C_{16} et $C_{18:1}$), en utilisant la lipase de *Candida antarctica* B comme

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

biocatalyseur (1,5 % p/p) (Figure 12). Deux types de milieu réactionnel ont été utilisés, à savoir en présence du 2-méthyl-2-butanol ou en absence de solvant. Dans ce dernier cas, l'estérification par des alcools gras a été possible et il s'est avéré que la conversion était dépendante de la longueur de la chaîne carbonée. Sa valeur était d'environ 60 % pour l'alcool en C₈, et 40 % pour les alcools de C₁₂ à C₁₈ après 30 jours de réaction. Notons qu'à l'instar des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique, l'estérification est très lente en milieu fondu.

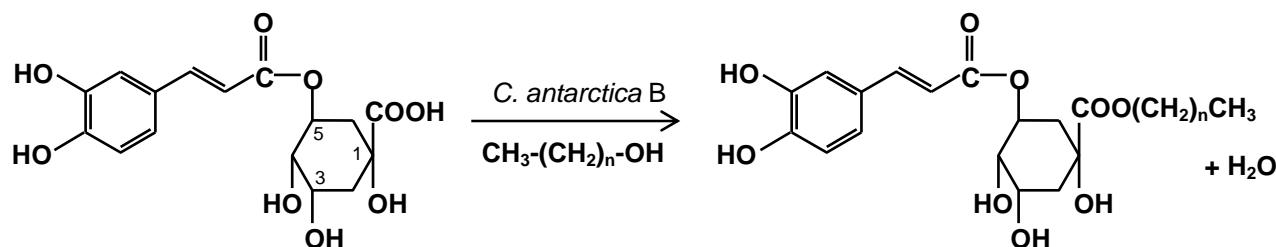


Figure 12. Synthèse enzymatique à 60°C d'esters gras d'acides chlorogéniques. n = 7, 11, 15 et 17:1. Adaptée de Guyot *et al.*, 2000.

En présence de 2-méthyl-2-butanol, les réactions ont été plus rapides et les conversions ont été systématiquement plus élevées que celles obtenues en milieu « fondu », avec des taux s'échelonnant de 55 à 75 %, en fonction de la longueur de chaîne de l'alcool. Dans tous les cas, les cinétiques d'estérification se sont rapidement accélérées après 4 jours. Cette accélération typique pourrait s'expliquer par les propriétés émulsifiantes des esters néoformés dont la présence, même en faibles quantités, est suffisante pour améliorer la solubilité des réactifs. Cependant, les auteurs concluent que de nombreux efforts restent encore à faire pour améliorer les rendements et les vitesses de réaction. En effet, il a été montré que les rendements atteignaient un palier au bout de 30 jours de réaction ce qui, d'un point de vue opérationnel, en limite fortement l'intérêt.

Parallèlement à la modification enzymatique Xiang et Ning (2008) ont préparé un dérivé lipophile de cet acide en partant des extraits de chèvrefeuille (*Lonicera confusa* DC), originaire du sud de la Chine par réaction chimiocatalytique. Dans leur cas, la lipophilisation de l'acide chlorogénique n'est pas portée sur la fonction carboxylique, mais sur le groupement hydroxyle secondaire du synthon quinique en position 3 (Figure 12). Leur milieu réactionnel classique est constitué de 10 mmol d'acide dissous en diméthylformamide et catalysé par 15 mmol de triméthylamine, en

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

utilisant comme agent d'acylation 10 mmoles de chlorure de dodécyle. Sous ces considérations, Xiang et Ning (2008) ont réussi à obtenir un dérivé lipophile avec un rendement de 81 %, après 8 h de réaction. Bien que les rendements et la vitesse de réaction aient été satisfaisants, notons que l'utilisation de la diméthylformamide et du chlorure de dodécyle représentent une contrainte d'un point de vue environnemental. Ceci montre clairement l'avantage de l'utilisation des lipases comme biocatalyseur dans ce type de synthèse et sous conditions de réaction douces.

IV.2.2. Lipophilisation d'autres acides et dérivés phénoliques

L'estérification enzymatique d'acides phénoliques a été étudiée par différents auteurs. Tout d'abord, Buisman *et al.* (1998) ont évalué deux stratégies d'estérification par des alcools gras. L'une s'inscrivait dans le prolongement du travail décrit par Guyot *et al.* (1997) concernant l'estérification d'acides cinnamiques, l'autre étude traitait des composés aromatiques comprenant des fonctions alcools primaires estérifiables par des acides aliphatiques.

En ce qui concerne les dérivés d'acides cinnamique et benzoïque, l'estérification a été testée avec le butanol, en présence de différentes lipases (*Candida antarctica* B, *Humicola lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas sp* et *Geotrichum candidum*). Pour toutes les enzymes testées, à l'exception de celle issue de *Candida antarctica* B, des rendements particulièrement faibles et n'excédant pas 3 % ont été observés. Par conséquent, la lipase de *Candida antarctica* B a été choisie pour les expériences suivantes et l'effet de la nature du solvant organique utilisé dans la réaction a été évalué. Dans les solvants apolaires tels l'heptane ou le cyclohexane, des conversions supérieures à 85 % ont été constatées en moins de 5 jours. En revanche, les cinétiques réactionnelles ont été extrêmement lentes avec des solvants plus polaires, comme le diéthyl éther, le *tert*-butylméthyl éther et le butanol. Les résultats fournis par Guyot *et al.* (1997) concernant l'estérification de l'acide benzoïque et de ses dérivés ont ainsi été confirmés dans cette étude, où aucune conversion des dérivés hydroxy- et méthoxy- n'a pu être observée. D'ailleurs, l'effet inhibiteur de la conjugaison des substituant donneurs d'électrons sur le groupe carboxylique a été de nouveau mis en évidence. Il est avancé que de tels effets

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

donneurs mésomères peuvent être responsables de la désactivation du carboxyle vis-à-vis de l'attaque nucléophile d'un alcool.

La seconde stratégie examinée par ces auteurs consiste à lipophiliser des phénols comportant des fonctions hydroxyles primaires sur le cycle aromatique. La lipase de *Candida antarctica* B a été employée pour l'estérification de l'hydroxytyrosol et de l'alcool 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylique (Figure 13).

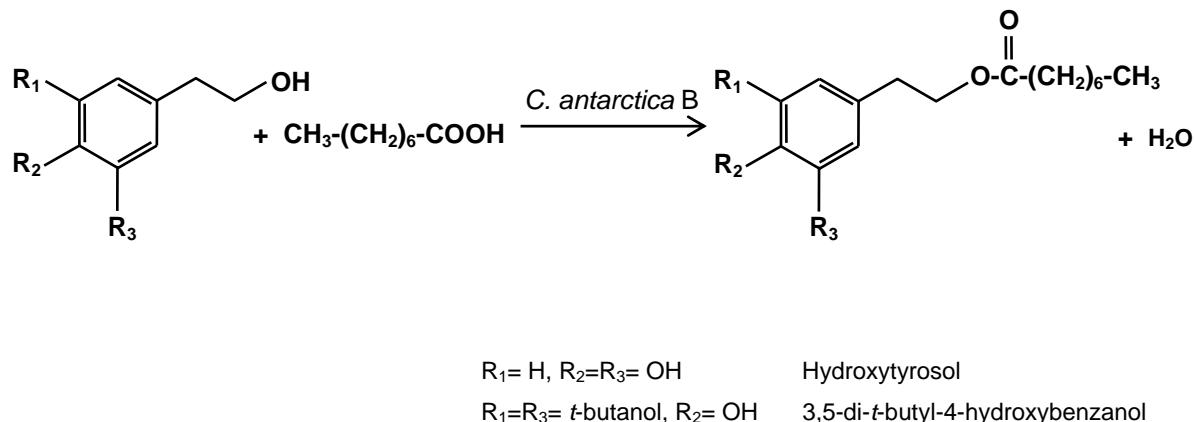


Figure 13. Estérification de l'hydroxytyrosol et du 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzanol par catalyse enzymatique en présence de lipase de *Candida antarctica* B. Adaptée de Buisman *et al.*, 1998.

L'estérification de l'hydroxytyrosol a été réalisée avec de l'acide octanoïque dans différents solvants. Dans le diéthyl éther, une conversion d'environ 85 % a été obtenue après 15 jours de réaction à 35°C. En revanche, dans les solvants plus polaires tels que le chloroforme, le dichlorométhane ou le tétrahydrofurane, des conversions proches de 20 % sont constatées. Avec l'heptane et l'hexane, la formation d'esters est de l'ordre de 70 à 80 %. Finalement, l'estérification complète du 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzanol, a été obtenue en moins de 2,5 h à 81°C dans le cyclohexane.

Afin d'améliorer les rendements et les vitesses de synthèse des dérivés lipophiles de l'hydroxytyrosol, Grasso *et al.* (2007) ont effectué la transestérification enzymatique de ce composé, mais également celle du 3-méthoxyl-4-hydroxyphényl éthanol en utilisant comme donneur d'acyles des esters vinyliques de différentes

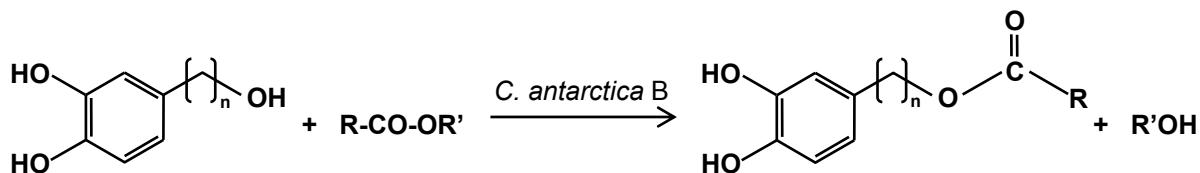
IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

longueurs de chaîne (C_2 , C_4 , C_{10} , C_{14}). Typiquement, leur milieu de réaction est constitué de 100 mg de lipase de *Candida antarctica*, 0,032 mmoles d'hydroxytyrosol ou de 3-méthoxyl-4hydroxyphénol éthanol, 0,64 mmol de l'ester vinylique et 1 mL de solvant (méthyl *tert*-butyl éther). Dans le cas de la transestérification de l'hydroxytyrosol, les auteurs ont obtenu des rendements compris entre 92 et 96 % après 35 à 180 min de réaction. De façon similaire, des rendements de 90 à 98 % sont obtenus après 60 à 240 min de réaction lors de la transestérification du 3-méthoxyl-4-hydroxyphénol éthanol.

En parallèle de la voie biocatalytique, Bernini *et al.* (2008) ont mis au point la synthèse chimique d'alkyl esters de l'hydroxytyrosol à partir du tyrosol ou du 3-méthoxyl-4-hydroxyphénol éthanol. Leur stratégie comporte une étape préliminaire de protection chimioselective de l'alcool secondaire par le diméthyle carbonate (DMC) suivie d'une acylation par un chlorure d'acide (C_2 , C_6 , C_{16} , $C_{18:1}$, $C_{18:2}$) Les esters du 3-méthoxyl-4-hydroxyphénol éthanol ainsi formés sont ensuite oxydés au moyen de l'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX), puis réduits *in situ* avec le dithionite de sodium ($Na_2S_2O_4$) pour conduire finalement aux alkyl esters de l'hydroxytyrosol. Cependant, malgré des rendements en esters relativement élevés (70-100 % pour les dérivés du 3-méthoxyl-4-hydroxyphénol éthanol et 62-88 % pour ceux de l'hydroxytyrosol), la transposition de cette synthèse à une échelle supérieure (pilote ou industrielle) reste très délicate en raison du caractère explosif de l'IBX. En outre, les rendements obtenus après 24 h, sont en moyenne inférieurs à ceux obtenus par catalyse enzymatique (Grasso *et al.*, 2007). Cet exemple illustre donc clairement les avantages de la synthèse enzymatique sur la synthèse chimique en termes de rendement, de sélectivité, d'économie d'étapes, de sécurité et de possibilité d'implémentation à plus grande échelle.

Dans le même esprit, Torres de Pinedo *et al.* (2005) ont travaillé sur la lipophilisation de catéchols portant un groupement alcool primaire aliphatic (Figure 14). La réaction de lipophilisation a été effectuée en 14 heures sous pression réduite (5-10 mmHg), à 37°C et en milieu « fondu », en utilisant comme catalyseur la lipase de *Candida antarctica B*.

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases



$n = 1$	Alcool 3,4-dihydroxybenzyllique	$R = \text{C}15, R' = \text{C}_2\text{H}_5$	Palmitate d'éthyle
$n = 2$	2-(3,4-dihydroxyphényl)-éthanol	$R = \text{C}17, R' = \text{C}_2\text{H}_5$	Stéarate d'éthyle
$n = 3$	3-(3,4-dihydroxyphényl)-propanol	$R = \text{C}17 : 1, R' = \text{C}_2\text{H}_5$	Oléate d'éthyle
$(=\text{CH=CH-CH}_2$	Alcool 3,4-dihydroxycinnamique	$R = \text{C}19:5, R' = \text{C}_2\text{H}_5$	Eicosapentaenoate d'éthyle
$\text{R} = \text{C}3, \text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5$	Butyrate d'éthyle	$R = \text{C}21:6, R' = \text{C}_2\text{H}_5$	Docosahexaenoate d'éthyle
$\text{R} = \text{C}15, \text{R}' = \text{H}$	Acide palmitique		

Figure 14. Estérification et transestérification d'alcools phénoliques avec des acides et des esters gras saturés et insaturés, par catalyse lipasique. Adaptée de Torres de Pinedo *et al.*, 2005.

Dans cette étude, les auteurs se sont particulièrement intéressés à l'influence de :

- la longueur et du degré d'insaturation de la chaîne latérale de l'alcool phénolique ;
- l'utilisation d'acides ou d'esters éthyliques comme donneurs d'acyles ;
- le degré d'insaturation du donneur d'acyle sur le rendement final de la réaction.

En ce qui concerne la chaîne latérale de l'alcool, lorsque cette dernière n'est pas conjuguée avec le noyau phénolique, des rendements d'estérification de l'ordre de 81-85 % sont obtenus avec l'acide palmitique. Lorsqu'il y a conjugaison, en revanche, une chute du rendement à 69-75 % est observée. Dans tous les cas, l'utilisation du palmitate d'éthyle au lieu de l'acide palmitique a permis d'augmenter les rendements finaux de la réaction, de 77,5 % à 91 % en moyenne. Finalement, ils ont noté que les rendements de transestérification avec des esters éthyliques d'acides gras insaturés et polyinsaturés étaient inversement proportionnels au degré d'insaturation.

Dans un travail plus récent et à l'inverse de Torres de Pinedo *et al.* (2005), Weitkamp *et al.* (2006) ont effectué les réactions de transestérification en partant des esters méthyliques et éthyliques des acides hydroxycinnamiques et

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

hydrocinnamiques. Dans leur approche, le milieu réactionnel est constitué d'un mélange équimolaire d'ester et d'alcool gras (C_{12} , C_{16} , $C_{18:1}$) et les réactions sont effectuées sous pression réduite à température modérée et en milieu « fondu ». De même que Torres de Pinedo *et al.* (2005), ils ont trouvé que l'activité enzymatique de transestérification de *Candida antarctica* B était jusqu'à 56 fois plus élevée que l'activité d'estérification. Par ailleurs, ils ont également confirmé que l'insaturation de la chaîne latérale des esters de l'acide hydroxycinnamique diminuait les rendements de transestérification. Finalement, il est possible de conclure que l'estérification préalable de l'alcool phénolique ou de l'agent acylant a le même effet sur les rendements de transestérification de ce type de composés.

De leur côté, Priya et Chadha (2003) ont évalué les potentialités de la lipase de *Pseudomonas cepacia* à catalyser la réaction de transestérification de dérivés cinnamates avec différents alcools (butanol, alcool benzylique, octanol et phénylethanol). Seul le butanol a permis de former le produit de transestérification. Afin d'optimiser la réaction, l'effet de la nature du solvant, en relation avec la valeur de log P, a été étudié. Il a été constaté que les solvants présentant une valeur élevée de log P, comme le cyclohexane, l'heptane ou l'hexane, fournissaient les meilleurs résultats. Dans tous les cas de figure, une conversion supérieure à 90 % a été obtenue en 48 h, l'éther diisopropylique et le toluène étant les solvants les plus appropriés pour ce type de réaction.

Stamatis *et al.* (1999) ont, quant à eux, évalué l'aptitude des lipases de *Candida antarctica* B et de *Rhizomucor miehei* à réaliser la synthèse de dérivés lipophiles d'antioxydants naturels issus de l'acide cinnamique. En premier lieu, l'estérification de l'acide cinnamique avec l'octanol a été choisie comme réaction modèle, avec les deux lipases immobilisées, dans différents solvants peu toxiques tels l'acétone, le 2-méthyl-2-propanol et le 2-méthyl-2-butanol. Il a été montré que le rendement de réaction était dépendant du solvant et de la lipase utilisée. Ainsi, avec la lipase de *Candida antarctica*, le cinnamate d'octyle est obtenu avec des rendements supérieurs à 80 %. En outre, les rendements étaient d'autant plus élevés que l'octanol était en large excès ce qui peut s'expliquer par une meilleure solubilisation de l'acide cinnamique dans le milieu réctionnel. L'estérification de l'acide cinnamique en absence de solvant a ensuite été testée, en employant des alcools primaires de

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

longueurs de chaîne différentes (C_4 à C_{10}) et il a pu être observé que la longueur de la chaîne aliphatique avait un effet significatif sur l'activité catalytique de la lipase. L'influence de la structure des acides phénoliques a également été étudiée au travers de l'estérification par l'octanol de dérivés hydroxylés ou méthoxylés de l'acide cinnamique, mais également d'acides hydroxybenzoïques et phénylacétiques. Les auteurs ont montré que les dérivés d'acides cinnamique ou benzoïque comportant un hydroxyle aromatique en *ortho* ou *para*, inhibaient l'action catalytique des deux lipases. En revanche, lorsque la chaîne carboxylique était saturée (acide *para*-hydroxyphénylacétique), l'hydroxylation en *para* n'exerçait aucun effet sur la lipase. Ainsi, ce travail confirme à nouveau, ce qui avait été précédemment observé par Guyot *et al.* (1997) puis par Buisman *et al.* (1998).

Afin de contourner ces limitations, Giuliani *et al.* (2001) ont étudié la synthèse du férulate de pentyle dans un environnement microémulsionné, en utilisant comme biocatalyseur une feruloyl esterase d'*Aspergillus niger* (FEAN). Dans leur système réactionnel, l'enzyme est solubilisée dans une microémulsion (céthyltriméthyleammoniumbromide (CTAB)/hexane/pentanol) tandis que l'acide férulique est solubilisé dans une solution tampon de pH 6. La mise en contact de la microémulsion et de l'acide férulique s'effectue en gardant un contrôle strict de la relation molaire de l'eau au surfactant (W_0), un grand excès d'eau pouvant favoriser la réaction d'hydrolyse. Les meilleurs résultats d'estérification (60 % de rendement) ont été obtenus après 8 h dans un système caractérisé par une valeur de W_0 de 10. Les auteurs suggèrent que les meilleurs rendements sont probablement dus à une plus haute concentration de l'alcool dans l'environnement proche de l'enzyme et à une conformation structurale plus active de l'enzyme. De plus, il est également probable que l'interface créée par l'émulsifiant contribue au contrôle de la quantité d'acide férulique en contact avec l'enzyme, limitant de cette façon le phénomène de désactivation décrit par Guyot *et al.* (1997) et Buisman *et al.* (1998).

Plus récemment, Vafiadi *et al.* (2008) ont immobilisé la feruloyl estérase d'*Aspergillus niger* par réticulation et précipitation au glutaraldéhyde, leur l'objectif étant une augmentation de l'activité catalytique et une meilleure séparation de l'enzyme en vue de sa réutilisation. L'activité de l'enzyme « immobilisée » a été évaluée dans des réactions de transestérification entre le butanol et des esters

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

méthyliques d'acides férulique, coumarique, caféïque et sinapique, en système ternaire (comme dans le cas décrit par Giuliani *et al.*, 2001). En conditions optimales, c'est-à-dire : (i) 0,25 mmol d'ester méthylique de l'acide considéré, (ii) 80 mg d'enzyme immobilisée, (iii) une température de réaction de 35°C et finalement (iv) un système ternaire n-hexane/1-butanol/eau (47,2/50,8/2 v/v/v), les esters butyliques des acides sinapique et férulique ont été obtenus avec des rendements de 78 et 42 % respectivement, tandis que les rendements en esters butyliques des acides *p*-coumarique et caféïque ont été inférieurs à 2 %. Les faibles rendements obtenus dans les deux derniers cas peuvent être attribués au fait que les auteurs ont utilisé des conditions réactionnelles optimisées pour la transesterification du sinapate de méthyle. Par conséquent, il est vraisemblable qu'un autre jeu de paramètres pourrait conduire à de meilleurs rendements de synthèses pour les autres esters. Cette hypothèse s'appuie sur le travail de Giulani *et al.* (2001), qui ont utilisé la même enzyme sous forme libre et qui ont obtenu un meilleur rendement dans la synthèse du férulate de pentyle.

D'autres équipes ont également travaillé à la synthèse biocatalysée d'esters féruliques. Par exemple, Compton *et al.* (2000) ont utilisé la lipase de *Candida antarctica* B pour la synthèse du férulate d'octyle, soit par estéification directe en milieu 2-méthyl-2-propanol, soit par alcoolysé du férulate d'éthyle dans l'octanol. Ces auteurs ont étendu le procédé au greffage de l'acide férulique sur des triacylglycérols, avec un rendement de 77 % en férulate de mono- ou dioléine. Récemment, de manière identique, une équipe canadienne a également travaillé sur le greffage direct d'acides phénoliques sur des triacylglycérols. Ainsi l'acide dihydrocaféïque a été transestérifié tout d'abord par la trilinoléine ou la trilinolénine (Sabally *et al.*, 2006 a), puis par de l'huile de lin (Sabally *et al.*, 2006 b), avec obtention de différents mélanges de mono et diacylglycérols phénoliques suivant les paramètres réactionnels choisis (rapport des substrats, milieu réactionnel : hexane/butanone).

La modification enzymatique de l'acide férulique avec des stéroïdes hydroxylés a été étudiée très récemment par Chigorimbo-Murefu *et al.* (2008) selon une stratégie en deux étapes : (i) transestérification de l'acide férulique avec l'acétate de vinyle en présence d'acétate de mercure, puis (ii) transestérification du férulate de

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

vinyle obtenu avec les hydroxystéroïdes dans une réaction catalysée par des enzymes de *Candida antarctica* B, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* et *Pseudomonas* sp (Figure 15).

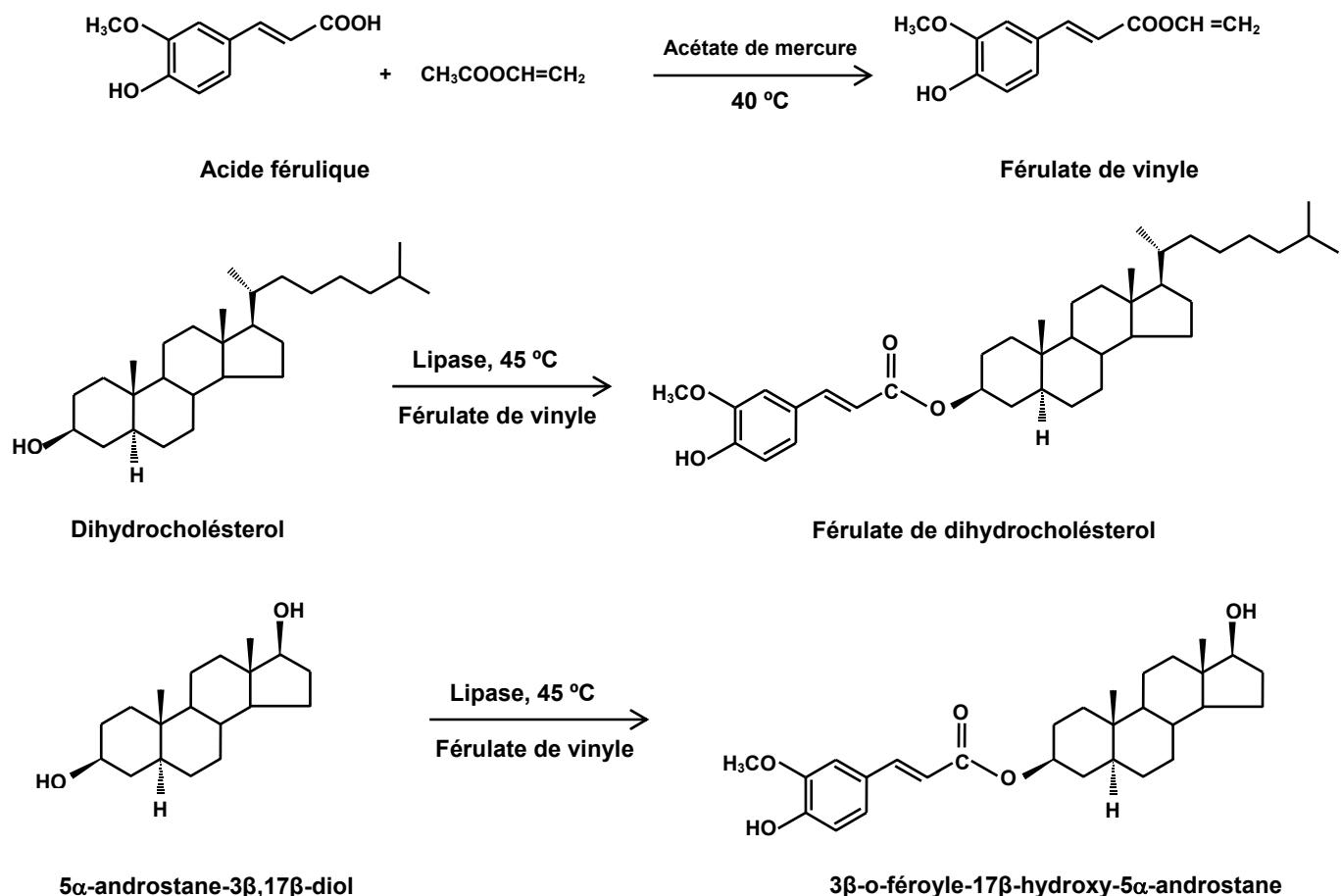


Figure 15. Transestérification régiosélective de l'acide férulique avec des hydroxystéroïdes, catalysée par voie chimio-enzymatique. Adaptée de Chigorimbo-Murefu *et al.* (2008).

Lors de la première étape, le férule de vinyle est obtenu avec un rendement de 45 %. Pour ce qui est de la deuxième étape, les auteurs ont étudié dans un premier temps la faisabilité de la synthèse en présence de l'enzyme la plus couramment employé pour ce type de réactions : la lipase de *Candida antarctica* B. Ils ont alors évalué, avec succès, la capacité de cette lipase à catalyser la réaction de transestérification de l'acétate de vinyle avec le dihydrocholesterol. Ils ont ensuite remplacé l'acétate de vinyle par le férule de vinyle et ont constaté, dans ce cas, que la réaction de transesterification ne se produisait pas. Ils ont conclu un effet

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

d'encombrement stérique, rendant difficile l'accès simultané des substrats au site catalytique de la lipase. Afin de contourner cette difficulté, les auteurs ont testé d'autres lipases, notamment celles de *Candida rugosa*, de *Chromobacterium viscosum* et de *Pseudomonas* sp, dans la réaction de transesterification du férulate de vinyle avec de dihydrocholestérol et le 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol. Finalement, la lipase de *Candida rugosa* s'est avérée la plus efficace avec des rendements d'estérfication de 56 % pour le dihydrocholestérol et de 44 % pour le 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol.

IV.2.3 Lipophilisation par voie enzymatique de flavonoïdes glycosylés

Les flavonoïdes, molécules attractives en raison de leurs fortes propriétés antioxydantes, sont présents dans différents fruits, légumes, épices ou herbes (Kandaswami et Middleton 1997 ; Tableau 2 et Figure 2). Il semble toutefois que la nature hydrophile de ces antioxydants réduit leur capacité à protéger les huiles et les graisses contre les processus oxydatifs. Certains exemples traitant de l'utilisation des lipases pour la lipophilisation de ces molécules sont décrits par la suite. Ainsi, l'acylation enzymatique de la naringine (naringénine-2-o-rhamnosylglucose) et de la rutine (quercétine-3-o-rhamnosylglucose) avec des acides gras à chaînes moyennes (C₈, C₁₀, C₁₂) a été réalisée par Kontogianni *et al.* (2001, 2003) en présence de lipase de *Candida antarctica* B (Figure 16). Dans cette étude, l'influence de divers paramètres réactionnels sur l'activité de l'enzyme a été évaluée, notamment la toxicité du solvant. Avec l'acide octanoïque, les taux de conversion les plus élevés ont été observés dans l'acétone, tandis que pour les acides décanoïque et dodécanoïque, le *tert*-butanol s'est avéré être le meilleur solvant. Quant au tétrahydrofurane il n'a donné satisfaction dans aucun des cas.

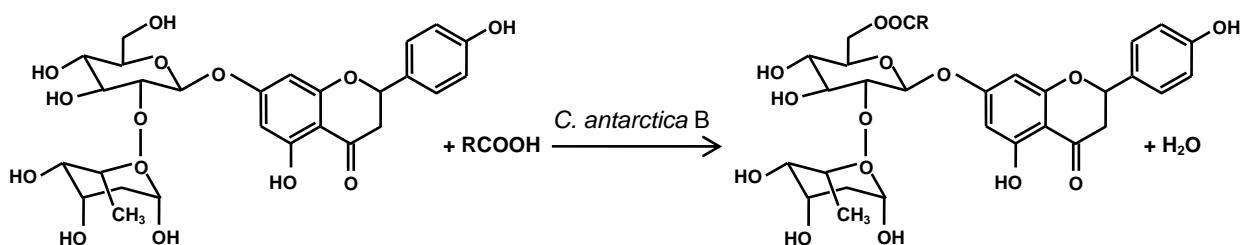


Figure 16. Acylation régiosélective de la naringine avec des acides gras (R = 7, 9 et 11).

Adaptée de Kontogianni *et al.*, 2003.

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

En outre, la caractérisation des produits par différentes techniques analytiques démontre clairement que l'acylation s'est effectuée de manière hautement régiosélective. En effet, le seul produit formé correspond à l'estérification de l'unique fonction hydroxyle primaire de la naringine. L'effet de l' a_w du milieu réactionnel a également été évalué dans le *tert*-butanol où les conversions les plus élevées ont été observées pour des valeurs d' a_w , inférieures ou égales à 0,11. Une autre étude s'est intéressée à l'estérification de ces flavonoïdes glycosylés par des acides gras à plus longues chaînes tel l'acide palmitique (Gayot *et al.*, 2003). Dans ce cas, un rendement d'environ 43 % en naringine 6-O-palmitate est obtenu après 55 h de réaction dans le 2-méthyl-2-butanol.

Dans leurs travaux, Enaud *et al.* (2004) ont utilisé la lipase de *Candida antarctica* pour l'acylation régiosélective du groupe hydroxyle primaire porté par le motif glycoside d'un flavonoïde appartenant à la famille des dihydrochalcones, la phloridzine. La transestérification est effectuée en milieu fondu avec des esters méthyliques d'acides cinnamique, benzoïque, salicilique, *p*-hydroxylphénylacétique et *p*-hydroxyphénylpropionique, dont le large l'excès assure la solvatation du système. Lors d'une première étape, la faisabilité de la réaction puis l'optimisation des paramètres réactionnels ont été réalisées au travers de la réaction de transestérification du flavonoïde avec le cinnamate d'éthyle. La synthèse complète du cinnamate de phloridzine a été obtenue après 4 h de réaction à 80°C sous vide (200 mbar), dans un milieu à 10 mM de phloridzine et 20 mg/mL d'enzyme. Ces paramètres réactionnels ont été appliqués à la synthèse du benzoate et du salicilate de phloridzine avec des rendements de 100 %, après 6 h de réaction. En ce qui concerne les synthèses avec les esters méthyliques des acides *p*-hydroxylphénylacétique et *p*-hydroxyphénylpropionique, seules des traces ont été obtenues après 10 jours de réaction. Dans ce derniers cas, les auteurs ont attribué ce rendement quasi nul à la très faible solubilité de la phloridzine dans ce type d'esters.

Plus récemment, la même équipe de recherche (Chebil *et al.*, 2007) a travaillé sur l'acétylation de flavonoïdes aglycones (quercétine, naringénine, hespéritine et chrysine) et glycosides (isoquercétine). Comme dans le cas de la phloridzine, les auteurs ont procédé par étapes afin d'optimiser les paramètres de la réaction et

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

conduire aux meilleures vitesses et rendements. Ils ont tout d'abord testé différents donneurs d'acyles (acide palmitique et esters vinyliques des acides acétique, propionique, butyrique et palmitique) en utilisant comme biocatalyseur la lipase de *Pseudomonas cepacia*. Ils ont alors observé que seuls les esters vinyliques étaient réactifs, et tout particulièrement l'acétate de vinyle qui a fait l'objet de leur choix. Dans la suite de l'étude, les auteurs se sont alors intéressés à l'influence (i) de l'origine de la lipase, (ii) de la nature du solvant, (iii) du ratio molaire des substrats et (iv) de la nature du flavonoïde utilisé.

Les meilleures conditions ont été obtenues lors de l'acétylation enzymatique de la quercétine (20 mM) et de l'isoquercétine (30 mM) dans l'acétonitrile, à une température de 50°C et avec un large excès d'acétate de vinyle d'environ 40 équivalents. Dans ces conditions, les auteurs ont testé l'efficacité des lipases de *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia* afin de catalyser l'acétylation des molécules mentionnées ci-dessous (Figure 17).

En ce qui concerne l'acétylation de la quercétine, la lipase de *Pseudomonas cepacia* a conduit à une conversion de 96 % après 96 h de réaction, tandis qu'avec la lipase *Candida antarctica* B aucun produit n'a été détecté.

Dans le cas de l'isoquercétine en revanche, une conversion 100 % a été observée avec les deux lipases, la principale différence se situant au niveau des temps de réaction, 24 h avec la lipase de *Pseudomonas cepacia* et 96 h avec celle de *Candida antarctica*. Par ailleurs, quel que soit le flavonoïde (quercétine ou isoquercétine) et les conditions réactionnelles mises en jeu, un mélange de mono-, di- et triesters est toujours obtenu (Figure 17). Finalement, la même procédure a été appliquée à l'acétylation de la naringénine, de l'hespérifine et de la chrysine, pour lesquelles les conversions ont été respectivement de 100 %, 30 % et 15 % après 96 h de réaction. Comme dans le cas de l'isoquercetine, les produits finaux sont un mélange de mono- et de diacétates.

IV. Stratégie de synthèse pour les réactions de lipophilisation biocatalysées par des lipases

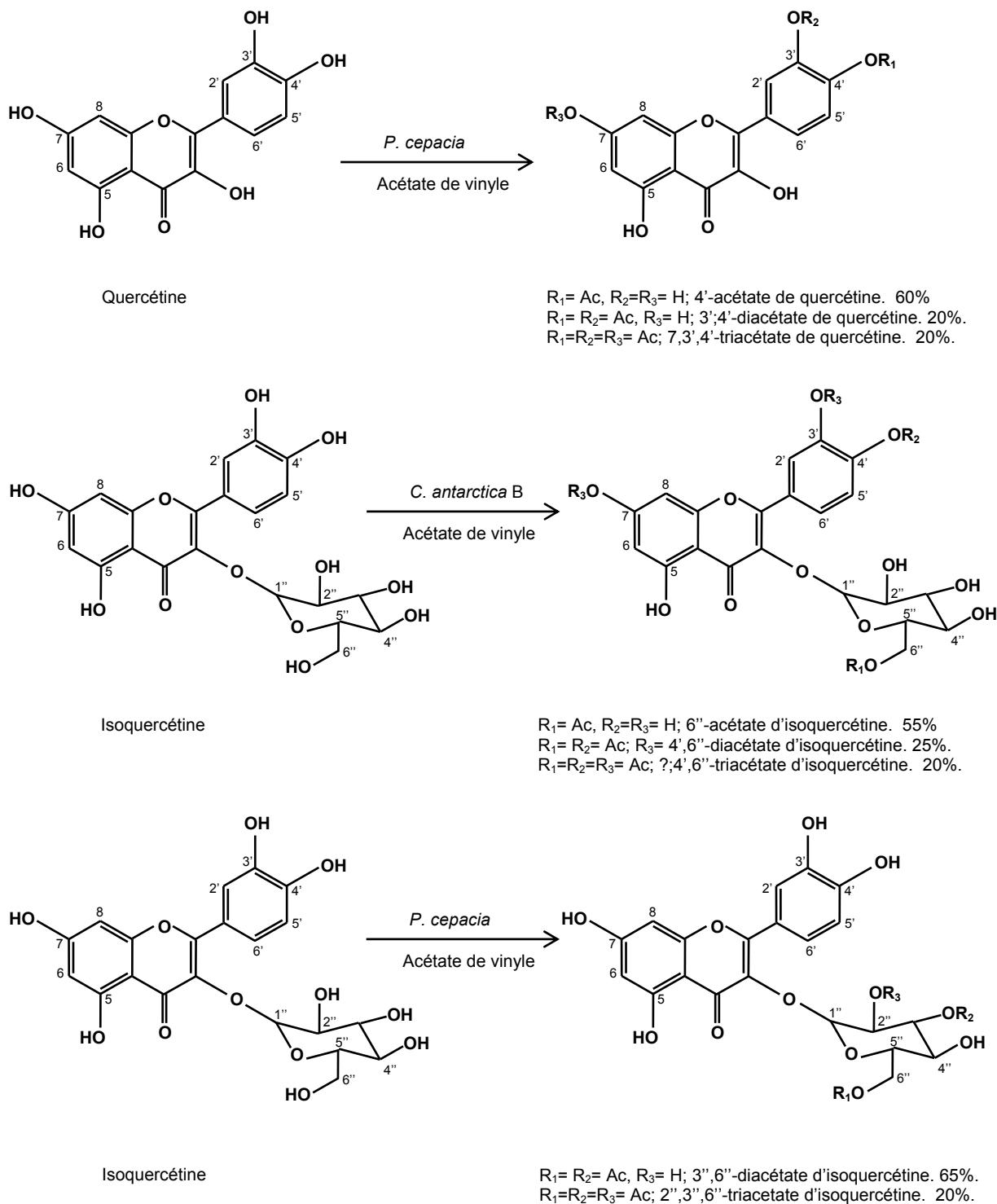


Figure 17. Acétylation enzymatique de la quercétine et de l'isoquercétine en utilisant comme biocatalyseur les lipases de *Candida antarctica B* et *Pseudomonas cepacia*. Adaptée de Chebil et al. (2007).

V. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques lipophilisés

Les composés phénoliques présentent un fort potentiel antiradicalaire, d'une part en raison de leur capacité à céder un atome d'hydrogène (proton et électron) à un radical libre et d'autre part, grâce à la bonne stabilité du radical phénoxyle ainsi formé. Il existe un nombre considérable d'études traitant des effets antioxydants de composés phénoliques purifiés ou de différents extraits végétaux riches en ces substances. En revanche, malgré de considérables efforts (Figueroa-Espinoza et Villeneuve, 2005), la connaissance du pouvoir antioxydant des composés phénoliques lipophilisés demeure parcellaire et leur valorisation limitée.

Concernant les acides phénoliques simples, Sabally *et al.* (2006 a, b) ont utilisé la méthode DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) pour évaluer le pouvoir antiradicalaire de l'acide dihydrocaféïque estérifié par des triacylglycérols de type trilinoléine, trilinolénine ou triacylglycérols de l'huile de lin. S'il apparaît que ces molécules expriment globalement une bonne activité antiradicalaire, il est toutefois à noter que le greffage de l'acide dihydrocaféïque sur une matrice triglycéridique ne permet pas d'améliorer l'activité antiradicalaire par rapport à la molécule de départ. Les auteurs attribuent cette perte d'activité à un changement conformationnel de l'acide. Par ailleurs, cette même équipe a constaté que l'estérification directe d'alcools gras linoléique ou linolénique sur l'acide dihydrocaféïque induit également une perte de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH[•] (Sabally *et al.*, 2005 a, b). Cependant, le fait que les molécules lipophilisées par des alcools gras présentent une meilleure activité antiradicalaire que celles obtenues par greffage de triacylglycérols, permet aux auteurs de conclure que la nature des chaînes aliphatiques greffées est de prime importance quant à l'activité antiradicalaire. En effet, il semblerait qu'un groupement lipophile de fort encombrement stérique limite la rotation de la chaîne latérale de l'acide phénolique lipophilisé, ce qui s'accompagnerait d'une baisse de l'activité antiradicalaire.

Amselmi *et al.* (2004) ont quant à eux, mené une étude plus complète de l'activité antioxydante de molécules lipophilisées de type alkyl férulates en solution aqueuse (Test ORAC, oxygen radical absorbance capacity) et alcoolique (Test DPPH[•]), ainsi qu'en suspension de microsomes pour lesquelles l'activité antioxydante

V. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques lipophilisés

a été mesurée par la méthode TBARS (Substances réactives à l'acide thiobarbiturique) (Figure 18, Tableau 4).

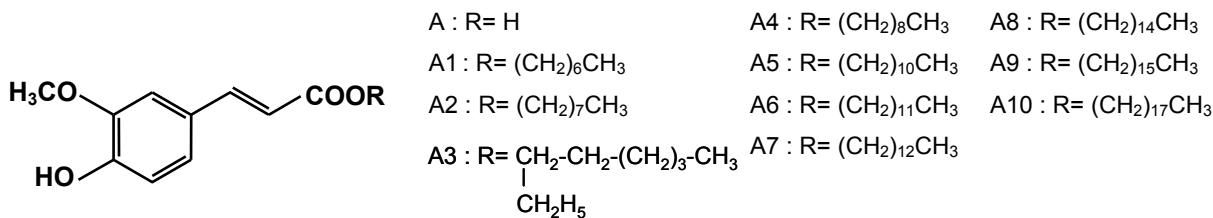


Figure 18. Structure chimique de l'acide férulique et de ses dérivés lipophiles.
Adapté d'Anselmi *et al.* (2004).

Concernant la synthèse, des chaînes grasses de structure linéaire ou ramifiée et comprenant six à dix huit atomes de carbone ont été testées. Les auteurs constatent que la lipophilisation ne modifie pas significativement le pouvoir antioxydant en milieu polaire (tests DPPH[•] et ORAC) et concluent, par conséquent, que la nature de la chaîne latérale n'exerce aucune influence vis-à-vis des interactions structurales en lien avec l'activité antiradicalaire.

Tableau 4. Capacités antioxydantes de dérivés lipophiles de l'acide férulique (Anselmi *et al.*, 2004)

Composé	DPPH ^a	ORAC ^b	TBARS ^c
A	21,98 ± 2,13	31,10 ± 2,15	250,11
A1	22,66 ± 1,57	28,60 ± 1,62	27,54
A2	22,94 ± 1,38	29,99 ± 2,19	12,40
A3	25,53 ± 1,68	28,85 ± 1,80	33,16
A4	24,64 ± 1,89	28,46 ± 2,22	19,74
A5	21,33 ± 2,82	28,31 ± 1,88	31,61
A6	26,62 ± 2,57	26,99 ± 1,95	11,03
A7	25,60 ± 1,25	28,57 ± 3,13	18,64
A8	24,93 ± 1,63	28,80 ± 2,73	30,45
A9	25,47 ± 1,35	28,46 ± 0,68	40,79
A10	24,97 ± 1,95	30,67 ± 1,14	49,78

^a Exprimé en IC₅₀ (μM) ; solution méthanolique du DPPH[•] (50 μM) ; antioxydants (5-50 μM). ^b Exprimé en équivalents Trolox (μM) ; solution aqueuse de R-phycoérythrine (16,7 nM dans tampon phosphate) ; initiateur 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (3 mg/ml) ; antioxydants (5-50 μM). ^c Exprimé en IC₅₀ (μM) ; suspension aqueuse (tampon phosphate) de microsomes de foie de rat (concentration inconnue) ; initiateur Fe⁺³/acide ascorbique (1,5 μM) ; antioxydant (5-50 μM).

V. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques lipophilisés

En revanche, une forte amélioration du pouvoir antioxydant des molécules lipophilisées par rapport aux molécules initiales a été observée en suspension microsomiale. De manière surprenante, les auteurs n'attribuent pas ce phénomène à la différence de polarité des molécules - mesurée expérimentalement par le log P - mais plutôt à une interaction entre molécule lipophilisée et membrane phospholipidique qui dépend de la nature de la chaîne aliphatique greffée. Pour étayer cette hypothèse, les auteurs ont fait appel à la RMN et aux outils de modélisation pour caractériser ces interactions. Les résultats montrent que la liaison avec la membrane phospholipidique est plus stable, d'une part, quand la chaîne latérale de la molécule présente une flexibilité élevée et d'autre part, lorsque la stabilité du champ conformationnel est maximal (énergie de liaison minimale), ce qui a bien été démontré pour la chaîne en C₁₂.

L'activité antioxydante de l'acide 3,4-dihydroxymandélique lipophilisé par des amines aliphatiques (6 à 8 carbones, linéaires ou ramifiée) a été évaluée (Ley et Bertram, 2003) par différentes stratégies de mesure, notamment (*i*) le test DPPH[•], (*ii*) le test d'activité de piégeur d'anions superoxydes et (*iii*) la méthode de co-oxydation de l'acide linoléique et du β-carotène (Tableau 5, Figure 19).

Tableau 5. Capacité antioxydante de dérivés lipophiles de l'acide 3,4-dihydroxymandélique, déterminée au moyen de trois méthodes courantes (Ley et Bertram, 2003).

Composés	DPPH ^a	Anion Superoxyde ^b	β-Carotène ^c
B ^d	0,062 ± 0,005	130	0,77 ± 0,04
B1 ^d	0,120 ± 0,004	220 ± 70	0,38 ± 0,12
B2 ^d	0,112 ± 0,004	64 ± 34	n.d.
B3 ^d	0,090 ± 0,009	n.d.	0,19 ± 0,08
B4 ^d	0,116 ± 0,001	580 ± 130	0,27 ± 0,03

^a Exprimé en EC₅₀ (mol/mol). ^b Exprimé en IC₅₀ (nM). ^c Exprimé en IC₅₀ (mM). n.d. non déterminé.

^d B à B4 voir figure 19.

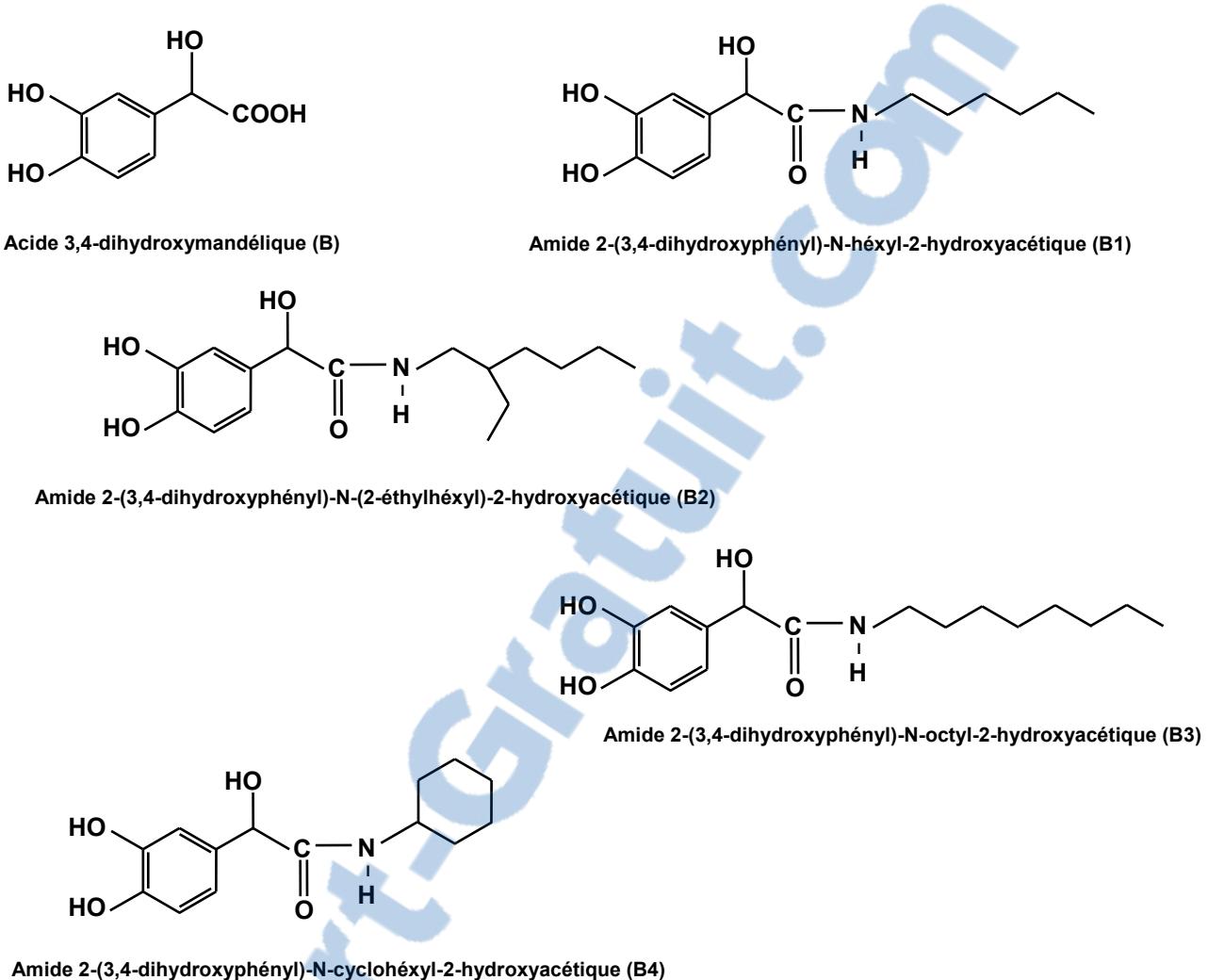


Figure 19. Structure chimique de l'acide 3,4-dihydroxymandélique et de ses dérivés lipophiles. Adaptée de Ley et Bertram (2003).

En premier lieu, il a été observé que l'acide 3,4-dihydromandélique, qu'il soit lipophilisé ou pas, exerçait une plus grande activité antioxydante que l'acide ascorbique, l'a-tocophérol, le butylhydroxyanisol (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), qui sont des antioxydants de référence. Les résultats concernant l'influence de la lipophilisation sur l'activité antioxydante sont en revanche plus mitigés.

Pour le test DPPH[•], toutes les molécules lipophilisées ont vu leur activité antiradicalaire diminuée. A l'opposé, une amélioration de la capacité à piéger l'anion superoxyde a été mise en évidence uniquement avec le dérivé à chaîne ramifiée (B2). Enfin, en système émulsionné (acide linoléique/β-carotène), il a été constaté

V. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques lipophilisés

que plus la chaîne grasse greffée était longue, plus le pouvoir antioxydant augmentait par rapport à l'acide phénolique initial. Ce résultat montre clairement que les antioxydants lipophilisés protègent mieux le substrat lipidique que l'acide 3,4-dihydroxymandélique, en raison vraisemblablement d'une meilleure localisation au niveau du « site d'oxydation » c'est-à-dire à l'interface des compartiments aqueux et lipidique.

Enfin, citons une étude visant à déterminer les effets de la lipophilisation de l'hydroxytyrosol par des chaînes aliphatiques de type acétate, palmitate, oléate et linoléate (Trujillo *et al.*, 2006) (Figure 20, Tableau 6).

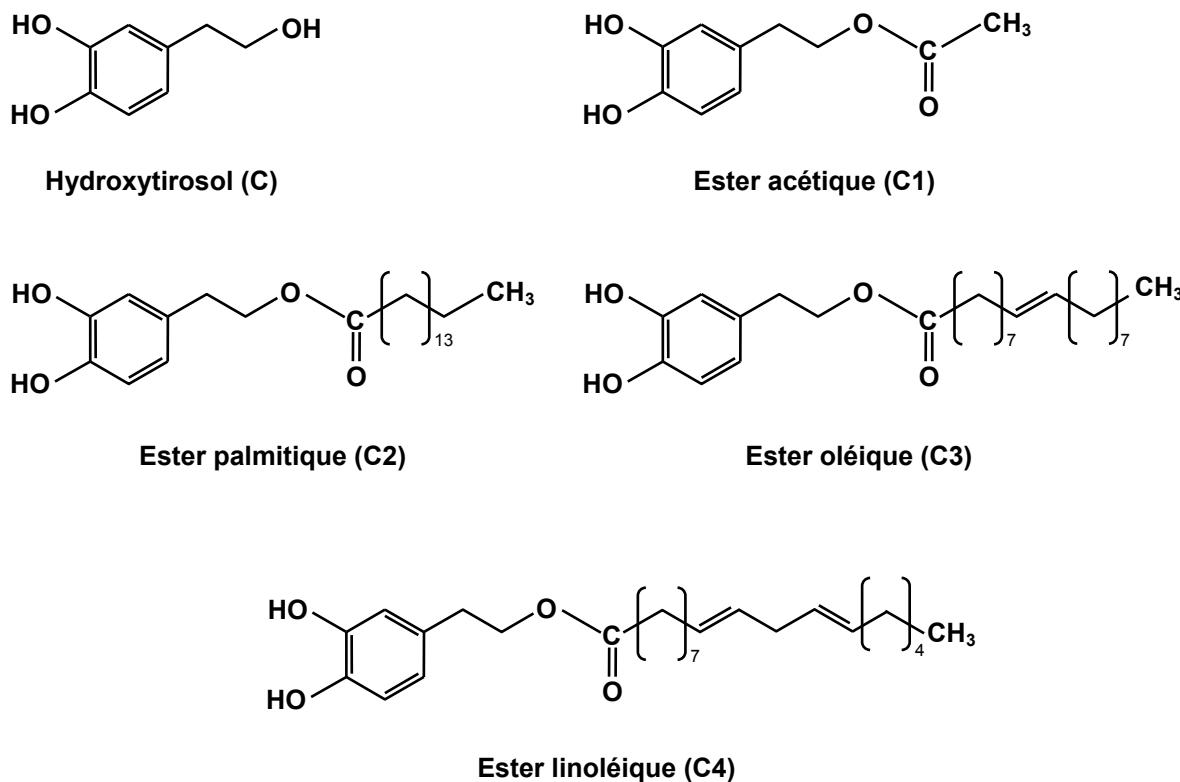


Figure 19. Structure chimique de l'hydroxytyrosol et de ses dérivés lipophiles (Trujillo *et al.*, 2006).

Les résultats montrent que la lipophilisation induit une augmentation de l'activité antioxydante vis-à-vis des lipides en système biologique modèle (tissus de cerveaux de rats).

Tableau 6. Capacité antioxydante l'hydroxytyrosol et de ses dérivés lipophiles par la méthode TBARS (Trujillo *et al.*, 2006).

Composé	TBARS ^a
Témoin	100
C ^b	52
C1 ^b	60
C2 ^b	46
C3 ^b	48
C4 ^b	30

^a Quantité (en %) d'aldéhyde malonique produit en présence (C, C1-C4) ou en absence (Témoin) de 5 mM d'antioxydant. ^b C à C4 voir figure 19.

Concernant les flavonoïdes, un certain nombre de travaux récents, permettent de mieux comprendre l'influence de la lipophilisation sur le comportement antioxydatif des molécules formées. A titre d'exemple, nous citerons simplement Mellou *et al.* (2005) qui ont synthétisé les esters lauriques de deux flavonoïdes glycosylés et mesuré l'effet de la lipophilisation sur l'oxydation du LDL. Il est apparu que les molécules hydrophobées protégeaient mieux les lipoprotéines que leurs homologues non modifiés. Les auteurs attribuent principalement cet effet à une diminution de la polarité des molécules acylées, avec pour conséquence une meilleure localisation de l'antioxydant au sein de la suspension. Néanmoins, il n'est pas exclu que l'amélioration des propriétés antioxydantes soit relayée de manière complémentaire par d'autres mécanismes.

En conclusion on peut dire que les lipases sont des enzymes qui peuvent être employées dans une large gamme de réactions biocatalysées. Elles peuvent bien souvent être considérées comme plus avantageuses que les catalyseurs chimiques classiques, dans la mesure où leur utilisation permet d'opérer de manière régiosélective dans des conditions réactionnelles douces. Il semble en particulier qu'elles soient bien adaptées à lipophilisation de composés hydrophiles. Dans de telles réactions, différents paramètres et stratégies peuvent être adoptés, dans le but d'améliorer les cinétiques et les rendements réactionnels. Récemment, de nouvelles applications des lipases ont été décrites pour modifier des composés naturels tels

V. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques lipophilisés

que les acides phénoliques et les flavonoïdes. Ces réactions biocatalysées ont pour objectif principal de moduler la balance hydrophile/lipophile de molécules initialement hydrophiles pour conférer aux nouveaux produits des propriétés multifonctionnelles combinant par exemple des activités antioxydantes et émulsifiantes. Se pose alors la question de l'efficacité antioxydante réelle des composés lipophilisés et des outils nécessaires à leur évaluation. Or, dans ce domaine, la diversité des molécules à analyser a conduit à l'utilisation de nombreux tests d'activité antioxydante, aucun d'entre eux ne présentant malheureusement un caractère universel. Cependant, malgré la disparité des résultats obtenus, il apparaît que les molécules lipophilisées soient plus actives en émulsions et en suspension lipidique que les molécules initiales. Bien évidemment, de nombreux travaux devront encore être entrepris pour espérer une application de ces réactions biocatalysées à l'échelle industrielle, ainsi qu'une valorisation des molécules à des fins nutritionnelles, cosmétiques ou autres. A long terme, les rendements réactionnels et la performance des enzymes devront notamment être améliorés. La lipophilisation biocatalysée de composés phénoliques est donc indubitablement amenée à progresser puisqu'elle permet l'obtention de biomolécules hautement spécifiques, à forte valeur ajoutée et très souvent multifonctionnelles.

Cependant, compte tenu de la grande diversité des composés phénoliques présents dans les végétaux, il est très difficile sinon impossible d'en faire l'étude exhaustive, du moins pour ce qui est de leur lipophilisation et de leur l'impact sur les propriétés résultantes.

Par conséquent, dans ce travail de thèse, nous avons volontairement focalisé notre attention sur deux composés modèles : l'acide chlorogénique et l'acide rosmarinique, ce choix étant orienté notamment par (i) la relative méconnaissance de la réactivité de ces molécules en milieu « fondu » (ii) le fort pouvoir antioxydant que leur confère la présence de structures de type catéchol (*ortho* diphénol) (iii) la grande diversité des sources et l'abondance naturelle de ces composés et enfin, (iv) la méconnaissance de l'effet de la lipophilisation sur l'efficacité de leur action antioxydante.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels

Les réactifs utilisés dans ce travail expérimental, ainsi que leurs références sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 7. Réactifs employés (Sigma Aldrich, France).

Composés	Référence	Composés	Référence
AAPH	440914	Ether diéthylique	0440528
Acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique)	C3878	Hexadécanol	258741
Acétate d'éthyle	319902	Hexane	52765
Acétate de potassium	236497	Huile de tung	440337
Acétonitrile	00687	Huile de tournesol	47123
Acide chlorhydrique	320331	Méthanol	525102
Acide formique	06450	Hydroxyde de sodium	S8881
Acide phosphorique	215104	Nitrate de magnésium	23717
Acide rosmarinique	536954	Octadécanol	74720
Alumine	06290	Eicosanol	23494
Amberlite® IR 120 H	216534	Octanol	297887
Brij 35®	P1254	Phénolphthaléine	105945
Butanol	281549	Silice	288624
<i>Candida antarctica</i> B (Novozyme 435)	L4777	PBS	319252
Chloroforme	438603	Sulfate de cuivre	C2857
Chlorure d'acétyle	00990	Sulfate de sodium	71961
Chlorure de magnésium	63063	Tamis moléculaire	69834
Dodécanol	443816	Toluène	412642
DPPH*	D9132	Tris-HCl 1 M, pH 8	43529
EDTA	03610	Trolox®	56510

II. Méthodes

II.1. Synthèse chimique des esters méthyliques des acides chlorogénique et rosmarinique

Dans un ballon à fond plat et à l'abri de la lumière, 10 mmol d'acide (chlorogénique ou rosmarinique) sont dissous dans 240 mL de méthanol. Après solubilisation complète, 10 g de catalyseur (Amberlite® IR 120 H), préalablement séché à 110°C pendant 48 h, sont ajoutés dans le milieu, afin de développer la réaction d'esterification par l'intermédiaire de la catalyse acide. Le milieu réactionnel est incubé à 55°C sous agitation orbitale (250 rpm). La réaction est suivie qualitativement et quantitativement par les méthodes décrites ci-dessous, puis arrêtée en retirant le catalyseur du milieu de réaction par filtration sur un filtre en microfibres de verre de 1,6 µm (Whatman international Ltd., Maidston, Angleterre). Le filtrat est ensuite évaporé à 40°C sous vide (40 mmHg) à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis 150 mL de chloroforme sont ajoutés. Ce milieu organique est alors filtré à nouveau en présence de sulfate de sodium, afin d'éliminer les traces d'eau éventuelles puis évaporé à 40°C sous vide (40 mmHg). Un solide jaune est alors obtenu dont la pureté est vérifiée par CLHP (section II.3).

Les rendements finaux obtenus sont de 95 % et 98,5 % respectivement pour les acides chlorogénique et rosmarinique.

II.2. Suivi qualitatif des synthèses des esters des acides chlorogénique et rosmarinique par chromatographie sur couche mince (CCM)

Il s'agit de réaliser une CCM qualitative afin d'identifier les différents substrats et produits synthétisés. L'échantillon est dilué 50 fois dans du méthanol et déposé sur la plaque de silice (référence 1.05719.0001, Merck, Strasbourg, France) à l'aide d'un déposeur automatique CAMAG Linomat IV (Voiron, France). Le volume de dépôt (20 à 30 µL) varie en fonction de l'échantillon à analyser. La ligne de dépôt est placée à 1 cm du bord inférieur de la plaque. Le système de développement utilisé est la chromatographie ascendante, par laquelle la plaque est placée en position verticale dans une cuve saturée en vapeurs de solvant qui l'imprègne progressivement par capillarité. Le solvant d'élution utilisé est un mélange toluène/acétate d'éthyle/acide formique (50 : 40 : 10, v/v/v). Lorsque le front de l'éluant se situe à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, celle-ci est retirée de la cuve, puis séchée. Elle

est alors révélée par pulvérisation d'une solution saturée de sulfate de cuivre/acide phosphorique (50 : 50, v/v,) puis placée à l'étuve à 180°C pendant 10 min.

II.3. Suivi quantitatif des synthèses des esters des acides chlorogénique et rosmarinique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Préalablement, nous préparons une gamme d'étalons des acides chlorogénique et rosmarinique, ainsi que de leurs esters, dans du méthanol, afin de déterminer leur concentration dans les milieux réactionnels. Les étalons, ainsi que les échantillons stockés au congélateur à -18°C, sont analysés en CLHP. L'appareil utilisé est une chaîne chromatographique Dionex U3000 (Jouy En Josas, France). Les solvants d'élution sont le méthanol et une solution aqueuse d'acide phosphorique (3 mM). La phase stationnaire est une colonne de phase inverse ACE® C18, taille des particules 5 µm, et de dimensions 4,5×250 mm (Houilles, France). Le débit est programmé à 1 mL/min. La détection est effectuée dans le domaine de l'UV-visible aux longueurs d'onde de 325 nm pour l'acide chlorogénique et de 328 nm pour l'acide rosmarinique, lesquelles correspondent aux maxima d'absorbance pour ces composés. Le gradient utilisé pour la séparation chromatographique de l'acide chlorogénique et de ses esters a été le suivant :

Tableau 8. Gradient d'élution employé pour la séparation chromatographique de l'acide chlorogénique et de ses esters.

Solvant \ Temps (min)	0	25	40	50	55
H ₃ PO ₄ (3 mM)	95 %	25 %	0 %	0 %	95 %
Méthanol	5 %	75 %	100 %	100 %	5 %

Les pourcentages exprimés sur le tableau correspondent au pourcentage en volume

Avec ces conditions, la séparation de chacun des composés est obtenue avec une bonne résolution comme le montre la Figure 20. Ensuite, nous avons procédé à l'élaboration des solutions d'étalonnage pour chacun des composés afin de déterminer les coefficients de proportionnalité molaire (Tableau 9).

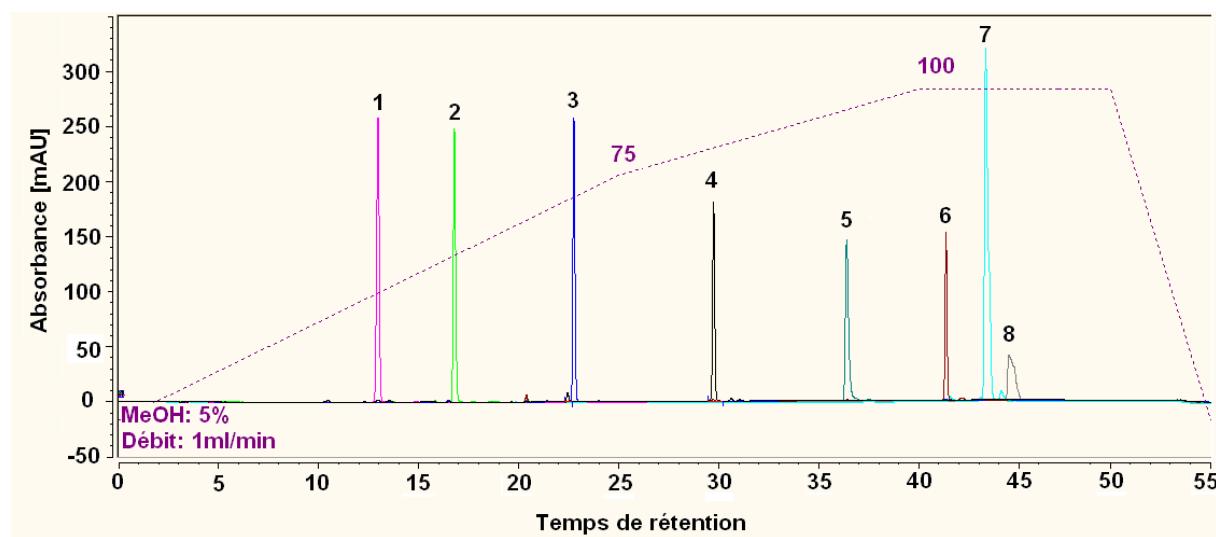


Figure 20. Profil de séparation obtenu par CLHP pour l'acide chlorogénique (1) et ses esters méthylique (2), butylique (3), octylique (4), dodécylque (5), hexadécylque (6), octadécylque (7) et eicosylque (8).

Tableau 9. Temps de rétention et coefficients de proportionnalité molaire de l'acide chlorogénique et de ses esters.

Composés	Temps de rétention (min)	Coefficient de proportionnalité molaire (\propto en mAU.min. μM^{-1})
Acide chlorogénique	12,9	0,278
Chlorogénate de méthyle	16,7	0,245
Chlorogénate de butyle	22,7	0,246
Chlorogénate d'octyle	29,7	0,201
Chlorogénate de dodécyle	36,4	0,181
Chlorogénate d'hexadécyle	41,4	0,194
Chlorogénate d'octadécyle	43,2	0,674
Chlorogénate d'eicosyle	44,5	0,201

Dans tous les cas, les coefficients de détermination (R^2) de la droite entre l'absorbance (ordonnée) et la concentration molaire (abscisse) sont supérieurs à 99 %.

En ce qui concerne l'acide rosmarinique et ses esters, quelques modifications au gradient d'élution ont été effectuées, afin de réduire le temps d'analyse. Le

meilleur compromis entre résolution et temps d'analyse a été trouvé avec le gradient suivant :

Tableau 10. Gradient d'élution pour la séparation chromatographique de l'acide rosmarinique et de ses esters.

Solvant	Temps (min)	0	30	40	45
H ₃ PO ₄ (3mM)		100 %	0 %	0 %	100 %
Méthanol		0 %	100 %	100 %	0 %

Les pourcentages exprimés sur le tableau correspondent au pourcentage en volume

En utilisant ces conditions, la séparation obtenue est montrée dans la figure 21.

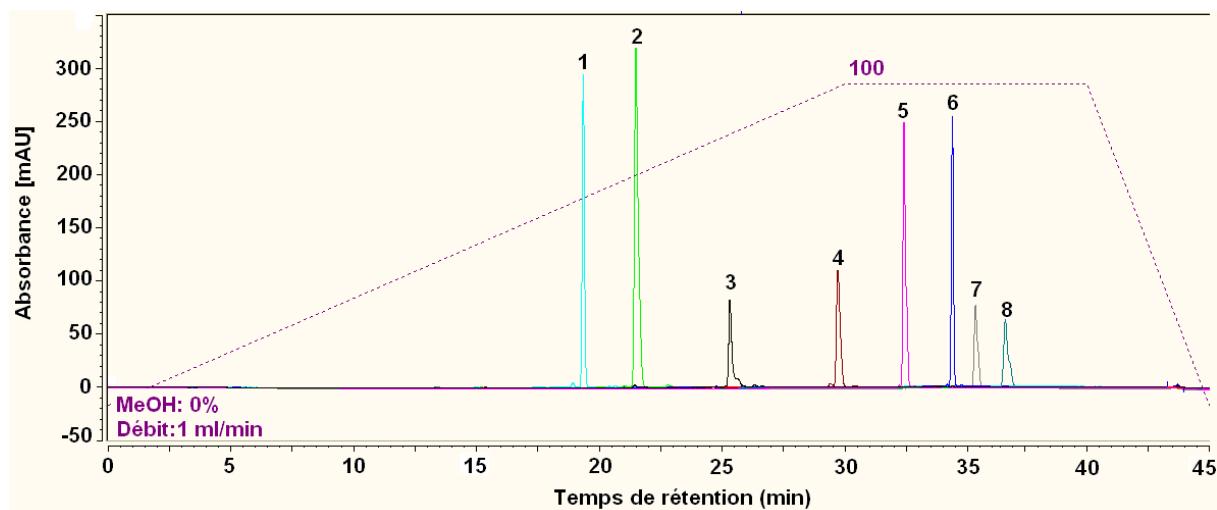


Figure 21. Profil de séparation obtenu par CLHP pour l'acide rosmarinique (1) et ses esters méthylique (2), butylique (3), octylique (4), dodécylque (5), hexadécylque (6), octadécylque (7) et eicosylque (8).

Comme dans le cas de l'acide chlorogénique, les temps de rétention et les coefficients de proportionnalité molaire ont été calculés avec des coefficients de détermination supérieurs à 0,99 (Tableau 11).

Tableau 11. Temps de rétention et coefficients de proportionnalité molaire pour l'acide rosmarinique et ses esters.

Composés	Temps de rétention (min)	Coefficient de proportionnalité molaire (\propto en mAU.min. μM^{-1})
Acide rosmarinique	19,3	0,222
Rosmarinate de méthyle	21,5	0,201
Rosmarinate de butyle	25,3	0,130
Rosmarinate d'octyle	29,7	0,178
Rosmarinate de dodécyle	32,8	0,303
Rosmarinate d'hexadécyle	34,4	0,246
Rosmarinate d'octadécyle	35,3	0,164
Rosmarinate d'eicosyle	36,7	0,147

Avec les coefficients de proportionnalité molaire, il est possible de faire le suivi quantitatif de chacune des réactions.

II.3.1. Calcul du rendement molaire des réactions d'estérification et de transestérification

Les rendements molaires de réaction ont été définis comme suit :

$$\text{Rendement molaire (\%)} = \frac{(\text{Aire}_d / \propto_d)}{(\text{Aire}_0 / \propto_0) + (\text{Aire}_d / \propto_d)} \times 100 \quad (12)$$

Où, \propto est le coefficient de proportionnalité molaire ; l'indice 0 représente le composé de départ dans les réactions soit d'estérification (acide chlorogénique ou rosmarinique), soit de transestérification (esters méthyliques des acides chlorogénique ou rosmarinique) ; et finalement d , représente le produit désiré de la réaction.

II.3.2. Calcul de la vitesse initiale des réactions d'estérification et de transestérification

Tout d'abord, la quantité de produit formé au cours de la réaction a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$[\text{Produit}] = \frac{\text{Aire}_d \times 1000}{N_d} \quad (13)$$

Ensuite, les concentrations du produit ($[\text{Produit}]$, en nM) ont été tracées en fonction du temps de réaction. La procédure est poursuivie par l'ajustement des données par régression non linéaire, dans notre cas, les valeurs suivant un comportement du type exponentiel ($a \times (1 - \exp(-b \times t))$) pour lequel les constantes a et b ont été calculées avec des coefficients de corrélation $> 0,98$. Finalement, la vitesse initiale de la réaction est obtenue quand la première dérivée de cette fonction est évaluée à un temps égal à zéro.

II.4. Solubilité des acides et des esters dans les alcools gras

La solubilité de chacun des substrats (acides chlorogénique, rosmarinique et leurs esters méthyliques) a été déterminée en préparant des solutions de ces composés dans les alcools utilisés pendant la catalyse enzymatique. Les solutions ont été préparées à la même concentration que celle utilisée pendant la catalyse enzymatique (5,6 mM) et cette valeur a alors été considérée comme le 100 % ou comme la quantité totale à dissoudre dans chacun des milieux. Afin de calculer une solubilité qui soit représentative de celle des substrats dans les milieux de réaction, les échantillons ont été placés sous conditions d'agitation (250 rpm) et de chauffage (55°C) identiques à celles utilisées pendant la biocatalyse. Après 2 h d'incubation, et afin d'éviter de prélever des échantillons contenant des particules de substrat en suspension, les milieux ont été laissés en repos pendant 30 min. La quantité de substrat solubilisée dans chacun des alcools a été mesurée en intégrant l'aire sous les pics obtenus en CLHP et en utilisant les coefficients de proportionnalité décrits précédemment. De cette façon, il est simple d'obtenir un pourcentage (p/p) de la quantité de matériel dissous après 2 h d'incubation à partir de l'équation suivante :

$$\% \text{Substrat dissous} = \frac{[\text{Calculée par CLHP}]}{5,6 \times 1000} \times \text{MM} \times 100 \quad (14)$$

Où MM est la masse molaire de l'acide ou de l'ester.

II.5. Conditionnement de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w), de la lipase de *Candida antarctica* B

La lipase de *Candida antarctica* B a été incubée sous vide pendant 2 semaines à 25°C dans des dessiccateurs en présence des solutions de sels saturés de NaOH ($a_w = 0,05$), de K(C₂H₃O₂) ($a_w = 0,23$), de MgCl₂ ($a_w = 0,33$) et de Mg(NO₃)₂ ($a_w = 0,53$), afin d'équilibrer l' a_w de l'enzyme à celle de ces sels références. La détermination de l' a_w de l'enzyme à l'équilibre a été effectuée par le système Aqualab (Fa-st/1, GBX, Romans, France).

II.6. Lipophilisation enzymatique des acides chlorogénique et rosmarinique et de leurs esters méthyliques

La lipophilisation enzymatique des acides chlorogénique et rosmarinique, ainsi que de leurs esters méthyliques, a été réalisée à l'abri de la lumière dans des flacons ambrés contenant 56 µmol de substrat et 10 mL de l'alcool gras utilisé (C4 (109,3 mmol), C8 (63,5 mmol), C12 (44,7 mmol) ou C16 (33,4 mmol)). Avant l'ajout de l'enzyme, ces milieux réactionnels sont placés pendant 2 h dans des incubateurs thermostatés (55°C) et sous agitation orbitale (250 rpm) (Stuart SI50, Montferrier, France), afin d'optimiser la solubilisation des composés. Après ce temps d'incubation, la réaction est lancée par l'addition de lipase de *Candida antarctica* B, dont l' a_w a été préalablement équilibrée avec les solutions des sels saturés (voir section précédente) à des valeurs de 0,05 ; 0,23 ; 0,33 et 0,53. Les quantités de catalyseur employé ont été de 2, 5 et 10 % (calculées sur une base pondérale prenant en compte la totalité des substrats impliqués). Dans le but d'orienter les réactions vers la synthèse, les co-produits des réactions ont été éliminés en continu du milieu réactionnel. Dans le cas de l'estérification, le co-produit de la réaction (eau) a été adsorbé sur tamis moléculaire ajouté à une quantité de 20 mg/mL de milieu réactionnel. En ce qui concerne la transestérification, son co-produit (méthanol) est éliminé pour l'intermédiaire d'un débit d'azote placé sur la tête de chacun des

bioréacteurs. Finalement, le suivi cinétique des réactions a été effectué en prélevant 20 µL du milieu réactionnel à différents intervalles de temps, lesquels sont dissous 50 fois dans du méthanol et stockés à -18°C en attendant d'être analysés.

II.7. Purification des esters lipophilisés de l'acide chlorogénique et rosmarinique

Une fois la réaction terminée, le catalyseur est retiré par filtration à travers un filtre en microfibres de verre de 1,6 µm (Whatman international Ltd., Maidston, Angleterre). Puis une première étape de séparation par extraction liquide-liquide est effectuée en utilisant comme solvant un mélange de 500 mL d'hexane/acétonitrile (1 : 3 v/v). Une fois l'équilibre des phases atteint, la phase hexanique, qui contient la majorité de l'alcool gras, est éliminée, tandis que la phase acétonitrile, contenant principalement les esters, est lavée encore 3 fois par 100 mL d'hexane. Après ces lavages, la phase acétonitrile est évaporée à 40°C sous pression réduite (40 mmHg) à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit sec est alors dissous à nouveau dans 60 ml d'un mélange toluène/acétate d'éthyle (70 : 30, v/v) et ensuite déposé sur une colonne en verre ($\phi = 0,3$ mm et hauteur = 50 cm) chargée de silice (préalablement séchée à 108°C pendant 48 h). La séparation sur colonne est accomplie en faisant passer ~1,5 L du mélange toluène/acétate d'éthyle (70 : 30, v/v). Finalement les fractions contenant les esters sont recueillies et le solvant évaporé à 40°C sous pression réduite (40 mmHg).

Remarque : Le temps pour atteindre l'équilibre des phases peut parfois être long en raison de la formation d'une émulsion probablement due aux propriétés émulsifiantes des nouveaux esters. Si l'émulsion persiste, l'ampoule à décanter peut être chauffée au sèche-cheveux, afin de faciliter la séparation des phases.

II.8. Identification par spectrométrie de masse des esters des acides chlorogénique et rosmarinique

Après purification, la présence des esters lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique a été confirmée par spectrométrie de masse. L'analyseur de masse utilisé est équipé d'une trappe d'ions quadripôle, une source d'ionisation externe opérant à pression atmosphérique, et avec un système d'injection intégré (Thermo Finnigan Serie LCQ, San José CA, USA). Les esters lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique sont préalablement dissous dans du méthanol à 10 et 100 mg/L, respectivement. Puis, les solutions sont injectées, par infusion, à l'intérieur d'une source d'ionisation par nébulisation qui opère en conditions de fragmentation négative à un débit de 5 µL/min. L'acquisition des données a été faite en mode balayage, mais aussi en faisant la fragmentation sur l'ion parent (MS^2) et sur les ions fils (MS^3). Les conditions d'opération ont été optimisées en suivant la procédure décrite par Clifford *et al.* (2003) en utilisant comme modèle les molécules de départ (acides chlorogénique et rosmarinique).

Ainsi, dans le cas des esters lipophilisés de l'acide chlorogénique les meilleures conditions obtenues sont :

- Voltage d'ionisation (kV) : 4,54
- Température du capillaire (°C) : 250
- Débit du gaz « sheath » (azote), en unités arbitraires : 20
- Energie de collision employée pour l'acquisition en MS^n (%) : 35

Concernant les esters lipophilisés de l'acide rosmarinique les conditions trouvées comme optimales sont :

- Voltage d'ionisation (kV) : 4,54
- Température du capillaire (°C) : 300
- Débit du gaz « sheath » (azote), en unités arbitraires : 20
- Energie de collision employée pour l'adquisition en MS^n (%) : 30-35

II.9. Mesure de l'activité antiradicalaire des esters lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique par la méthode DPPH[•]

La procédure de détermination des paramètres stationnaires de l'activité antiradicalaire a été faite par spectrométrie comme décrit par Brand-Williams *et al.* (1995). Dans cette méthode, la vitesse de décoloration du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) due à l'action d'un antioxydant (AOH), est suivie à 515 nm. Les solutions de travail sont préparées comme suit : 1,95 mL de solution méthanolique de DPPH[•] à 60 µM est placé dans une cuve en quartz. Puis, 50 µL d'une solution d'antioxydant (acides chlorogénique ou rosmarinique ou leurs esters lipophilisés) sont ajoutés à une concentration comprise entre 0,154 et 1,15 mM. Ces concentrations correspondent à des ratios molaires de AOH/DPPH[•] allant de 0,05 à 0,5. La chute de l'absorbance à 515 nm causée par la réduction du DPPH[•] après l'addition d'AOH est contrôlée toutes les minutes, à 20°C jusqu'à ce qu'elle atteigne un état stable. L'équipement utilisé pour le suivi est un spectrophotomètre Lambda 25UV (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) équipé d'un système de contrôle de température et d'agitation. L'homogénéité du milieu réactionnel est garantie par une agitation magnétique à 1000 rpm. Une mesure est également faite en absence d'AOH, afin d'obtenir une correction de la chute du signal intrinsèque du DPPH[•] au cours du temps, en évitant de cette façon une surestimation de la capacité antiradicalaire du composé testé. Dans ces circonstances, il est possible de calculer l'absorbance corrigée au cours du temps correspondant à l'action exercée par l'AOH (équation 15).

$$\text{Abs}^c = \text{Abs}_t + \text{Abs}_{t_0}^b - \text{Abs}_t^b \quad (15)$$

où Abs^c est l'absorbance corrigée de l'AOH, Abs_t l'absorbance de l'AOH à chaque minute de réaction, et $\text{Abs}_{t_0}^b$ et Abs_t^b les absorbances respectives du blanc (1,95 mL du DPPH[•] et 50 µL de méthanol) à 0 min et à chaque intervalle de temps.

Le pourcentage du DPPH[•] est calculé avec l'équation (16).

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} = (\text{Abs}_t^c / \text{Abs}_{t_0}^c) \times 100 \quad (16)$$

Où $\text{Abs}_{t_0}^c$ est l'absorbance corrigée de l'AOH à 0 min, et Abs_t^c l'absorbance corrigée à chaque intervalle de temps. Pour chaque concentration d'AOH testée, le % du DPPH[•] restant a été tracé en fonction du temps (Figure 22), à partir de cette figure, il

est possible de calculer le % de DPPH[•] à l'état stable.

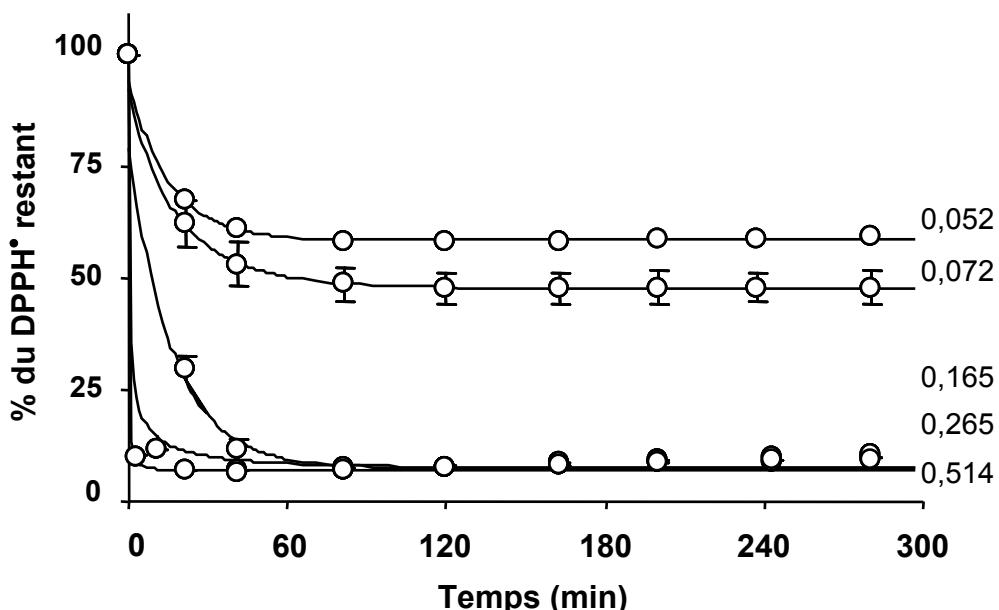


Figure 22. Exemple classique de l'évolution du % du radical DPPH[•] au cours du temps suite à l'addition de différents concentrations d'antioxydant (AOH).

Puis, le % de DPPH[•] restant à l'état stable est tracé en fonction du ratio molaire d'AOH/DPPH[•] (Figure 23). La capacité antiradicalaire est alors définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50 % la concentration initiale du DPPH[•] et exprimée en EC₅₀ (Blois 1958).

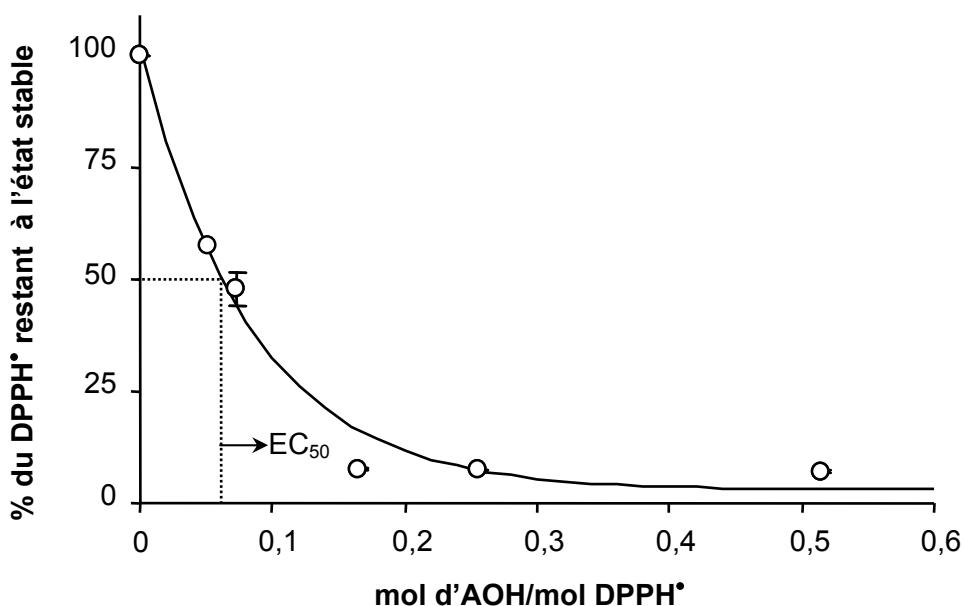


Figure 23. Exemple de la détermination de la capacité antiradicalaire des esters de l'acide chlorogénique et rosmarinique exprimés en EC₅₀.

Concernant l'étude des paramètres cinétiques, quelques modifications expérimentales ont été faites. Ainsi, les principaux changements sont :

- la concentration finale des composés testés est de 1,76-17,6 µM ;
- la fréquence d'acquisition est de 0,1 s pendant une période de temps comprise entre 1 et 2 min.

Il est nécessaire de porter une attention particulière de façon à réduire au minimum la perte d'information au cours des premières secondes de la réaction. De cette manière, l'addition de la solution d'AOH a été réalisée sous agitation après que la température de réaction ait été stabilisée.

II.9.1. Détermination par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (CLHP-SM) des produits d'oxydation obtenus après la réduction du DPPH*

Les produits d'oxydation résultants durant les deux 2 premières minutes de réaction, après que l'antioxydant ait stabilisé le radical DPPH, ont été identifiés par CLHP-SM. Les milieux réactionnels mis en œuvre sont préparés à des concentrations finales de 2,16 mM de radical DPPH et 1,8 mM d'AOH. L'équipement employé est constitué d'une chaîne de CLHP (Thermo Fisher, San José CA, USA) couplée à un spectromètre de masse (Thermo Fisher Serie LCQ, San José CA, USA). La chaîne CLHP est équipée d'une boucle, d'un passeur automatique, d'un détecteur PDA qui permet à la fois, d'enregistrer le signal à des longueurs d'onde fixes (327, 280 et 254 nm), mais aussi de faire un balayage entre 200 et 600 nm. La séparation des composés a été réalisée sur une colonne ACE® C18 (3 µm, 50×2,1 mm, Houilles, France) en utilisant comme solvant *A* une solution d'eau/acide formique (99,9 : 0,1 v/v) et comme solvant *B* une solution d'acétonitrile/eau/acide formique (80 : 19,9 : 0,1 v/v/v). Le débit d'élution est de 0,3 mL/min. Le gradient d'élution utilisé pour la séparation chromatographique de l'acide chlorogénique et de ses esters a été le suivant :

Tableau 12. Gradient d'élution pour la séparation en CLHP des produits d'oxydation résultants de la réduction du radical DPPH.

Solvant \ Temps (min)	0	50	55	60	65	75	85
A	97 %	65 %	50 %	20 %	0	0	97 %
B	3 %	35 %	50 %	80 %	100	100	3 %

Concernant les conditions du spectromètre de masse, les conditions d'analyses ont été légèrement modifiées par rapport à celles énoncées dans le paragraphe II.8 ; ainsi les nouvelles conditions sont :

- Voltage d'ionisation (kV) : 4,54
- Température du capillaire (°C) : 270
- Débit du gaz « sheath » (azote), en unités arbitraires : 80
- Débit du gaz auxiliaire (hélium), en unités arbitraires: 20

II.10. Détermination des coefficients de distribution (log P) des acides chlorogénique et rosmarinique ainsi que de leurs esters

II.10.1. Détermination théorique des coefficients de distribution octanol/eau

La détermination théorique des coefficients de distribution octanol/eau a été développée en utilisant le logiciel Chemdraw Ultra 5.0 (CambridgeSoft Corp., Cambridge MA, USA).

II.10.2. Détermination expérimentale des coefficients de distribution octanol/eau

La détermination expérimentale des coefficients de partition octanol/eau a été effectuée de la façon suivante :

- Dans un tube Eppendorf, 750 µL d'octanol sont mis en contact avec 750 µL d'eau. Puis, le système est mélangé à l'aide d'un vortex pendant 30 min (5 min

d'agitation et 10 min de repos). La procédure est poursuivie par une centrifugation (Centrifugeuse Jouan CR412, St Quentin, France) à 10 000 g pendant 30 min à 4°C. Après cette centrifugation, les antioxydants sous forme de poudres, sont additionnés à la phase supérieure du système hétérogène, afin d'obtenir des concentrations finales comprises entre 0 et 10 mM. Après l'addition de l'antioxydant, les milieux sont mélangés en utilisant la procédure décrite plus haut (vortex pendant 1 h (5 min d'agitation et 10 min de repos)) puis centrifugés à 10 000 g pendant 30 min. Chacune des phases liquides séparées est alors analysée par CLHP. Le calcul final du coefficient de distribution est alors réalisé de la façon suivante :

$$P_{o/e} = \frac{\left(\frac{\text{g d'antioxydant dans la phase octanol}}{\text{g d' octanol}} \right)}{\left(\frac{\text{g d'antioxydant dans la phase eau}}{\text{g d' eau}} \right)} \quad (17)$$

II.10.3. Détermination expérimentale du pourcentage d'antioxydant dans la phase continue d'une émulsion huile dans l'eau

Les émulsions d'huile de tournesol dans l'eau (2 % p/p) ont été préparées en utilisant comme émulsifiant le Brij 35. Les concentrations finales de l'émulsifiant ont été comprises entre 0,017 mM et 10 mM. La procédure classique pour la préparation des émulsions a été la suivante :

Les solutions d'émulsifiant aux concentrations désirées ont été préparées dans 25 mL de tampon phosphate (pH 7,2, 0,05 M). Ensuite, ces solutions sont additionnées à 0,5 g d'huile de tournesol et mélangées à l'aide d'un vortex pendant 10 s. Immédiatement après, l'émulsion est formée en utilisant un homogénéisateur Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Germany). Les conditions employées pendant cette dernière opération sont les suivantes : vitesses de rotation de 2 400 rpm pendant 90 s à température ambiante.

Puis, 750 µL de l'émulsion sont mélangés à 750 µL d'une solution d'EDTA 100 µM dans du tampon phosphate de potassium (0,05 M pH 7,2). L'EDTA est utilisé pour chélater les éventuelles traces de métaux présents dans l'huile, afin d'éviter les possibles réactions d'oxydation. 20 µL d'une solution méthanolique d'antioxydant (1,9-7,6 mM) sont alors additionnés au milieu. Ces dernières solutions sont gardées à l'abri de la lumière pendant 24 h, puis elles sont centrifugées à 4°C et 10 000 g pendant 40 min. Ensuite, 1 mL de la partie continue de l'émulsion (phase aqueuse) est prélevée et aussitôt diluée à nouveau dans 0,5 mL de solution de tampon phosphate de potassium (cette opération est répétée 3 fois). Après la dernière centrifugation, la phase continue est filtrée (filtre millipore, 0,20 µm). Finalement, les concentrations d'antioxydants présents dans cette phase sont dosées par CLHP.

II.11. Détermination de la capacité antioxydante en utilisant le test des triènes conjugués autooxydables (Conjugated autooxidizable Trienes : CAT)

Cette méthode en milieu hétérogène, développé au sein de notre laboratoire (Laguerre *et al.*, 2008), est fondée sur la forte sensibilité à l'oxydation de l'acide α -éléostéarique naturellement présent dans les triacylglycérols de l'huile de bois de Chine (Tung oil, *Aleurites fordii*, huile de tung). Sous conditions non oxydantes, le système triénique de l'acide α -éléostéarique, a un fort signal trifide dans le domaine de l'UV avec un maximum à 273 nm. Suite à l'oxydation, initié par l'azo-initiateur 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH), la dégradation du système de triènes conjugués en un système diénique, est accompagnée d'une diminution du signal (Figure 24).

En conséquence, un suivi spectrophotométrique, en présence et absence d'antioxydant, conduira à une détermination directe de la capacité d'une molécule à protéger cette huile de l'oxydation. Dans les sections suivantes, nous allons décrire les étapes préliminaires de la caractérisation de l'huile, les conditions et le mode opératoire de la méthode et finalement, la façon dont les résultats sont exprimés.

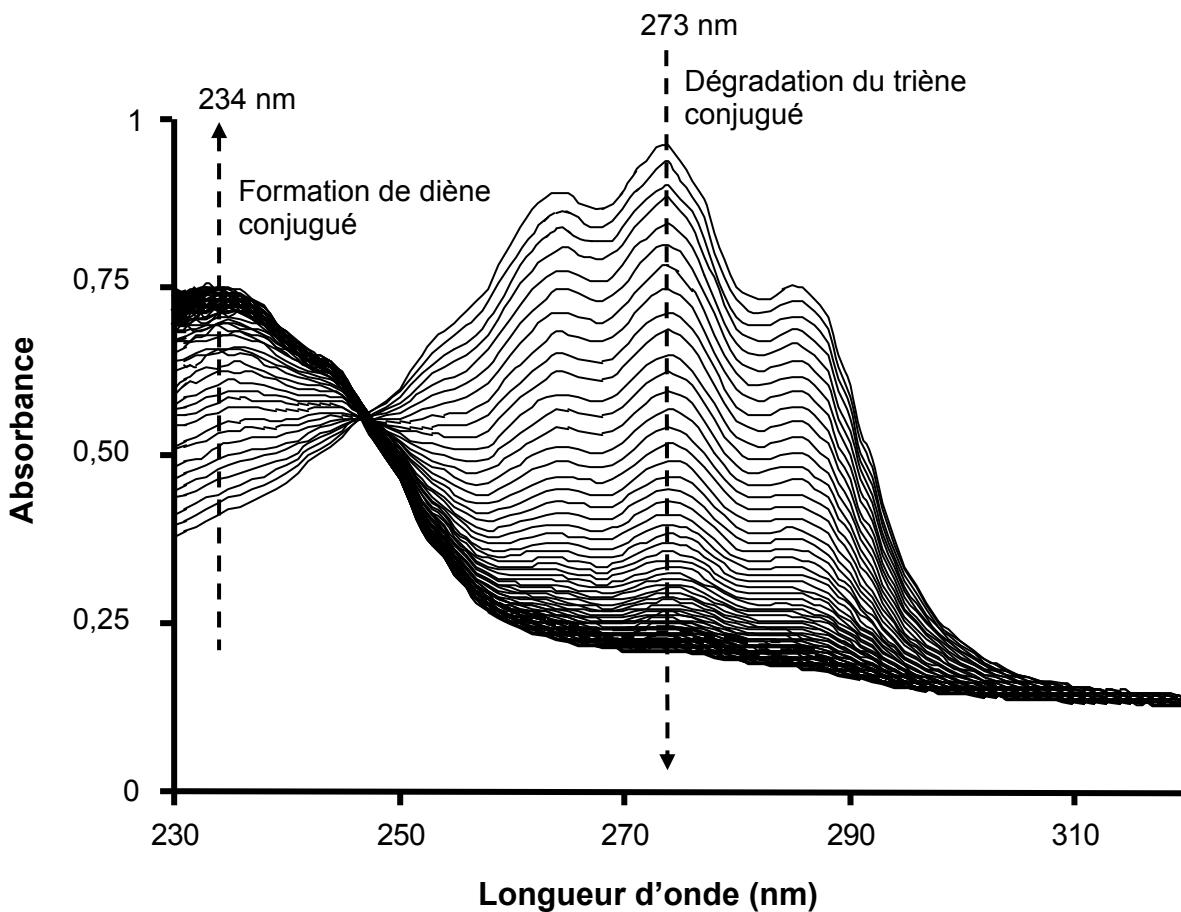


Figure 24. Evolution du spectre UV d'une émulsion huile de tung dans l'eau sous conditions d'oxydation induites par le radical AAPH à 37°C.

II.11.1. Composition et régidistribution en acides gras par dérivation en esters méthyliques

La détermination en acides gras de l'huile de tung est obtenue par dérivation de l'ensemble des acides gras en esters méthyliques. La dérivation consiste en une méthanolysé basique suivie d'une estérification acide selon la norme Afnor NF T60-203.

II.11.1.1. Préparation des réactifs

Une solution de méthylate de sodium a été préparée en mélangeant 62 mL d'une solution méthanolique de méthylate de sodium (0,5 M), 560 mL de méthanol et une pointe de phénolphthaleine pure. Une solution de méthanol chlorhydrique a été préparée en mélangeant 50 mL de chlorure d'acétyle avec 625 mL de méthanol.

II.11.1.2. Mode opératoire

A l'aide d'une pipette pasteur, l'huile de tung (20 à 30 mg) a été introduite dans un ballon de 50 mL et 3 mL de la solution de méthylate de sodium ont été ajoutés. Une canne de saponification a été placée au-dessus du ballon et le mélange a été chauffé à reflux en présence de pierre ponce durant 10 min. Ensuite, 3 mL de la solution de méthanol chlorhydrique ont alors été ajoutés par le haut de la canne de saponification jusqu'à décoloration de la phénolphthaléine. Le mélange a de nouveau été chauffé à reflux durant 10 min. Après refroidissement du milieu réactionnel à température ambiante, 10 mL d'eau distillée et 6 mL d'hexane ont été ajoutés dans le ballon. Après agitation manuelle, le milieu a été laissé au repos 5 min et quelques mL de la phase supérieure contenant les esters méthyliques ont été prélevés. Cette phase organique a été séchée par ajout de Na₂SO₄ anhydre, filtrée (millipore 0,45 µm) pour être analysée en chromatographie en phase gazeuse (CPG).

II.11.1.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

La CPG utilisée (Agilent série 6890, Sigma-Aldrich) est équipée d'une colonne capillaire Supelcowax 10 (SGE, Courtaboeuf, France) de 30 m de longueur, 0,32 mm de diamètre interne et 0,25 µm d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un intégrateur enregistreur Merck D 2000.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- injection de 1 µL de l'échantillon hexanique en mode division (rapport de fuite 1/100) ;
- injecteur et détecteur respectivement à 250 et 270°C ;
- hélium (gaz vecteur) à un débit de 2 mL/min ;
- gradient de température du four : palier de 2 min à 185°C, montée en température (4°C/min) de 185 à 225°C, palier final de 3 min à 225°C ;

Le calcul final des acides gras (AGs) libres est effectué à partir de la droite étalon.

II.11.1.4. Régiодistribution des acides gras présents dans l'huile de tung

La détermination a été faite en suivant la norme Afnor T60-241. 100 mg d'huile de tung ont été introduits dans un tube à hémolyse et mélangés avec 2 mL d'une solution tampon (Tris-HCl 1 M, pH 8), 0,5 mL d'une solution de cholate de sodium (1 g/L), et 0,2 mL d'une solution de chlorure de calcium (220 g/L). L'ajout de 20 mg de lipase pancréatique de porc (hydrolysant les triacylglycérols (TAGs) aux positions sn-1 et sn-3) a immédiatement été suivi d'une agitation manuelle du milieu réactionnel durant 3 min dans un bain-marie à 40°C. La réaction a été stoppée par ajout de 1 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (6 M) et les lipides ont été extraits par 1 mL d'éther diéthylique. Après centrifugation (3 000 g, 10 min, à 20°C, centrifugeuse Sigma, Fischer Bioblock Scientific, Marseille, France), la phase organique a été prélevée puis déposée automatiquement (300 µL) sur une plaque de silice préparative (10 cm × 20 cm × 0,25 mm). La phase mobile utilisée lors de la migration est constituée d'hexane/éther diéthylique/acide acétique (50 : 50 : 1, v/v/v). Les monoacylglycérols (MAGs) avec un rapport frontal de 0,15 ont été grattés. Après hydrolyse, les acides gras libres ont été dérivés en esters méthyliques directement à partir de la silice grattée, afin d'être injectés en chromatographie en phase gazeuse (CPG, cf. II.11.1.3).

Cette méthode permet de déterminer la composition en AGs de la position interne des TAGs. La composition en AG totaux dans ces mêmes TAGs étant connue, les pourcentages des AGs correspondant à la moyenne des 2 positions externes peuvent être calculés à partir de la formule :

$$A_e = \frac{3A_t - A_i}{2} \quad (18)$$

avec A_e , A_i et A_t , correspondant respectivement aux % molaires des AGs en position externe, interne et totale. Finalement, la régiодistribution et la teneur en AGs de cette huile sont résumées dans le tableau 13.

Tableau 13. Composition et régiодistribution des acides gras présents dans l'huile de tung (% molaire).

Acide gras	Total	Position interne	Position externes
Palmitique (16:0)	1,6	1,0	1,9
Stéarique (18:0)	1,7	1,4	1,9
Oléique (18:1 ⁹)	4,2	6,5	3,0
Linoléique (18:2 ^{9,12})	5,6	17,4	Traces
Linolénique (18:3 ^{9,12,15})	0,1	Traces	Traces
Gadoléique (C20:1 ¹¹)	0,5	0,7	0,5
α -Eleostéarique (C18:3 ^{9 cis, 11trans, 13trans})	72,5	41,8	87,8
Eleostéarique total	85,9	73,0	92,4

II.11.2. Elimination des tocophérols *in situ* dans l'huile de tung

Comme dans toutes les huiles, l'huile de tung contient des antioxydants natifs présents sous la forme de tocophérols. La présence de ces antioxydants naturels, empêche jusqu'à un certain degré son oxydation. En conséquence, la détermination de l'impact d'une molécule antioxydante exogène, doit être faite en absence de ces derniers de façon à quantifier seulement l'effet antioxydant de la molécule testée. Ainsi, les tocophérols natifs de l'huile de tung sont au préalable éliminés de ce substrat d'oxydation par la méthode décrite ci-dessous.

Les composés polaires de l'huile de tung, ainsi que les tocophérols ont été enlevés de l'huile par chromatographie sur colonne. Le système utilisé comme phases fixe et mobile sont respectivement, l'alumine et l'hexane. Le système de séparation est préparé comme suit :

Dans une colonne de verre ($\phi = 0,3$ mm et hauteur = 50 cm), 25 g d'alumine sont introduits à l'aide de la phase mobile (hexane). Quand les particules d'alumine en suspension sont complètement décantées, l'excès d'hexane est retiré et 25 mL d'huile (200 mg/mL d'hexane) sont élusés dans la colonne. La solution hexanique obtenue après le procédé de séparation est aussitôt évaporée en utilisant un système d'évaporateur rotatif sous vide réduit (40 mmHg), à une température de

35°C. Les procédés de séparation et d'évaporation ont été effectués à l'abri de la lumière, afin de prévenir l'oxydation de l'huile. Finalement, ces échantillons sont inertés sous un débit d'azote et conservés à -18°C jusqu'à leur utilisation. Etant donnée la haute oxydabilité de cette huile, nous devons préparer un flacon par analyse. Un flacon ouvert n'est plus réutilisable.

II.11.3. Protocole du test des triènes conjugués autooxydables

Les milieux de réactions ont été préparés comme suit :

Dans des conditions normales d'analyses (Laguerre *et al.*, 2008), les antioxydants sont préparés directement dans des solutions de tampon phosphate (PBS, 0,05 M pH 7,2). Cependant, le caractère hydrophobe des esters à chaîne longue, empêche leur solubilisation complète dans ce type de solvant. De façon à surmonter cette difficulté, la solubilisation initiale de tous les composés analysés (hydrophiles ainsi qu'hydrophobes) a été faite en utilisant le méthanol comme solvant. Dans cette étape, nous avons préparé 4 solutions d'antioxydants à des concentrations de 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 et 4×10^3 μM . Suite à la solubilisation méthanolique, 20 μL de chacune de ces solutions sont prélevés et aussitôt dissous dans du PBS (25 mL). De cette façon, les solutions de travail, nommées par la suite A', B', C' et D', ont respectivement une concentration de 0,8 μM , 1,6 μM , 2,4 μM et 3,2 μM .

Puis, 50 μL de ces solutions (A', B', C', D') sont transférés sur une microplaquette UV-Star (Greiner, Frickenhausen, Allemagne) constituée de 96 puits à l'aide d'une micropipette multicanneaux. Les puits de la microplaquette sont remplis de façon à faire une analyse triplée pour chaque concentration de chaque antioxydant testé. Après le remplissage complet de la microplaquette, les milieux réactionnels sont chauffés (37°C) et agités (1 200 rpm) durant 5 min en utilisant un agitateur de plaques doté d'un contrôle de température (PHMT Grant Instruments Ltd, Shepreth, Angleterre).

Parallèlement, pendant que la microplaquette est chauffée, une émulsion d'huile de tung est préparée comme suit : 5 mg d'huile (dépourvue de ses tocophérols, MM = 872 g/mol) sont mélangés à 25 mL d'une solution d'émulsifiant non ionique

(Brij 35, MM = 1198 g/mol ; à 34 µM dans une solution de PBS (0,05 M pH 7,2)). Après agitation à l'aide d'un vortex pendant 10 s, le milieu est émulsifié avec un homogénéisateur Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Allemagne) à une vitesse de ~ 2 400 rpm durant 90 s à température ambiante. Puis, 100 µL de l'émulsion sont transférés dans chacun des puits de la microplaqué. Afin d'améliorer la répétitivité, la plaque est préchauffée et pré-agitée sous les mêmes conditions décrites ci-dessus. L'oxydation est alors initiée par l'ajout de 50 µL d'une solution 4 mM d'AAPH préparée dans du PBS de façon journalière pour chaque analyse. Ainsi, le milieu réactionnel pour chaque puit est constitué d'une émulsion d'huile de tung (115 µM) stabilisée par une solution de Brij 35 (17 µM), et additionnée d'un initiateur de radicaux libres (AAPH, 1 mM) et d'antioxydant testé (de 0 à 0,8 µM).

II.11.3.1. Expression des résultats

Afin de normaliser les données, les signaux d'absorbance initiaux ont été transformés en absorbance relative en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Absorbance relative } (\text{Abs}_r) = \frac{\text{Abs}_t}{\text{Abs}_0} \quad (19)$$

où Abs_0 et Abs_t représentent respectivement, les absorbances enregistrées à 0 min et à chaque min pendant une période de 300 min. L'aire sous la courbe (ASC) correspondant à la diminution de l'absorbance relative a été calculée de la façon suivante :

$$\text{ASC} = 1 + \sum_{i=1}^{300} \text{Abs}_{ri} \quad (20)$$

L'aire de protection totale, générée par un antioxydant est calculée comme la différence entre l'ASC en présence d'antioxydant (ASC_{AOH}) et l'ASC de l'échantillon sans antioxydant (ASC_{blanc}).

De façon similaire à d'autres méthodes, le Trolox®, a été utilisé comme antioxydant de référence pour chacune des déterminations d'activité antioxydante. En conséquence, la valeur de capacité antioxydante (valeur CAT) de chacun des échantillons testés est exprimée comme suit:

$$\text{Valeur CAT} = \frac{(\text{ASC}_{\text{échantillon}} - \text{ASC}_{\text{blanc}})}{(\text{ASC}_{\text{Trolox}} - \text{ASC}_{\text{blanc}})} \times \frac{(\text{mol de Trolox})}{(\text{mol d'échantillon})} \quad (21)$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

I.1. Synthèses des dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique en milieu fondu

La synthèse enzymatique d'esters d'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique) de longueur de chaîne variable (de C₈ à C₁₈) a été étudiée auparavant par Guyot *et al.* (2000) en utilisant comme biocatalyseur la lipase de *Candida antarctica* B. Dans ce travail, la réaction a été effectuée avec et sans solvant. Si les auteurs ont pu obtenir des rendements corrects (jusqu'à 75 %) en utilisant le 2-méthyl-2-butanol comme solvant, les vitesses de réaction se sont avérées quant à elles extrêmement lentes (plus de 30 jours).

En conséquence, dans ce chapitre, nous nous proposons de décrire les stratégies suivies afin d'optimiser les paramètres de synthèse d'esters de l'acide 5-caféoylquinique. Cette optimisation vise notamment à améliorer les cinétiques et les rendements réactionnels tout en s'affranchissant, dans la mesure du possible, de l'utilisation de solvants organiques (milieu fondu).

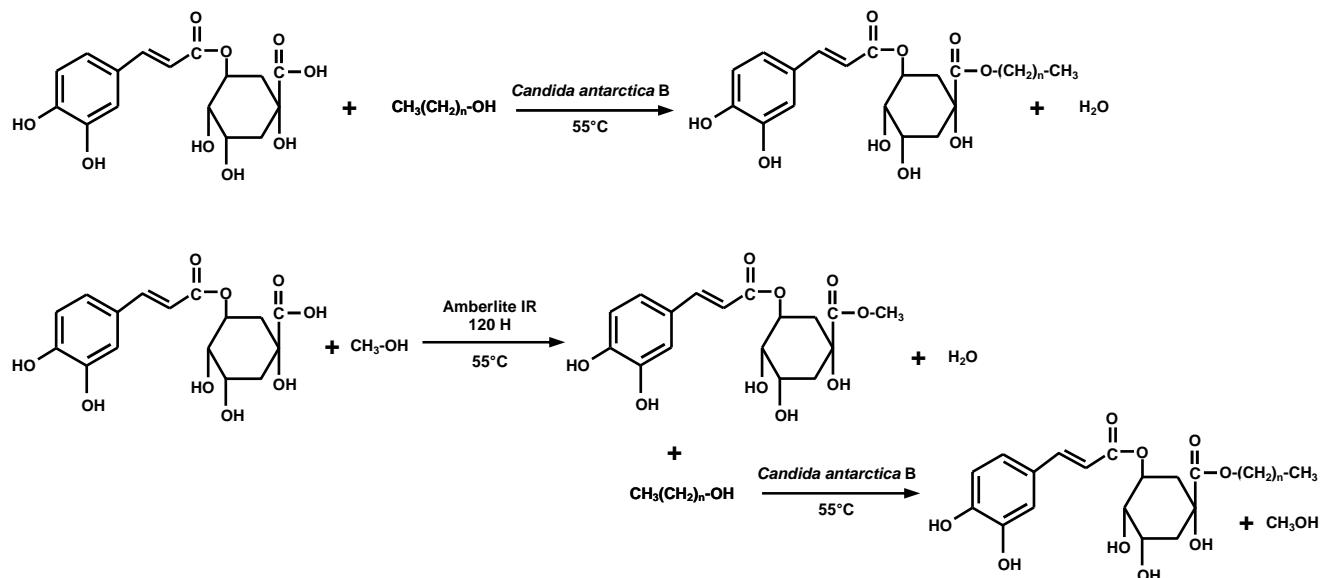


Figure 25. Stratégies étudiées pour la synthèse des esters lipophilisés de l'acide chlorogénique catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B, (a) estérfication directe, (b) transestérfication par stratégie chimio-enzymatique. n = 3, 7, 11 et 15.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Pour cela, et comme décrit dans la partie bibliographique de ce mémoire, l'une des stratégies consiste en la modification préalable du composé hydrophile (acide chlorogénique) afin d'en améliorer la solubilité dans le milieu réactionnel choisi, à savoir un milieu fondu, dans lequel l'alcool gras joue à la fois le rôle de substrat et de solvant de la réaction. L'autre stratégie possible, correspond à l'estérification directe de l'acide chlorogénique, sans modification préalable. Dans les deux cas, l'optimisation des variables a été centrée sur l'effet de la quantité d'enzyme, de la longueur de la chaîne aliphatique employée pour la synthèse et de l'activité de l'eau du biocatalyseur sur la vitesse et le rendement des différentes réactions étudiées, transestérification et estérification (Figure 25).

I.1.1. Synthèses chimique du chlorogenate de méthyle

La transformation de l'acide chlorogénique en son homologue chlorogénate de méthyle par l'intermédiaire d'une catalyse chimique a été choisie afin d'établir les avantages qu'il y aurait à passer par un intermédiaire réactionnel plus soluble dans les alcools gras, couramment utilisés pour l'hydrophobation de composés phénoliques. De plus, l'utilisation de l'intermédiaire ester méthylique dans une réaction de transfert d'acyle, présente l'avantage supplémentaire de générer comme co-produit le méthanol. Celui-ci peut être alors éliminé plus facilement que l'eau (produite dans le cas d'une estérification directe d'un acide phénolique non modifié) ce qui favorise donc le déplacement de l'équilibre réactionnel vers la synthèse du dérivé lipophile cible.

Par ailleurs, on peut noter que nombre d'auteurs privilégient la synthèse chimique au détriment de la voie biocatalytique, en raison de l'effet inhibiteur du méthanol sur les lipases d'origine microbienne (Shimada *et al.*, 1999 ; Watanabe *et al.*, 2000 ; Shimada *et al.*, 2002). Par conséquent, nous nous sommes orientés vers la synthèse chimique catalysée par une résine acide en suivant le protocole décrit dans la section « matériels et méthodes ». Le suivi qualitatif de la réaction a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM, Figure 26), à intervalle régulier (une plaque CCM pour chaque heure de réaction). Dès la première heure, on peut noter la présence d'un nouveau composé de Rf (rapport frontal) supérieur à l'acide chlorogénique correspondant vraisemblablement à son ester méthylique.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

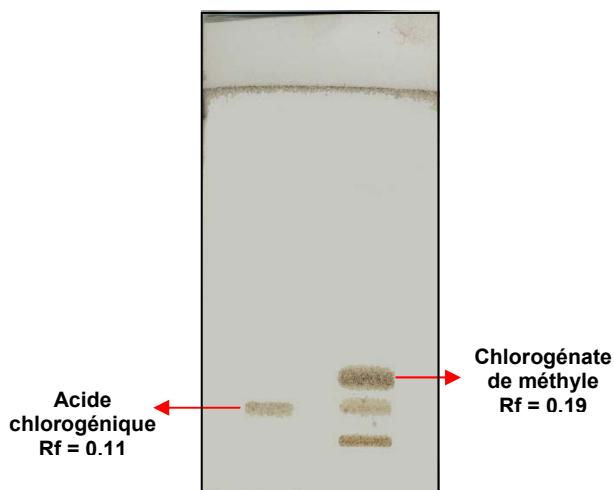


Figure 26. Détermination du rapport frontal (Rf) de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique par chromatographie sur couche mince avec le mélange d'élution toluène/acétate d'éthyle/acide formique (50 : 40 : 10 v/v/v).

En parallèle, le suivi quantitatif (Figure 27) de la réaction a été réalisé par chromatographie liquide d'haute performance (CLHP). Après 9 h de réaction les rendements sont de l'ordre de 95 %.

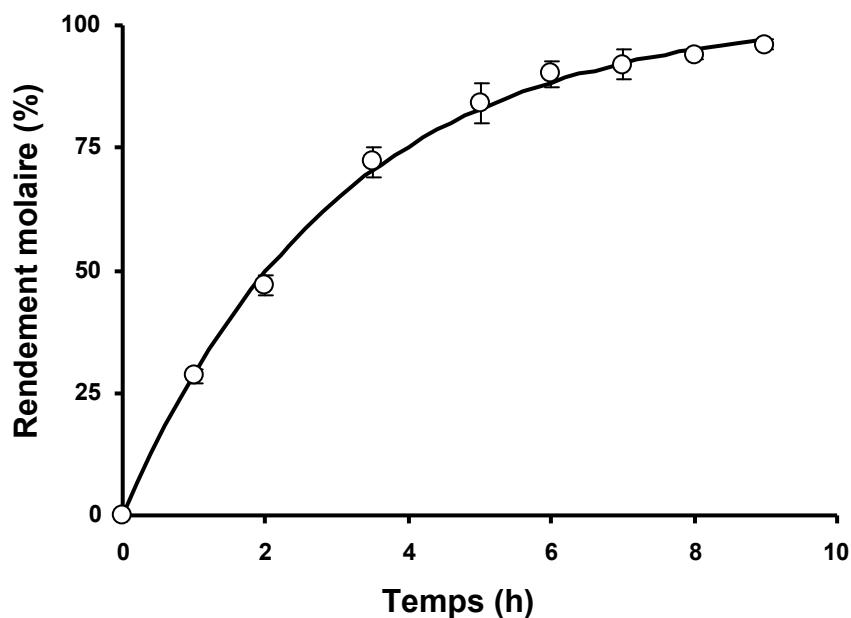


Figure 27. Cinétique d'estérification en milieu fondu de l'acide chlorogénique en son ester méthylique catalysée avec 5 % (p/p) d'amberlite® IR 120 H. Valeurs exprimées comme la moyenne de trois répétitions.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

I.1.2. Évaluation de la solubilité de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique

La solubilité de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique dans chacun des alcools utilisés pendant la synthèse enzymatique a été mesurée et les résultats sont indiqués dans le tableau 14.

Tableau 14. Solubilité de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique (% p/p) dans les alcools gras après 2 heures d'agitation à 250 rpm et 55 °C.

Alcool	Solubilité (% p/p)	
	Acide chlorogénique	Chlorogénate de méthyle
Butanol	89,2 ($\pm 3,6$)	99,4 ($\pm 4,8$)
Octanol	69,6 ($\pm 6,1$)	85,7 ($\pm 3,9$)
Dodécanol	59,5 ($\pm 5,8$)	73,9 ($\pm 5,1$)
Hexadécanol	43,2 ($\pm 2,5$)	52,1 ($\pm 1,8$)

Les valeurs en parenthèses représentent la déviation standard des trois répétitions.

Comme il apparaît dans le Tableau 14, l'estérification de l'acide chlorogénique en son ester méthylique, conduit à une meilleure solubilité de ce substrat phénolique dans chacun des alcools gras testés. De ce fait, en favorisant un meilleur contact des deux substrats durant la synthèse biocatalysée, on peut effectivement s'attendre à restreindre les limitations dues au transfert de masse durant la synthèse de nouveaux esters gras catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B. En revanche, en raison de la plus faible solubilité de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique dans les alcools à chaînes les plus longues, on peut supposer également de moins bons rendements et cinétiques réactionnelles. Cependant, bien que le contact entre les deux substrats soit un paramètre d'importance cruciale, les études préliminaires de Guyot *et al.* (2000) ont montré, que même dans des conditions de solubilité partielle, les réactions de lipophilisation enzymatique de l'acide chlorogénique ont été possibles. De plus, ces auteurs ont estimé que l'augmentation observée de la vitesse de réaction pouvait être due aux propriétés émulsifiantes des esters néo-formés, dont la présence dans le milieu réactionnel permettait alors de

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

faciliter le contact entre les deux substrats.

Ainsi, bien qu'une solubilisation améliorée des deux substrats soit probablement possible par l'addition de co-solvants, il semble que le milieu fondu soit cependant adapté pour obtenir des rendements et cinétiques globalement satisfaisants. De plus, le milieu fondu correspondant à un très large excès d'alcool, on peut envisager là encore un déplacement de l'équilibre de la réaction vers la production de l'ester gras.

I.1.3. Estéification et transestérification de l'acide chlorogénique et de son ester méthylique en milieu « fondu » catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B

I.1.3.1. Effet du caractère hydrophobe de l'accepteur d'acyle sur la vitesse de formation des produits

Dans un premier temps, les réactions d'estéification de l'acide chlorogénique et de transestérification de son ester méthylique ont été conduites avec des alcools à longueur de chaîne variable (C_4 , C_8 , C_{12} , C_{16}), l'objectif étant de corroborer l'impact de la méthylation sur la vitesse de formation des produits. Les suivis cinétiques ont été effectués sur une période de dix jours en suivant le protocole décrit dans le chapitre « matériels et méthodes ». Les cinétiques d'apparition des produits ont été suivies dans ces conditions, et sont représentées sur la Figure 28.

Dans tous les cas, la méthylation initiale de l'acide chlorogénique conduit à l'amélioration des quantités de produits formés. En effet, si l'on considère les quantités d'esters butylique, octylique, dodécylque et hexadécylque formées après 10 jours de réaction, il apparaît que la transestérification apporte un gain de conversion respectivement de 34 %, 12 %, 2 % et 13 % par rapport à l'estéification.

Bien que ces résultats puissent être liés à la meilleure solubilité du chlorogénate de méthyle dans les alcools gras (Tableau 14), un contact amélioré entre les substrats ne peut pas à lui seul être responsable de l'augmentation de la quantité d'ester produite.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

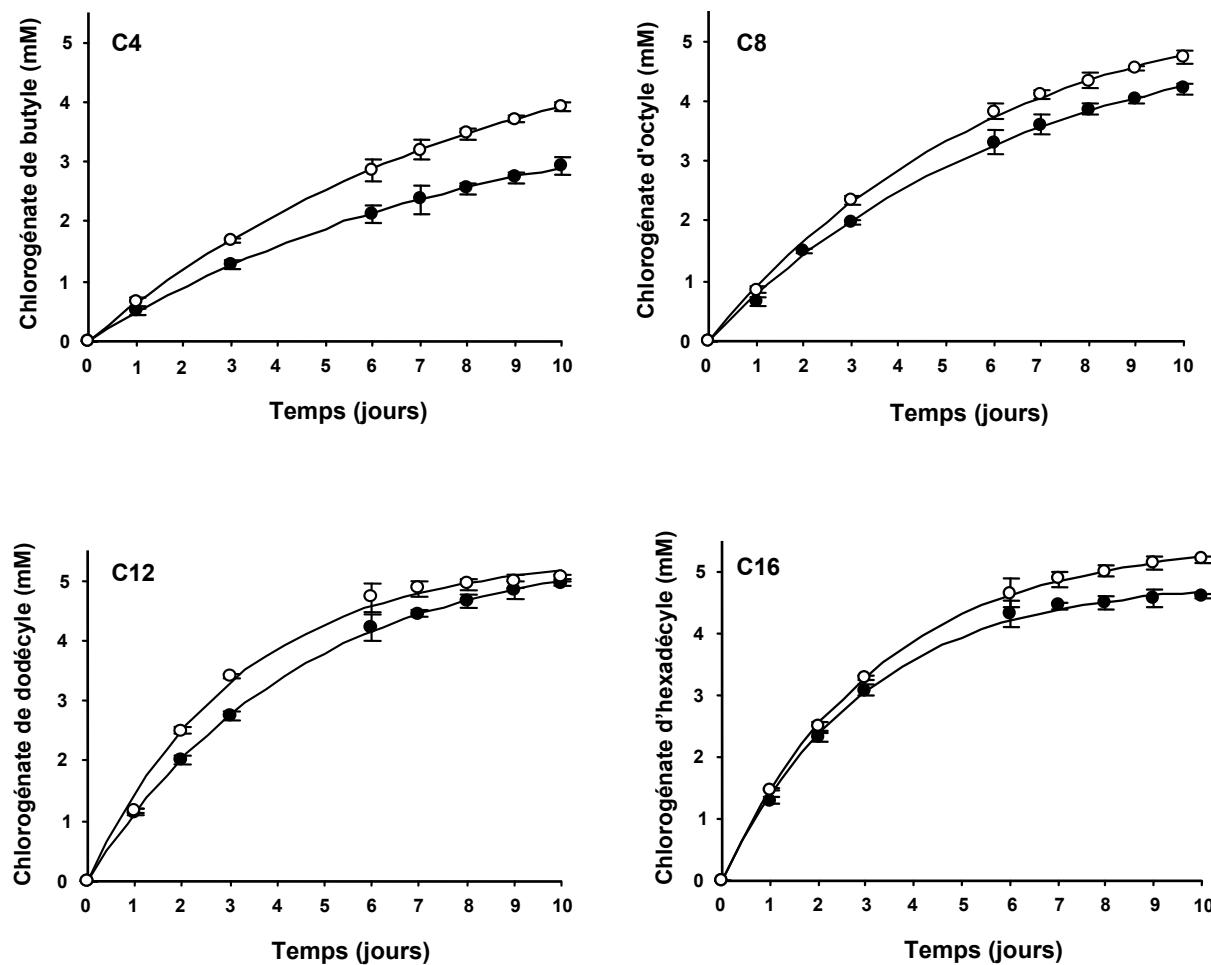


Figure 28. Cinétiques de formation de produits des réactions d'estéification (●) et de transestérification (○) de l'acide chlorogénique et son ester méthylique avec le butanol, l'octanol, le dodécanol et l'hexadécanol, catalysées avec 2 % (p/p) de lipase de *Candida antarctica* B.

En effet, au bout de 10 jours, on constate que les meilleurs résultats en termes d'esters formés sont obtenus pour les réactions impliquant les alcools à chaînes les plus longues (C₁₂ et C₁₆) (Figure 28), dans lesquels non seulement l'acide chlorogénique libre mais également son ester méthylique, ont les plus faibles solubilités (Tableau 14). Ainsi, une approche unidimensionnelle, dans laquelle la solubilité est le seul descripteur, semble insuffisante pour expliquer les résultats obtenus. De plus, une comparaison avec les travaux de Guyot *et al.* (2000), concernant la quantité de lipase mise en œuvre, montre qu'une augmentation de seulement 0,5 % (p/p), entraîne une amélioration des rendements d'estéification pouvant aller jusqu'à 60 %.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Par conséquent, dans les sections suivantes, l'influence du milieu réactionnel et de la quantité de biocatalyseur ont été évaluées afin d'optimiser ces deux paramètres pour l'obtention de meilleurs rendements de synthèse.

1.1.3.2. Effet de la quantité d'enzyme

Le coût des biocatalyseurs reste à ce jour un des principaux facteurs limitant l'utilisation des lipases à l'échelle industrielle. Nous avons donc déterminé la quantité minimale de lipase nécessaire pour obtenir une vitesse et un rendement de réaction au moins égaux à ceux obtenus par Guyot *et al.* (2000).

La Figure 29 montre la relation existant entre les vitesses initiales d'estérification et transestérification et la quantité de lipase employée dans ces réactions. En estérification, une relation linéaire entre la vitesse de réaction et la quantité de lipase a été observée lorsque le butanol et l'octanol sont utilisés, avec des coefficients de corrélation (R^2) respectivement de 0,98 et 1. En présence de dodécanol, cette linéarité est valable seulement jusqu'à 5 % de lipase ($R^2 = 0,95$). Finalement, avec l'hexadecanol, une chute de la vitesse est obtenue avec 10 % (p/p) de lipase. Concernant la transestérification, la relation existant entre vitesse réactionnelle et quantité de lipase est linéaire dans tous les cas avec des coefficients de corrélation $\geq 0,98$.

Une explication possible, quant à la diminution de la vitesse d'estérification directe pour l'hexadécanol, pourrait être liée à la quantité d'eau formée pendant la réaction. Cette quantité peut être calculée compte tenu du fait que le nombre de moles d'eau formées est égal au nombre de moles d'ester formées, donc il est possible d'obtenir directement de la Figure 28, ces concentrations.

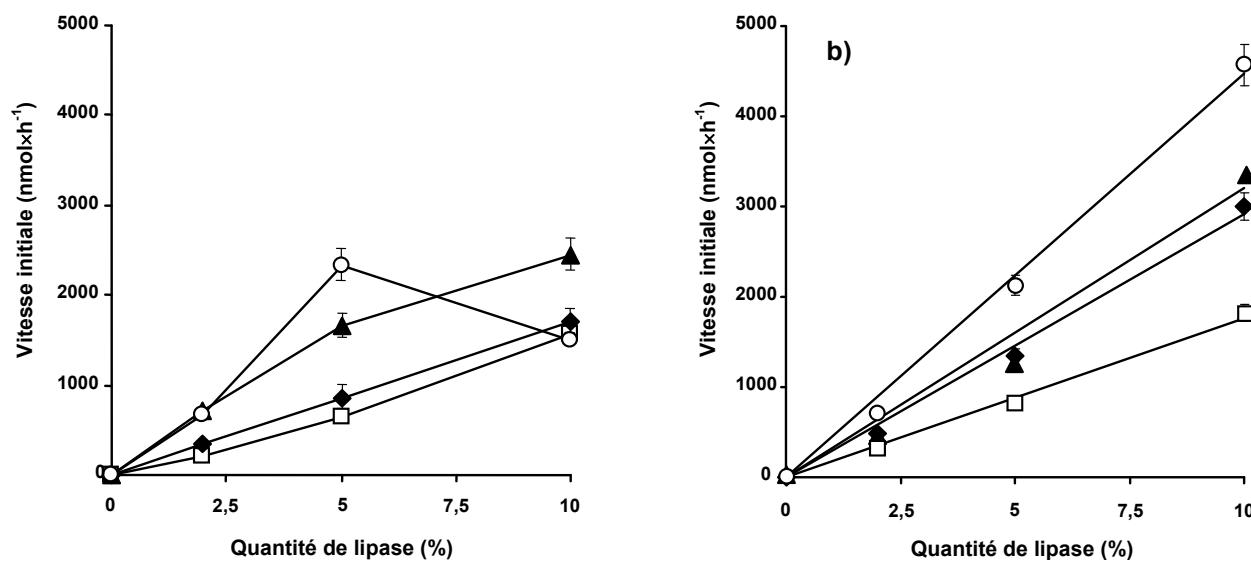


Figure 29. Effet du pourcentage (p/p) de la lipase *Candida antarctica* B sur les vitesses des réactions d'estérification (a) et de transestérification (b) pour les synthèses des chlorogénates de butyle (□), d'octyle (◆), de dodécyle (▲) et d'hexadécyle (○).

Ainsi, la concentration en eau (pendant les premières 24 h de réaction) est de 0,66 mM pour les réactions d'estérification par le butanol et l'octanol mais elle double (environ 1,3 mM) pour celles avec le dodécanol et l'hexadécanol. En conséquence, il est vraisemblable que dans le cas de l'estérification avec des alcools gras de longueur de chaîne de 12 et 16 carbones, pour lesquels les vitesses de réaction ont été supérieures à celles de leurs analogues en C₄ et C₈, une formation trop rapide et importante d'eau ne peut être totalement adsorbée par la quantité de tamis moléculaire présente dans le milieu réactionnel. De ce fait, cette eau non piégée serait adsorbée par la lipase elle-même pour former une couche mono- ou multi-moléculaire autour du biocatalyseur, empêchant ainsi la diffusion de l'alcool vers son site catalytique (Vásquez Lima *et al.*, 1995). De plus, cette hypothèse est étayée par le fait que dans les systèmes de transestérification aucune inhibition ou décroissance de la vitesse réactionnelle n'a été observée.

Bien que la vitesse de réaction dans ce type de synthèses soit cruciale d'un point de vue énergétique et de productivité, il est évident que le rendement obtenu au final l'est tout autant. En conséquence, nous avons également étudié la relation

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

existant entre la quantité de lipase utilisée et le rendement obtenu (Figure 30).

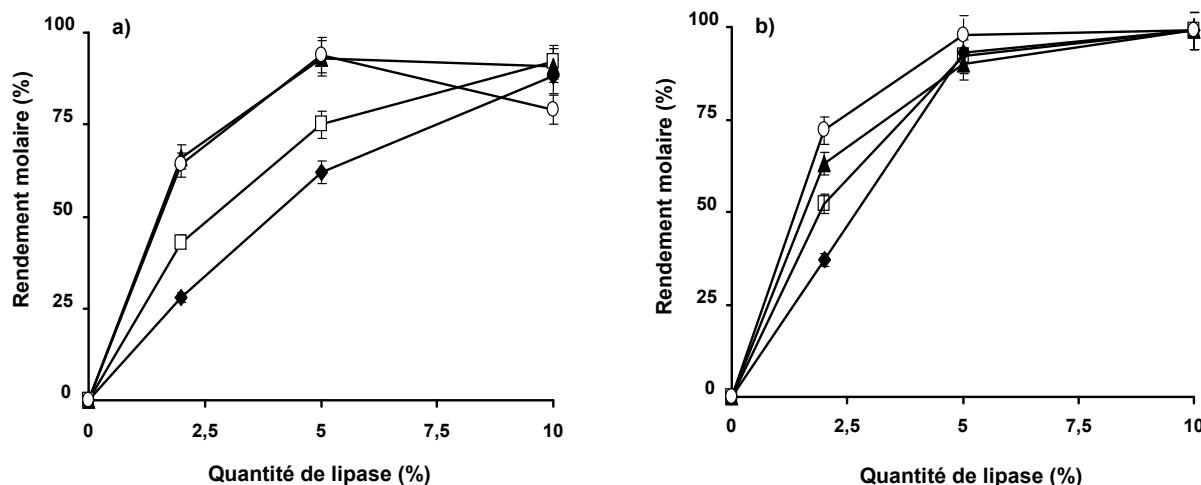


Figure 30. Effet de la quantité (% p/p) de lipase de *Candida antarctica* B sur les rendements molaires des réactions d'estérfication (a) et tranestérfication (b) pour les synthèses des chlorogénates de butyle (◆), octyle (□), dodécyle (▲) et hexadécyle (○).

Dans tous les cas (estérfication et tranestérfication), le rendement de la réaction augmente jusqu'à ce que la quantité de lipase atteigne 5 % puis un comportement stagnant semble être observé. Ce comportement pourrait être attribué à un phénomène d'agglomération du biocatalyseur lorsqu'il est utilisé au-delà de ce pourcentage. Un résultat similaire a par exemple été observé par Enaud *et al.* (2004) concernant les synthèses de phloridzine-5"-o-cinnamates. Ces auteurs concluent qu'au dessus d'une concentration en lipase de 20 mg/L la diminution de la vitesse de réaction est liée à des limitations de diffusion.

De plus, un comportement atypique a été observé en estérfication directe impliquant les alcools en C₁₂ et C₁₆ pour lesquelles les rendements de la réaction atteignent un maximum pour une quantité de lipase de 5 % (p/p), puis diminuent au delà (Figure 29 a). Une telle observation pourrait être liée, une fois de plus, à l'eau formée durant la réaction qui ne serait alors que partiellement adsorbée par le tamis moléculaire ce qui générerait une forte résistance au transfert de masse pour les molécules les plus apolaires comme c'est le cas pour l'hexadécanol par exemple. En conclusion, les meilleurs rendements et vitesses de réaction sont obtenus pour une quantité de biocatalyseur de l'ordre de 5 % et

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

c'est donc cette valeur qui a été retenue pour les études ultérieures.

I.1.3.3. Effet de la polarité du milieu réactionnel (longueur de chaîne de l'alcool)

Dans le paragraphe I.3.1, nous avons déterminé que la vitesse et les rendements de réaction sont fortement influencés par l'hydrophobie du milieu réactionnel. En conséquence, dans cette section, nous allons aborder l'effet de la longueur de chaîne des alcools aliphatiques utilisés à la fois comme solvant (milieu fondu) et comme substrat. En ce sens, l'influence du caractère hydrophobe de chacun des alcools sur l'activité enzymatique, a été évaluée en utilisant comme descripteur le log P. En effet, cette valeur est une mesure quantitative de la tendance qu'a un solvant ou une molécule organique à se distribuer entre deux phases de polarités différentes. Le calcul de cette variable a été effectué en utilisant le logiciel Chemdraw Ultra 5.0 (cf. matériels et méthodes, section II.10.1).

Comme le montre la Figure 31, l'activité enzymatique pour les réactions d'estérification et de transestérification augmente pour des valeurs de log P croissantes à l'exception de l'estérification entre l'acide chlorogénique et l'hexadécanol. Afin de mieux comprendre ce comportement, il est nécessaire de prendre en considération les aspects structuraux de la lipase de *Candida antarctica* B et comment cette dernière peut être influencée par la polarité du milieu.

D'après Uppenber *et al.* (1994), et comme illustré dans la Figure 8 (cf. bibliographie, page 44), le site catalytique de la lipase de *Candida antarctica* B est accessible au solvant et aux substrats à travers des canaux hydrophobes en forme d'entonnoir. De plus, les auteurs ont identifié deux régions protéiques de haute mobilité qui, en théorie, sont les responsables de la variation d'accessibilité au site catalytique pendant la catalyse. Les fonctions de ces régions sont bien déterminées et les auteurs ont conclu que la première agit comme un volet, tandis que la deuxième modifie la taille et la forme des canaux hydrophobes et de ce fait, la surface hydrophobe à parcourir pour les substrats avant d'atteindre le site catalytique de l'enzyme.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

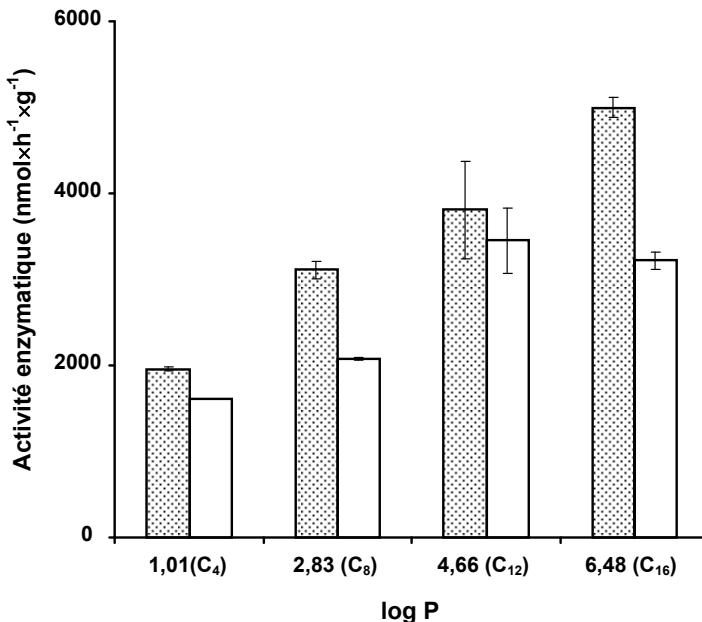


Figure 31. Effet du caractère hydrophobe du milieu sur l'activité enzymatique de la lipase de *Candida antarctica* B pour les réactions de transestérification (●) et d'estérfication (□) en milieu « fondu » pour la synthèse de chlorogénates de butyle (C₄), d'octyle (C₈), de dodécyle (C₁₂) et d'hexadécyle (C₁₆).

Par conséquent, à mesure que l'hydrophobie du milieu augmente (Figure 31), il est possible qu'un changement de conformation de la lipase vers une forme optimale favorisant la synthèse ait lieu. Cette conformation optimisée résulterait en un changement de la forme et de la taille des canaux hydrophobes améliorant ainsi la capacité du substrat à accéder au site actif dont l'accèsibilité aurait été facilitée. Par ailleurs, la plus faible activité enzymatique observée en estérfication directe pourrait être liée au caractère plus hydrophile de l'acide chlorogénique libre par rapport à son homologue ester alkylique. En effet, la plus forte polarité de l'acide pourrait gêner son accession au site actif en raison de forces de répulsion générées par la présence de grandes quantités d'alcool gras interagissant à la fois avec la surface de l'enzyme et ses parois hydrophobes.

Des phénomènes comparables ont été observés par d'autres auteurs, et à titre d'exemple on peut citer les travaux de Humeau *et al.* (1998) et Lue *et al.* (2005). Les premiers ont étudié la lipophilisation de l'acide ascorbique par transestérification avec le palmitate de méthyle en milieu organique (2-méthyle-2-butanol), et ont constaté

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

qu'une augmentation de l'hydrophobie du milieu (utilisant comme variable des valeurs de log P comprises entre 0,02, et 0,16) conduisait à une amélioration de la vitesse de réaction de 4 à 25 g.L⁻¹.h⁻¹. Lue *et al.* (2005), quant à eux, ont montré que l'hydrophobie du milieu exerçait une influence considérable sur l'activité enzymatique lors de l'estérification de l'acide cinnamique par l'alcool oléique. Ainsi, par exemple, les milieux de faible hydrophobie ($\log P < 2,5$) conduisent à une activité enzymatique peu importante et comprise entre 1 et 3,92 nmol. min⁻¹.g⁻¹, tandis qu'en milieu de polarité plus élevée ($\log P > 3,5$), ces mêmes activités avoisinaient des valeurs comprises entre 128 et 155 nmol. min⁻¹.g⁻¹.

I.1.3.4. Effet de l'activité de l'eau initiale

L'activité thermodynamique de l'eau (a_w) est très importante en biocatalyse puisqu'elle régit l'état conformationnel de l'enzyme et donc son activité en synthèse (Caro *et al.*, 2002). Afin d'étudier l'influence de ce paramètre, nous avons choisi de mettre en œuvre des réactions d'estérification et de transestérification en utilisant comme nucléophile le dodécanol. Le choix de cet alcool gras a été fondé sur le fait qu'il présentait une longueur de chaîne intermédiaire parmi tous les alcools utilisés dans les sections ultérieures.

La Figure 32 montre les effets de l' a_w sur l'activité enzymatique et les rendements pour l'estérification directe de l'acide chlorogénique et la transestérification du chlorogénate de méthyle. Dans les deux cas, l'activité enzymatique est favorisée pour les valeurs d' a_w faibles, ce qui indique que la lipase de *Candida antarctica* B requiert de faibles quantités d'eau pour atteindre sa configuration optimale pour ce type de synthèses. D'autre part, on observe également que l'augmentation de l' a_w a un effet négatif sur l'activité enzymatique.

Ce phénomène peut être compris en analysant l'influence du micro environnement aqueux autour de la lipase sur son activité enzymatique. En effet comme proposé par Caro *et al.* (2002), le niveau d'hydratation initial du biocatalyseur et sa teneur en eau peuvent être corrélés par l'intermédiaire des courbes d'isotherme de sorption du biocatalyseur (adsorption/désorption). Le niveau d'hydratation optimal pour la synthèse se trouve en général dans la région linéaire de cet isotherme.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

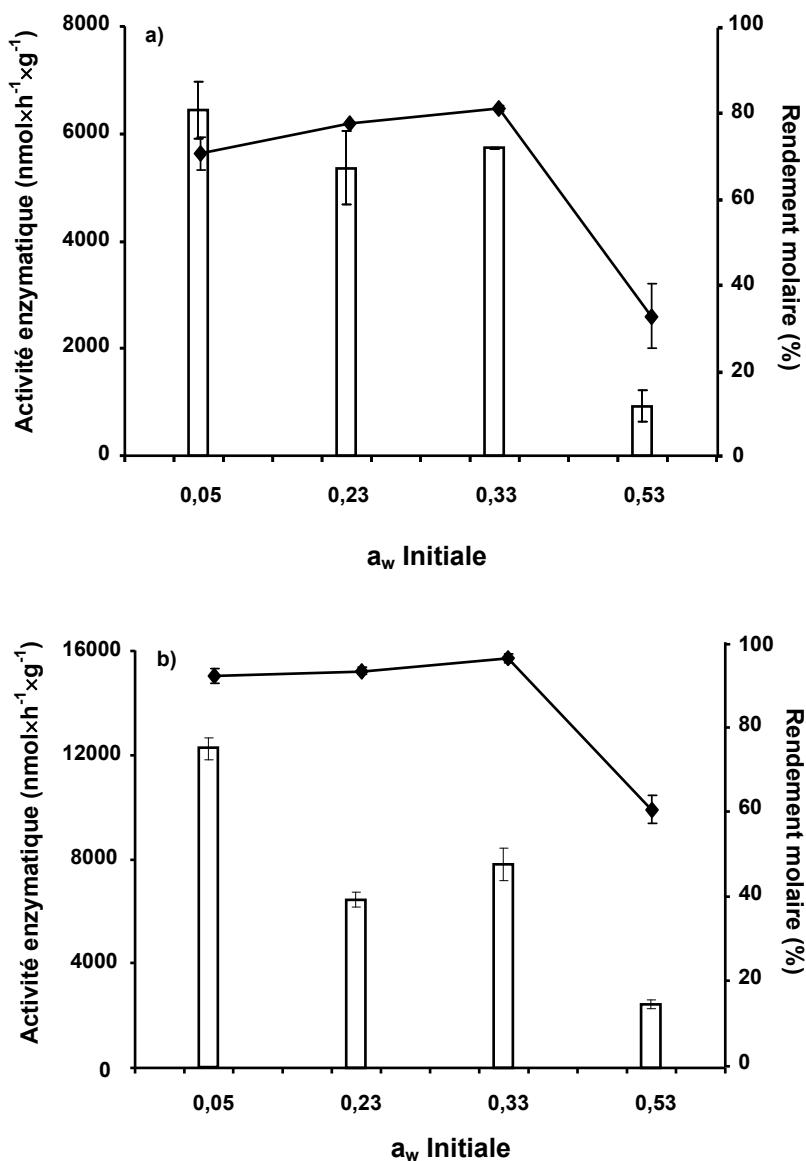


Figure 32. Effet de l' a_w initiale sur l'activité enzymatique (□) et les rendements de réaction à 96 h de réaction (◆) pour les réactions d'estérification (a) et transestérification (b) de l'acide chlorogénique et du chlorogénate de méthyle avec le dodécanol catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B.

Pour les valeurs d' a_w élevées, l'eau en excès est liée à l'enzyme par l'intermédiaire de forces capillaires et osmotiques qui changent sa configuration enzymatique et la rendent plus active en hydrolyse. L'influence de l' a_w sur la catalyse enzymatique est bien documentée dans la littérature, et différents moyens de contrôle sont proposés. Le plus courant consiste en l'addition de tamis moléculaire.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Ainsi par exemple, Adamczak *et al.* (2005), ont montré que l'addition de tamis pour la synthèse enzymatique d'ascorbat d'oléyle permettait d'augmenter les rendements de 15 à 46 %. Par la suite, Stevenson *et al.* (2007), ont constaté, eux aussi, que l'usage d'un tamis moléculaire dans les réactions d'estérification des acides caféïque et cinnamique avec le phénylethanol résultait en l'amélioration des rendements de production des esters ; de 22 à 88 % dans le cas de l'acide cinnamique et de 22 à 40 % dans celui de l'acide caféïque.

Dans le cas de la transestérification, la réaction devient pratiquement irréversible comme en témoigne le rendement proche de 95 % (Figure 33). Ce phénomène d'irréversibilité peut être expliqué facilement par une élimination aisée du méthanol formé au cours de la réaction en raison de sa forte volatilité.

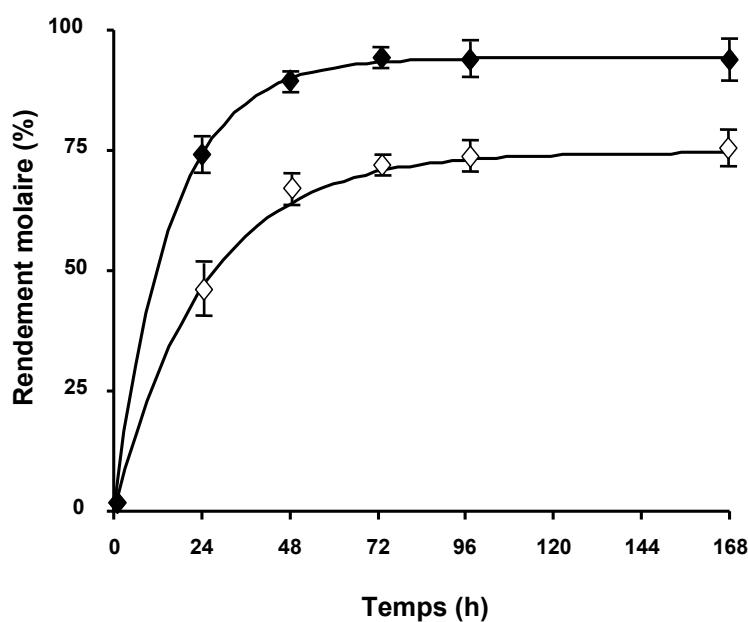


Figure 33. Rendements molaires des réactions d'estérification (◊) et transestérification (◆) de l'acide chlorogénique avec le dodécanol en milieu fondu à une $a_w = 0,05$.

Une autre explication aux fortes différences d'activités observées peut être l'existence de limitations de transfert de masse, dues au fait que l'eau présente sur les particules de biocatalyseur empêcherait le transfert des substrats au site catalytique. Cette hypothèse est basée sur le travail de Vásquez-Lima *et al.* (1995),

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

qui ont déterminé les effets de l'eau, à échelle microscopique, sur l'activité enzymatique d'une lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei*. Leurs résultats ont montré que l'eau pouvait créer des couches autour du biocatalyseur qui sont plusieurs fois plus épaisses que les couches d'eau adsorbées pour la lipase afin de lui conférer sa structure conformationnelle optimale. Ainsi, à mesure que l'épaisseur de cette couche augmente, il est plus difficile pour les substrats, notamment pour les plus hydrophobes, d'atteindre le site actif de la lipase. En conséquence, nous proposons que pour des valeurs d' a_w supérieures à 0,33 la diminution de l'activité enzymatique peut être attribuée à un déplacement de l'équilibre en faveur de la réaction inverse (hydrolyse) ou des limitations de transferts de masse vers le site catalytique. Concernant l'efficacité de la réaction de transestérification, la Figure 32, permet de constater que l'activité catalytique de la lipase est pratiquement le double de celle obtenue en estérification directe.

Des résultats similaires concernant l'influence de l' a_w initiale de la lipase de *Candida antarctica* B en milieux organiques impliquant des substrats de polarités différentes sont abondants dans la littérature. Ainsi par exemple, nous pouvons citer Humeau *et al.* (1998) montrant que les meilleurs rendements pendant la synthèse de palmitate d'ascorbyle sont obtenus avec une a_w égale à 0,07 ; Kontogianni *et al.* (2001) qui, en étudiant l'acylation de flavonoïdes de type rutine et narangine avec des alcools de longueur de chaînes variables (C_8 , C_{10} et C_{12}) ont obtenu les meilleurs résultats avec une a_w optimale à 0,11 ; Enaud *et al.* (2004) qui ont obtenu la même valeur d' a_w optimale concernant la synthèse de cinnamate de phloridzine et enfin, Lue *et al.* (2005), dont les meilleurs rendements d'estérification de l'acide cinnamique avec l'alcool oléique sont atteints pour une a_w fixée à 0,05.

Ces résultats montrent clairement que, malgré la différence structurale des substrats, les meilleures conformations spatiales de la lipase en réactions de synthèse, sont obtenues à de faibles niveaux d'hydratation. En conséquence, il faut avoir à l'esprit, que dans ce type de système, un pré-équilibrage de l' a_w est capital pour obtenir des rendements et des vitesses de réaction satisfaisants.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

En conclusion, la voie chimio-enzymatique pour la synthèse d'esters de l'acide chlorogénique, en passant par un intermédiaire de type méthyl ester, semble être la meilleure stratégie. En effet, la lipophilisation de l'ester méthylique présente l'avantage de générer un co-produit, le méthanol, qui est facilement éliminé en continu. En outre, la meilleure solubilité du dérivé ester dans les milieux hydrophobes utilisés pour la synthèse, conduit à un meilleur contact entre les substrats, ce qui se traduit par une diminution de la résistance au transfert de masse et d'excellents rendements, lors de la transestérification. Enfin, dans le cas de l'estérification directe de l'acide chlorogénique par un alcool gras, l'élimination de l'eau formée représente un inconvénient majeur que les tamis moléculaires ne peuvent pallier et qui nécessiterait des systèmes plus efficaces, dont l'impact serait significatif sur le coût global du procédé.

I.1.4. Caractérisation des esters gras de l'acide chlorogénique par spectrométrie de masse d'ionisation par nébulisation opérant en mode de fragmentation négatif (SM-IPN)

L'identification des produits de la réaction après leur purification (cf. matériels et méthodes) a été faite par spectrométrie de masse en utilisant une source d'ionisation par nébulisation en conditions de fragmentation négative. Après acquisition en mode balayage (MS) la fragmentation est réalisée sur les ions moléculaires parents (MS^2) et leurs fils (MS^3). À titre d'exemple, nous analyserons les résultats obtenus pour la fragmentation du chlorogénate de dodécyle. Les Figures 34 a, 34 b et 34 c, montrent respectivement les spectres de masse obtenus en conditions de fragmentation négative en mode balayage, MS^2 et MS^3 .

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

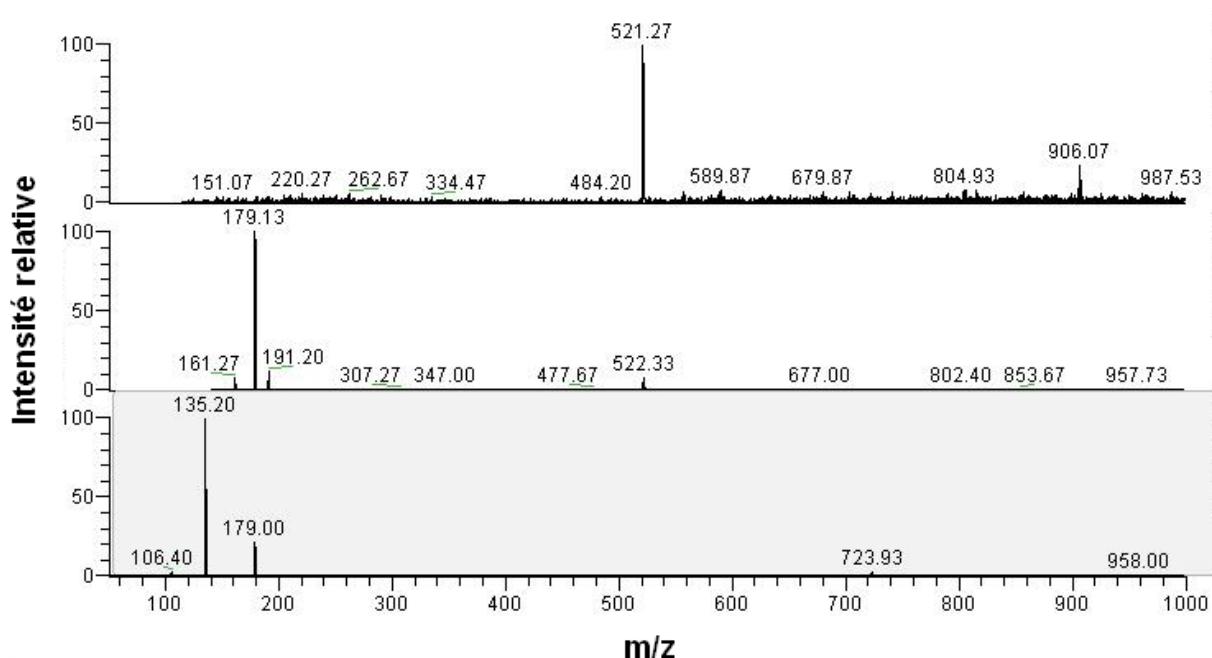


Figure 34. Spectres de masse obtenus sous conditions de fragmentation négative pour le chlorogénate de dodécyle en mode balayage (a), MS^2 (b) et MS^3 (c).

Le pic à 521,27 uma, correspond à la forme déprotonée du chlorogénate de dodécyle qui, suite à une fragmentation en utilisant une énergie de collision de 35 % génère des fragments à 179,13 uma et 191,2 uma ce qui correspond respectivement aux fragments de l'acide quinique et caféique. Pour finir, une fragmentation complémentaire sur l'ion de l'acide caféique, en utilisant une fois de plus une énergie de collision de 35 %, conduit à la perte du groupement carboxyle de cet acide. En ce qui concerne les autres esters, le modèle de fragmentation a été identique, comme en témoignent les valeurs consignées dans le Tableau 15.

En conséquence, il est possible de proposer un mode de fragmentation général pour ce type d'esters comme le montre la Figure ci-dessous (Figure 35). En mode balayage, en effet, les ions moléculaires obtenus correspondent à chacun des esters sous leur forme déprotonée. La fragmentation de l'ion moléculaire conduit à des fragments de l'acide quinique (191 uma) et caféique (179 uma). Finalement, une fragmentation de l'ion correspondant à l'acide caféique amène à la perte de sa fonction carboxylate (COO^-). Ces résultats concordent avec ceux reportés par Stevenson *et al.* (2007) pour le caféate de 4-méthoxyphényléthyle, pour lequel la

Résultats et discussion :

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

fragmentation a d'abord lieu au niveau des liaisons esters, puis elle est suivie de la perte de la fonction carboxylate résultante.

Tableau 15. Ions obtenus sous conditions de fragmentation négative des dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique en mode balayage, MS² et MS³.

Composés	Masse molaire	Mode balayage	MS ²	MS ³
Chlorogénate de méthyle	368,31	367 (100)	191 (5)	179 (100) 179 (8) 135 (100)
Chlorogénate de butyle	410,31	409 (100)	191 (4)	179 (100) 179 (16) 135 (100)
Chlorogénate d'octyle	466,31	465 (100)	191 (2)	179 (100) 179 (2) 135 (100)
Chlorogénate de dodécyle	522,31	521 (100)	191 (13)	179 (100) 179 (25) 135 (100)
Chlorogénate d'hexadécyle	578,31	577 (100)	191 (59)	179 (100) n.d. n.d.

Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'intensité relative du signal. n.d. = non déterminé en raison d'un signal trop faible.

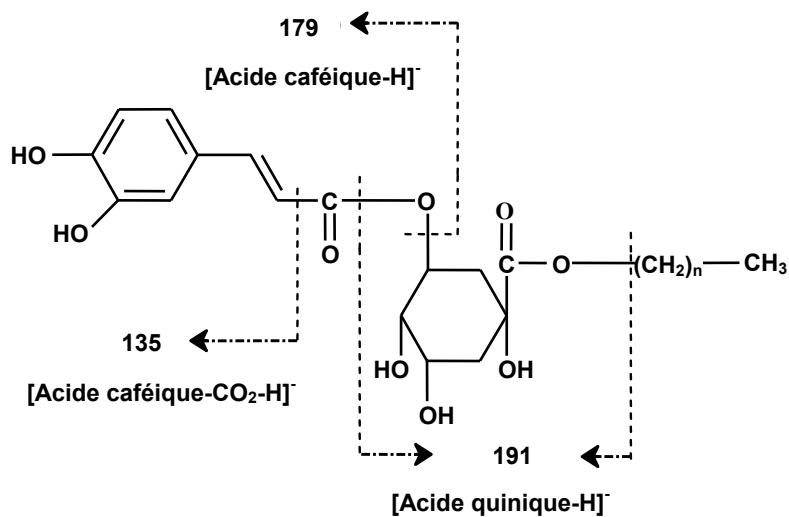


Figure 35. Schéma de fragmentation de dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique. n = 3, 7, 11, 15.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

I.2. Synthèse enzymatique des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique en milieu fondu

A notre connaissance, la synthèse enzymatique d'esters gras d'acide rosmarinique n'a jamais été développée auparavant. Cependant, il existe des travaux montrant l'existence à l'état naturel d'esters méthyliques et butyliques de cet acide dans la famille des *Lamiaceae* (Huang *et al.*, 1999 ; Fecka et Turek, 2007). Si la synthèse enzymatique de ces composés n'est pas encore décrite à ce jour, Huang et Yu en 2005 ont synthétisé le rosmarinate de butyle par voie chimique asymétrique en cinq étapes, dans le but d'évaluer les activités biologiques de ce produit. Etant donné la littérature peu abondante dans le domaine, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une méthodologie permettant d'obtenir une large gamme de dérivés plus lipophiles de cet acide.

I.2.1. Synthèse chimique du rosmarinate de méthyle

Comme dans le cas de la lipophilisation de l'acide chlorogénique, nous avons tout d'abord procédé à une étape préliminaire de modification chimique de l'acide rosmarinique en son ester méthylique (cf. matériels et méthodes). En effet, la synthèse des esters gras d'acide chlorogénique a mis en évidence les avantages de la transestérification sur l'estérification directe, qui peuvent être résumés de la manière suivante :

- une meilleure solubilité du dérivé de l'acide phénolique dans les milieux hydrophobes utilisés pour la synthèse, conduit à un meilleur contact entre les substrats et facilite le transfert de masse lors de la transestérification ;
- une élimination aisée du méthanol formé permet de déplacer l'équilibre vers la synthèse et d'obtenir des taux de conversion proches de 100 %.

La méthylation de l'acide rosmarinique dans les conditions optimisées pour l'acide chlorogénique conduit, après 96 h de réaction, à un excellent rendement de 98,5 %. Cependant, le temps nécessaire pour atteindre les conditions d'équilibre thermodynamique a été presque 11 fois plus élevé que dans le cas du chlorogénate de méthyle.

Les résultats de la chromatographie sur couche mince de l'acide rosmarinique

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

et de son ester méthylique après purification sont montrés dans la Figure 36. Dans les mêmes conditions chromatographiques que celles mises en œuvre pour l'acide chlorogénique, le rapport frontal de l'acide et son ester méthylique sont respectivement de 0,36 et 0,49.

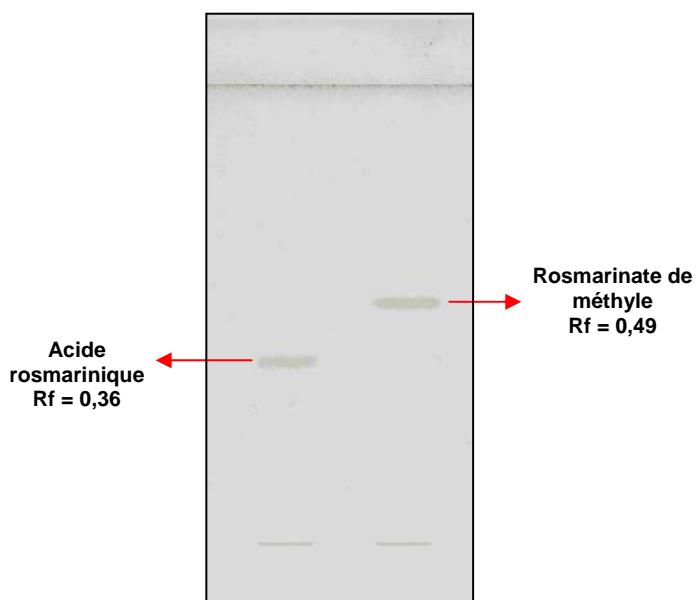


Figure 36. Détermination du rapport frontal (Rf) de l'acide rosmarinique et de son ester méthylique par chromatographie sur couche mince avec un mélange d'élution toluène/acétate d'éthyle/acide formique (50 : 40 : 10 v/v/v).

Ces valeurs montrent que ces composés ont un caractère plus hydrophobe que leurs homologues chlorogéniques. En conséquence, il est raisonnable de considérer que la solubilisation de l'acide rosmarinique ou de son ester méthylique dans les alcools gras mis en œuvre serait suffisante pour garantir le contact entre les deux substrats. C'est la raison essentielle pour laquelle les analyses de solubilité n'ont pas été effectuées pour ces composés, comme cela avait été le cas pour l'acide chlorogénique et ses dérivés. Cependant, nous avançons qu'au moins 50 % de chacun des composés seraient solubles dans les alcools gras utilisés. Cette valeur estimée est basée sur les valeurs obtenues pour l'acide chlorogénique et son ester qui ont un caractère hydrophile plus marqué.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

I.2.2. Estérfication et transestérfication de l'acide rosmarinique et de son ester méthylique en milieu « fondu »

En ce qui concerne les réactions d'estérfication et de transestérfication catalysées par la lipase de *Candida antarctica* B (Figure 37), nous avons décidé d'effectuer la lipophilisation dans les mêmes conditions optimisées mises en œuvre pour la synthèse de dérivés de l'acide chlorogénique.

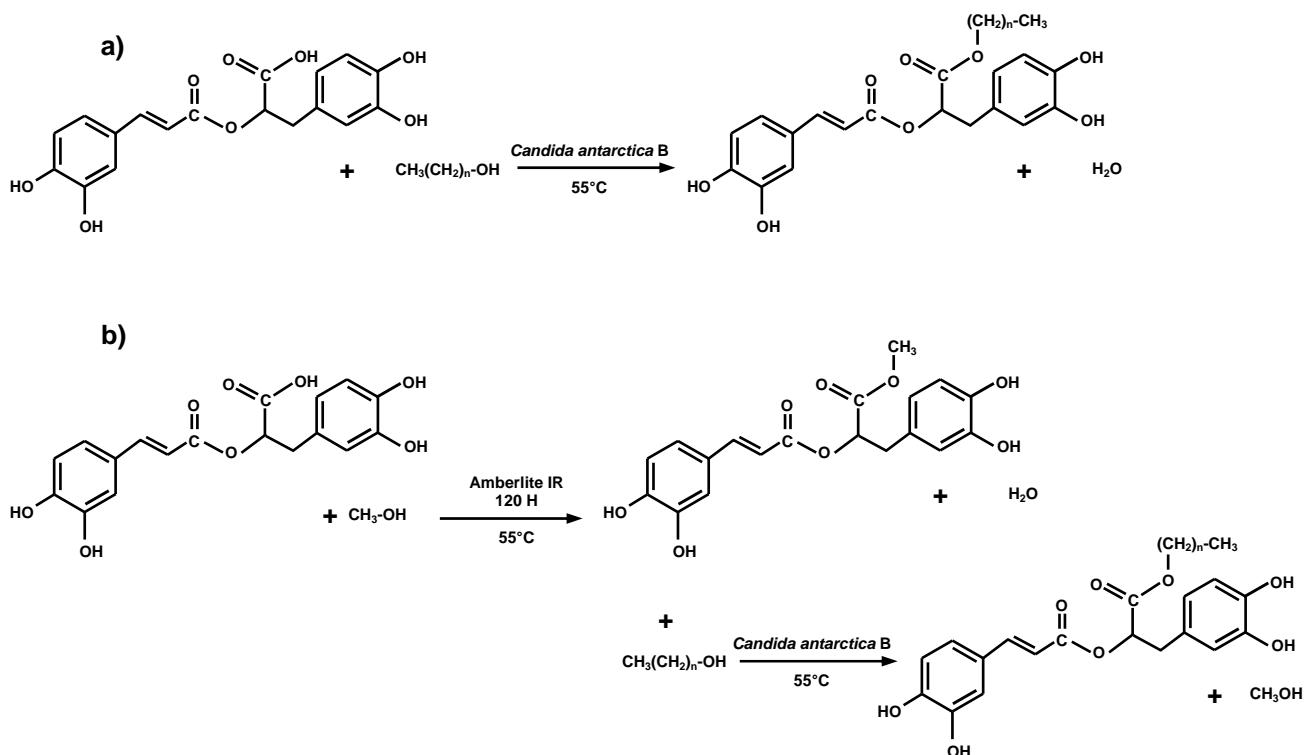


Figure 37. Stratégies étudiées pour la synthèse des esters lipophilisés de l'acide rosmarinique catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B par estérfication directe (a) et transestérfication (b) par voie chimio-enzymatique. $n = 3, 7, 11$ et 15 .

Ce choix est facilement justifiable dans la mesure où une quantité de 5 % (p/p) de biocatalyseur permet un bon compromis entre rendement et vitesse de réaction. De plus, et comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, le pré-équilibrage de l' a_w du biocatalyseur à des valeurs inférieures à 0,11 a été systématiquement effectué.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Dans ces conditions, nous avons tout d'abord déterminé l'influence de la longueur de chaîne de l'alcool sur les vitesses de réaction d'estérification et transestérification. Pour cela, nous avons travaillé avec des alcools aliphatiques primaires de longueur de chaîne de 4, 8 et 12 atomes de carbone. Les résultats cinétiques pour les réactions d'estérification et de transestérification en employant l'octanol et le dodécanol sont montrés en la Figure 38. Dans le cas du butanol, après plus de 11 jours de réaction, aucune formation de l'ester désiré n'a été observée en estérification directe, tandis qu'un rendement de seulement 0,95 % était mesuré pour la transestérification.

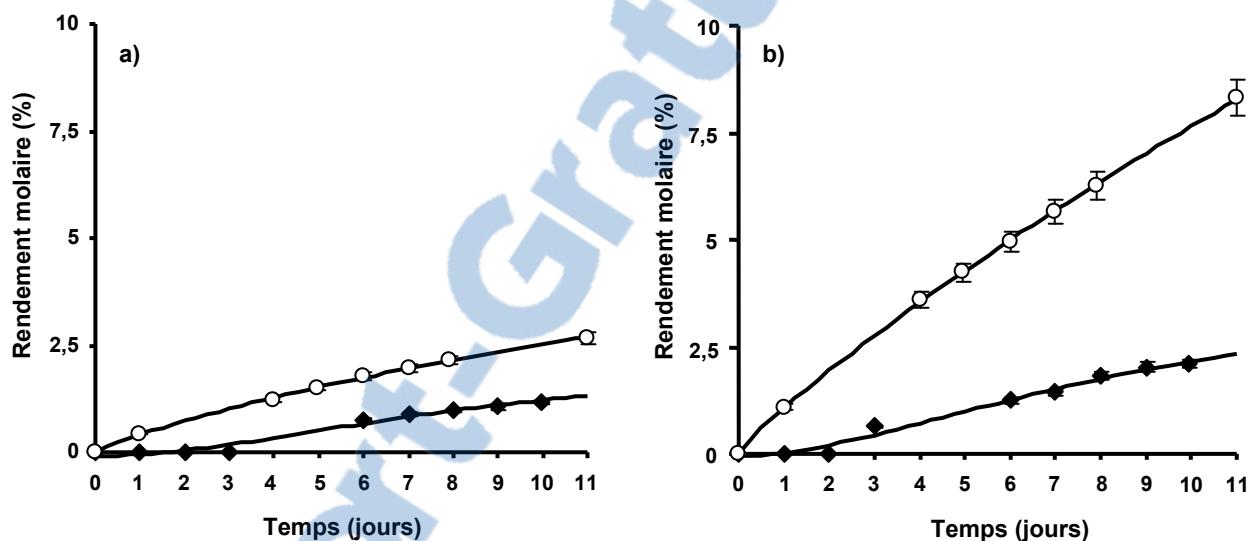


Figure 38. Rendements molaires des réactions d'estérification (◆) et transesterification (○) catalysées par la lipase de *Candida antarctica* B avec l'octanol (a) et le dodécanol (b) comme donneurs d'acycles.

Comme le montre la Figure 38, il apparaît clairement que la réaction de transestérification est plus efficace que celle d'estérification. En effet, une comparaison des rendements au bout de 11 jours montre que la transestérification a été 2,3 et 4 fois plus efficace que l'estérification avec l'octanol et le dodécanol, respectivement. En outre, dans le cas de l'estérification, il a été observée une phase de latence qui pourrait être expliquée si l'on considère que dans ce cas, l'acide a une solubilité plus limitée, ainsi la réaction se montre peu performante jusqu'à la formation des premières molécules d'esters qui vont alors aider la solubilisation de l'acide (Guyot *et al.*, 2000). De plus, les effets positifs de l'utilisation d'un milieu

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

réactionnel plus hydrophobe suivent la même tendance que celle démontrée dans le cas de l'acide chlorogénique. Par conséquent, nous considérons que les hypothèses formulées pour l'acide chlorogénique sont également valables pour ce système réactionnel.

Cependant, il est surprenant qu'après 11 jours de réaction les rendements demeurent aussi faibles, et en conséquence, avant de tenter de modifier les conditions dans le but d'améliorer la synthèse, il nous est apparu indispensable d'en comprendre d'abord les raisons. Afin d'essayer d'y répondre, nous abordons ci-dessous les principales variables pouvant être impliquées dans l'efficacité de cette synthèse enzymatique.

Si l'on considère le contact entre les deux substrats, dans les deux cas (estérification et transestérification), par comparaison avec les résultats de solubilité de l'acide chlorogénique et de son dérivé, nous avons conclu qu'il est très peu probable que les limitations de solubilité soient impliquées dans les faibles rendements obtenus.

D'un point de vue structural, la modification enzymatique de l'acide rosmarinique et de son ester méthylique porte sur la structure de l'acide 3,4-dihydroxylphénylpropionique qui a été auparavant estérifié par la même lipase avec des rendements molaires de 82 % (Weitkamp *et al.*, 2008). Par conséquent, le phénomène décrit par différents auteurs (Guyot *et al.*, 1997; Buisman *et al.*, 1998 ; Stamatis *et al.*, 1999) où le carbone de la fonction carboxylique voit son caractère électrophile affaibli par des phénomènes de mésomérie est peu probable.

Concernant la lipase elle-même, les conditions du pré-équilibrage de l' a_w ont été les mêmes que dans le cas de la synthèse des esters de l'acide chlorogénique. On peut donc penser que son état d'hydratation optimal, garantissant une bonne activité biocatalytique, était également atteint. De plus, même en conditions de forte hydratation où il est parfaitement décrit que l'équilibre est déplacé vers la réaction d'hydrolyse (Caro *et al.*, 2002 ; Adamczak *et al.*, 2005 ; Stevenson *et al.*, 2007), les rendements de la lipophilisation de l'acide chlorogénique, par exemple, ont été

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

supérieurs à 25 %, ce qui est loin d'être le cas ici. Si l'on s'intéresse maintenant aux aspects mécanistiques des phénomènes (Figure 39), on peut dire que ce type de biocatalyseurs agit par l'intermédiaire d'un mécanisme de type « bi-bi ping pong ». Ce mécanisme est caractérisé par l'apparition de deux états de transition qui sont stabilisés par le trou oxyanionique après l'adsorption des substrats. Dans ces deux états, la catalyse développée a un comportement similaire à celui d'une catalyse acide classique.

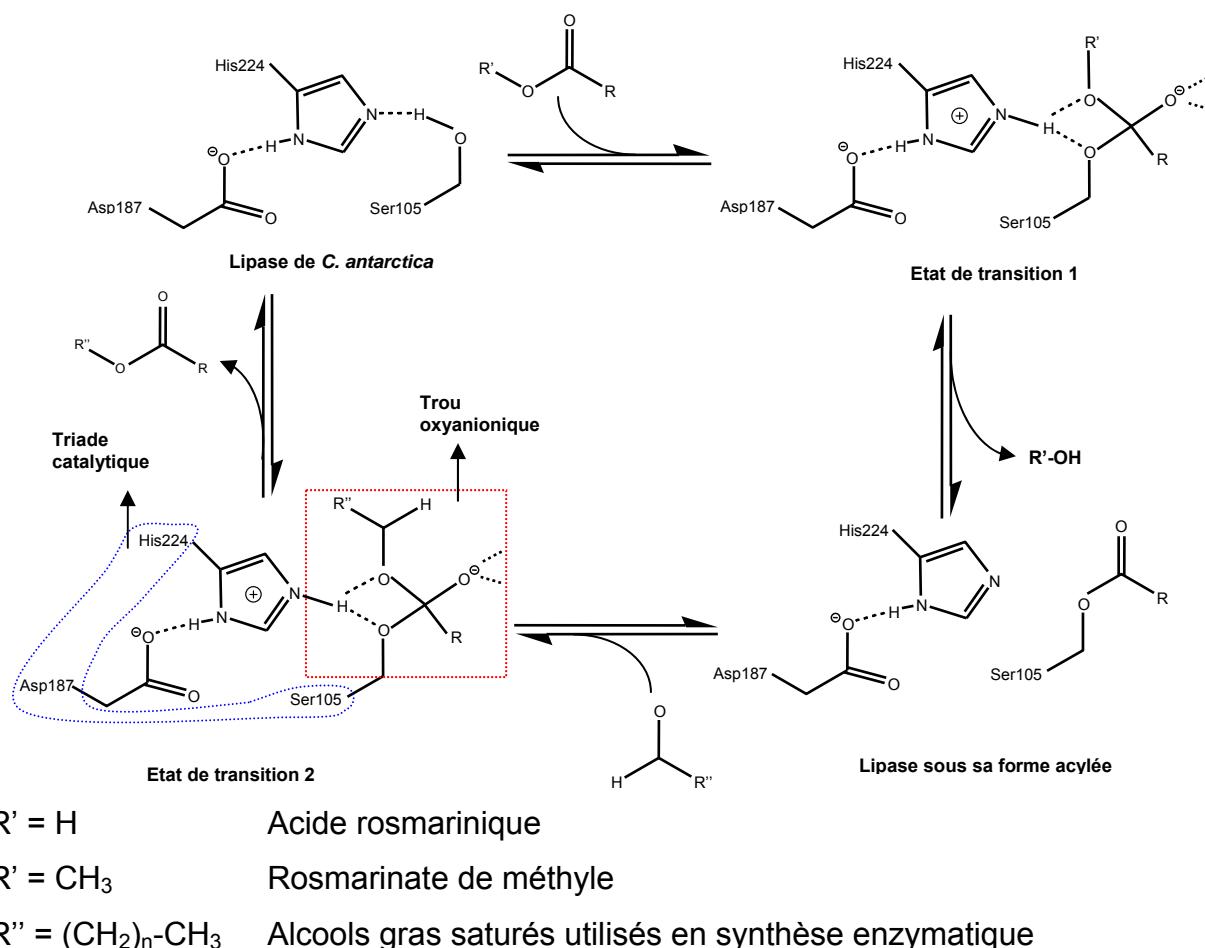


Figure 39. Mécanisme réactionnel impliqué dans la synthèse enzymatique de dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique. Adapté de Rotticci (2000).

Les étapes de ce mécanisme peuvent être décrites de la façon suivante :

- Tout d'abord l'agent acylant, acide ou ester, est adsorbé sur le site catalytique de la lipase puis le groupement carbonyle est attaqué par le groupement

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

hydroxyle de la serine afin de former l'état de transition 1. Ainsi, la double liaison C=O est transformée en une liaison simple, ce qui confère à l'oxygène une charge négative (oxyanion) ; tandis que la quatrième valence de l'atome de carbone est liée à la serine par une liaison covalente. Concernant l'oxyanion, ce dernier va former des liaisons hydrogènes avec les groupes amides des résidus Thr40 et Gln106. C'est ce site, nommé de façon courante « trou oxyanionique », qui contribue à la stabilisation de l'état de transition. Puis, la désorption conduit à la formation du co-produit de la réaction (R'-OH), correspondant à l'eau dans le cas de l'estérification ou au méthanol dans le cas de la transestérification. De plus la désorption du co-produit conduit à la formation d'un intermédiaire dans lequel la lipase est présente sous forme acylée.

- La catalyse se poursuit avec l'addition nucléophile de l'alcool sur le groupe carbonyle de la forme acylé de la lipase conduisant à la formation d'un deuxième état de transition, lequel est stabilisé à nouveau par la formation d'un trou oxyanionique, comme lors de la première étape. Finalement, la désorption de cet état de transition conduit à la formation du produit final de la réaction et à la libération de la lipase dans son état actif.

Par conséquent, l'efficacité globale de la biocatalyse est liée au bon déroulement de chacune des étapes décrites précédemment. Or, on peut écarter le fait que la deuxième étape soit limitante car la formation de cet état de transition est liée à l'adsorption des nucléophiles (alcools gras). En effet, si la synthèse enzymatique des esters de l'acide chlorogénique (ainsi que celles d'autres dérivés phénoliques décrits dans la littérature), s'est avérée satisfaisante avec ces mêmes alcools gras, on peut donc en déduire que l'adsorption des nucléophiles a bien eu lieu.

Si cette étape là ne peut pas être remise en cause, on peut donc raisonnablement penser que la faible activité catalytique mesurée dans le cas de la lipophilisation de l'acide rosmarinique et de son ester méthylique est liée à un phénomène d'inhibition se manifestant lors de la formation du premier état de transition.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Concernant le caractère électrophile des carboxyles des acides chlorogénique et rosmarinique, il peut être considéré comme identique, puisque les deux carboxyles sont uniquement soumis à l'effet attracteur inductif d'un oxygène en β . Par ailleurs, le caractère nucléophile de l'hydroxyle de la Ser105 peut être considéré comme indépendant du type d'acide utilisé. En conséquence, nous émettons l'hypothèse que, dans le cas de l'acide rosmarinique, l'inhibition intervenant lors de la formation du premier état de transition est due à une question de gène stérique qui rend difficile :

- soit l'attaque nucléophile de la sérine sur le groupe carboxyle et donc la formation du premier état de transition ;
- soit le transfert de proton dans l'état de transition et l'élimination du coproduit.

Or, malgré cette inhibition, une faible quantité d'ester est néanmoins formée. Une des explications à ce phénomène pourrait être la « plasticité » du site catalytique qui rend parfois possible la formation de l'état de transition. La lipase étant une protéine chargée, il n'est pas exclu alors qu'elle puisse fournir des protons de faible acidité et catalyser ainsi la réaction par un autre mécanisme.

Ainsi, nous avons décidé d'évaluer s'il était possible d'obtenir des esters gras d'acide rosmarinique en utilisant un catalyseur exprimant une force acide élevée. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser comme catalyseur chimique une résine sulfonique acide de type amberlite® IR 120 H laquelle s'était avérée efficace pour la transformation en ester méthylique des acides chlorogénique et rosmarinique. Les conditions opérationnelles choisies ont été les mêmes que pour la catalyse enzymatique avec une quantité de catalyseur équivalente (5 %, p/p). Avec ces conditions, les rendements molaires obtenus à l'équilibre chimique pour chacun des esters sont consignés dans le Tableau 16.

Ces résultats montrent que l'estérification catalysée chimiquement est performante et permet d'obtenir les esters gras de l'acide rosmarinique. Cependant, notons que les rendements de synthèse des esters à chaînes longues sont obtenus pour des périodes d'incubation très longues. Ce résultat pourrait s'expliquer par la décroissance de solubilité de l'acide rosmarinique dans les milieux plus hydrophobes.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Tableau 16. Rendements molaires en dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique obtenus par synthèse chimique en présence de 5 % (p/p) d'amberlite® IR-120 H.

Composés	Rendements molaires (%)
Rosmarinate de méthyle	98,5 (96 h)
Rosmarinate de butyle	99,3 (96 h)
Rosmarinate d'octyle	99,5 (96 h)
Rosmarinate de dodécyle	94,4 (216 h)
Rosmarinate d'hexadécyle	81,6 (504 h)

Enfin, bien que la synthèse des esters gras d'acide rosmarinique ait finalement été effectuée par catalyse chimique, ce qui n'était pas initialement l'objectif fixé car nous souhaitions privilégier la voie biocatalytique, il faut cependant noter que la catalyse par une résine acide s'avère plus performante que la stratégie proposée par Huang et Yu (2005). En effet, rappelons que ces auteurs ont réussi à obtenir le rosmanate de butyle par synthèse chimique en 5 étapes avec un rendement final avoisinant les 63 %. Dans notre cas, la synthèse est effectuée en une seule étape avec des rendements pratiquement quantitatifs pour les chaînes jusqu'en C₈ et très satisfaisants (de 81 à 95 %) pour celles plus longues.

I.2.3. Caractérisation des esters lipophilisés de l'acide rosmarinique par spectrométrie de masse d'ionisation par nébulisation opérant en mode de fragmentation négatif (SM-IPN)

Comme dans le cas précédent, l'identité des produits de réaction après leur purification (cf. matériels et méthodes) a été faite par spectrométrie de masse en utilisant une source d'ionisation par nébulisation sous conditions de fragmentation négative et en faisant l'acquisition en mode balayage (MS), puis la fragmentation sur les ions moléculaires parents (MS²). En mode balayage, les spectres de masses pour l'acide rosmarinique conduisent à l'apparition de deux pics à 358,97 et 718,9 uma lesquels représentent, respectivement, les ions moléculaires de l'acide rosmarinique déprotoné et son adduit. En ce qui concerne les esters, tous les spectres ont des pics qui correspondent à la masse molaire de chacune des

Résultats et discussion :

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

molécules sous sa forme déprotonée (Tableau 17).

Tableau 17. Ions obtenus lors de la fragmentation en mode négatif des esters de l'acide rosmarinique en mode balayage, et MS².

Composés	Masse molaire	Mode balayage	MS ²		
Acide rosmarinique	360,31	358,97 (100) 718,90 (72)	161,04 (100)	179,02 (26)	197,01 (22)
Rosmarinate de méthyle	374,34	373,04 (100) 786,84 (58)	135,14 (28)	178,97 (100)	
Rosmarinate de butyle	416,42	415,11 (26) 831,21 (100)	135,14 (28)	178,97 (100)	
Rosmarinate d'octyle	472,52	471,15 (60) 943 (100)	135,11 (23)	178,99 (100)	
Rosmarinate de dodécyle	528,63	527,25 (52) 1055,21 (100)	135 (12)	179 (100)	
Rosmarinate d'hexadécyle	584,74	583,2 (24) 1167,24 (100)	135,09 (27)	178,95 (100)	

Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'intensité relative du signal.

Les résultats pour l'acide rosmarinique obtenus après la fragmentation de l'ion parent (358,97 uma) conduisent à la formation de 3 pics à 197, 179 et 161 uma (Tableau 17). Ces masses, correspondent respectivement aux formes déprotonées des acides 3-(3,4-dihydroxyphényl) lactique et caféïque ainsi que leurs formes déshydratées (Figure 40).

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

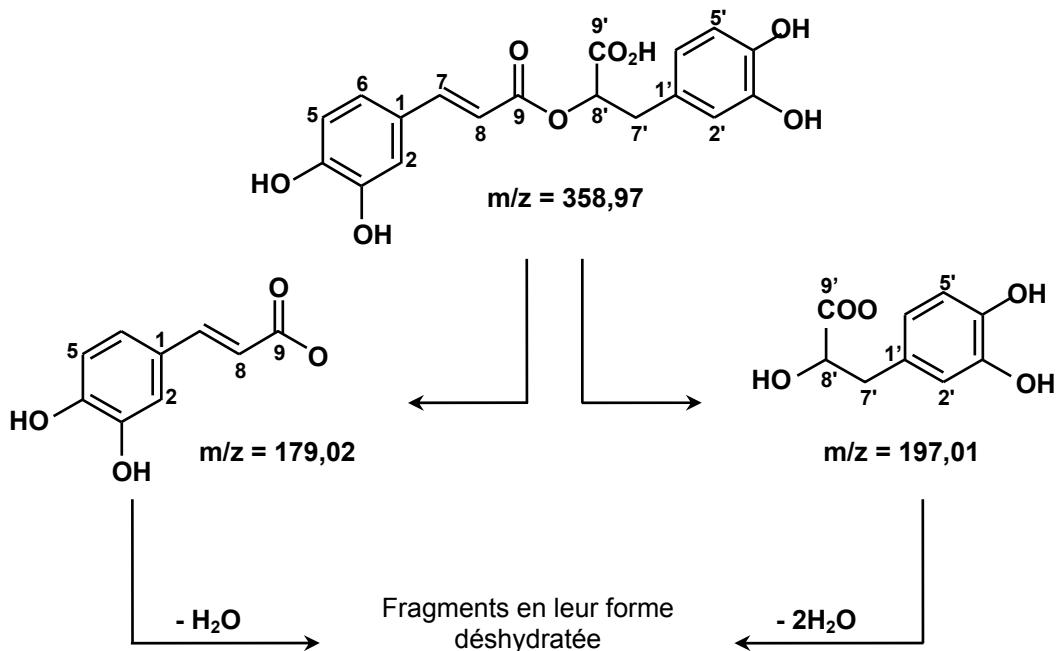


Figure 40. Schéma de la fragmentation de l'acide rosmarinique obtenue par spectrométrie de masses (Møller, 2007).

Concernant les esters, la fragmentation de chacun des ions moléculaires obtenus (Tableau 17) conduit à la formation des ions de masses 179 et 135 uma. Ces derniers, correspondent respectivement à la forme déprotonée de l'acide caféïque avant et après la perte de la fonction CO₂ correspondant à la fonction carboxylique (Figure 41). Les différences de fragmentation entre l'acide rosmarinique et ses esters pourraient être dues au fait que la liaison ester sur le carbone 9' est plus difficile à rompre que celle correspondant au carbone 9. En effet, pour chacun des esters, la fragmentation ne montre pas l'apparition d'un fragment correspondant à l'acide 3-(3,4-dihydroxyphényl) lactate, confirmant ainsi que la rupture de la liaison en 9' est la plus difficile.

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

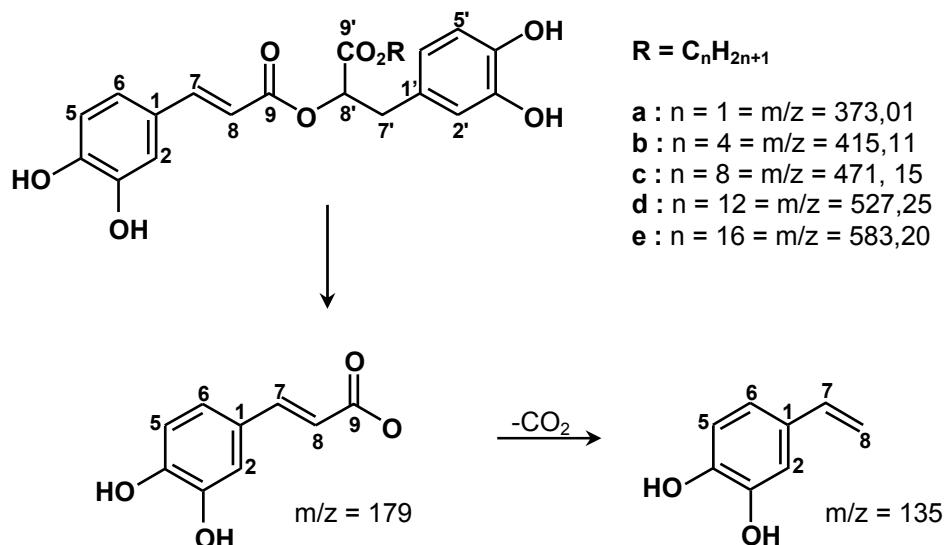


Figure 41. Schéma de la fragmentation des esters de l'acide rosmarinique par spectrométrie de masses.

I.3. Estérification chimique des acides rosmarinique et chlorogénique avec l'octadécanol et l'eicosanol

La synthèse d'esters des acides chlorogéniques et rosmarinique avec un caractère encore plus hydrophobe a été envisagée afin d'avoir un ensemble de molécules permettant de faire une étude plus approfondie des effets de la longueur de chaîne greffée sur les activités antioxydantes que nous allons évaluer dans les chapitres suivants. Cependant, la synthèse enzymatique en milieu fondu de ce type d'esters nous est apparue particulièrement délicate à mettre en oeuvre en raison du point de fusion élevé (octadécanol = 56-59°C ; eicosanol = 62-65°C) des alcools utilisés comme solvants et substrats et de l'impact négatif de telles températures réactionnelles sur l'activité catalytique de la lipase de *Candida antarctica* B. Lue *et al.* (2005) ont en effet, montré qu'une hausse de température de 55 à 60°C avait pour conséquence une réduction de moitié de l'activité catalytique de cette lipase : d'environ 200 nmol×min⁻¹×g⁻¹ à 100 nmol×min⁻¹×g⁻¹.

Afin de surmonter ces difficultés tout en gardant de bons rendements, nous avons décidé d'effectuer les synthèses de ces esters par l'intermédiaire de la catalyse chimique décrite précédemment. Les conditions réactionnelles ont été identiques hormis la température qui a été fixée à 70°C. Avec ces conditions, les

Résultats et discussion :

I. Synthèses des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

rendements molaires pour les esters octadécanoliques et eicosanoliques des acides chlorogéniques (après 15 jours) et rosmariniques (après 21 jours) ont été de l'ordre de 99 %. Comme dans le cas exposé ci-dessus, ce résultat pourrait s'expliquer par la décroissance de solubilité de l'acide rosmarinique dans les milieux plus hydrophobes. Enfin, la caractérisation des produits a été faite, par spectrométrie de masse comme cela a été décrit auparavant (Tableau 18). Les résultats suivent les mêmes tendances de fragmentation obtenues auparavant, confirmant ainsi l'identité de ces nouvelles molécules.

Tableau 18. Ions obtenus lors de la fragmentation en mode négatif des esters octadécyliques et eicosyliques des acides chlorogénique et rosmarinique en mode balayage et MS².

Composés	Masse molaire	Mode balayage	MS ²	
Chlorogénate d'octadécyle	606,79	605, 54 (100)	179 (100)	191 (8)
Chlorogénate d'eicosyle	634,84	633,51 (100)	179 (100)	191 (5)
Rosmarinate d'octadécyle	612,79	611,36 (62) 1223,36 (100)	135,09 (27)	178,95 (100)
Rosmarinate d'eicosyle	640,85	639,41 (58) 1279,42 (100)	n.d.	n.d.

Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'intensité relative du signal. n.d. = non déterminé en cause d'un signal trop faible.

I.4. Conclusion

Nous pouvons conclure des travaux exposés dans ce chapitre qu'une voie chimio-enzymatique pour la synthèse d'esters lipophilisés à partir de l'acide chlorogénique, en passant par un intermédiaire de type méthyl ester, semble être la meilleure stratégie. En effet, la lipophilisation par transestérification de cet intermédiaire alkylique, au lieu d'une estérisation directe de l'acide libre, a l'avantage de générer un co-produit, le méthanol, lequel peut être facilement éliminé en continu. De ce fait, l'équilibre chimique est déplacé en faveur de la synthèse à un point qui avoisine les conditions d'irréversibilité (disparition d'un co-produit de la réaction). De plus, la valeur d' a_w optimale (0,05) établie permet de conclure qu'en milieu organique, une faible hydratation de la lipase de *Candida antarctica* B est absolument nécessaire pour une synthèse biocatalysée performante.

Concernant la lipophilisation enzymatique de l'acide rosmarinique ou de son ester méthylique, nous avons constaté que l'utilisation des paramètres précédemment jugés optimaux pour l'acide chlorogénique, conduisaient, dans le meilleur des cas (transestérification), à des rendements avoisinant seulement 8 % après 11 jours de réaction. Ceci pourrait être dû à une inhibition de la lipase lors de l'état de transition 1.

Nous avons aussi pu montrer que la synthèse chimique des esters gras d'acide rosmarinique donnait des rendements pratiquement quantitatifs pour les chaînes jusqu'en C8 et très satisfaisants (de 81 à 95 %) pour celles plus longues. Pour finir, ces conditions de synthèses optimisées ont servi à l'obtention d'un ensemble de molécules lipophilisées, dont les propriétés antiradicalaires et antioxydantes sont exposées dans les chapitres suivants.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique.

Il est bien connu que la principale caractéristique responsable de l'activité antioxydante d'un composé phénolique est sa capacité à piéger les radicaux libres. Afin d'évaluer cette capacité, l'une des méthodes les plus répandues et les plus faciles à utiliser consiste à mesurer la capacité d'une molécule à réduire le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) (Blois, 1958). Néanmoins, comme l'a souligné Goupy *et al.* (2003), cet essai ne prend généralement pas en compte la cinétique de transfert de l'atome d'hydrogène, qui peut être pourtant aussi importante que la stœchiométrie totale ou l'EC₅₀. Les sections suivantes sont centrées sur l'analyse des propriétés anti-radicalaires des molécules synthétisées dans le chapitre précédent. Plus précisément, l'influence de la chaîne aliphatique greffée sur les mécanismes anti-radicalaires des esters d'acides chlorogénique et rosmarinique a été évaluée par la méthode DPPH[•] en étudiant les paramètres cinétiques et stationnaires de leur activité anti-radicalaire.

II.1. Comportement anti-radicalaire de l'acide chlorogénique et de ses esters déterminé par la méthode DPPH[•]

Le comportement cinétique de la diminution de l'absorbance du DPPH[•], due à la stabilisation par l'acide chlorogénique ou par ses esters, est montrée sur la Figure 42. On constate que la vitesse à laquelle le DPPH[•] est stabilisé, varie fortement en fonction de la nature de l'antioxydant (AOH) utilisé. Ainsi par exemple, les états stables sont atteints après plus de 240 min dans le cas de l'acide, tandis que la stabilisation avec les esters est obtenue après seulement 60 min. Ce comportement peut être expliqué si l'on considère que les mécanismes impliqués dans la stabilisation du DPPH[•] sont différents pour l'acide et pour ses esters. Afin de corroborer ces observations nous allons étudier dans les chapitres qui suivent, les étapes mécanistiques impliquées dans la réduction du DPPH[•] par cession d'atomes H de l'acide chlorogénique ou de ses esters. A ce sujet, nous analyserons les deux mécanismes par lesquels le transfert peut avoir lieu, à savoir : un simple transfert d'atome d'hydrogène (TAH) ou d'un transfert d'électron (TE).

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

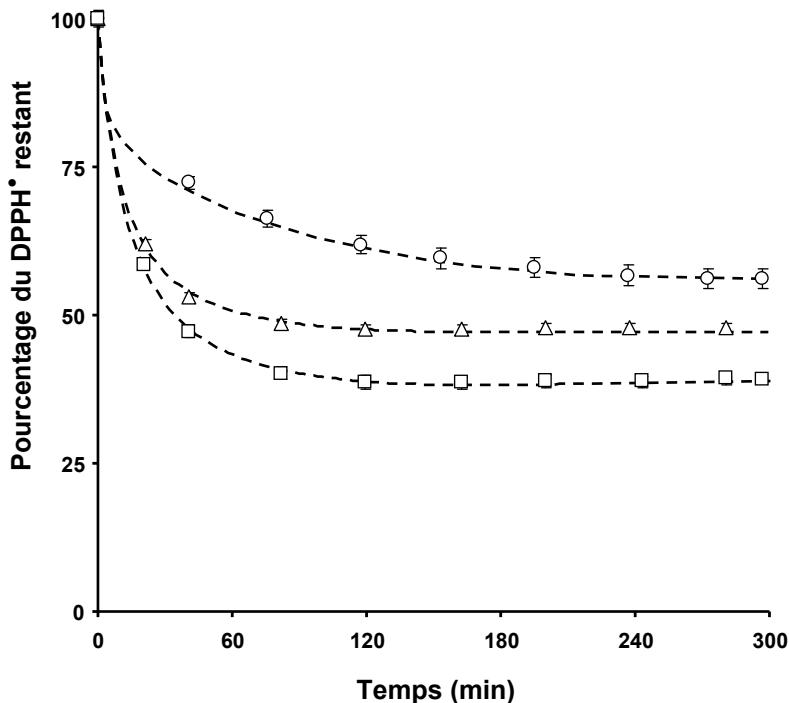


Figure 42. Cinétiques de stabilisation du DPPH[•] après l'addition d'acide chlorogénique (○), de chlorogénate de butyle (□) et de chlorogénate de dodécylique (Δ) pour un ratio molaire antioxydant/DPPH[•] égal à 0,08.

II.1.1 Détermination des paramètres cinétiques de l'acide chlorogénique et de ses esters selon l'hypothèse d'un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène

Afin d'obtenir des informations sur les voies impliquées dans la stabilisation du DPPH[•] par l'acide chlorogénique ou par ses esters, l'approche employée est la détermination des constantes de vitesse et des coefficients stœchiométriques pendant les premiers instants de la réaction (2 min). L'avantage de faire un suivi cinétique sur les 2 premières minutes de la réaction se base sur une hypothèse proposée par différents auteurs (Goupy *et al.*, 2003 ; Foti *et al.*, 2004 ; Roche *et al.*, 2005) et selon laquelle la stabilisation du DPPH[•] est effectuée uniquement par transfert d'atome(s) d'hydrogène(s) (TAH) présent(s) dans les groupes hydroxyles des antioxydants. Dans ces conditions, la réaction entre un antioxydant (AOH) et le DPPH[•] peut être exprimée comme suit :



II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

La constante de vitesse de la réaction (k_{22}) a été déterminée dans le méthanol à 20°C en suivant la chute de l'absorbance du DPPH[•] à 515 nm (confère matériel et méthodes). Dans ces conditions et comme l'ont proposé Goupy *et al.* (2003) et Foti *et al.* (2004), la constante de pseudo-deuxième ordre (k_{22}) peut être déterminée après l'intégration de l'équation 23 :

$$-\frac{d[DPPH^{\bullet}]}{dt} = k_{22}[AOH] \times [DPPH^{\bullet}] \quad (23)$$

L'intégration de l'équation 23, qui conduira à la détermination de la valeur k_{22} , peut être effectuée après transformation de cette dernière en termes de la variable mesurable (absorbance). Les relations additionnelles utilisées à cette fin sont les suivantes :

$$[DPPH^{\bullet}] = \frac{Abs}{\varepsilon} \quad (24)$$

et

$$[AOH] = \frac{[DPPH^{\bullet}]}{n^{ei}} \quad (25)$$

Dans les dernières équations, Abs représente l'absorbance mesurée à chaque intervalle de temps (0,1 s), ε (déterminée expérimentalement à $10680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) est le coefficient d'extinction molaire du DPPH[•], et finalement n^{ei} est le nombre de molécules de radical DPPH[•] réduites par molécule d'AOH pendant les premiers instants de la réaction. Ce paramètre, n^{ei} , peut être déterminé de la façon suivante :

$$n^{ei} = \frac{Abs_0 - Abs_f}{[AOH]_0 \times \varepsilon} \quad (26)$$

Les indices *0* et *f* correspondent respectivement aux conditions initiales et finales (2 min). Enfin, après intégration et factorisation, les valeurs de k_{22} peuvent être calculées à partir de l'équation 27, qui est valable pour une cinétique de pseudo-second ordre lors des premiers stades de la réaction.

$$\ln\left(\frac{1 - Abs_f / Abs}{1 - Abs_f / Abs_0}\right) = k_{22} \times \frac{Abs_f}{\varepsilon} \times t \quad (27)$$

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Ainsi, lorsque $\ln [(1-\text{Abs}_f/\text{Abs})/(1-\text{Abs}_f/\text{Abs}_0)]$ est tracé en fonction du temps (Figure 43), il est possible de déterminer graphiquement les valeurs de k_{22} à partir de la pente de la droite obtenue durant les deux premières minutes de réaction.

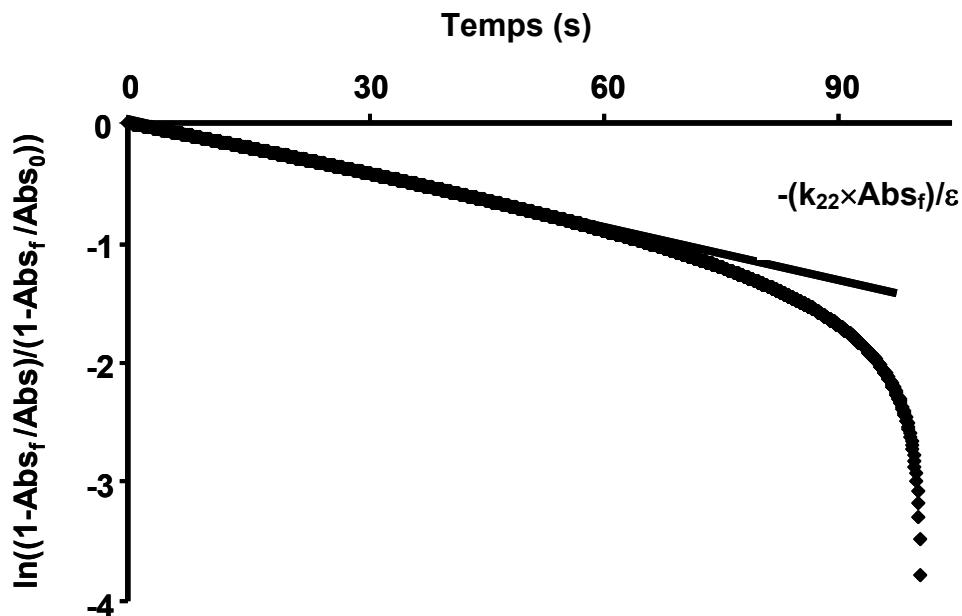


Figure 43. Exemple de la détermination graphique des constantes de vitesse (k_{22}) de la réduction du DPPH[•] par l'acide chlorogénique ou ses esters.

En conséquence, la même procédure a été adoptée pour chacune des molécules testées et les résultats sont résumés dans le Tableau 19. En outre, le Tableau 19 indique également le nombre de molécules de DPPH[•] réduites par molécule d'AOH pendant les premiers instants de la réaction (n^{ei} , équation 26). Cette variable est très importante puisqu'elle est un indicateur direct de la quantité d'atomes d'hydrogène cédés par l'AOH avant que des réactions de stabilisation plus complexes aient lieu.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Tableau 19. Paramètres cinétiques des mécanismes de transfert d'atome d'hydrogène (TAH) ou d'électron (TE) et à l'état stable, de la stabilisation du radical DPPH par l'action anti-radicalaire de l'acide chlorogénique et de ses esters.

Molécule testée	Paramètres cinétiques du mécanisme (TAH)			Paramètres cinétiques du mécanisme (ET)			Paramètres en stade stable
	n^{st} (mole DPPH [•] /mole AOH)	σ (mole AOH/mole DPPH [•])	k_{22}^{st} (L ¹ mole ⁻¹ ×s ⁻¹)	A	m^{st}	A'	
Acide chlorogénique	1,81 ± 0,11	0,55 ± 0,03	7198 ± 323 ^a 523 ± 84 ^b	2,8 × 10 ⁻³ ± 2,1 × 10 ⁻³	1,25 ± 0,2	2,68 × 10 ⁻⁵ ± 8,5 × 10 ⁻⁶	4,88 ± 0,48
Chlorogénate de méthyle	1,36 ± 0,09	0,73 ± 0,05	20000 ± 3447 ^a 8870 ± 838 ^b	89,3 ± 1,4	0,35 ± 0,05	26,5 ± 3,7	6,25 ± 0,20
Chlorogénate de butyle ^c	1,40 ± 0,12	0,71 ± 0,06	12470 ± 1947 ^a 4322 ± 136 ^b	22 ± 11,0	0,39 ± 0,09	18,9 ± 0,88	8,21 ± 0,40
Chlorogénate d'octyle	1,46 ± 0,03	0,68 ± 0,01	18463 ± 1542 ^a 9090 ± 294 ^b	261 ± 17,3	0,31 ± 0,07	38,2 ± 4,6	8,52 ± 0,08
Chlorogénate de dodécyle	1,49 ± 0,05	0,67 ± 0,02	41202 ± 2614 ^a 7451 ± 162 ^b	1,76 ± 0,2	0,5 ± 0,08	31,3 ± 8,1	6,64 ± 0,13
Chlorogénate d'hexadécyle	1,32 ± 0,08	0,76 ± 0,05	40024 ± 3311 ^a 8987 ± 409 ^b	9,1 ± 4,9	0,47 ± 0,05	30,3 ± 5,6	6,33 ± 0,16
Chlorogénate d'octadécyle	1,85 ± 0,34	0,54 ± 0,10	10169 ± 1692 ^a 3991 ± 842 ^b	117 ± 155	0,32 ± 0,07	16,7 ± 1,2	6,70 ± 0,21
Chlorogénate d'eicosyle	1,42 ± 0,16	0,70 ± 0,08	27774 ± 2841 ^a 8013 ± 562 ^b	23 ± 8,2	0,34 ± 0,05	29,2 ± 3,3	6,17 ± 0,08

^a Valeurs calculées à une concentration de 1,76 µM. ^b Valeurs calculées à une concentration de 17,6 µM. ^c Valeurs calculées à 12°C.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Il semble que, pendant les premières étapes de la réaction, le mécanisme de stabilisation du DPPH[•] soit différent pour l'acide chlorogénique et ses esters. En effet, le nombre de molécules du DPPH[•] réduites pendant les premières instants de la réaction suggère que l'acide chlorogénique ($n^{ei} = 1,81 \pm 0,11$) peut transférer deux atomes labiles d'hydrogène au radical DPPH[•], tandis que ses esters ne peuvent transférer qu'un seul atome d'hydrogène ($n^{ei} \sim 1,4$; excepté pour le chlorogénate d'octadécyle). Cependant le caractère fractionnel de nos données montre qu'il n'existe probablement pas un seul mécanisme mais plutôt une combinaison de mécanismes impliqués dans la stabilisation du radical DPPH. En effet, une valeur de n^{ei} proche de 1,4 pour les chlorogénates de méthyle, butyle, octyle, dodécyle, hexadécyle et eicosyle, pourrait signifier que la donation d'un atome H a été favorisée, tandis qu'un n^{ei} de l'ordre de 1,8 pour l'acide chlorogénique, favoriserait plutôt la donation de deux atomes H; mais il n'y a probablement pas une situation qui implique la donation pure de 1 ou 2 atomes H. En ce qui concerne le chlorogénate d'octadécyle, il semblerait que ses valeurs de n^{ei} proches de $1,85 \pm 0,34$ indiquent qu'il est capable de transférer deux atomes d'hydrogène de la même façon que l'acide chlorogénique. Néanmoins, il convient de mentionner que malgré 8 répétitions indépendantes, le coefficient de variation (CV) de la détermination du n^{ei} a été de 18,4 %, qu'est environ trois fois plus élevé que le CV des autres composés étudiés. Cette variabilité ne nous permet pas de conclure quant au nombre d'atomes d'hydrogène donnés par le chlorogénate d'octadécyle pendant l'état initial de la réaction.

En addition au nombre d'atome(s) d'hydrogène(s) transféré(s) au DPPH[•], nous avons également cherché à connaître le type de mécanisme (TAH ou TE) à l'origine de cette stabilisation. Pour cela, nous avons choisi comme paramètre d'étude, la constante de vitesse k_{22} , qui contient les informations mécanistiques des espèces impliquées dans la réaction.

Tout d'abord, il est apparu à partir du Tableau 19, que les valeurs k_{22} de l'ensemble des esters sont plus élevées que celle de l'acide chlorogénique, ce qui est probablement dû au fait qu'il est plus rapide de transférer un atome H (dans le cas des esters) que d'en transférer deux (dans le cas de l'acide chlorogénique). Une

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

explication complémentaire pourrait être donnée à partir de l'hypothèse de Foti *et al.* (2004), selon laquelle les différences d'activité anti-radicalaire entre un acide phénolique (dérivés de l'acide hydroxycinnamique) et ses esters pourraient être dues à la quantité d'anions phénolates et carboxylates après la dissociation en milieu alcoolique. En supposant que le mécanisme de réaction entre le DPPH[•] et l'AOH implique un transfert rapide d'électrons de l'anion phénolate au DPPH[•], la dissociation du groupe carboxylique libre dans le cas de l'acide chlorogénique pourrait réduire la quantité d'anions phénolates et provoquer ainsi une réduction des valeurs des k_{22} . En conséquence, nous proposons l'hypothèse suivant laquelle l'estérification de la fonction carboxylique du synthon quinique par une chaîne aliphatique favoriserait grandement le processus de transfert d'électron à partir de la fonction phénol, par rapport à sa forme non estérifiée.

Dans un second temps, nous avons porté un intérêt particulier à la forte influence de la concentration initiale en AOH sur la constante de vitesse k_{22} . En effet, nous avons pu constater que l'augmentation des concentrations de tous les antioxydants conduit à une diminution spectaculaire de k_{22} (Figure 44, Tableau 19).

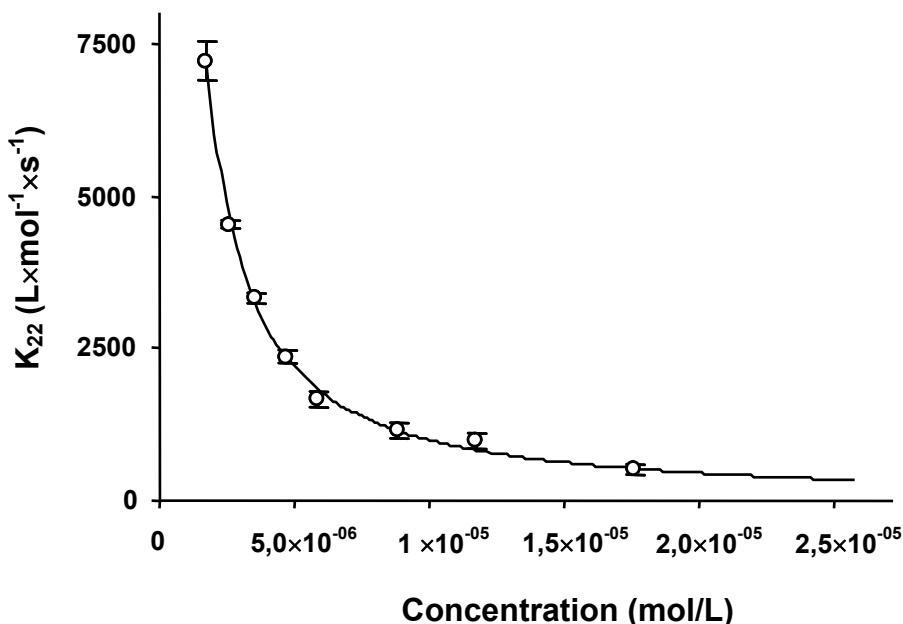


Figure 44. Evolution de la constante de vitesse de stabilisation du DPPH[•] (k_{22}) calculée dans le méthanol à 20°C, en fonction de la concentration initiale en acide chlorogénique.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Cette observation montre que l'hypothèse d'un mécanisme élémentaire est peu probable. En effet, un simple regard sur les coefficients stœchiométriques (σ) (Tableau 19) et les ordres partiels de réaction (m^{ei} , Tableau 6 ; voir paragraphe I.1.2 pour les calculs) confirment qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme élémentaire, et, par conséquent, que la réduction du DPPH[•] implique des étapes intermédiaires, pouvant inclure notamment (i) la formation d'espèces chargées, (ii) un mécanisme de TE ou (iii) la réaction entre produits de courte durée de vie. Un comportement similaire a été observé par Foti *et al.* (2004), qui ont conclu que le mécanisme de TE était le plus important dans la voie de stabilisation du DPPH[•] par l'acide hydroxycinammique et ses esters. En outre, Litwinienko et Ingold (2003, 2004, 2005) ont observé un accroissement anormal des constantes de vitesse de stabilisation du DPPH[•] en milieu alcoolique dû à l'ionisation partielle des phénols et à un transfert d'électron de l'anion phénolate au DPPH[•] très rapide. Ces études coïncident avec nos résultats et suggèrent que dans un milieu alcoolique, le mécanisme TE prédomine sur le mécanisme TAH pour l'acide chlorogénique et ses esters.

I.1.2. Détermination des paramètres cinétiques de l'acide chlorogénique et de ses esters selon l'hypothèse d'un mécanisme de transfert d'électrons

L'hypothèse d'un mécanisme de transfert d'électrons (TE) implique que la stabilisation du DPPH[•] ne se fasse pas en une seule étape et par conséquent, l'équation 22 doit être décomposée pour chacune des étapes impliquées dans ce type de mécanisme. En effet, tel que décrit par de nombreuses études (Litwinienko et Ingold, 2003, 2004 ; Foti *et al.*, 2004), le mécanisme TE suppose (i) la dissociation du groupe hydroxyle phénolique (équation 28), (ii) le transfert d'électrons à partir de l'anion phénolate au DPPH[•] (équation 29) et enfin, (iii) la stabilisation de l'anion DPPH⁻ par le proton présent dans le milieu (équation 30).



II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

A partir de ces nouvelles considérations, la vitesse de réduction du DPPH[•] due à l'AOH peut donc être exprimée comme suit :

$$-\frac{d[DPPH^{\bullet}]}{dt} = k_{29} \times [DPPH^{\bullet}] \times [AO^-] \quad (31)$$

où, la concentration en phénolate [AO⁻] peut être déterminée à partir de la constante de dissociation (K_{OH} , équation 28) comme suit :

$$[AO^-] = \frac{K_{OH} \times [AOH]}{[H^+]^\alpha} \quad (32)$$

Ici, le facteur α représente les possibilités de dissociation pour les deux groupes hydroxyles phénoliques présents dans l'acide chlorogénique et dans ses esters. Dans le cas de l'acide chlorogénique, la quantité de H⁺ a été calculée d'après l'hypothèse, employée par ailleurs par Foti *et al.* (2004), que la quantité de H⁺ provenant de la dissociation du phénol en phénolate est négligeable par rapport à la quantité de protons provenant de la dissociation de la fonction carboxylique. Dans ces conditions, il est possible de calculer la quantité de H⁺ par l'intermédiaire de la constante de dissociation de l'acide (équation 33).

$$K_{COOH} = \frac{[H^+]^2}{[AOH]_0} \quad (33)$$

Dans le cas de l'ester, cette quantité peut être théoriquement déterminée en faisant un bilan de matière de la réaction 28, comme suit :

Composés	t = 0	Transformation	à t = 0
AOH	[AOH] ₀	- $\chi \times [AOH]_0$	[AOH] = [AOH] ₀ × (1 - χ)
AO ⁻	0	$\theta \times \chi \times [AOH]_0$	[AO ⁻] = 0 + $\theta \times \chi \times [AOH]_0$
H ⁺	0	$\theta \times \chi \times [AOH]_0$	[H ⁺] = 0 + $\theta \times \chi \times [AOH]_0$

Par conséquent [H⁺] = $\theta \times \chi \times [AOH]_0$, où θ représente la relation entre les coefficients stœchiométriques (H⁺/AOH) et χ représente le facteur de transformation de la forme AOH à la forme dissociée H⁺. Avec ces nouvelles considérations, la

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

vitesse de stabilisation du radical DPPH[•] peut être exprimée par l'équation 34 dans le cas de l'acide chlorogénique et par l'équation 35 dans le cas de ses esters alkyliques.

$$-\frac{d[DPPH^{\bullet}]}{dt} = \frac{k_{29} \times K_{OH} \times [AOH]_0^{-\alpha/2}}{K_{COOH}^{\alpha/2}} [AOH] \times [DPPH^{\bullet}] \quad (34)$$

$$-\frac{d[DPPH^{\bullet}]}{dt} = k_{29} \times K_{OH} \times [\theta \times \chi \times [AOH]_0]^{-\alpha} \times [AOH] \times [DPPH^{\bullet}] \quad (35)$$

Une simple comparaison des deux dernières équations avec l'équation 23, permettent de postuler que si le mécanisme de transfert d'électrons est prédominant, k_{22} peut être remplacé par le terme $(k_{29} \times K_{OH} \times [AOH]_0^{-\alpha/2})/K_{COOH}^{\alpha/2}$ dans le cas de l'acide chlorogénique, alors que dans le cas des esters, k_{22} est équivalent au terme $k_9 \times K_{OH} \times (\theta \times \chi \times [AOH]_0)^{-\alpha}$. Ces expressions montrent aussi que k_{22} est directement proportionnel à la quantité d'anions phénolates formés pendant l'état initial de la réaction (qui est régi par K_{OH}) et diminue avec l'augmentation de la concentration initiale de l'acide chlorogénique et de ses esters. En outre et comme prévu, dans le cas de l'acide chlorogénique, k_{22} diminue avec l'augmentation de la concentration des anions carboxylates (K_{COOH}). En d'autres termes, k_{22} peut être exprimée en fonction de la concentration initiale de l'acide chlorogénique et de ses esters comme suit :

$$k_{22} = A \times [AOH]_0^{-m^{ei}} \quad (36)$$

où toutes les constantes (k_{29} , K_{OH} , K_{COOH} , θ , χ) ont été regroupées en une seule constante, A , qui tient compte de la capacité de dissociation de l'acide chlorogénique et de son ester, tandis que m^{ei} est l'ordre partiel de réaction pour chacun des antioxydants pendant les premiers instants de la réaction. Il est devient alors possible de calculer l'ordre de réaction partiel des composés phénoliques (m^{ei}) et la constante (A) en faisant une régression non linéaire entre les valeurs expérimentales de k_{22} et les concentrations initiales de chaque antioxydant (Figure 45). Les valeurs de m^{ei} (Tableau 19), ont été de 1,5 pour l'acide chlorogénique et de 0,5 pour ses esters. Concernant les valeurs de la constante A , nous nous sommes aperçus qu'une petite

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

variation du coefficient m^{ei} avait un effet chaotique sur ces dernières. Par conséquent, nous avons décidé de corriger cette valeur en recalculant ces coefficients, après avoir fixé les valeurs des ordres partiels de réaction, m^{ei} , à 1,5 pour l'acide chlorogénique et à 0,5 pour ses esters. On en déduit les valeurs corrigées, A' , à partir de la régression linéaire de k_{22} en fonction de $[AOH]_0^{mei}$.

Tout d'abord, et comme attendu, les ordres de réaction expérimentaux de l'acide chlorogénique et de ses esters confirment que le mécanisme suggéré par l'équation 23 n'est pas élémentaire, ce qui est probablement dû au fait que les espèces moléculaires impliquées dans la stabilisation du DPPH[•] ne sont pas présentes sous forme neutre et, conforme par conséquent, l'hypothèse d'un mécanisme TE. En outre, la forte différence entre les ordres de réaction de l'acide chlorogénique et de ses esters, suggère que la stabilisation du DPPH[•] s'effectue par différentes voies réactionnelles. Cette observation est aussi en accord avec ce qui a été observé dans la section précédente concernant les différentes valeurs obtenues pour le nombre de molécules du DPPH[•] réduites par molécule d'antioxydant pendant l'état initial de la réaction.

II.1.3 Analyses par CLHP-SM des produits de réaction obtenus après la réduction du radical DPPH

Dans les sections précédentes, nous avons montré que la stabilisation des radicaux DPPH par l'acide chlorogénique et ses esters peut être attribuée à deux voies réactionnelles différentes. Cette hypothèse a été basée sur les résultats cinétiques suggérant que l'acide chlorogénique est plutôt en mesure de réduire deux molécules de DPPH[•], tandis que ses esters ne réduiraient qu'une seule molécule de DPPH[•] au cours des premiers stades de la réaction. Afin de confirmer cette hypothèse, la caractérisation des produits de la réaction a été réalisée par CLHP-SM avec 1,3 équivalent du DPPH[•]. En effet, les expériences préliminaires ont montré qu'une plus grande quantité de radicaux conduisait à des mélanges polymériques, qui augmentaient le signal de bruit et rendaient ainsi difficile l'identification des produits primaires de la réaction. Toutes les analyses CLHP-SM ont été réalisées après deux minutes de réaction, ce qui correspond à la durée de l'étape initiale analysée lors de l'étude cinétique. Dans ces conditions, les résultats de CLHP-SM

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

obtenus pour l'acide chlorogénique (MM = 354,7 g/mol) et les esters butylique (MM = 410,5 g/mol) et dodécylique (MM = 522,6 g/mol) ont confirmé l'existence de deux voies réactionnelles (Tableau 20).

Tableau 20. Temps de rétention et ions obtenus (mode balayage et sous conditions de fragmentation négative) pendant la réaction de stabilisation du DPPH[•] par l'acide chlorogénique et ses esters butylique et dodécylique.

Composés	Temps de rétention (min)	Ions obtenus en mode balayage
Acide chlorogénique	10,2	351,7 (100) – 703,5 (83)
	13,2	353,7 (38) – 707,7 (100)
	65,4	394,5 (100)
Chlorogénate de butyle	41,7	409,8 (15) – 819,6 (100)
	55,6	817,9 (94) – 1635,6 (100)
	56,6	817,8 (100) – 1635,7 (82)
	58,7	817,8 (48) – 1635,7 (100)
	65,4	394,5 (100)
Chlorogénate de dodécyle	65,4	394,5 (100)
	66,0	1043,5 (100) – 521,6 (20)
	75,5	1041,8 (100)

Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'intensité relative du signal.

En effet, pour l'acide chlorogénique, après deux minutes de réaction, un ion moléculaire à 351,7 uma a été détecté. Il s'agit de celui de l'acide chlorogénique sous sa forme *ortho*-quinone après la cession des deux hydrogènes des hydroxyles phénoliques. Ce résultat, confirme ainsi les conclusions obtenues à partir de l'étude cinétique selon lesquelles la stabilisation du radical DPPH procède par un transfert rapide et successif de deux électrons depuis l'anion phénolate au DPPH[•]. Le processus de stabilisation se termine avec la stabilisation de la forme radicalaire de l'acide chlorogénique en sa forme *ortho*-quinone (voie réactionnelle a, Figure 45).

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

En ce qui concerne le chlorogénate de butyle, un ion moléculaire à 817,9 uma a été détecté, cet ion correspondant à la forme dimère résultante de la stabilisation (voie réactionnelle b, Figure 45) de deux radicaux semi-quinone du chlorogénate de butyle. La même observation a également été faite pour le chlorogénate de dodécyle pour laquelle un ion moléculaire à 1043,5 uma a été détecté. Ces valeurs montrent qu'après un rapide transfert d'électron, les radicaux semi-quinone dérivées des esters de l'acide chlorogénique sont plus enclins à former rapidement un dimère (Figure 45) qu'à céder un deuxième électron. Par conséquent, les résultats obtenus par SM corroborent l'hypothèse avancée pendant l'analyse cinétique, selon laquelle, pendant les premières étapes de réaction, l'acide chlorogénique est plutôt en mesure de donner deux atomes d'hydrogène (par mécanisme TE), tandis que ses esters sont plutôt en mesure de donner un seul atome d'hydrogène par le biais du même mécanisme TE. De plus, les voies de dimérisation entre les radicaux semi-quinone peuvent impliquer différents types de liaison. En effet, les liaisons entre deux radicaux semi-quinone seront fonction de la position de l'électron non apparié après stabilisation par mésomérie (Figure 45). Bien entendu, la probabilité de formation de ce type de liaisons particulières est fonction de la densité de spin, qui malheureusement dans notre cas reste inconnue. A titre d'information, nous avons établi à 21 le nombre de combinaisons de liaisons possibles. Parmi elles, les plus reportées (Goupy *et al.*, 2003) sont :

- d'une part la liaison C-C entre les cycles aromatiques conduisant à la formation des dimères de biphenyle (ou dimère CC, b1 Figure 45), et
- d'autre part la liaison C-O entre les cycles aromatiques conduisant à la formation des dimères diaryle éther (ou dimère CO, b2 Figure 45).

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique chlorogénique et rosmarinique

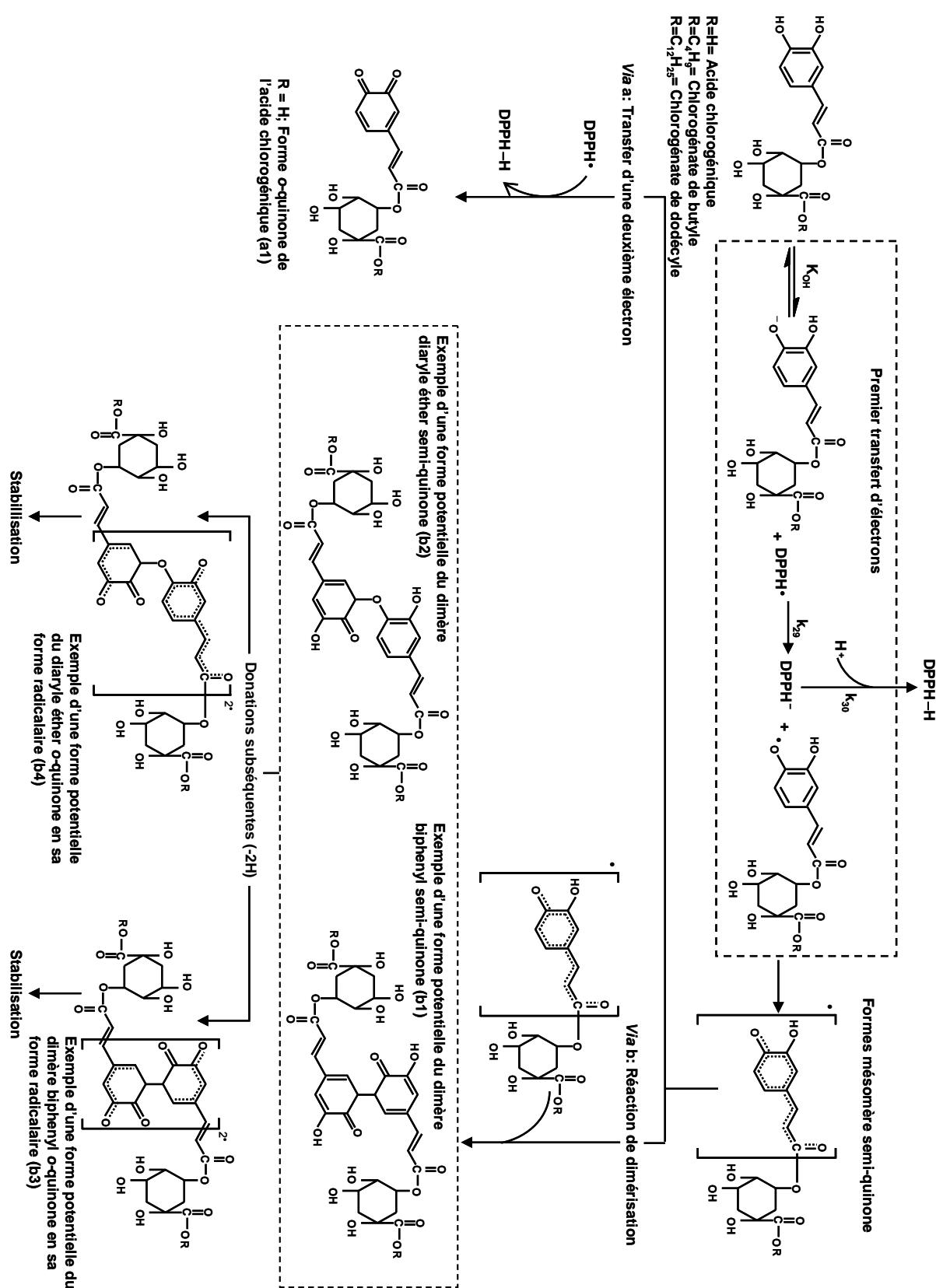


Figure 45. Mécanisme de réaction proposé pour l'état initial de la réaction entre le radical DPPH et l'acide chlorogénique (voie a) et ses esters (voie b).

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

En outre, le fait que lors des analyses effectuées par SM après 2 min de réaction, l'ion correspondant à la forme *o*-quinone ne soit pas détecté (Tableau 20), suggère que toutes les formes semi-quinone des esters butylique et dodécylique de l'acide chlorogénique sont transformées en dimères. Cette observation pourrait expliquer le caractère non entier du nombre de molécules de DPPH[•] réduites pendant l'état initial de la réaction dans le cas des esters ($n^{ei} \approx 1,4$). En effet, si l'encombrement stérique du radical DPPH et du dimère n'entrave pas leur contact, il est probable que les dimères ayant encore des groupes hydroxyles continuent le processus de stabilisation du radical DPPH.

Dans le cas particulier de liaisons C-C (Figure 45, b1) et C-O (Figure 45, b2), les dimères possèdent encore deux groupes hydroxyles disponibles pour la stabilisation du DPPH[•]. En conséquence, une donation subséquente de deux atomes d'hydrogène (*via* un mécanisme TE) peut se produire pour former un dimère dans l'état radicalaire *o*-quinone (b3 et b4, figure 5). Cette donation additionnelle des atomes H pourrait donc expliquer que la valeur n^{ei} pendant les deux premières minutes de la stabilisation du DPPH[•] par les esters de l'acide chlorogénique ne soit pas égale à 1, mais plutôt comprise entre 1,36 et de 1,49 (à l'exception du chlorogénate d'octadécyle). En d'autres termes, la valeur n^{ei} déterminée pendant les 2 premières minutes de la réaction, prend en compte le transfert d'atome d'hydrogène provenant non seulement de l'ester initial, mais également du dimère.

Enfin, les données obtenues par l'analyse cinétique, mais également par CLHP-MS, permettent de proposer un schéma général au cours duquel le radical semi-quinone, résultant de la réduction mono-électronique d'un radical DPPH, réagit rapidement afin de donner un deuxième électron à un deuxième radical DPPH. Le résultat de ces processus d'oxydo-réduction conduisent à la stabilisation de l'acide chlorogénique en sa forme *o*-quinone, forme qui n'est pas réactive en termes d'activité antiradicalaire (voie a, Figure 45). En outre, dans le cas des esters, la réaction entre le radical semi-quinone et une deuxième molécule de DPPH[•] peut être limitée à cause d'une réaction compétitive de dimérisation entre deux radicaux semi-quinone (voie b, Figure 45). De cette façon, le devenir des radicaux semi-quinone pourrait être lié par la probabilité d'un contact entre eux.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

D'après les données de CLHP-SM, il est clair que l'acide chlorogénique ne forme pas de dimère, tandis que les chlorogénates de butyle et de dodécyle peuvent le faire. Ces résultats suggèrent que la présence d'une fonction carboxylique ne favorise pas le contact de deux radicaux semi-quinone permettant la formation d'un dimère. La véritable raison de ce comportement reste néanmoins à déterminer en raison du fait que l'encombrement stérique dans le cas des esters est apparemment plus élevé que dans le cas de l'acide chlorogénique.

En outre, le fait que les données de CLHP-SM pour le chlorogénate de butyle révèlent l'existence de trois formes dimère, alors qu'une seule forme est détectée dans le cas du chlorogénate de dodécyle (Tableau 20), prouvent l'existence d'un effet stérique. En effet, il est possible que les formes mésomères du radical semi-quinone résultant du transfert du premier atome H dans le cas du chlorogénate de butyle permettent un meilleur contact, que celles résultant du chlorogénate de dodécyle, dont l'encombrement stérique est probablement plus élevé.

II.1.4 Paramètres stationnaires de l'activité antiradicalaire de l'acide chlorogénique et de ses esters

Étant donné que l'action anti-radicalaire de l'acide chlorogénique et de ses esters vis-à-vis du radical DPPH ne concerne pas exclusivement les 2 premières minutes de réaction, une détermination de leur stœchiométrie globale a été réalisée après 5 h de réaction, lorsque tout l'antioxydant avait été consommé. Le nombre total de molécules du DPPH[•] réduites (n^{es} , exprimé en moles de DPPH[•]/moles de AOH) à l'état stable a été calculé comme étant $1/(2 \times EC_{50})$ et résumé dans le Tableau 19. Ces paramètres stœchiométriques donnent une deuxième possibilité de comparer les molécules testées.

Il est montré que la valeur n^{es} est de ~ 4-5 pour l'acide chlorogénique et ~ 6-7 pour ses esters, à l'exception des chlorogénates butylique et octylique pour lesquels les valeurs de n^{es} trouvées sont de ~ 8-9. Cependant, aucune des voies mécanistiques décrites auparavant (voie a et b, Figure 45) peuvent expliquer pourquoi la valeur n^{es} est jusqu'à 4 fois supérieure à 2. En outre, l'ensemble des valeurs n^{es} sont plus importantes que le nombre de groupements hydroxyles

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

phénoliques (connus comme responsables de l'activité anti-radicalaire) présents dans chaque molécule testée. Cette observation suggère que de nouvelles voies réactionnelles ont eu lieu dans le cas de l'acide chlorogénique et de ses esters. Ce comportement n'est pas spécifique à notre étude et de nombreux auteurs (Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Goupy *et al.*, 2003 ; Roche *et al.*, 2005 ; Saito et Kawabata, 2005, 2006) ont observé également que le nombre de radicaux du DPPH réduits dépasse le nombre de groupements hydroxyle phénoliques disponibles sur l'antioxydant testé.

Parmi les possibles explications, la plus rencontrée est une attaque nucléophile sur la forme oxydée de l'antioxydant après que cette dernière ait stabilisé le radical DPPH. Ainsi, nous pouvons avancer que le solvant (méthanol), présent en excès dans le système, peut agir comme un puissant agent nucléophile et, par conséquent, peut régénérer les formes non réactives (monomères et dimères *o*-quinone, Figure 20) à leurs formes réduites correspondantes qui possèdent des groupes hydroxyles phénoliques, ce qui est censé accroître leur stoechiométrie n^{es} . Cela est d'autant plus probable, que Saito et Kawabata (2005) ont observé que le nombre de molécules de DPPH[•] réduites à 30 min par l'ester méthylique de l'acide protocatéchuique est de 2,2 dans l'acétonitrile, et de 5 dans le méthanol, ce qui suggère que la présence de méthanol influence fortement l'activité antiradicalaire d'un antioxydant vis-à-vis du radical DPPH. En outre, ces auteurs ont aussi identifié un adduit entre le méthanol et l'ester méthylique de l'acide protocatéchuique par résonance magnétique nucléaire (RMN).

En ce qui concerne le comportement anti-radicalaire de l'acide chlorogénique et de ses esters, il convient de mentionner que les valeurs de n^{es} des esters étaient plus élevées que celles de l'acide chlorogénique. En outre, d'un point de vue cinétique, la chute de l'absorbance du DPPH[•] due à l'action anti-radicalaire de l'acide chlorogénique atteint l'état stable après 240 min de réaction, tandis que dans le cas d'esters, l'état stable est atteint au bout de 120 min (Figure 42). Il est intéressant de noter que la forte différence entre la cinétique de l'acide et celle de l'ester a déjà été observée pour les acides carboxyliques, tels que, protocatechique (Saito et Kawabata, 2006) et caféique (Silva *et al.*, 2000 ; Son et Lewis, 2002), mais aussi

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

pour les acides 3,4-dihydroxybenzylesulfonique et 3,4-dihydroxyphenylphosphonique (Saito et Kawabata, 2006).

Saito et Kabawata (2006) ont avancé que la dissociation de la fonction carboxylique conduit à une diminution de l'effet mésomérique abstracteur d'électrons du groupe COOH par rapport à son ester. Par conséquent, le cycle sera plus riche en électrons pour l'acide que pour son ester, ce qui implique la diminution du caractère électrophile des atomes de carbone dans le cycle. De cette façon, la capacité des carbones du cycle à se soumettre à une addition nucléophile par le méthanol diminue à mesure que le caractère électrophile des carbones du cycle diminue. Comme conséquence de ce qui est exposé ci-dessus, la régénération des formes semi-quinones due à l'attaque nucléophilie de l'alcool est plus facilement réalisable dans le cas de l'ester que dans le cas de l'acide. Étonnamment, dans notre cas, une meilleure addition méthanolique, induite par des effets mésomériques, est impossible, car dans le cas de l'acide chlorogénique et de ses esters il n'y a pas de conjugaison entre le cycle et la fonction carboxylique. Cela pourrait signifier que la meilleure activité antiradicalaire des esters par rapport aux acides, observée de façon courante (Silva *et al.*, 2000 ; Son et Lewis, 2002 ; Saito et Kawabata, 2005, 2006), implique un autre type de mécanisme qui ne serait pas gouverné par des effets de mésomérie apportés pour les groupements abstracteurs d'électrons.

Enfin, il est clair que la réactivité du (des) produit(s) d'oxydation résultant des premières étapes de la stabilisation contribue de façon importante à la valeur de la stœchiométrie finale (n^{es}). En effet, si on considère que le paramètre n^{es} représente l'ensemble des informations pertinentes en ce qui concerne les étapes initiales et intermédiaires qui conduisent à l'état stable, nous nous apercevons que dans le cas de l'acide chlorogénique seulement 37 % de la valeur de n^{es} peut être expliqué à partir des informations obtenues pendant l'état initial de la réaction (n^{ei}). Concernant les esters butyliques et octyliques le comportement est encore plus marqué (17 %) que celui obtenu pour les autres esters (21-23 %).

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

II.2 Comportement anti-radicalaire de l'acide rosmarinique et de ses esters déterminé par la méthode DPPH[•]

En ce qui concerne l'acide rosmarinique et ses esters, l'objectif était double. Tout d'abord, l'étude a été focalisée sur l'influence de la lipophilisation sur les caractéristiques anti-radicalaires évaluées à l'état stationnaire de la réaction. Puis, nous nous sommes intéressés à l'influence d'un deuxième groupement catéchol en comparaison avec l'acide chlorogénique et ses dérivés lipophiles qui n'en possèdent qu'un.

Comme précédemment exposé, une approche qualitative du comportement cinétique de la réaction de stabilisation du DPPH[•] est montrée en Figure 46.

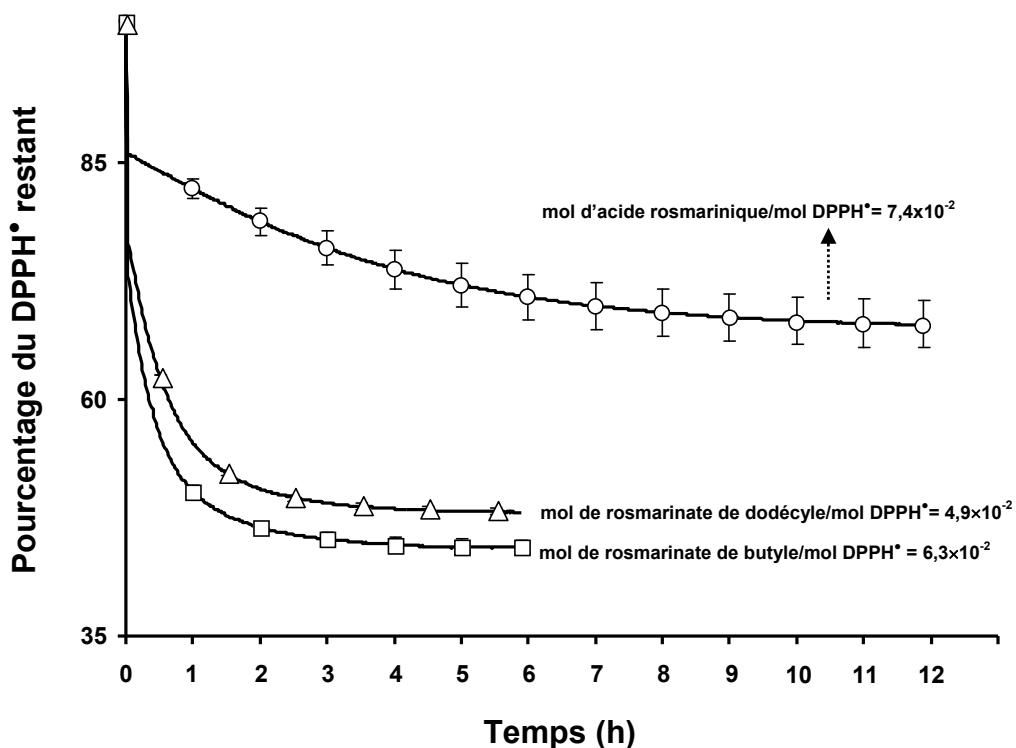


Figure 46. Cinétiques de stabilisation du radical DPPH[•] après l'addition d'acide rosmarinique (○), de rosmarinate de butyle (□) et de rosmarinate de dodécyle (Δ).

A partir de cette figure nous constatons que la vitesse de stabilisation du DPPH[•] est considérablement différente entre l'acide rosmarinique et ces esters. Ainsi, dans le cas de l'acide rosmarinique, l'état stationnaire est atteint après 12 h de réaction, tandis que pour ses esters il est atteint après deux heures seulement. Il est important

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

de noter que ce comportement de stabilisation concorde avec celui observé dans le cas de l'acide chlorogénique et de ses dérivés. En conséquence, il est très probable qu'un mécanisme de TE soit aussi impliqué dans les cas de la stabilisation de l'acide rosmarinique et ses esters. De plus, en milieu alcoolique, le mécanisme de TE est prévalant sur le mécanisme TAH comme cela a été postulé par différents auteurs (Litwinienko et Ingold, 2003, 2004 ; Foti *et al.*, 2004). En conséquence, nous avons étendu cette l'hypothèse au cas de l'acide rosmarinique et ses dérivés. De ce fait, les différences de vitesse de stabilisation du DPPH[•] entre l'acide rosmarinique et ses esters peuvent s'expliquer qualitativement par l'intermédiaire des étapes du mécanisme de TE (équations 28 à 30). En effet, ces dernières tiennent compte de la dissociation du groupe hydroxyle phénolique (équation 28), du transfert d'électron à partir de l'anion phénolate au DPPH[•] (équation 29) et de la stabilisation de l'anion DPPH⁻ par le proton présent dans le milieu. Comme cela a été exposé auparavant, dans le cas de l'acide (équation 34), la formation des anions phénolates est en compétition avec celle des anions carboxylates, tandis que dans le cas des esters (équation 35) cette compétition n'existe pas. Par conséquent, la vitesse plus faible de stabilisation du DPPH[•] exprimée pour l'acide rosmarinique pourrait être due à la formation de l'anion carboxylate.

II.2.1 Paramètres stationnaires de l'activité anti-radicalaire de l'acide rosmarinique et de ses esters

Les résultats obtenus à l'état stable pour l'acide rosmarinique et ses esters sont mentionnées dans le Tableau 21. Les valeurs montrent que la lipophilisation exerce un effet positif sur l'activité anti-radicalaire globale (exprimée en n^{es}) pour les esters ayant une longueur de chaîne jusqu'à 16 atomes de carbone, à l'exception du rosmarinate d'octyle. De plus, une diminution de l'activité est observée pour les esters à plus longue chaîne, ce qui pourrait s'expliquer soit par une plus faible solubilité, soit par un possible encombrement stérique limitant le contact entre l'antioxydant et le radical DPPH.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Tableau 21. Nombre de molécules de DPPH[•] réduites à l'état stationnaire par l'acide rosmarinique et ses esters (n^{es})

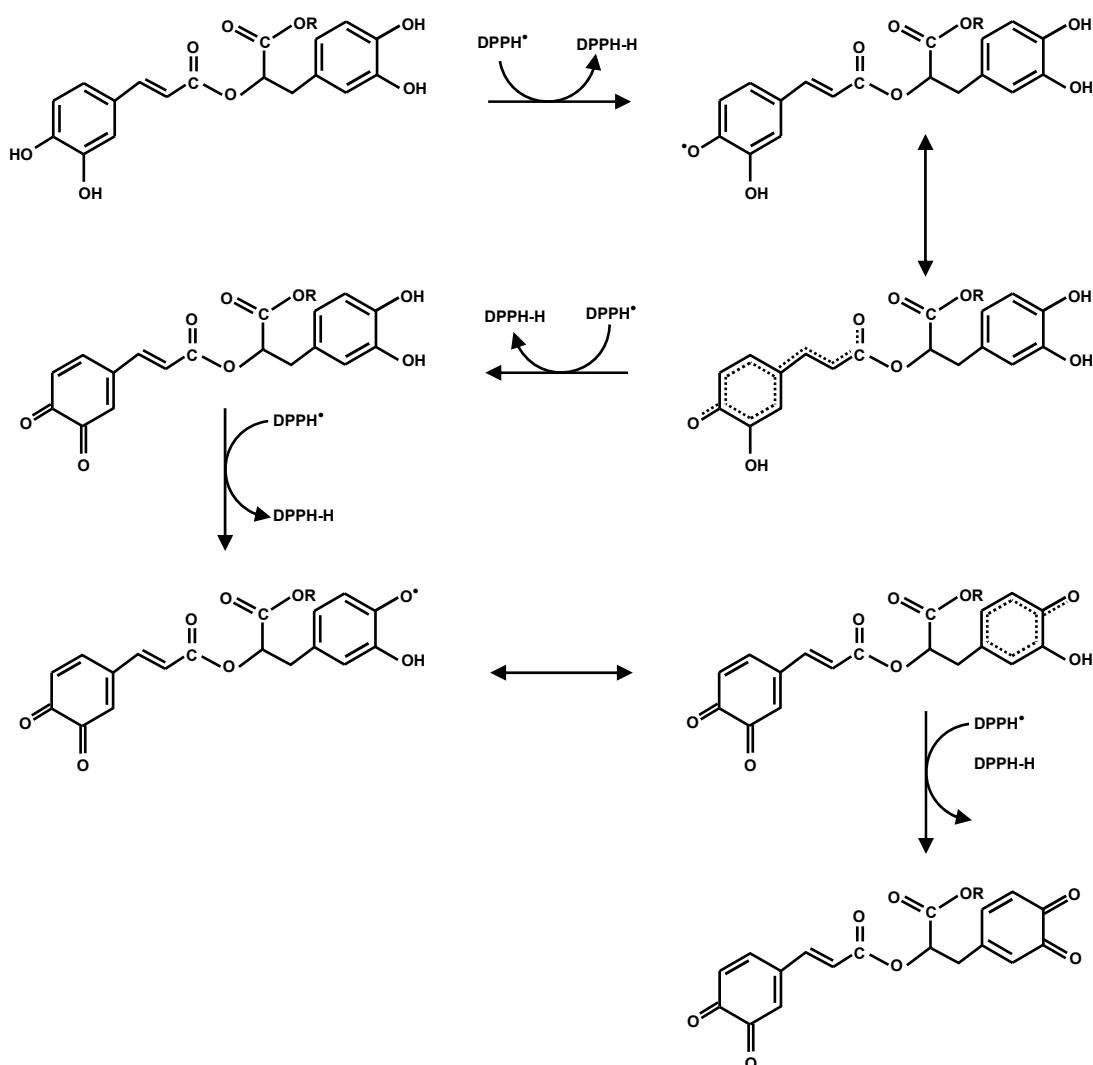
Composés	n^{es}
Acide rosmarinique	8,06 ± 0,86
Rosmarinate de méthyle	9,06 ± 0,49
Rosmarinate de butyle	8,70 ± 0,45
Rosmarinate d'octyle	6,34 ± 0,84
Rosmarinate de dodécyle	10,77 ± 0,92
Rosmarinate d'hexadécyle	10,52 ± 0,39
Rosmarinate d'octadécyle	6,82 ± 0,28
Rosmarinate d'eicosyle	6,50 ± 0,47

Comme dans le cas de l'acide chlorogénique, tous les composés testés sont en mesure de stabiliser une quantité de molécules de DPPH[•] supérieure à celle déductible à partir de leur structure de base. En effet, d'un point de vue structurel l'acide rosmarinique et ses esters contiennent quatre groupes hydroxyles phénoliques disponibles pour effectuer la réduction du DPPH[•].

En conséquence, il est clair qu'en plus du nombre de groupements hydroxyles phénoliques présents dans la structure, le milieu joue également un rôle important sur le pouvoir anti-radicalaire final des molécules testées. En effet, comme cela a été abordé auparavant, Saito et Kawabata (2005, 2006) expliquent d'après leur travaux sur l'acide protocatéchique et ses dérivés, qu'après la cession des groupes hydroxyles phénoliques, les antioxydants sont stabilisés sous leur forme o-quinone, laquelle est susceptible de subir une attaque nucléophile par le méthanol. Suite à cette attaque, il y a régénération de la forme o-diphénol, laquelle est capable de céder à son tour des atomes d'hydrogène au DPPH[•], ce qui conduit évidemment à une augmentation des valeurs n^{es} . En supposant que l'étude de Saito et Kawabata (2005, 2006) est extrapolable à la notre, le mécanisme impliqué dans la stabilisation du DPPH[•] due à l'action anti-radicalaire de l'acide rosmarinique et ses esters peut être expliqué comme suit.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Si l'on considère les quatre hydroxyles phénoliques de l'acide rosmarinique et de ses esters, il est naturel d'attendre une réduction de quatre radicaux DPPH selon le mécanisme décrit en Figure 47. Or, d'après le Tableau 21, l'on peut constater que les valeurs n^{es} obtenues pour l'acide rosmarinique et ses dérivés sont toutes supérieures à quatre. Ce résultat suggère que, en plus du simple transfert des quatre hydrogènes phénoliques, d'autres mécanismes sont impliqués dans la réduction des radicaux DPPH, la régénération par le méthanol et ou la dimérisation étant les plus probables, seront discutées par la suite.



$R=C_nH_{2n+1}$

$n=0$	Acide rosmarinique	$n=12$	Rosmarinate de dodécyle
$n=1$	Rosmarinate de méthyle	$n=16$	Rosmarinate d'hexadécyle
$n=4$	Rosmarinate de butyle	$n=18$	Rosmarinate d'octyle
$n=8$	Rosmarinate d'octyle	$n=20$	Rosmarinate d'eicosyle

Figure 47. Mécanisme théorique impliqué dans la stabilisation du DPPH• par l'acide rosmarinique et ses esters d'un point de vue structural.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Comme nous venons de l'exposer, le point de vue structural n'est pas capable d'expliquer le nombre total de molécules du radical DPPH réduites (n^{es}) pendant la réaction. Les résultats quantitatifs du poids exercé pour les caractéristiques structurelles sur le n^{es} , exprimés en pourcentage sont montrés dans le Tableau 22.

Tableau 22. Pourcentage de la valeur n^{es} explique d'un point de vue structural.

Composés	Réductions expliquées à partir de la stœchiométrie de base (% = $4/n^{es} \times 100$)
Acide rosmarinique	49,63
Rosmarinate de méthyle	44,15
Rosmarinate de butyle	45,98
Rosmarinate d'octyle	63,10
Rosmarinate de dodécyle	37,38
Rosmarinate d'hexadécyle	38,02
Rosmarinate d'octadécyle	58,65
Rosmarinate d'eicosyle	61,54

En conséquence, nous allons décrire par la suite comment l'attaque nucléophile du méthanol (MeOH) présent dans le milieu peut conduire à la régénération des groupes hydroxyles phénoliques afin d'expliquer le pourcentage d'information manquante.

Comme le montre la Figure 48, il existe plusieurs carbones susceptibles de l'attaque nucléophile du méthanol, laquelle dépend de la densité de spin qui malheureusement reste inconnue. Cependant, à titre d'exemple nous avons effectué l'attaque nucléophile de façon arbitraire afin d'arriver à expliquer le 100 % de la valeur n^{es} .

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

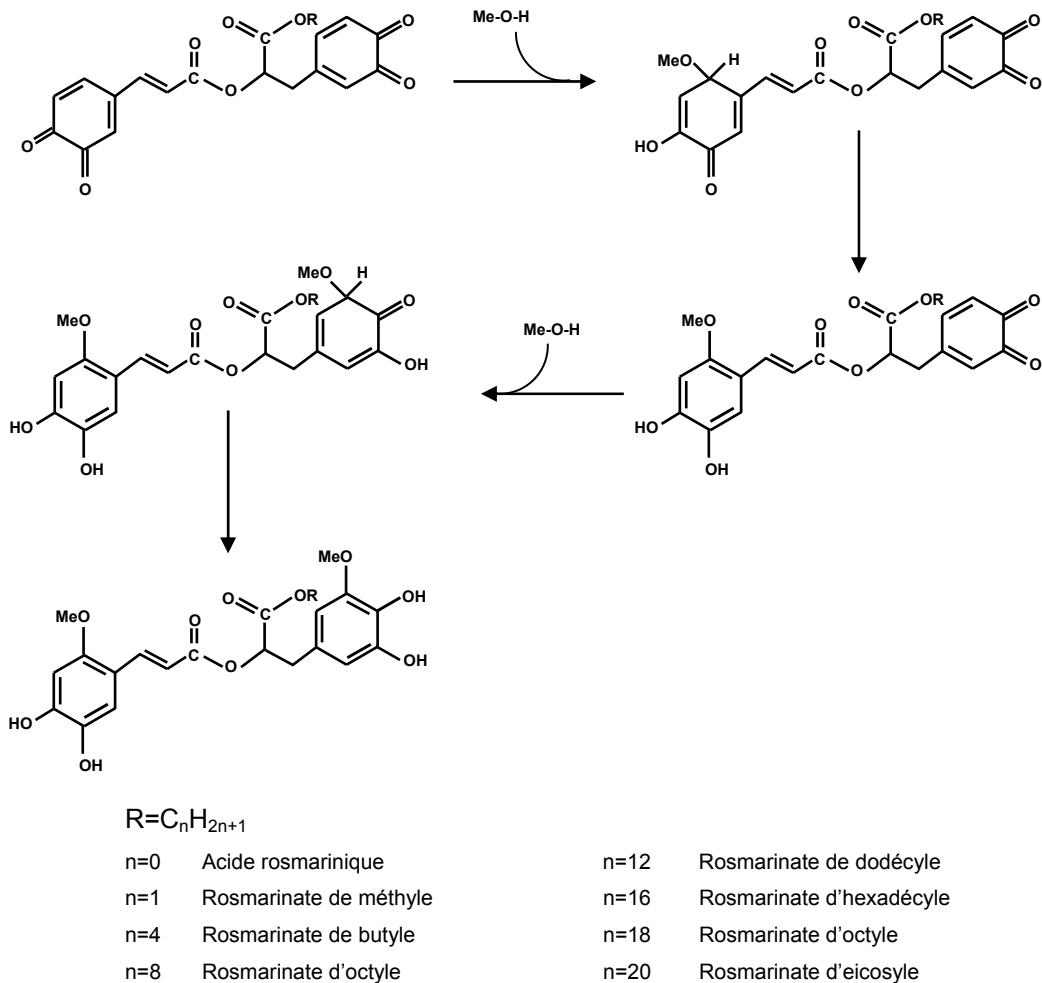


Figure 48. Mécanisme théorique impliqué pendant la régénération des formes o-quinone de l'acide rosmarinique et de ses esters par l'attaque nucléophile du méthanol.

De cette façon, la régénération par l'attaque nucléophile du méthanol conduirait à une molécule avec 4 groupes hydroxyles phénoliques disponibles pour réagir avec 4 molécules du DPPH^{\bullet} par un mécanisme similaire au montré en la Figure 47. En outre, la régénération par une attaque nucléophile peut aussi expliquer les valeurs obtenues par les esters de l'acide rosmarinique. Ainsi par exemple, les valeurs de n^{es} respectives de $10,7 \pm 0,92$ et $10,52 \pm 0,39$ pour les esters dodécylque et hexadécylque peuvent être expliquées en considérant que suite à la stabilisation de 8 molécules de DPPH^{\bullet} , en suivant les mécanismes proposés par les Figures 47 et 48, les formes o-quinone résultantes de la dernière étape peuvent être régénérées une deuxième fois, en récupérant de cette façon 4 groupes hydroxyles phénoliques

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

disponibles pour la stabilisation de molécules additionnelles du DPPH[•]. Cependant, et comme le montrent les valeurs expérimentaux uniquement 3 atomes d'hydrogène ont été effectivement utilisés pour la stabilisation du DPPH[•], ce qui pourrait s'expliquer si on considère qu'à mesure que la taille de la chaîne greffée augmente, les phénomènes d'encombrement stérique le font aussi. En effet, ce phénomène semble se confirmer avec les valeurs obtenues pour les esters octadecylique ($6,82 \pm 0,28$) et eicosylique ($6,50 \pm 0,47$) pour lesquelles, suite à la première addition nucléophile, seulement la moitié de groupes régénérés réduiraient les molécules additionnelles de DPPH[•]. Cependant, les faibles valeurs obtenues pour les rosmarinates de méthyle ($9,06 \pm 0,49$), de butyle ($8,70 \pm 0,45$) et d'octyle ($6,34 \pm 0,84$) où le phénomène d'encombrement stérique est moins important semblent contredire cette hypothèse. Néanmoins, il est possible aussi que d'autres types de mécanismes soient impliqués dans la stabilisation du radical DPPH pour les esters à courte chaîne.

Ainsi par exemple, Brand-Williams *et al.* (1995) postule qu'après une première stabilisation du DPPH[•] par la cession d'un atome d'hydrogène, le radical semi-quinone résultant peut stabiliser une deuxième molécule de DPPH[•] en réagissant avec elle, par une réaction de dimérisation hétérogène (Figure 49). Selon cette voie mécanistique il est possible d'expliquer les valeurs des n^{es} comprises entre 0 et 8. Ainsi dans le cas de l'acide rosmarinique la valeur n^{es} serait aussi expliquée par cette hypothèse. Concernant les esters méthylique et butylique, les valeurs n^{es} ont été légèrement supérieures à 8, cependant si les écart types pour ces dernières sont considérées, les valeurs n^{es} sont encore dans le domaine explicatif de cette hypothèse. Finalement le chlorogénate d'octyle avec une valeur inférieure à 8 semble montrer qu'il est possible qu'après les multiples cessions et réactions de dimérisation hétérogène le phénomène d'encombrement stérique commence à se manifester.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

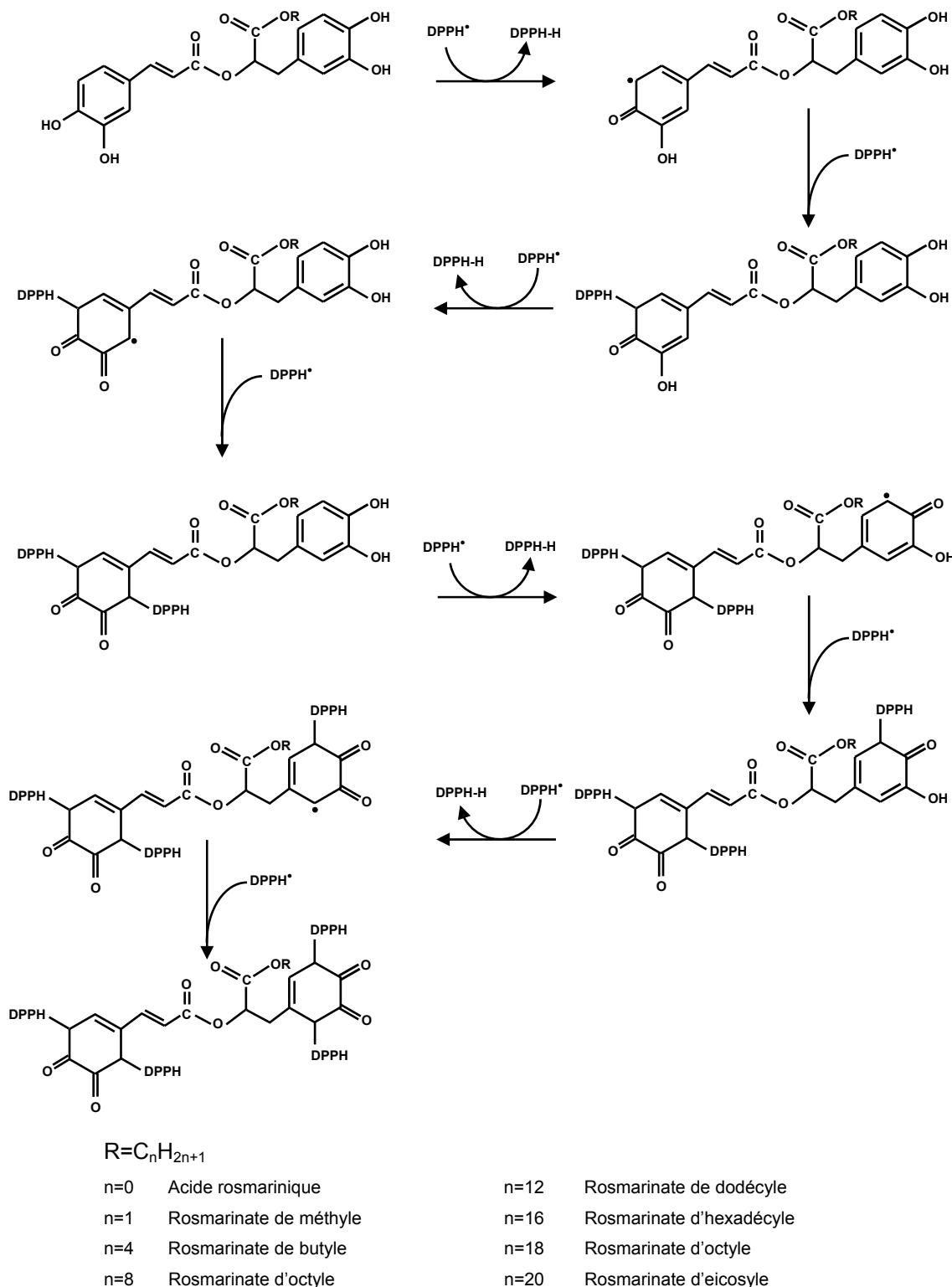


Figure 49. Mécanisme théorique de dimérisation hétérogène impliqué dans la stabilisation du radical DPPH par l'acide rosmarinique et ses esters.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

II.3 Influence du nombre de structures catéchol

En tenant compte uniquement des caractéristiques structurales, le fait de passer de une (dans le cas de l'acide chlorogénique et ses esters) à deux structures cathéchol devrait conduire, logiquement, à l'augmentation de la capacité anti-radicalaire d'un facteur deux. Cependant, comme nous l'avons montré précédemment, en plus des effets de structure, les interactions avec le milieu ont un impact important sur la valeur n^{es} de chacune des molécules. Le Tableau 23 donne une comparaison directe des résultats obtenus pour les composés de structure mono-catéchol (acide chlorogénique et ses esters) et di-catéchol (acide rosmarinique et ses esters).

Tableau 23. Effet du nombre de structures cathéchol sur les valeurs n^{es} .

Couple de composés	Ratio n_R^{es} / n_C^{es}
$C_0 - R_0$	$1,65 \pm 0,14$
$C_1 - R_1$	$1,45 \pm 0,03$
$C_4 - R_4$	$1,06 \pm 0,003$
$C_8 - R_8$	$0,74 \pm 0,09$
$C_{12} - R_{12}$	$1,61 \pm 0,11$
$C_{16} - R_{16}$	$1,66 \pm 0,02$
$C_{18} - R_{18}$	$1,02 \pm 0,01$
$C_{20} - R_{20}$	$1,05 \pm 0,06$

Où C et R représentent respectivement les structures de base de l'acide chlorogénique et rosmarinique. Les indices 0, 1, 4, 8, 12, 16, 18 et 20 représentent le nombre de carbone de la chaîne aliphatique greffée sur les structures de base.

Les résultats de ce tableau peuvent être classés en trois catégories :

Effet positif de la structure di-catéchol : Dans le cas des couples C_0-R_0 , $C_1 - R_1$, $C_{12} - R_{12}$ et $C_{16} - R_{16}$ l'augmentation du nombre de structures catéchol de un à deux conduit à l'amélioration de la capacité anti-radicalaire à des valeurs comprises

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

entre 1,45 et 1,66. Par conséquent, il est possible que les mécanismes de cession, régénération et/ou dimérisation impliqués pour ce type de composés dans la stabilisation du DPPH[•] soient similaires.

Effet négatif de la structure di-catéchol : La valeur atypique obtenue pour le couple C₈ – R₈ où l'augmentation des nombres de structures catéchol a un effet négatif sur la valeur anti-radicalaire globale de ces molécules reste surprenante. En effet, ces composés sont moins encombrés, d'un point de vue stérique, que les couples C₁₂ – R₁₂ et C₁₆ – R₁₆ et de ce fait, une valeur plus importante était attendue. Cependant, il est possible que la stabilisation du DPPH[•] effectuée par les esters octyliques de l'acide chlorogénique et rosmarinique ne suivent pas les mêmes mécanismes. En effet, la valeur n^{es} du chlorogénate d'octyle (8,52), suggère que la stabilisation du DPPH[•] suit préférentiellement la voie de régénération par addition de méthanol tandis que pour le rosmarinate d'octyle (n^{es} = 6,34), il est plus probable que la stabilisation soit effectuée par la voie de dimérisation hétérogène.

Absence d'effet de la structure di-catéchol : Enfin, pour les couples C₁₈ – R₁₈ et C₂₀ – R₂₀ l'augmentation du nombre de catéchol n'a eu aucun effet ce qui pourrait être dû à des phénomènes d'encombremens stériques à mesure que la longueur de chaîne greffée augmente.

II.4 Conclusion

Concernant l'acide chlorogénique et ses esters, l'étude cinétique a montré que le mécanisme de transfert d'électron (TE) est la voie la plus probable pour expliquer la stabilisation des radicaux DPPH[•]. De plus, les ordres partiels de réaction obtenus pendant les premières minutes de réaction suggèrent que les voies mécanistiques impliquées sont différentes pour l'acide chlorogénique et ses esters. En effet, pendant les premières minutes de la réaction l'acide chlorogénique peut stabiliser deux molécules du DPPH[•] contre une seulement pour ses esters. Ces résultats ont été confirmés par CLHP-SM en montrant que, suite à la cession successive de deux atomes d'hydrogène, l'acide chlorogénique se stabilise en sa forme o-quinone, tandis qu'après la cession d'un atome d'hydrogène ses esters suivent une réaction de dimérisation entre deux radicaux semi-quinones.

II. Détermination des capacités anti-radicalaires des dérivés lipophilisés des acides chlorogénique et rosmarinique

Concernant les valeurs n^{es} obtenues à l'état stationnaire, les acides chlorogénique et rosmarinique, mais également leurs esters respectifs, montrent une capacité réductrice supérieure à la capacité théorique imputable à leur seule structure. Ces résultats peuvent être rationalisés si, outre la structure moléculaire des antioxydants, des réactions entre les produits d'oxydation et le milieu sont considérées. Ainsi, nous avons proposé que les hautes valeurs de n^{es} obtenues pouvaient être expliquées en considérant l'existence de réactions de régénération et/ou de dimérisation.

Cependant, bien que ces voies soient en mesure d'expliquer les valeurs de n^{es} (nombre de molécules de DPPH[•] réduites par mole d'antioxydant), un long travail d'approfondissement reste nécessaire pour parfaitement élucider le chemin réactionnel emprunté par chaque molécule. Aussi, bien qu'une telle étude représente un grand intérêt d'un point de vue fondamental, nous avons préféré nous consacrer à l'étude du comportement antioxydant de ce type de molécules lipophilisées dans un milieu hétérogène où un véritable substrat oxydable (lipide de type triacylglycérol) est présent. Cette étude fait l'objet du chapitre suivant.

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

La production, la propagation et la réactivité des radicaux libres ainsi que leur implication dans de nombreuses physiopathologies humaines sont un sujet de grand intérêt, depuis plusieurs décennies (Armstrong et al., 1984 ; Kagan, 1988 ; Siesjö et al., 1989 ; Maxwell, 2000). Il y a 50 ans, Harman (1956) a ainsi postulé que le vieillissement pouvait être partiellement dû à l'accumulation de dommages causés par les radicaux libres aux niveaux moléculaire, cellulaire et tissulaire. En outre, les réactions d'oxydation, induites par attaque radicalaire, sont également présentes dans des systèmes lipidiques mis en œuvre dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. L'oxydation de ces systèmes lipidiques, généralement sous forme d'émulsion, est responsable non seulement de l'altération des qualités gustatives (saveurs et odeurs) des produits, mais également de la formation de produits toxiques. Afin de limiter ces processus oxydatifs, une des stratégies consiste à additionner des composés antioxydants synthétiques ou naturels, d'origine végétale notamment. Parmi ces derniers, citons les caroténoïdes, les ascorbates, ainsi que les composés phénoliques (confère partie bibliographie). Concernant cette classe de composés, nous avons plus particulièrement focalisé notre intérêt sur les acides chlorogénique et rosmarinique, composés bien connus pour leurs propriétés antioxydantes. En outre, ces acides sont présents en fortes concentrations dans des espèces végétales originaires de régions équatoriales (ex : café) et du bassin méditerranéen (ex : romarin).

Dans les chapitres précédents, nous avons décrit l'activité antioxydante des composés phénoliques, en système hétérogène, comme un événement multifactoriel dépendant entre autres de :

- la facilité de ces composés à céder des hydrogènes, à partir de leurs hydroxyles phénoliques, qui vont stabiliser les radicaux initiant les réactions d'oxydation ;
- la stabilisation aisée des radicaux phénoxyles par effets mésomères ;
- la distribution appropriée des composés dans le système hétérogène et plus particulièrement de leur localisation aux endroits où l'oxydation prend place (interface).

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

Le caractère anti-radicalaire des acides chlorogénique et rosmarinique, mais également de leurs dérivés lipophilisés, a été évalué dans la section précédente par la méthode DPPH^o. Bien que les résultats obtenus soient encourageants, cette approche unidimensionnelle ne prend en compte que les interactions entre un antioxydant et une espèce radicalaire. En conséquence, elle néglige les interactions multidimensionnelles existantes dans les milieux complexes, comme les aliments. En effet, cette méthode ne rend pas compte de l'ensemble des interactions entre les différentes variables que sont le(s) substrat(s) oxydable(s), les espèces radicalaires, l'antioxydant ainsi que le type et la quantité d'émulsifiant. En outre, la mise en œuvre de cette méthode en milieu homogène ne permet pas d'appréhender les phénomènes de distribution de chacune des espèces dans les systèmes multiphasiques.

Il est alors évident que la détermination de la capacité antioxydante par des méthodes capables de prendre en considération toutes ces variables relève d'un véritable défi, mais demeure indispensable à l'évaluation, en milieux hétérogènes, de composés de polarités très différentes.

Ainsi par exemple, Porter *et al.* (1989) ont évalué des antioxydants hydrophiles et hydrophobes dans des systèmes hétérogènes à base de phospholipides et ont observé que les antioxydants hydrophobes étaient les plus performants. Par contre, la tendance est inversée lorsque l'activité antioxydante est déterminée en système lipidique homogène. Ce comportement, connu sous le terme de « Paradoxe Polaire », a été également confirmé par divers auteurs utilisant des systèmes hétérogènes d'évaluation de l'activité antioxydante. Cuvelier *et al.* (2000) ont par exemple employé un système dispersé d'acide linoléique et d'eau, tandis que Huang *et al.* (1996 a, b ; 1997) ont travaillé avec des émulsions huile - eau. Enfin, Chalas *et al.* (2001) ont effectué le suivi de l'oxydation de la lipoprotéine de basse densité (LDL). Dans tous les cas, les auteurs concluent que la meilleure activité antioxydante des composés hydrophobes par rapport à leurs homologues hydrophiles est due au fait que les premiers sont localisés à l'interface où les réactions d'oxydation ont lieu. Cependant, leur conclusion commune est basée uniquement sur la différence des polarités existantes entre couples d'analogues, tels que le Trolox et l' α -tocopherol,

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

l'acide carnosique et le carnosate de méthyle, l'acide ascorbique et le palmitate d'ascorbyle, l'acide caféïque et le caféate d'éthyle. De plus, le « Paradoxe Polaire », ne considère ni le type (anionique, non ionique ou cationique) ni la quantité d'émulsifiant mis en œuvre dans les tests, dont dépend pourtant de façon cruciale, la distribution des différentes espèces (Mei et al., 1999).

Aussi, dans les paragraphes suivants, nous nous proposons de discuter des résultats obtenus au travers de l'évaluation critique d'un test de mesure de la capacité antioxydante prenant en compte l'ensemble des facteurs que nous venons de décrire.

Pour cela la mesure du processus d'oxydation, a été réalisée par une nouvelle méthode appelée test des triènes conjugués autoxydables (CAT) (Laguerre et al., 2008), dont le choix est fondé principalement sur les critères suivants :

- la cible d'oxydation est un triacylglycérol, ce qui est plus représentatif des substrats oxydables naturels (de type alimentaire notamment) par rapport aux chromophores ou fluorophores artificiels utilisés dans d'autres méthodes ;
- l'émulsion est stabilisée par un émulsifiant non ionique. Cela permet de s'affranchir des interactions ioniques avec les antioxydants chargés et de raisonner sur la distribution de ces composés au sein de l'émulsion en termes de balance hydrophile/hydrophobe ;
- le pouvoir antioxydant est évalué avec des ratio molaires [antioxydant]/[substrat oxydable] inférieurs à 0,01, ce qui est en accord avec la définition selon laquelle « un antioxydant est une substance qui, lorsqu'elle est présente en petites concentrations par rapport au substrat oxydable, retarde ou empêche la détérioration oxydative » (Halliwell et Gutteridge, 1995) ;
- les essais sont effectués avec un matériel à haut débit (lecteur de micro plaques) ;
- le substrat oxydable est un produit naturel commercial et peu coûteux (50 euros/L) ;
- le triène conjugué des acides éléostéariques constitutifs de la majorité des TAG de l'huile de tung possède des propriétés spectrales adaptées à un suivi spectrophotométrique ;
- la stratégie du test est basée sur le suivi de la disparition du substrat oxydable représenté par l'huile de tung et non sur le dosage de produits d'oxydation.

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

III.1. Évaluation des propriétés antioxydantes des dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique par la méthode des triènes conjugués autoxydables (CAT)

Dans ce paragraphe nous allons évaluer la capacité antioxydante de l'acide chlorogénique et de ses esters en utilisant la méthode CAT (cf. matériels et méthodes). Cette méthode est basée sur le suivi de l'oxydation de l'huile de tung par des réactions radicalaires en chaîne, ces dernières étant initiées par les radicaux R[•] provenant de la décomposition thermique de l'AAPH (azo-initiateur de type R-N=N-R) (réaction 36).



En milieu aérobie, les radicaux R[•] réagissent de façon immédiate avec l'oxygène de l'air afin de former les radicaux peroxydes (réaction 37)



Ces derniers vont alors arracher un atome d'hydrogène allylique aux triènes conjugués présents dans l'huile de tung (réaction 38), propageant ainsi le processus oxydatif (réactions 39, 40).



III.1.1. Évaluation qualitative de la capacité antioxydante de dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique

Le suivi cinétique de l'oxydation des triènes conjugués (réactions 38 et 40) dans l'huile de tung (présents essentiellement sous forme de triéthéostéarine, Figure 50) est facilement réalisable dans la mesure où leur dégradation conduit à une diminution du signal d'absorbance à 273 nm.

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

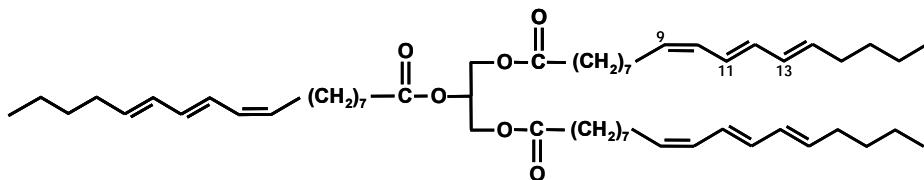


Figure 50. Structure moléculaire de la triéléstéarine.

Ainsi, le suivi de la chute d'absorbance (exprimée en absorbance relative) en absence et en présence d'acide chlorogénique et de ses esters, conduira à une évaluation directe du degré d'inhibition du processus oxydatif induit par ces derniers. Comme le montre la Figure 51 l'addition de différentes concentrations d'acide chlorogénique et de ses esters (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 µM) a pour effet une diminution de la vitesse d'oxydation de l'huile.

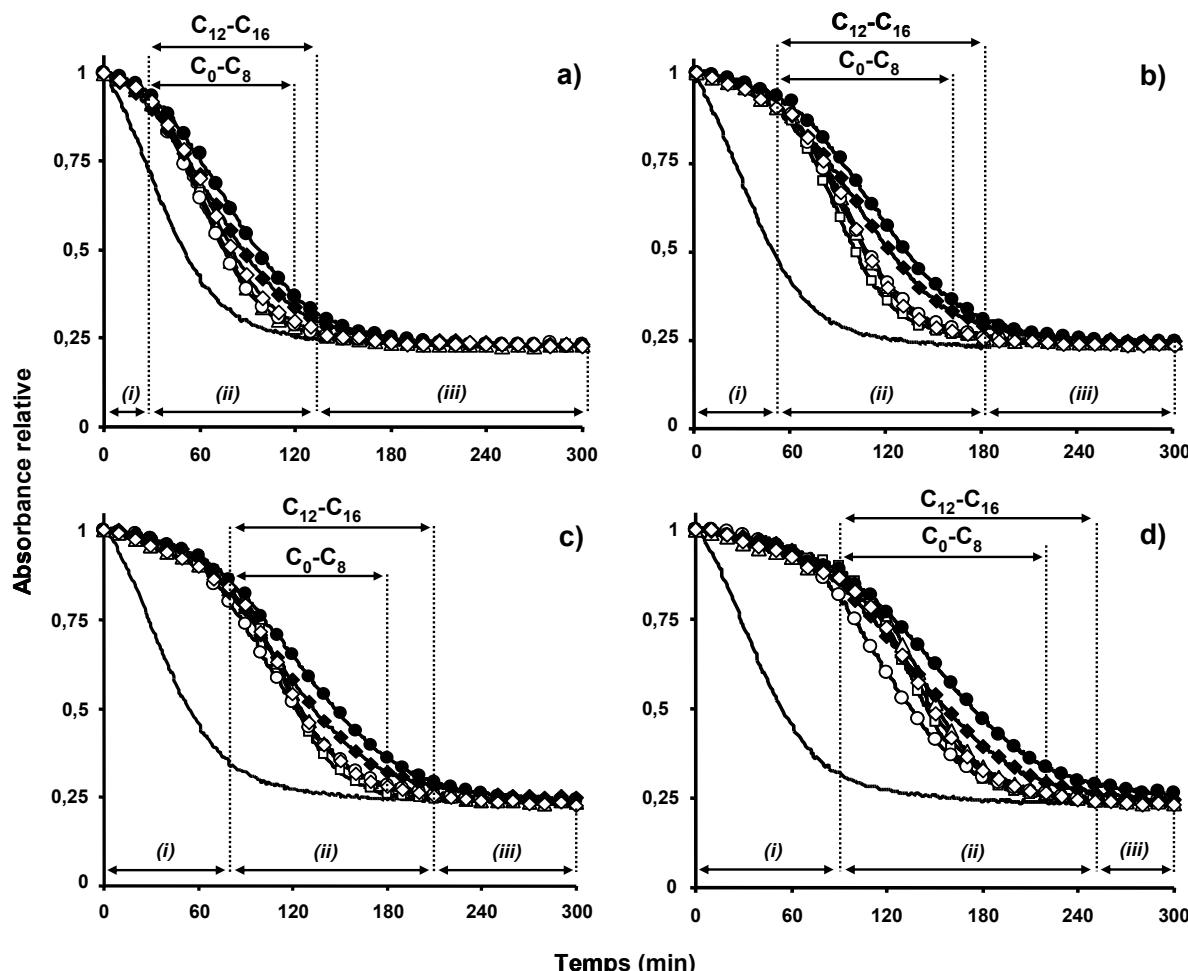


Figure 51. Cinétiques d'oxydation à 37°C de l'huile de tung en absence (—) et en présence de 0,2 µM (a), 0,4 µM (b), 0,6 µM (c) et 0,8 µM (d) d'acide chlorogénique (◊), et de ses esters méthylique (Δ), butylique (□), octylique (○), dodécylique (●) et hexadécylique (◆), en système émulsionné contenant 115 µM d'huile de tung, 17 µM de Brij® 35 et 1 mM d'AAPH.

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

En outre, la Figure 51 montre également que toutes les courbes d'inhibition de l'oxydation ont la même allure et peuvent être divisées en trois régions :

- (i) **Pseudo phase de latence** : cette région peut être définie comme la période pendant laquelle l'acide chlorogénique et ses esters sont capables de réduire une grande quantité de radicaux ROO[·] avant que ces derniers n'atteignent l'huile et commencent le processus oxydatif. Cependant et comme le montrent les figures, la légère décroissance du signal obtenu dans ces intervalles de temps, témoigne que la réduction des radicaux ROO[·] n'est pas complète et qu'un certain nombre d'entre eux a atteint l'huile.
- (ii) **Phase de décroissance** : elle commence après que la majorité des molécules d'antioxydant ait réagi avec les radicaux ROO[·]. Elle se caractérise par une chute de signal à une vitesse différente de celle obtenue sans antioxydant. Les différences de vitesses entre les systèmes avec et sans antioxydant peuvent se comprendre en considérant que les produits oxydés de l'acide chlorogénique et ses esters gardent encore un caractère antioxydant.
- (iii) **Etat stationnaire** : c'est l'état atteint lorsque l'huile a été complètement oxydée.

Par ailleurs, il peut être observé sur les Figures 51 que la phase de décroissance est plus importante pour les chlorogénates de dodécyle et d'hexadécyle et que la durée de la pseudo phase de latence augmente de façon proportionnelle avec la concentration des composés testés.

III.1.2. Évaluation de la capacité antioxydante des dérivés lipophilisés de l'acide chlorogénique par la méthode CAT

En termes quantitatifs, la capacité antioxydante exercée par chaque molécule a été calculée en déterminant l'aire sous la courbe (ASC) obtenue après l'addition de l'antioxydant. Cette aire, comme il a été évoqué précédemment (cf. matériels et méthodes), peut être calculée directement par l'équation 20 :

$$ASC = 1 + \sum_{i=1}^{300} Abs_{ri} \quad (20)$$

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

où Abs_{ri} représente l'absorbance relative évaluée à chaque minute pendant une période de 300 minutes. Finalement les valeurs d'inhibition de l'oxydation sont exprimées en valeurs CAT par l'intermédiaire de l'équation suivante :

$$\text{Valeur CAT} = \frac{(\text{ASC}_{\text{échantillon}} - \text{ASC}_{\text{blanc}})}{(\text{ASC}_{\text{Trolox}} - \text{ASC}_{\text{blanc}})} \times \frac{(\text{mol de Trolox})}{(\text{mol d'échantillon})} \quad (21)$$

Ici, les $\text{ASC}_{\text{échantillon}}$ et $\text{ASC}_{\text{blanc}}$ représentent respectivement les aires obtenues pour les essais effectués avec et sans antioxydant.

L'évolution de la valeur CAT en fonction du nombre de carbones de la chaîne aliphatique greffée sur l'acide chlorogénique ($n=0$) est montrée sur la Figure 52.

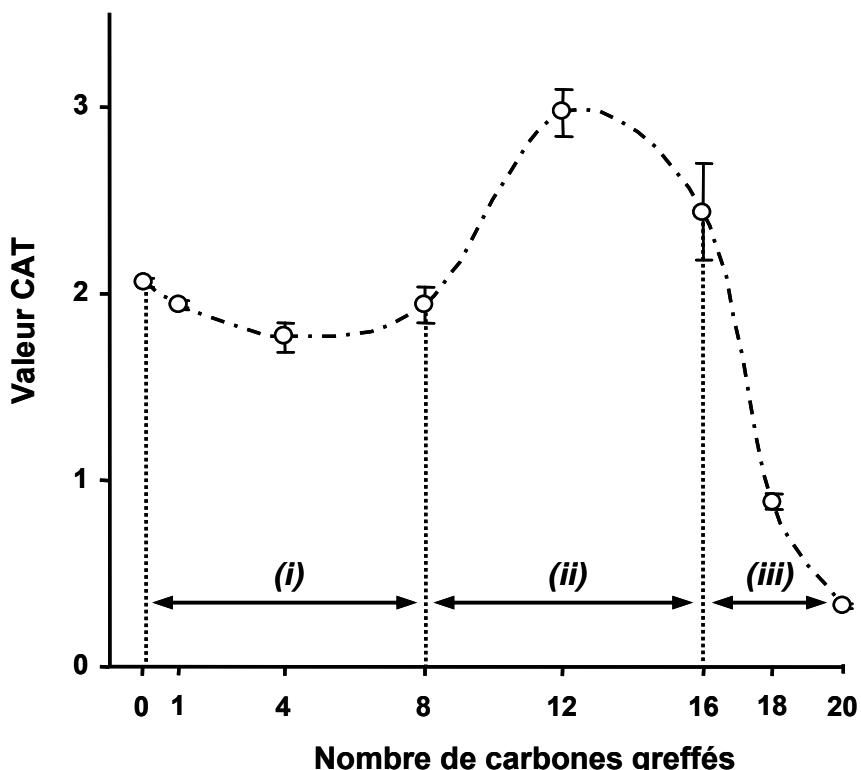


Figure 52. Capacité antioxydante de l'acide chlorogénique et de ses esters exprimée en valeur CAT.

A l'examen de cette figure, il apparaît que l'ordre d'efficacité antioxydante exprimée en valeurs CAT est le suivant : chlorogénate de dodécyle ($2,97 \pm 0,13$) > chlorogénate d'hexadécyle ($2,46 \pm 0,23$) > acide chlorogénique ($2,05 \pm 0,03$) > chlorogénate d'octyle ($1,95 \pm 0,07$) = chlorogénate de méthyle ($1,94 \pm 0,02$) >

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

chlorogénate de butyle ($1,76 \pm 0,08$) > chlorogénate d'octadécyle ($0,88 \pm 0,04$) > chlorogénate d'eicosyle ($0,32 \pm 0,02$). Néanmoins, l'effet du nombre de carbones de la chaîne aliphatique greffée sur la capacité antioxydante déterminée par la méthode CAT n'est pas linéaire, et la courbe représentant son évolution peut être divisée virtuellement en trois régions :

- (i) Une première région où jusqu'à 8 atomes de carbone, la longueur de la chaîne aliphatique n'a pas d'effet significatif sur l'activité antioxydante,
- (ii) une région intermédiaire centrée sur la valeur optimale correspondant à une longueur de chaîne de 12 atomes de carbone (chaîne dodécyle),
- (iii) et finalement, une dernière région où un effondrement de la capacité antioxydante est observé pour des longueurs de chaîne supérieures à 16 atomes de carbones.

Or, le comportement qui vient d'être décrit est particulièrement intéressant pour les deux raisons suivantes. En premier lieu, l'explication des résultats obtenus selon la théorie du « Paradoxe Polaire » (Porter, 1989) ne peut être avancée dans la mesure où un phénomène de « cut-off » (courbe en cloche passant par un maximum appelé point de rupture), est observé pour une longueur de chaîne de 12 atomes de carbone. Rappelons que le « Paradoxe Polaire », précédemment cité, stipule qu'à mesure que l'hydrophobie de la molécule augmente, sa capacité antioxydante en milieu hétérogène augmente également. D'autre part, nos résultats coïncident avec ceux obtenus dans les domaines pharmacologiques et cosmétiques où le même effet de « cut off » est observé sur modèle *in vitro* de systèmes biologiques (Walters *et al.*, 1993). En effet, les activités biologiques des composés amphiphiles, possédant une chaîne aliphatique, montrent souvent un comportement non linéaire à allure quasi parabolique (Rucka *et al.*, 1981, 1983; Devínsky *et al.*, 1990; Bagalvy et Devínsky, 1996). Ainsi, par exemple, Devínsky *et al.* (1990) ont montré que l'activité antimicrobienne d'une série d'homologues d'oxydes de N,N-diméthylalkylamines augmentait progressivement jusqu'à atteindre un maximum pour une longueur de la chaîne alkyle de 12 atomes de carbone, puis diminuait pour des longueurs supérieures. A notre connaissance, ce phénomène de « cut-off » a été observé exclusivement pour des systèmes physico-chimiques impliquant des membranes de liposomes (Kleszczynska *et al.*, 1981 ; Przestalski et Kuczera, 1992) ainsi que dans

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

des études effectuées *ex vivo* en milieux cellulaires, microbiens (Devínsky *et al.*, 1990; Birnie *et al.*, 2000) ou sur modèles animaux (Anselmi *et al.*, 2004) et humains (Kimura *et al.*, 2003). Cependant, dans des études *in vitro* impliquant un système lipidique homogène ou hétérogène l'effet « cut-off » n'a pas été observé. Une des raisons possibles à l'absence de cet effet, pourrait être le fait que la grande majorité des études *in vitro* des antioxydants, est généralement réalisée sur une série d'homologues dont l'étendue du caractère hydrophobe n'est pas très large (Cuvelier *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 1996 a, 1996 b, 1997 ; Frankel *et al.*, 1994), alors que dans les études pharmacologiques le nombre de composés analogues analysés dans une même série est généralement plus grand. D'autre part, on peut également postuler que l'absence apparente d'effet « cut-off » dans les études *in vitro* pourrait résulter de la composition du milieu réactionnel impliqué dans le système testé. En effet, il est d'une importance capitale de prendre en considération l'effet des variables comme :

- la nature, la concentration et l'état physique du substrat oxydable ;
- les espèces utilisées pour initier et propager la réaction d'oxydation, et finalement ;
- dans le cas de systèmes émulsifiés, la nature et la concentration de l'émulsifiant employé pour stabiliser l'émulsion.

Concernant les systèmes dispersés et plus particulièrement la distribution des antioxydants entre les différentes phases impliquées dans l'oxydation, Walters *et al.* (1993) affirment qu'il est très difficile d'expliquer le phénomène de « cut-off » en prenant pour uniques descripteurs le coefficient de distribution ($\log P$) et la concentration micellaire critique (CMC) de chaque antioxydant. En effet, aucun des deux ne présente de minima ou maxima lorsque la longueur de la chaîne aliphatique greffée varie. Pour notre part, nous avons déterminé lors d'une étude préliminaire, les coefficients de distribution théoriques $\log P$ (Figure 53 a), $\log D$ (Figure 53 b) et le pourcentage expérimental d'antioxydant présent dans la phase aqueuse d'un système huile de tournesol - eau en absence d'émulsifiant (Figure 53 c).

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

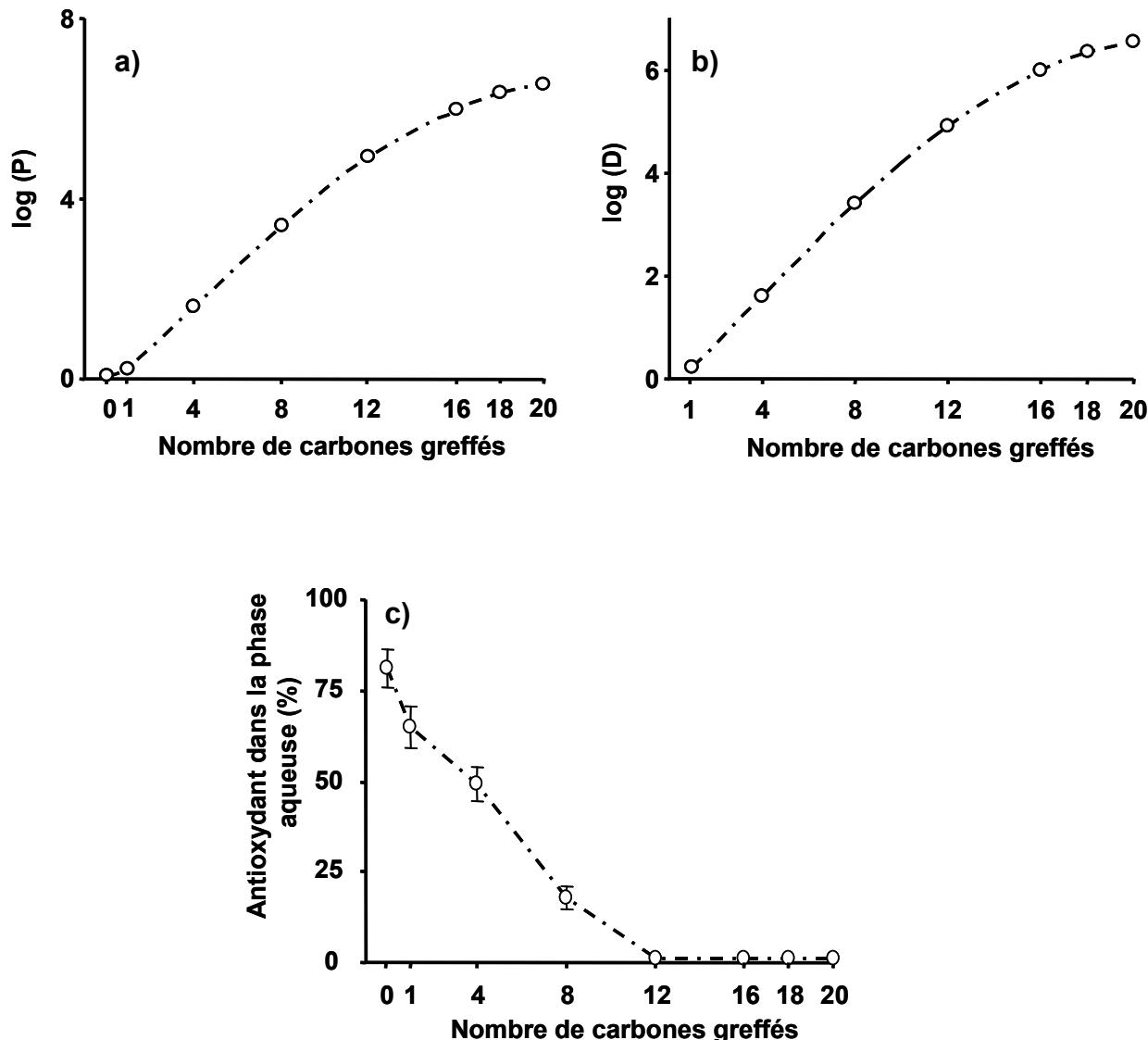


Figure 53. Effet de la longueur de chaîne greffée sur la distribution de l'acide chlorogénique et de ses esters, coefficients de distribution théoriques $\log P$ (a), $\log D$ (b) et % expérimental d'antioxydant présent dans la phase aqueuse d'un système huile de tournesol - eau.

Ces résultats confirment, comme ceux de Walters *et al.* (1993) que l'absence de maxima ou minima rend ces descripteurs inappropriés pour expliquer le comportement antioxydant observé par la méthode CAT.

En effet, le système réactionnel mis en jeu dans la méthode CAT implique une région interfaciale qui doit être prise en compte dans la recherche de descripteurs physico-chimiques. Or, c'est au niveau de cette région interfaciale, que les

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

composants actifs tels que les radicaux libres et les antioxydants vont se concentrer ou non, accélérant ou retardant alors le processus oxydatif. En effet les antioxydants amphiphiles (esters lipophilisés de l'acide chlorogénique) peuvent s'associer soit aux molécules de surfactant qui entourent les gouttelettes d'huile, soit aux surfactants présents dans la phase aqueuse sous forme de micelles. Ces associations auront alors une conséquence directe sur (i) la distribution de l'antioxydant au sein du système et (ii) sa capacité d'action en tant qu'agent protecteur de l'huile.

Puisque le phénomène de « cut-off » a été observé avec la méthode CAT (où il existe une membrane tensioactive entre les gouttelettes d'huile de tung et la phase aqueuse) nous avons à nouveau déterminé expérimentalement le pourcentage d'antioxydant présent dans la phase aqueuse d'un système huile de tournesol - eau dans les mêmes conditions d'émulsification que celles de la méthode CAT ($17\mu\text{M}$ de Brij® 35) (Figure 54).

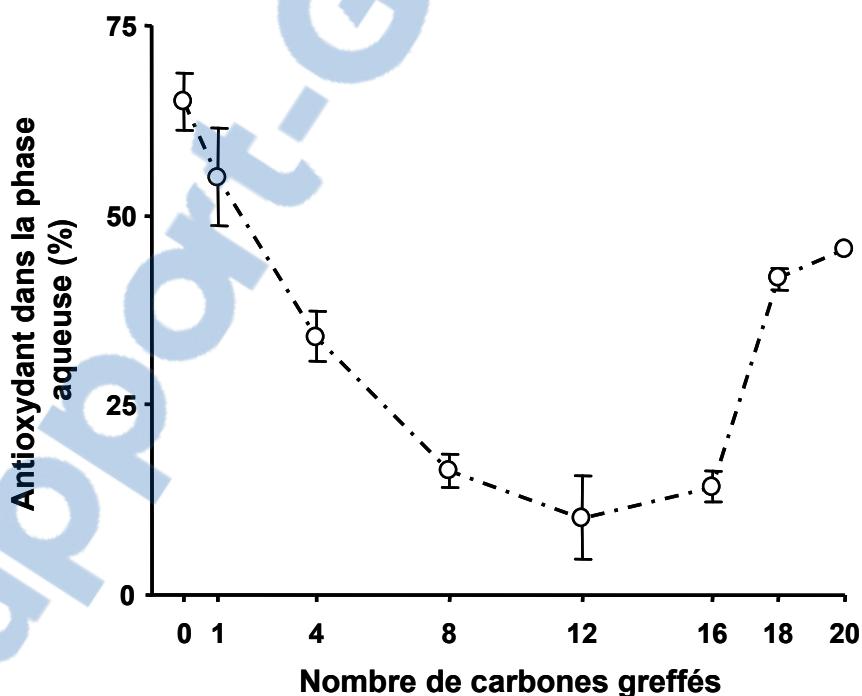


Figure 54. Pourcentage d'acide chlorogénique et de ses esters dans la phase continue d'une émulsion huile de tournesol – eau stabilisée avec $17\mu\text{M}$ de Brij® 35.

La Figure 54 montre que l'addition d'une petite concentration d'émulsifiant (Brij®35) change radicalement la distribution de l'acide chlorogénique et de ses

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

esters entre la phase continue (eau) et la phase discontinue (huile+membrane). En effet, le pourcentage d'antioxydant présent dans la phase continue de l'émulsion décroît à mesure que la longueur de la chaîne carbonée augmente jusqu'à une longueur de chaîne de 12 atomes de carbones. Ainsi, jusqu'à 12 carbones, l'allure de la courbe est similaire à celle que nous avons observée sans émulsifiant (Figure 53 c). Cependant, au-delà de 12 carbones l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle accroît la quantité d'antioxydants dans la phase aqueuse.

Bien que les Figures 52 et 54 ne soient pas complètement superposables, elles mettent en évidence une relation directe entre la distribution des antioxydants entre les différentes phases de l'émulsion (aqueuse, huile, membrane) et leur activité antioxydante. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il nous permet de proposer un scénario capable d'expliquer l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante déterminée par la méthode CAT (Figure 55).

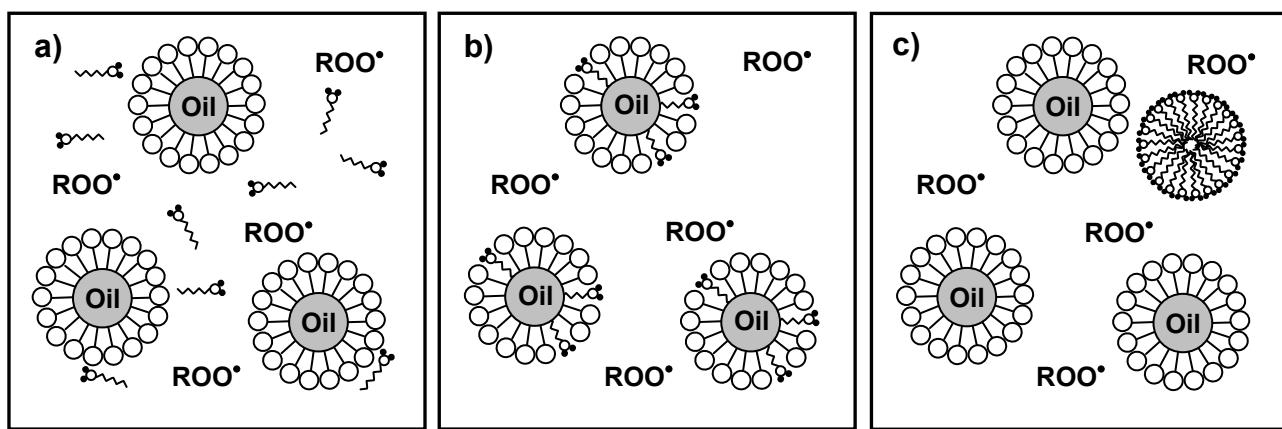


Figure 55. Schéma représentant la distribution de l'acide chlorogénique et de ses esters en milieu émulsionné : (a) acide chlorogénique, chlorogénates de méthyle, butyle et octyle ; (b) chlorogénate de dodécyle ; (c) chlorogénate d'hexadécyle, d'octadécyle et d'éicosyle. Les antioxydants sont représentés par le symbole ($\sim\text{---}\text{a}$), l'émulsifiant par le symbole ($-\text{O}$).

Ainsi, nous pensons que jusqu'à 8 atomes de carbone, l'acide chlorogénique et ses esters correspondants, sont distribués préférentiellement dans la phase aqueuse en raison de la prédominance des interactions de van der Waals sur les interactions hydrophobes. En outre, comme le proposent Quina *et al.* (1995) et Metcalf et Mulley

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

(1956), il se peut également que les groupes hydroxyles phénoliques des antioxydants forment des liaisons hydrogène avec les chaînes polyoxyéthylene du groupe de tête de l'émulsifiant (Brij® 35). Dans ces conditions, l'antioxydant se trouverait au niveau de l'interface mais dans une position défavorable à la pleine expression de sa capacité antioxydante (Figure 55 a). Pour une chaîne à 12 atomes de carbone, nous faisons en revanche l'hypothèse que le positionnement du chlorogénate de dodécyle à l'interface est plus proche des radicaux responsables de l'oxydation ou dans une orientation plus favorable à une action antioxydante (Figure 55 b). Finalement, le fait qu'au-delà de 16 atomes de carbone la valeur CAT s'effondre, pourrait s'expliquer par le fait que les esters à longue chaîne de l'acide chlorogénique sont présents dans le milieu sous forme de micelles (Figure 55 c). En effet, pour les émulsifiants, il est bien connu que la tendance à former des micelles est d'autant plus élevée que la longueur de la chaîne alkyle est importante (Yuji et al., 2007). Par conséquent, si la tendance de l'antioxydant à former des micelles devient plus importante que celle à s'accumuler à l'interface, sa concentration au niveau des sites de l'oxydation décroît. De plus, comme la taille des espèces augmente, leur capacité à se disperser diminue, affectant de cette manière leur action antioxydante. En d'autres mots, le processus de formation de micelles d'antioxydant présente trois désavantages majeurs pour contrer le processus d'oxydation : une mauvaise localisation, une faible mobilité et finalement la formation de cluster.

Bien évidemment, le scénario présenté dans la Figure 55 ne constitue qu'une approche simplifiée du phénomène, car nous avons négligé le fait que la différence des valeurs obtenues par la distribution entre le chlorogénate d'octyle et le chlorogénate de dodécyle (Figure 54) soit moins importante que la différence de capacité antioxydante déterminée par la méthode CAT (Figure 52). Ce point montre que d'autres facteurs interviennent dans l'action antioxydante de l'acide chlorogénique et de ses esters dans un tel système réactionnel, comme notamment la mobilité qui peut être affectée par la longueur de la chaîne alkyle. De plus, à partir de la Figure 51, nous pouvons constater que la pseudo phase de latence obtenue pour les chlorogénates d'octyle et dodécyle sont pratiquement identiques, tandis que les différences entre les deux phases de décroissance sont significatives. En

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

supposant que la pseudo phase de latence soit liée à l'action de l'antioxydant sous sa forme non-oxydée, et que la phase de décroissance corresponde à l'action de l'antioxydant sous sa forme oxydée, il est logique de considérer que la forte capacité antioxydante du chlorogénate de dodécyle est plutôt liée à une meilleure localisation de l'antioxydant sous sa forme oxydée. Cependant nos données ne nous permettent pas de vérifier cette hypothèse puisque nous n'avons mesuré que la distribution des antioxydants sous leur forme réduite (Figure 54).

Aussi, il n'a pas échappé à notre attention que la spécificité du double effet « cut-off » (capacité antioxydante et distribution d'antioxydant dans la phase continue d'une émulsion) pour une longueur de 12 atomes de carbone peut être simplement due au fait que la queue hydrophobe de l'émulsifiant employé (Brij® 35) est de même longueur que la chaîne alkyle du chlorogénate de dodécyle. En effet, comme le montre la Figure 55 b, cette analogie structurelle pourrait être à la base d'un meilleur alignement entre le chlorogénate de dodécyle et l'interface créée par le Brij® 35. Cependant, il peut être opposé à cet argument qu'un grand nombre d'études biologiques développées sur culture cellulaire en l'absence d'émulsifiant, montrent le même phénomène de « cut-off » pour une longueur de chaîne autour de 12 atomes de carbone (Hansch and Fujita 1964; Lien *et al.*, 1968; Lee, 1976; Devínsky *et al.*, 1978; Janoff *et al.*, 1981; Pringle *et al.*, 1981; Requena and Haydon, 1985; Baláž *et al.*, 1988; Franks and Lieb, 1986; Devínsky *et al.*, 1990; Birnie *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2003). En outre, les résultats expérimentaux d'une autre thèse en cours d'achèvement au laboratoire, ont montré que la capacité antioxydante de l'acide chlorogénique et de ses esters, en culture cellulaire, était caractérisée par le même effet de « cut-off ».

Finalement jusqu'à 12 atomes de carbone nos résultats concordent avec le « Paradoxe Polaire », selon lequel les antioxydants hydrophobes sont plus actifs en milieu émulsifié que leurs homologues polaires (Porter *et al.*, 1989). Puis, au-delà de 16 atomes de carbone la divergence de comportement observée par rapport à la prédiction du « Paradoxe Polaire » pourrait s'expliquer par l'accumulation des antioxydants dans la phase continue sous forme de micelles. En d'autres termes, il semblerait que le « Paradoxe Polaire » soit en réalité un cas particulier d'un phénomène global plus large de type « cut-off ».

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

III.1.3. Effet de la concentration en l'émulsifiant sur la distribution des antioxydants dans la phase continue de l'émulsion

En tenant compte du fait que les concentrations d'émulsifiant mises en œuvre dans la méthode CAT sont très faibles par rapport à celles employées dans d'autres tests de détermination de la capacité antioxydante en milieu hétérogène, nous avons décidé d'évaluer l'influence de cette concentration sur la distribution de l'acide chlorogénique et de ses esters, notamment dans la phase aqueuse. La Figure 56, montre l'évolution de la concentration de l'antioxydant dans la phase aqueuse en fonction de la concentration en émulsifiant Brij® 35.

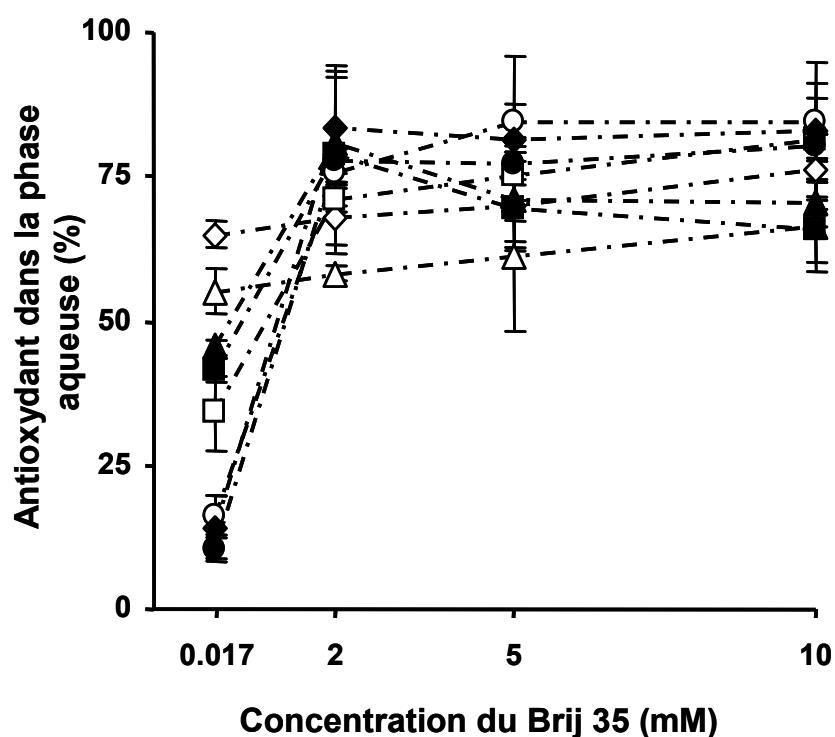


Figure 56. Teneur (%) de l'acide chlorogénique (\diamond), et de ses esters méthylique (Δ), butyle (\square), octylique (\circ), dodécylélique (\bullet), hexadécylélique (\blacklozenge), octadécylélique (\blacksquare) et eicosylélique (\blacktriangle) dans la phase continue d'une émulsion huile de tournesol – eau stabilisée par le Brij® 35 à différentes concentrations.

Comme on peut le constater, la distribution de l'acide chlorogénique et de ses esters dans la phase aqueuse est fort différente de l'allure quasi parabolique observée sur la Figure 54 et semble indiquer qu'au delà d'une concentration en

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

émulsifiant de l'ordre de 2 mM, l'influence de la longueur de chaîne de l'antioxydant n'est plus significative.

Or, cette observation nous permet à nouveau de proposer un scénario susceptible de décrire les multiples interactions existant entre les espèces chimiques impliquées dans ce système émulsionné. En effet, il est communément accepté que jusqu'à la CMC, un émulsifiant comme le Brij® 35 se situe autour de la gouttelette d'huile, et qu'au-delà, il se produit une saturation de la membrane interfaciale qui conduit les molécules additionnelles d'émulsifiant à s'auto-assembler, notamment sous forme de micelles. Aussi, nous postulons que les processus de formation de micelles générées par le Brij® 35 (survenant entre 0,017 mM et 2 mM) conduisent à une modification drastique de la distribution de l'acide chlorogénique et de ses esters dans la phase continue de l'émulsion. Cependant, comme il est très difficile de conclure uniquement sur la base de la Figure 56, nous avons également examiné, pour chaque antioxydant, l'évolution du coefficient de distribution (c'est-à-dire la concentration de l'antioxydant dans la phase huile et à l'interface, divisée par sa concentration dans la phase aqueuse) en fonction de la concentration molaire de Brij® 35 (Figure 57).

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

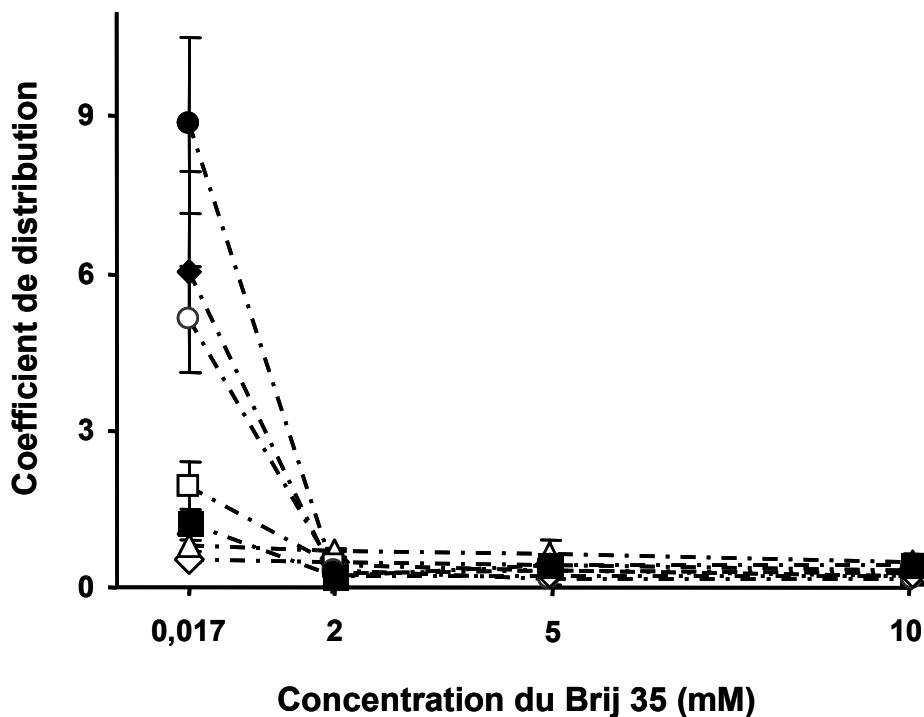


Figure 57. Coefficient de distribution exprimé comme le ratio entre la concentration de l'antioxydant dans la phase huile et à l'interface divisée par celle dans la phase aqueuse, en fonction de la concentration molaire en Brij® 35. Acide chlorogénique (◊), chlorogénate de méthyle (Δ), chlorogénate de butyle(□), chlorogénate d'octyle (○), chlorogénate de dodécyle (●), chlorogénate d'hexadécyle (◆), chlorogénate d'octadécyle (■) et chlorogénate d'éicosyle (▲).

A partir de ces figures il est clair que le coefficient de distribution calculé pour tous les antioxydants diminue considérablement quand la concentration de Brij® 35 passe de 0,017 mM à 2 mM, concentration au delà de laquelle une augmentation de la concentration en émulsifiant ne conduit pas à un changement significatif du comportement de distribution des antioxydants. Ceci est cohérent avec notre hypothèse selon laquelle la saturation de l'interface se produit entre 0,017 et 2 mM. De plus, ces résultats nous permettent de lier le processus de formation de micelles à l'accumulation de l'acide chlorogénique et de ses esters dans la phase aqueuse de l'émulsion (quelle que soit la longueur de la chaîne aliphatique greffée). En d'autres termes, il est probable que les micelles de Brij® 35 agissent comme des véhicules transportant l'acide chlorogénique et ses esters vers la phase aqueuse. En effet, comme le montrent la Figure 57, il n'y a pas de différence significative du coefficient

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

de distribution des antioxydants testés, ce qui suggère que les micelles de Brij® 35 solubilisent de façon similaire tous les composés indépendamment du nombre de carbones de la chaîne aliphatique greffée. En outre, cette hypothèse est d'autant plus plausible que le Brij® 35 est en très large excès par rapport à l'antioxydant. Ainsi, l'augmentation de la concentration en émulsifiant au-dessus de sa CMC affecte considérablement la distribution des antioxydants en milieu émulsionné au point de conduire à la disparition de l'effet « cut-off » et de n'observer que le « Paradoxe Polaire » décrit par Porter *et al.* (1989).

III.2. Évaluation de la capacité antioxydante des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique par la méthode de triènes conjugués autoxydables (CAT)

A l'instar de l'acide chlorogénique et de ses esters, le comportement antioxydant de l'acide rosmarinique et de ses esters lipophilisés a été étudié par la méthode CAT et une analyse critique des principaux résultats de cette évaluation est donnée dans les paragraphes suivants.

III.2.1 Evaluation quantitative de la capacité antioxydante des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique.

L'évaluation de la capacité antioxydante, exprimée en valeur CAT, de l'acide rosmarinique et de ses esters a été réalisée dans les mêmes conditions que celles employées pour l'acide chlorogénique et l'ordre d'efficacité s'est révélé être le suivant : rosmarinate d'octyle ($15,31 \pm 1,33$) > rosmarinate de butyle ($10,33 \pm 1,39$) > rosmarinate de méthyle ($8,37 \pm 0,60$) > rosmarinate de dodécyle ($7,67 \pm 0,76$) > acide rosmarinique ($5,21 \pm 0,25$) > rosmarinate d'hexadécyle ($1,53 \pm 0,26$) > rosmarinate d'octadécyle ($0,65 \pm 0,11$) > rosmarinate d'eicosyle ($0,54 \pm 0,13$).

Cependant, comme dans le cas de l'acide chlorogénique, cet ordre d'efficacité est peu informatif de l'influence de la chaîne aliphatique greffée sur le comportement de l'antioxydant. En revanche, la courbe représentant l'évolution de la capacité antioxydante en fonction de la longueur de la chaîne alkyle greffée (Figure 58) est beaucoup plus instructive. En effet, cette courbe qui passe par un maximum, peut être divisée en deux régions distinctes :

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

- (i) Une première région, correspondant à l'acide rosmarinique et à ses esters de longueur de chaîne inférieure ou égale à 8 carbones, pour laquelle une croissance quasi linéaire de la capacité antioxydante est observée. Notons que dans cette région, les résultats obtenus sont en accord avec le « Paradoxe Polaire » précédemment décrit en section 1.1.2.
- (ii) Une deuxième région, correspondant aux esters à chaîne alkyle supérieure à 8 carbones, où la capacité antioxydante chute de façon spectaculaire jusqu'à des valeurs quasi nulles pour une longueur de chaîne supérieure à 16 carbones.

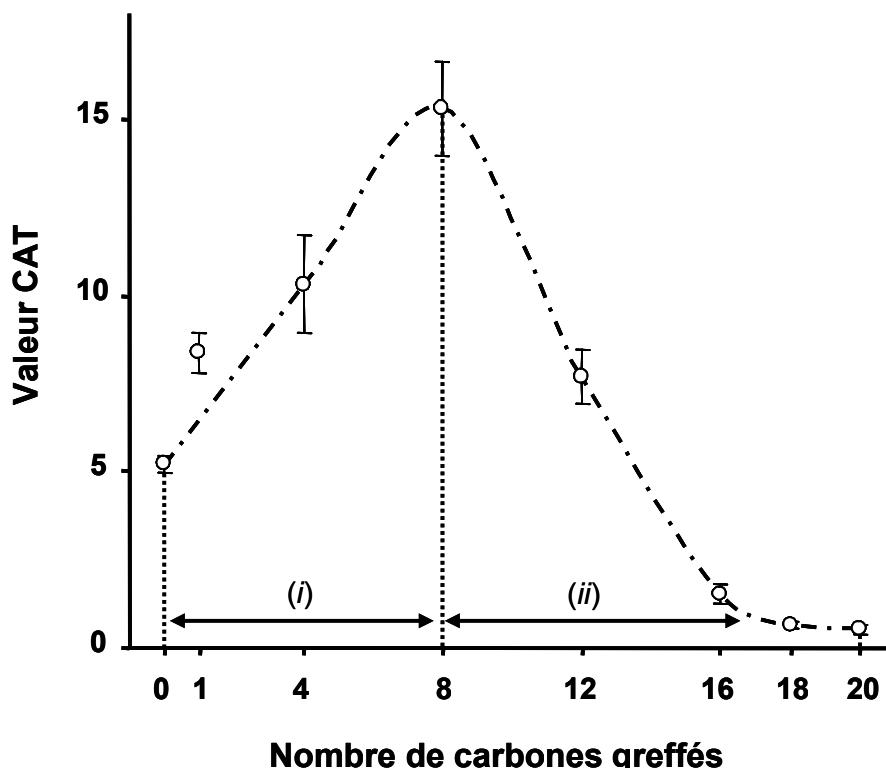


Figure 58. Capacité antioxydante de l'acide rosmarinique et de ses esters exprimée en valeur CAT. Le test est réalisé en système émulsionné contenant 0,2-0,8 µM d'antioxydant, 115 µM d'huile de tung, 17 µM de Brij® 35 et 1 mM d'AAPH.

Comme dans le cas de l'acide chlorogénique et de ses esters il est vraisemblable que la raison de ce comportement singulier est à chercher au niveau de la distribution des composés entre les différentes phases du milieu réactionnel. En effet, il peut être postulé qu'avec l'allongement progressif de la chaîne alkyle, les antioxydants au caractère hydrophobe de plus en plus marqué vont se rapprocher de l'interface huile – eau et retarder d'autant mieux l'oxydation de l'huile. Concernant la

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

chute de la capacité antioxydante au-delà de 8 atomes de carbone, il est possible que le phénomène de micellisation de l'antioxydant en soit à l'origine avec, comme conséquence pour ce dernier, une faible mobilité et une mauvaise localisation à l'interface.

De même que pour l'acide chlorogénique et ses esters, l'infirmation ou la confirmation de ces hypothèses a été faite en employant comme descripteur le pourcentage d'antioxydant présent dans la phase continue d'une émulsion (eau) en utilisant la même concentration d'émulsifiant ($17 \mu\text{M}$) mise en œuvre dans le test CAT (Figure 59).

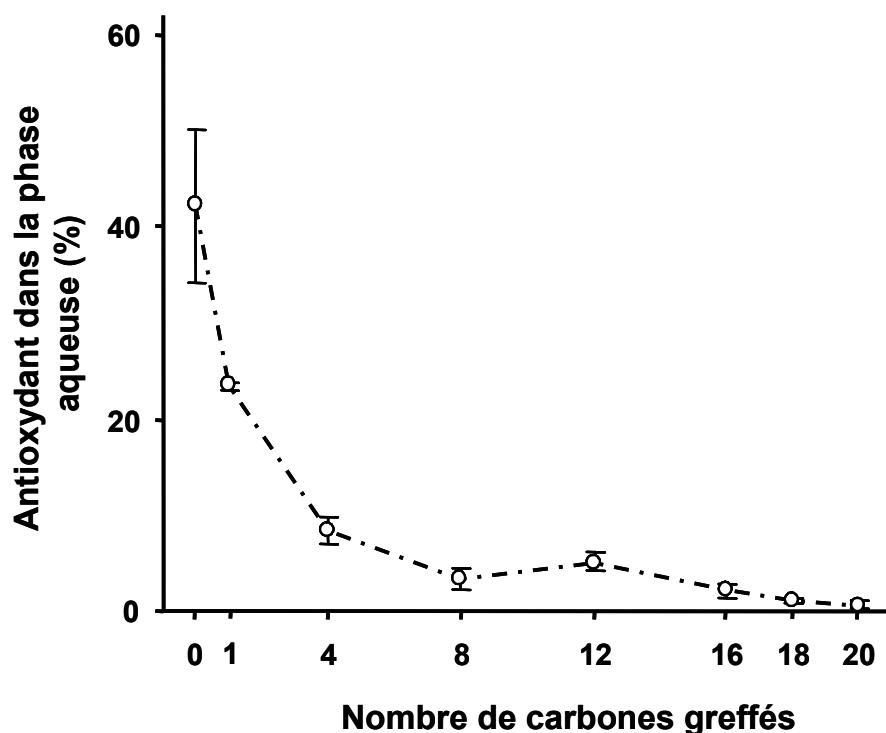


Figure 59. Pourcentage d'acide rosmarinique et de ses esters présents dans la phase continue d'une émulsion huile de tournesol – eau stabilisée avec $17 \mu\text{M}$ de Brij® 35.

Comme le montre la Figure 59, à mesure que la longueur de chaîne augmente, le pourcentage de chaque antioxydant dans la phase aqueuse diminue sans qu'un effet de « cut-off » soit observé. Cette absence de « cut-off » est très surprenante car nous nous attendions à un phénomène de formation de micelles, notamment pour

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

les dérivés les plus hydrophobes, avec comme conséquence l'augmentation du pourcentage d'antioxydant dans la phase aqueuse.

Ces résultats montrent bien que le pourcentage d'antioxydant présent dans la phase aqueuse de l'émulsion n'est pas suffisant pour expliquer le comportement antioxydant inattendu de l'acide rosmarinique et de ses esters. En effet, d'après la Figure 59, on pourrait s'attendre à ce que la capacité antioxydante augmente de façon progressive avec l'allongement de la chaîne, jusqu'à devenir maximale à partir de 8 atomes de carbone.

Il faut cependant avoir à l'esprit que la méthode employée pour déterminer la distribution des antioxydants dans les différentes phases du système émulsionné ne donne pas accès aux informations concernant :

- les quantités d'antioxydant à proximité et/ou associé à la membrane tensioactive,
- les quantités d'antioxydant ayant éventuellement traversé la membrane tensioactive.

Ainsi, il est possible qu'un certain pourcentage d'antioxydant puisse traverser la membrane tensioactive pour se distribuer préférentiellement dans l'huile et se situer très loin de l'interface où les réactions d'oxydation ont lieu. Cela pourrait être le cas des esters ayant les chaînes alkyle les plus longues (> 16 atomes de carbone) et pour lesquels l'affinité pour la phase huileuse serait la plus forte. Ainsi, cette hypothèse pourrait expliquer à la fois la forte décroissance de l'activité antioxydante pour les esters de l'acide rosmarinique au delà de 16 atomes de carbone, mais également l'absence de phénomène de micellisation. En complément, il peut être également envisagé que pour les chaînes alkyle à plus de 16 atomes de carbone, les esters correspondant sont proches de l'interface mais sous forme de cluster ce qui limiterait leur capacité antioxydante. Par ailleurs, cette aptitude à traverser la membrane ou à former des clusters a été la principale explication donnée par Kagan *et al.* (1990) concernant l'inhibition de la peroxydation lipidique par une série d'homologues de l' α -tocophérol en systèmes microsomal et mitochondrial de foie de rat.

En conséquence il apparaît que la compréhension du déterminisme de la capacité antioxydante en milieu hétérogène implique la connaissance exhaustive de

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables

la répartition de d'antioxydant dans chacune des phases du système (phase huile, interface et phase aqueuse)

III.3. Conclusion

Les résultats de l'évaluation de la capacité antioxydante en milieu hétérogène pour une série d'homologues lipophiles des acides chlorogénique et rosmarinique ont montré que l'augmentation de la longueur de chaîne ne conduit pas forcement à une augmentation de la capacité antioxydante comme le prédit le « Paradoxe Polaire ». En effet, un phénomène de rupture (« cut-off ») de la capacité antioxydante pour des longueurs de chaîne de 12 et de 8 atomes de carbone a été observé pour les dérivés lipophiles des acides chlorogénique et rosmarinique respectivement.

Afin de comprendre la raison de ce comportement, nous nous sommes intéressés à la répartition de l'antioxydant dans le système réactionnel et plus particulièrement dans la phase continue (aqueuse) de l'émulsion. Dans cette phase, la teneur relative (en %) de l'antioxydant a pu être déterminée et a servi de descripteur. Concernant les esters de l'acide chlorogénique, l'évolution de ce descripteur en fonction du nombre de carbones de la chaîne alkyle a été également caractérisée par un phénomène de « cut-off », centré sur 12 carbones, ce qui pourrait expliquer la meilleure performance antioxydante du chlorogénate de dodécyle. Cependant la faible différence de distribution entre les chlorogenates d'octyle et dodécyle ne concorde pas avec la forte différence d'activité antioxydante de ces dernières. En conséquence, nous avons postulé que la localisation des premiers produits d'oxydation pouvait être un facteur déterminant sur la valeur finale de la capacité antioxydante bien que les données en notre possession ne soient pas en mesure de confirmer cette hypothèse.

Concernant les esters de l'acide rosmarinique, il est apparu que le descripteur employé (pourcentage d'antioxydant dans la phase aqueuse) n'était pas suffisant pour expliquer le comportement antioxydant observé. Ce descripteur, en effet, ne renseigne pas sur les quantités et l'organisation des molécules d'antioxydant présentes à l'interface et/ou dans la phase huileuse ce qui, dans le cas de l'acide

III. Détermination des propriétés antioxydantes en milieu hétérogène par le test des triènes conjugués autoxydables
rosmarinique et ses esters, semble être la raison essentielle de l'effet de « cut-off » observé.

Finalement, l'ensemble de ces résultats montre qu'en milieu hétérogène, la connaissance de la répartition de l'antioxydant et/ou de ses formes oxydées dans les différentes phases du système, est d'une importance capitale quant à la compréhension de sa performance et de ces modes d'action.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusions et Perspectives

La biomasse végétale, et plus particulièrement celle issue des pays du Sud, suscite un intérêt grandissant en raison de la très large gamme de molécules bioactives qu'elle renferme. Parmi ces molécules, les composés phénoliques semblent particulièrement prometteurs, de par leur ubiquisme dans le règne végétal, mais également pour les fortes propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antivirales et anticancérigènes qu'ils présentent. Ces composés s'avèrent, par conséquent, de très bons candidats en tant qu'agents de conservation dans les industries agro-alimentaires et cosmétiques, mais également en tant qu'agents thérapeutiques. Parmi les composés phénoliques présents dans le règne végétal nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux acides chlorogénique et rosmarinique, présents en grandes quantités dans les extraits de café vert et de romarin. Cependant, malgré leurs potentialités, la mise en œuvre et l'efficacité de ces molécules dans les matrices lipidiques, et plus particulièrement dans les émulsions, se trouvent limitées en raison de leur forte polarité. Pour pallier ces limitations, l'une des stratégies consiste à diminuer leur polarité par le greffage d'une chaîne aliphatique de longueur variable (*via* une réaction de transfert d'acyles). Ces réactions d'hydrophobation, également appelées réaction de lipophilisation, peuvent être réalisées par catalyse chimique (acide ou basique) ou enzymatique (lipase). Bien que ces deux types de réaction présentent des avantages et des inconvénients, l'intérêt supérieur des lipases est de pouvoir mettre en œuvre des réactions d'estérification sélectives et dans des conditions douces de température qui préserve les composés phénoliques de toute dégradation thermique. De plus, dans un contexte réglementaire favorable au développement de procédés plus respectueux de l'environnement, la catalyse enzymatique apparaît comme une alternative intéressante.

Ainsi, dans la première partie de ce manuscrit nous nous sommes particulièrement intéressés à l'optimisation des paramètres de synthèse impliqués dans les réactions de lipophilisation enzymatique d'esters alkyliques d'acides chlorogénique et rosmarinique. À ce sujet, les résultats obtenus ont montré que l'estérification enzymatique directe de l'acide chlorogénique par des alcools gras était beaucoup moins efficace que le transfert d'acyle entre l'alcool et l'ester méthylique de l'acide

chlorogénique (ce dernier étant synthétisé par catalyse chimique en présence d'une résine sulfonique). Ainsi ce procédé mixte, dit chimio-enzymatique, de synthèse d'esters lipophilisés d'acide chlorogénique, passant par un intermédiaire de type ester méthylique s'est avéré être la meilleure stratégie. En effet, la lipophilisation par transestérification de cet intermédiaire alkyle présente, contrairement à l'estérification directe de l'acide libre, l'avantage de générer un co-produit (méthanol) pouvant être facilement éliminé en continu. De ce fait, l'équilibre chimique est déplacé en faveur de la synthèse à un point tel qu'il avoisine les conditions d'irréversibilité (disparition d'un co-produit de la réaction). De plus, la valeur d' a_w optimale (0,05) déterminée pour l'enzyme, permet de conclure qu'en milieu organique, une faible hydratation de la lipase de *Candida antarctica* B est absolument nécessaire pour une synthèse performante. Concernant la lipophilisation enzymatique de l'acide rosmarinique ou de son ester méthylique, nous avons constaté que l'utilisation des paramètres précédemment optimisés pour l'acide chlorogénique, conduisaient, dans le meilleur des cas (transestérification), à des rendements avoisinant seulement 8 % après 11 jours de réaction. Une explication à ce comportement inattendu pourrait être l'inhibition de la lipase lors de l'état de transition 1 et nous avons alors postulé que l'encombrement stérique de l'acide rosmarinique en était vraisemblablement la cause. À l'avenir, il serait donc intéressant de valider cette hypothèse en utilisant des conditions réactionnelles spécifiquement optimisées pour la synthèse de dérivés lipophiles d'acide rosmarinique. D'autre part, si la modification des paramètres réactionnels ne conduisait pas à une amélioration significative du rendement, l'emploi d'autres lipases pourrait être également envisagé pour la production de dérivés lipophiles d'acide rosmarinique.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les propriétés antiradicalaires des esters ainsi formés. L'influence de la longueur de la chaîne alkyle greffée (1 à 20 atomes de carbone) sur ce type d'activité a plus spécifiquement été examinée. Pour cela, l'emploi du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) absorbant dans le spectre visible semble particulièrement bien adapté. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des capacités anti-radicalaires, des points de vues cinétique et stationnaire. Concernant l'acide chlorogénique et ses esters, l'étude cinétique a montré que le mécanisme de transfert d'électron (TE) était la voie réactionnelle la plus probable pour expliquer la stabilisation des radicaux DPPH[•]. De

plus, les ordres partiels de réaction obtenus pendant les premières minutes de réaction suggèrent que les voies mécanistiques impliquées sont différentes pour l'acide chlorogénique et ses esters. En effet, pendant les premières minutes de la réaction l'acide chlorogénique peut stabiliser deux molécules de DPPH[•] contre une seulement pour ses esters. Ces résultats ont été confirmés par CLHP-SM en montrant que, suite à la cession successive de deux atomes d'hydrogène, l'acide chlorogénique se stabilise sous sa forme o-quinone, tandis qu'après la cession d'un atome d'hydrogène ses esters suivent une réaction de dimérisation entre deux radicaux semi-quinones. Concernant les valeurs n^{es} (nombre de molécules de DPPH[•] réduites par mole d'antioxydant) obtenues à l'état stationnaire, les acides chlorogénique et rosmarinique, mais également leurs esters respectifs, montrent une capacité réductrice supérieure à la capacité théorique imputable à leur seule structure (nombre d'hydroxyles phénoliques). Ces résultats peuvent être rationalisés si, outre la structure moléculaire des antioxydants, des réactions entre les produits d'oxydation et le milieu sont considérées. Ainsi, nous avons proposé que les hautes valeurs de n^{es} obtenues pouvaient être expliquées en considérant l'existence de réactions de régénération et/ou de dimérisation. Cependant, bien que ces voies soient en mesure d'expliquer les valeurs de n^{es} , un long travail d'approfondissement reste néanmoins nécessaire pour élucider le chemin réactionnel emprunté par chaque molécule. À ce titre, la résonance magnétique nucléaire associée à la modélisation moléculaire pourrait constituer des outils d'investigation particulièrement pertinents pour caractériser les formes oxydées des acides et des esters.

Bien que la méthode DPPH[•] fournisse de précieuses informations quant à la réactivité intrinsèque de composés phénoliques vis-à-vis du radical DPPH, elle présente néanmoins l'inconvénient de ne pas mettre en compétition l'antioxydant avec un substrat oxydable. Cet aspect est en effet discutable, tant il est vrai que la seule réduction d'espèces oxydantes n'est pas suffisante pour contrer l'oxydation. À cet égard, seul un piégeage rapide des radicaux libres à proximité des substrats cibles de l'oxydation permettrait de protéger ces derniers. Pour prendre en compte un tel phénomène, une approche compétitive impliquant l'utilisation d'un substrat est par conséquent nécessaire. Par ailleurs, en parallèle de ces mécanismes de compétition, le type de système employé selon qu'il soit homogène ou hétérogène peut moduler la capacité antioxydante d'un composé donné. Dans ce contexte,

l'étude en milieu hétérogène des propriétés antioxydantes d'acides phénoliques libres ou estérifiés nous a semblé particulièrement pertinente. Aussi avons-nous employé la méthodologie CAT (conjugated autoxidable trienes) mise en œuvre en milieu émulsifié pour étudier l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur le comportement antioxydatif de composés phénoliques. Les résultats obtenus pour une série d'homologues lipophiles d'acides chlorogénique et rosmarinique ont montré que l'augmentation de la longueur de chaîne aliphatique ne conduisait pas forcément à une amélioration de la capacité antioxydante comme le prédit le « Paradoxe Polaire ». En effet, un phénomène de rupture (« cut-off ») de la capacité antioxydante pour des longueurs de chaîne de 12 et 8 atomes de carbone a été observé pour les dérivés lipophiles des acides chlorogénique et rosmarinique respectivement.

En faisant l'hypothèse que la localisation de l'antioxydant est de prime importance quant à l'expression de son activité antioxydante, nous nous sommes intéressés en second lieu à la répartition de l'antioxydant dans le système réactionnel et plus particulièrement dans la phase continue (aqueuse) de l'émulsion. Dans cette phase, la teneur relative (en %) de l'antioxydant a pu être déterminée et a servi de descripteur.

Concernant les esters d'acide chlorogénique, l'évolution de ce descripteur en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaîne alkyle a également été caractérisée par un phénomène de « cut-off », centré sur 12 atomes de carbone. Ce résultat pourrait expliquer la meilleure efficacité antioxydante du chlorogénate de dodécyle. Cependant la faible différence de distribution entre les chlorogenates d'octyle et dodécyle ne concorde pas avec la forte différence d'activité antioxydante entre ces dernières. Ainsi, puisque l'allure cinétique des courbes d'antioxydation suggèrent fortement que le phénomène de cut-off provient des produits d'oxydation et non des molécules telles qu'introduites initialement dans le test, nous avons postulé que la localisation des produits d'oxydation pouvait être un facteur déterminant sur la valeur finale de la capacité antioxydante. La mise en évidence de ce type de contribution pourrait constituer une perspective de travail intéressante.

Concernant les esters d'acide rosmarinique, il est apparu que le descripteur employé (pourcentage d'antioxydant dans la phase aqueuse) n'était pas suffisant pour expliquer le comportement antioxydant observé. Ce descripteur, en effet, ne

renseigne pas sur les quantités et l'organisation des molécules d'antioxydant présentes à l'interface et/ou dans la phase huileuse ce qui, dans le cas de l'acide rosmarinique et ses esters, semble être la principale cause de l'effet « cut-off » observé. L'ensemble de ces résultats montre qu'en milieu hétérogène, la connaissance de la répartition de l'antioxydant et/ou de ses formes oxydées dans les différentes phases du système, est de prime importance quant à la compréhension de son activité et de ces modes d'action. À l'avenir, l'isolement et la caractérisation des différents produits d'oxydation, en relation avec des études de distribution, pourrait permettre de rationaliser les phénomènes oxydatif et antioxydatif à l'œuvre dans les systèmes hétérogènes.

Finalement, les résultats obtenus et les interprétations qui en découlent, pourraient constituer le point de départ d'une étude de la lipophilisation d'extraits végétaux riches en acides chlorogénique et rosmarinique ainsi que l'évaluation du pouvoir antioxydant des molécules formées après réaction. En outre, l'amélioration des connaissances apportée par ce travail et les études à venir, ainsi que la demande croissante de molécules actives amphiphiles dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques, devrait à terme, contribuer à une valorisation plus importante des ces composés et de leurs sources végétales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adachi S, Kobayashi T. Synthesis of esters by immobilized-lipase catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. J. Biosci. Bioeng., 99 : 87-94, 2005.

Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W. Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antarctica* lipases. Process Biochem., 40 : 3177-3180, 2005.

Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. Free Radic. Biol. Med., 31 : 1043-1050, 2001.

al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Ind. Exper. Biol., 37 : 124–130, 1999.

Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, Hansen S, Meyer AS. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. J. Agric. Food Chem., 49 : 4090-4096, 2001.

Anselmi C, Centini M, Granata P, Sega A, Buonocore A, Bernini A, Facino RM. Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight. J. Agric. Food. Chem., 52 : 6425-6432, 2004.

Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slate TF. Free radicals in molecular Biology, aging and disease. Raven Press, New York, p 432, 1984.

Athawale V, Manjrekar N, Athawale M. Enzymatic synthesis of chiral methyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of (\pm)-menthol. J. Mol. Catal. B Enzym., 16 : 169-173, 2001.

Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. J. Agric. Food Chem., 48 : 5496-5500, 2000.

Bagalvy P, Devínsky F. Cut-off effects in biological activities of surfactants. *Adv. Coll. Interface Sci.*, 66 : 23-63, 1996.

Bagi S, Simon LM. Comparison of esterification and transesterification of fructose by porcine pancreatic lipase immobilized on different supports. *Biotech. Tech.*, 13 : 309-312, 1999.

Baláž S, Šturdík E, Rosenberg M, Augustín J, Škára B. Kinetics of drug activities as influenced by their physico-chemical properties: antimicrobial effects of alkylating 2-furyethylenes. *J. Theor. Biol.*, 131 : 115-134, 1988.

Balcao VM, Paiva AL, Malcata FX. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enz. Microb. Technol.*, 18 : 392-416, 1996. ojo con el primer nombre.

Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.*, 68 : 457-462, 2000.

Berardini N, Knödler M, Schieber A, Carle R. Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Inov. Sci. Techn. Emerg.*, 6 : 442-452, 2005.

Bernheim F, Bernheim MLC, Wilbur KM. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *J. Biol. Chem.*, 174 : 257-264, 1947.

Bernini R, Mincione E, Barontini M, Crisante F. Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.*, 56 : 8897-8904, 2008.

Birnie CR, Malamud D, Schnaare RL. Antimicrobial evaluation of n-alkyl betaines and N-alkyl-N,N-dimethylamine oxides with variation in chain length. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 : 2514-2517, 2000.

Bisht KS, Gross RA, Kaplan DL. Enzyme mediated regioselective acylations of sophorolipids. *J. Org. Chem.*, 64 : 780-789, 1999.

Björkling F, Godtfredsen SE, Kirk O. A highly selective enzyme-catalyzed esterification of simple glucosides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1989 : 934-935, 1989.

Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature*, 181 : 1199-2000, 1958.

Bordwell FG, Cheng JP. Substituent effects on the stabilities of phenoxy radicals and the acidities of phenyl radical cations. *J. Am. Chem. Soc.*, 113 : 1736-1743, 1991.

Bornscheuer UT. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols. *Enz. Microb. Technol.*, 17 : 578-586, 1995.

Bors W, Michel C, Saran M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 796 : 312-319, 1984.

Bousquet MP, Willemot RM, Monsan P, Boures E. Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications. *Biotech. Bioeng.*, 63 : 730-736, 1999.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28 : 25-30, 1995.

Buisman GJH, Van Helteren CTW, Kramer GFH, Veldsink JW, Derksen JTP, Cuperus, FP. Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol. Lett.*, 20 : 131-136, 1998.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 14 : 303–311, 1993.

- Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis L. subsp. officinalis*) tea. *Pharm. Acta Helv.*, 72 : 301-305, 1998.
- Caro Y, Pina M, Turon F, Guilbert S, Mugeot E, Fetsch DV, Attwool P, Graille J. Plant lipases: Biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions. *Biotechnol. Bioeng.*, 77: 693-703, 2002.
- Chalas J, Claise C, Edeas M, Messaoudi C, Vergnes L, Abella A. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother.*, 55 : 54-60, 2001.
- Chebil L, Anthoni J, Humeau C, Gerardin C, Engasser JM, Ghoul M. Enzymatic acylation of flavonoids : effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *J. Agric. Food Chem.*, 55 : 9496-9502, 2007.
- Chigorimbo-Murefu NTL, Riva S, Burton SG. Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties. *J. Mol. Cat. B : Enzym.*, doi : 10.1016/j.molcatb.2008.05017, 2008.
- Chopineau J, Mc Caffery FD, Therisod M, Klibanov AM. Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a non aqueous medium. *Biotechnol. Bioeng.*, 31 : 208-214, 1998.
- Chun SS, Vattem DA, Lin YT, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.*, 40 : 809-816, 2005.
- Chung HS, Chang LC, Lee SK, Shamon LA, van Breemen RB, Mehta RG, Farnsworth NR, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Flavonoids constituents of *Chorizante diffusa* with potential cancer chemopreventive activity. *J. Agric. Food Chem.*, 47 : 36-41, 1999.

Clifford MN. Chlorogenic Acids. In: RJ Clark, R Macrae ed. Coffe Vol1 Chemistry: Elsevier Applied Science, London, 153-202, 1985.

Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden, adsorption and metabolism. J. Sci. Food Agric., 79 : 362-372, 1999.

Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical sheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. J. Agric. Food Chem., 51 : 2900-2911, 2003.

Compton DL, Laszlo JA, Berhow MA. Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters. J. Am. Oil Chem. Soc., 77 : 513-519, 2000.

Coulon D, Girardin M, Ghoul M. Enzymatic synthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors. Process. Biochem., 34 : 913-918, 1999.

Cuvelier ME. Mesure de l'efficacité des antioxygènes d'origine végétale. Recherche des composés actifs de la sauge. Thèse de sciences alimentaires, ENSIA de Massy. 1992.

Cuvelier ME, Bondet V, Berset C. Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium : structure-activity relationship. J. Am. Oil Chem. Soc., 77 : 819-824, 2000.

De Diego T, Lozano P, Gmouh S, Vaultier M, Iborra JL. Understanding structure-ability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. Biomacromolecules, 6 : 1457-1464, 2005.

Degn P, Pedersen LH, Duus JØ, Zimmermann W. Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol. Biotech. Lett., 21 : 275-280, 1999.

Rodriguez de Sotillo DV, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucher rats. J. Nutr. Biochem., 13 : 717-726, 2002.

- Devínsky F, Lacko I, Nagy A, Krasnec L. Amine oxides. I. Synthesis, $^1\text{H-NMR}$, and infrared spectra of 4-alkylmorpholine-N-oxides. *Chem. Zvesti.*, 32 : 106-115, 1978.
- Devínsky F, Kopecka-Leitmonova A, Sersen F, Balgavy P. Cut-off effect in antimicrobial activity and in membrane perturbation efficiency of the homologous series of N,N-dialkylmethylamine oxides. *J. Pharm. Pharmacol.*, 42 : 790-794, 1990.
- Dudal Y, Lortie R. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, 45 : 129-134, 1995.
- Edreva A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivates in photoprotection. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 106 : 135-146, 2005.
- Enaud E, Humeau C, Piffaut B, Girardin M. Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *J. Mol. Cat. B Enzym.* 27 : 1-6, 2004.
- Fecka I, Turek S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from *Lamiaceae* : peppermint, melissa, and sage. *J. Agric. Food Chem.*, 55 : 10908-10917, 2007.
- Figueroa-Espinoza M-C and Villeneuve P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. *J. Agric. Food Chem.*, 53 : 2779-2787, 2005.
- Foglia TA, Villeneuve P. *Carica papaya* latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 74 : 1447-1450, 1997.
- Foti MC, Daquino C, Corrada G. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH $^\bullet$ radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.*, 69 : 2309-2314, 2004.
- Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants : bulk oil vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 42 : 1054-1059, 1994.

Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 44 : 131-135, 1996.

Frankel EN, Finley JW. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 56 : 4901-4908, 2008.

Franks NP, Lieb WR. Partitioning of long-chain alcohols into lipid bilayers: implications for mechanism of general anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83 : 5116-5120, 1986.

Gandhi NN. Applications of Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74 : 621-634, 1997.

Ganske F, Bornscheuer UT. Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and *t*-BuOH. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 36 : 40-42, 2005.

Gao C, Whitcombe MJ, Vulfson EN. Enzymatic synthesis of dimeric and trimeric sugar fatty acid esters. *Enzyme Microb. Tech.*, 25 : 264-270, 1999.

Gayot S, Santarelli X, Coulon D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *J. Biotech.*, 101 : 29-36, 2003.

Oguntiemein GB, Erdmann H, Schmid RD. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotech. Lett.*, 15 : 175-180, 1993.

Ghanem A. The utility of cyclodextrins in lipase-catalyzed transesterification in organic solvents : enhanced reaction rate and enantioselectivity. *Org. Biomol. Chem.*, 1 : 1282-1291, 2003.

Gillam AE, Heilbron IM, Hilditch TP, Morton RA. Spectrographic data of natural fats and their fatty acids in relation to vitamin A. *Biochem. J.*, 25 : 30-38 1931.

- Giuliani S, Piana C, Setti L, Hochkoeppler A, Pifferi PG, Williamson G, Faulds CB. Synthesis of pentylfenolate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnol. Lett.*, 23 : 325-330, 2001.
- Glazer AN. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species : a protective role for creatinine. *FASEB J.*, 2 : 2487-2491, 1988.
- Glazer AN. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods. Enzymol.*, 186 : 161-168, 1990.
- Gordon MH. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In : Hudson BJF. *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, Londres, 1-18, 1990.
- Goto M, Kamiya N, Miyata M, Nakashio F. Enzymatic esterification by surfactant-coated lipase in organic media. *Biotechnol. Prog.*, 10 : 263-268, 1994.
- Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles, O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to DPPH radical. *J. Agric. Food Chem.*, 51 : 615-622, 2003.
- Grasso S, Siracusa L, Spatafora C, Renis M, Tringali C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues : enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg. Chem.*, 35 : 137-152, 2007.
- Gridley JJ, Hacking AJ, Osborn HMI, Spackman DG. Regioselective lipase-catalyzed acylation of 4,6-O benzylidene- alpha and beta -D- pyranoside derivatives displaying a range of anomeric substituents. *Tetrahedron*, 54: 14925-14946, 1998.
- Gross RA, Kalra B, Kumar A. Polyester and polycarbonate synthesis by *in vitro* enzyme catalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55 : 655-660, 2001.
- Guyot B, Bosquette B, Pina M, Graille J. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnol. Lett.*, 19 : 529-532, 1997.

Guyot B, Gueule D, Pina M, Graille J, Farines V, Farines M. Enzymatic synthesis of fatty esters in 5-caffeooyl quinic acid. Eur. J. Sci. Technol., 102 : 93-95, 2000.

Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Free Radic. Biol. Med., 18 : 125-126, 1995.

Hansch C, Fujita T. ρ - σ - π Analysis; method for the correlation of biological activity and chemical structure. J. Am. Chem. Soc., 86 : 1616-1626, 1964.

Harman D. Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol., 11 : 298-300, 1956.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. J. Agric. Food Chem., 50 : 1815-1821, 2002.

Huang LJ, Yu DQ. Total synthesis of (\pm)-butyl ester of rosmarinic acid. Chin. Chem. Lett., 16 : 763-766, 2005.

Huang SW, Frankel EN, Schwarz K, Aeschbach R, German JB. Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. J. Agric. Food Chem., 44 : 2951-2956, 1996 a.

Huang SW, Hopia A, Schwarz K, Frankel EN, German JB. Antioxidant activity of α -tocopherol and Trolox in different lipid substrates: bulk oils vs. oil-in-water emulsions. J. Agric. Food Chem., 44 : 444-452, 1996 b.

Huang SW, Frankel EN, Aeschbach R, German BJ. Partition of selected antioxidants in corn oil-water model. J. Agric. Food Chem., 45 : 1991-1994, 1997.

Huang H, Chao QR, Tan RX, Sun HD, Wang DC, Ma J, Zhao SX. A New rosmarinic acid derivative from *isodon oresbius*. Planta Med., 65 : 92-93, 1999.

Humeau C, Girardin M, Rovel B, Miclo A. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *J. Biotechnol.*, 63 : 1–8, 1998.

Ikken Y, Morales P, Martínez A, Marín ML, Haza AI, Cambero MI. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *J. Agric. Food Chem.*, 47 : 3257-3264, 1999.

Itoh T, Mitsukura K, Kanphai W, Tagaki Y, Kihara H, Tsukube H. Thiacrown ether technology in lipase catalyzed reaction : scope and limitation for preparing optically active 3-hydroxyalkanenitriles and application to insect pheromone synthesis. *J. Org. Chem.*, 62 : 9165-9172, 1997.

Janoff AS, Pringle MJ, Miller KW. Correlation of general anesthetic potency with solubility in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 649 : 125-128, 1981.

Jarstoff B, Störmann R, Ranke J, Möller K, Stock F, Oberheitmann B, Hoffmann W, Hoffmann J, Nüchter M, Ondruschka B, Filser J. How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chem.*, 5 : 136–142, 2003.

Jiménez-Ecrig A, Rincón M, Pulido R, Saura-Calixto F. Guava fruit (*Psidium guajava L*) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.*, 49 : 5489-5493, 2001.

Kaar JL, Jesionowski AM, Berberich JA, Moulton R, Russell AJ. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 : 4125-4131, 2003.

Kagan VE. Lipid peroxidation in biomembranes. CRC Press, Boca Raton, Florida, p 187, 1988.

Kagan VE, Serbinova EA, Bakalova RA, Stoytchev Ts, Erin AN, Prilipko LL, Evstigneeva RP. Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol. Biochem. Pharm., 40 : 2403-2413, 1990.

Kanazawa K, Sakakibara H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish Banana. J. Agric. Food Chem., 48 : 844-848, 2000.

Kandaswami C, Middleton JRE. Flavonoids as antioxidants In: F Shahidi ed. Natural antioxidants: Chemistry, Health effects and applications : AOCS press, Campaign, Illinois, USA, 174-203, 1997.

Kaslauskas AL, Bornscheuer UT. Biotransformations with lipases. In: HJ Rehm, G Reed, ed. Biotechnology. Second edition vol 8A. Weinheim: Wiley-VCH, 37-191, 1998.

Kato K, Ono M, Akita H. New total synthesis of (\pm),(-) and (+) chuangxinmycin. Tetrahedron, 57 : 10055-10062, 2001

Katsoura MH, Polydera AC, Tsironis L, Tselepis AD, Stamatis H. Use of ionic liquids as a media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. J. Biotechnol., 123 : 491-503, 2006.

Kaur J, Wehtje E, Adlercreutz P, Chand S, Mattiasson B. Water transfer kinetics in a water activity control system designed for biocatalysis in organic media. Enzym. Microb. Technol., 21 : 496-501, 1997.

Khaled N, Montet D, Pina M, Graille J. Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. Biotechnol. Lett., 13 : 167-172, 1991.

Khmelniski YL, Welch SH, Clark DS, Dordick JS. Salts dramatically enhance activity of enzymes in organic solvents. J. Am. Oil Chem. Soc., 116 : 2647-2648, 1994.

Kim DY, Dordick JS. Combinatorial array-based enzymatic polyester synthesis. Biotechnol. Bioeng., 76 : 200-206, 2001.

Kim MJ, Choi MY, Lee JK, Ahn Y. Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids : significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 26 : 115-118, 2003.

Kimura Y, Kanatani H, Shima M, Shuji A, Matsuno R. Anti-oxidant activity of acyl ascorbates in intestinal epithelial cells. *Biotechn Lett.*, 25 : 1723-1727, 2003.

Kiyota H, Higashi E, Koike T, Oritani T. Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron Asymm.*, 12 : 1035-1038, 2001.

Kleszczynska H, Matyjasik S, Przetalski S, Witek S. Influence of N-alkoxymethyleneammonium chlorides on the erythrocyte membrane. *Stud. Biophys.*, 84 : 123-132, 1981.

Kohn HI, Liversedge N. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 82 : 292-300, 1944.

Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, Shibata H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets : rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim. Biophys. Acta*, 1335 : 335-342, 1997.

Kontogianni A, Skouridou V, Sereti V, Stamatis H, Kolisis FN. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 103 : 665-660, 2001.

Kontogianni A, Skoudirou V, Sereti V, Stamatis H, Kolisis FN. Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J. Molec. Cat. B. Enz.*, 21 : 59-62, 2003.

Koops BC, Verheij MH, Slotboom AJ, Egmond MR. Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 25 : 622-631, 1999.

Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N. Enzyme catalysis in ionic liquids. Curr. Opin. Biotechnol., 13 : 565-571, 2002.

Ku MA, Hang YD. Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssochlamys fulva*. Biotech. Lett., 17 : 1081-1084, 1995.

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation : existing methods, new trends and challenges. Progr. Lipid Res., 46 : 244–282, 2007.

Laguerre M, López-Giraldo LJ, Lecomte J, Baréa B, Cambon E, Tchobo PF, Barouh N, Villeneuve P. Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: a novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. Anal. Biochem., 380 : 282-290, 2008.

Lang S, Syldatk C, Rau U. Enzymatic synthesis and modification of glycolipids. In: UT Bornscheuer ed. Enzymes in Lipid Modification. Weinheim :Wiley-VCH, 361-393, 2000.

Larsson KM, Janssen A, Adlercreutz P, Mattiasson B. Three systems used for biocatalyst in organic solvents. A comparative study. Biocatal. Biotransform., 4 : 163-175, 1990.

Lea CH. The effect of light on the oxidation of fats. Proc. Roy. Soc. London, 108 : 175-189, 1931.

Lee AG. Interactions between anesthetics and lipid mixtures. Normal alcohols. Biochemistry, 15 : 2448-2452, 1976.

Ley JP, Bertram HJ. 3,4-Dihydroxymandelic acid amides of alkylamines as antioxidants for lipids. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 105 : 529-535, 2003.

Lien EJ, Hansch C, Anderson SM. Structure-activity correlations for antibacterial agents on Gram-positive and Gram-negative cells. *J. Med. Chem.*, 11 : 430-441, 1968.

Litwinienko G, Ingold KU. Abnormal solvent effect on hydrogen atom abstractions.
1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) in alcohols. *J. Org. Chem.*, 68 : 3433-3438, 2003.

Litwinienko G, Ingold, KU. Abnormal solvent effect on hydrogen atom abstractions.
2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. *J. Org. Chem.*, 69 : 5888-5896, 2004.

Litwinienko G.; Ingold, KU. Abnormal solvent effect on hydrogen atom abstractions.
3. Novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry. *J. Org. Chem.*, 70 : 8982-8990, 2005.

Ljunger G, Adlercreutz P, Mattiasson B. Lipase catalyzed acylation of glucose. *Biotech. Lett.*, 16 : 1167-1172, 1994.

Lu Y, L. Foo LY. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.*, 65 : 1-8, 1999.

Lue B-M, Karboune S, Yeboah FK, Kermasha S. Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80 : 462-468, 2005.

McClements DJ, Decker EA. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions : impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.*, 65 : 1270-1282, 2000.

Macrae AR. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 60 : 291-294, 1983.

Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc., 45 : 594-598, 1968.

Maruta Y, Kawabata J, Niki R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Artium lappa* L.). J. Agric. Food Chem., 43 : 2592-2596, 1995.

Maxwell SRJ. Coronary artery disease - free radical damage, antioxidant protection and the role of homocysteine. Basic Res. Card., 95 : I65-I71, 2000.

Mei L, McClements DJ, Decker EA. Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. J. Agric. Food Chem., 47 : 2267-2273, 1999.

Mellou F, Lazari D, Skaltsa H, Tselepis AD, Kolisis FN, Stamatis H. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. J. Biotech., 116 : 295-304, 2005.

Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc., 48 : 91, 1971.

Mine Y, Fukunaga K, Itoh K, Yoshimoto M, Nakao K, Sugimura Y. Enhanced enzyme activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents by crown ethers and cyclodextrins. J. Biosci. Bioeng., 95 : 441-446, 2003.

Møller JKS, Catharino RR, Eberlin MN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils : spices from the Labiate family. Food Chem., 100 : 1283-1288, 2007.

Morishita H, Ohnishi M. Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds. Stud. Nat. Prod. Chem., 25 : 919-953, 2001.

Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. Food Chem., 72 : 145-171, 2001.

Muderhwa JM, Pina M, Graille J. Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3. Oléagineux, 43 : 427-432, 1988.

Metcalf AD, Mulley BA. Non-ionic surface-active agents. I. The solubility of chloroxylenol in aqueous solutions of polyethylene glycol 1000 monocetyl ether. J. Pharm. Pharmcol., 8 : 774-779, 1956.

Mutua LN, Akoh CC. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non aqueous media by *Candida* sp. lipase. J. Am. Oil Chem. Soc., 70 : 43-46, 1993.

Naguib YMA. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. Anal. Biochem., 265 : 290-298, 1998.

Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. J. Agric. Food Chem., 48 : 1150-1154, 2000.

Núñez Sellés AJ, Vélez Castro HA, Agüero- Agüero J, González- González J, Naddeo F, De Simone F, Rastrelli L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica L.*) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a Nutritional supplement. J. Agric. Food Chem., 50 : 762-766, 2002.

Okahata Y, Ijiro K. A lipid-coated lipase as new catalyst for triglyceride synthesis in organic media. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 20 : 1392-1394, 1988.

Oliveira L, Freire CSR, Silvestre AJD, Cordeiro N, Torres IC, Evtuguin D. Steryl glucosides from banana plant *Musa acuminata* Colla var *cavendish*. Ind. Crop. Prod., 22 : 187-192, 2005.

Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. Phytochemistry, 65 : 3249-3254, 2004.

Ono M, Suzuki K, Tanikawa S, Akita H. First synthesis of (+) and (-) elvirol based on an enzymatic function. Tetrahedron Asymm., 12 : 2597-2604, 2001.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorption capacity assay using fluorescein as a fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49 : 4619-4626, 2001.

Parnham MJ, Kesselring, K. Rosmarinic acid. *Drug Future*, 10 : 756-757, 1985.

Park S, Kazlauskas RJ. Biocatalysis in ionic liquids: advantages beyond green technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14 : 432-437, 2003.

Patton S, Kurtz GW. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.*, 34 : 669-674, 1951.

Persson M, Wehtje E, Adlercreutz P. Factors governing the activity of lyophilised and immobilised lipase preparations in organic solvents. *Chem. Bio. Chem.*, 3 : 566-571, 2002 a.

Persson M, Wehtje E, Adlercreutz P. Preparations of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 31 : 833-841, 2002 b.

Petersen M, Simmonds MSJ. Molecules of interest : rosmarinic acid. *Phytochem.*, 62 : 121-125, 2003.

Petersson AEV, Adlercreutz P, Mattiasson B. A water activity system for enzymatic reactions in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, 97 : 235-241, 2007.

Plou FJ, Cruces MA, Ferrer M, Fuentes G, Pastor E, Bernabé M, Christensen M, Comelles F, Parra JL, Ballesteros A. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J. Biotechnol.*, 96 : 55-66, 2002.

Pokorny J. Major factors affecting the antioxidation in lipids. In : Chan H. *AUTOXIDATION OF UNSATURATED LIPIDS*. Academic Press, Londres, 141-2006, 1987.

Porter WL, Black ED, Drolet AM. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsion: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.*, 37 : 615-624, 1989.

Porter WL. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol. Ind. Health*, 9 : 93-122, 1993.

Pringle MJ, Brown KB, Miller KW. Can the lipid theories of anesthesia account for the cut off in anesthetic potency in homologous series of alcohols ? *Mol. Pharmacol.*, 19 : 49-55, 1981.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53 : 4290-4302, 2005.

Priya K, Chadha A. Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase. *Enz. Microb. Technol.*, 32 : 485-490, 2003.

Pryor WA, Strickland T, Church DF. Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulphate micelle solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 110 : 2224-2229, 1988.

Pryor WA, Cornicelli JA, Devall LJ, Tait B, Trivedi BK, Witiak DT, Wu M. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J. Org. Chem.*, 58 : 3521-3532, 1993.

Przestalski S, Kuczera J. Molecular mechanisms of interaction between amphiphilic ammonium salts and membranes. *Polish. J. Environ. Studies*, 2: 13-22, 1992.

Puupponen-Pimia RL, Nohynek L, Meier C, Kahkonen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microb.*, 90 : 494-507, 2001.

Quina FH, Alonso EO, Farah JPS. Incorporation of nonionic solutes into aqueous micelles : a linear solvation free energy relationship analysis. *J. Phys. Chem.*, 99 : 11708-11714, 1995.

Quinlan P, Moore S. Modification of triglycerides by lipases : process technology and its applications to the production of nutritionally improved fats. *Inform*, 4 : 580-585, 1993.

Redmann I, Pina M, Guyot B, Blaise P, Farines M, Graille J. Chemoenzymatic synthesis of glucose fatty esters. *Carb. Res.*, 300 : 103-108, 1997.

Requena J, Haydon DA. Is there a “cut-off” in the adsorption of long chain amphipathic molecules into lipid membranes ? *Biochim. Biophys. Acta*, 814 : 191-194, 1985.

Riva S. Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 19 : 43-54, 2002.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 20 : 933-956, 1996.

Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsikang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66 : 401-436, 1999.

Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols : mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org. Biomol. Chem.*, 3 : 423-430, 2005.

Rosell CM, Vaidya AM, Halling PJ. Continuous in situ water activity control for organic phase biocatalysis in a packed bed hollow fibre reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 49 : 284-289, 1996.

Rottici D. Understanding and engineering the enantioselectivity of *Candida Antarctica* lipase B towards sec-alcohols. Thesis of Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 2000.

Ru MT, Dordick JS, Reimer JA, Clarck DS. Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents. Biotechnol. Bioeng., 63 : 233-241, 1999.

Rucka M, Oswiecimska M, Witek S. New biocides for cooling water treatment. II. Alkoxyethyleneammonium chlorides. Env. Protection Eng., 7 : 45-55, 1981.

Rucka M, Oswiecimska M, Witek S. New biocides for cooling water treatment. III. Quaternary ammonium salts. Env. Protection Eng., 9 : 25-30, 1983.

Sabally K, Karboune S, Yebaoh FK, Kermasha S. Enzymatic esterification of dihydrocaffeic acid with linoleyl alcohol in organic solvent media. Biocat. Biotrans., 23 : 37-44, 2005 a.

Sabally K, Karboune S, Saint-Louis R, Kermasha S. Lipase-catalyzed esterification of linolenyl alcohol with selected phenolic acids in organic solvent media. Appl. Biochem. Biotechnol., 127 : 17-28, 2005 b.

Sabally K, Karboune S, Saint-Louis R, Kermasha S. Lipase-catalyzed transesterification of trilinolein or trilinolenin with selected phenolic acids. J. Am. Oil Chem. Soc., 83 : 101-107, 2006 a.

Sabally K, Karboune S, Saint-Louis R, Kermasha S. Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids. J. Biotech., 127 : 167-176, 2006 b.

Saito S, Kawabata J. Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents. Tetrahedron, 61 : 8101-8108, 2005.

Saito S, Kawabata J. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging reaction of protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid): difference in reactivity between acids and their esters. *Helv. Chim. Acta.*, 89 : 1395-1407, 2006.

Sarney DB, Kapeller H, Fregapane G, Vulfson EN. Chemo-enzymatic synthesis of disaccharide fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71 : 711-714, 1994.

Sarni-Manchado P, Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire. Editions TEC & DOC Lavoisier, 30-31, 2006.

Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds, implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J. Agri. Food Chem.*, 47 : 397-402, 1999.

Schlotterbeck A, Lang S, Wray V, Wagner F. Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. *Biotech. Lett.*, 15 : 61-64, 1993.

Scholz E, Heinrich M, Hunkler D. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. *Planta Med.*, 60 : 360-364, 1994.

Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 2432-2438, 2002.

Sheldon RA, Lau RM, Sorgedrager MJ, van Rantwijk F, Seddon KR. Biocatalysis in ionic liquid. *Green Chem.*, 4 : 147-151, 2002.

Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 : 789-793, 1999.

Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Cat. B : Enz.*, 17 : 133-142, 2002.

Siesjö BK, Agrdh CD, Bengtsson F. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 3 : 165-211, 1989.

Silva FAM, Borges F, Guimarães C, Lima JLFC, Matos C, Reis S. Phenolic acids and derivatives : studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 2122-2126, 2000.

Sin YM, Cho KW, Lee TH. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnol. Lett.*, 20 : 91-94, 1998.

Someya S, Yoshiki Y, Okubo K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chem.*, 79 : 351-354, 2002.

Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 468-472, 2002.

Stamatis H, Sereti V, Kolisis FN. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 : 1505-1510, 1999.

Stamatis H, Sereti V, Kolisis FN. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J. Mol. Catal. B. Enzymatic.*, 11 : 323-328, 2001.

Stevenson DE, Parkar SG, Zhang J, Stanley RA, Jensen DJ, Cooney JM. Combinatorial enzymatic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). *Enzyme Microb. Technol.*, 40 : 1078-1086, 2007.

Svensson I, Wehtje E, Adlercreutz P, Mattiasson B. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioeng.*, 44 : 549-556, 1994.

Tagaki Y, Teramoto J, Kihara H, Itoh T, Tsukube H. Thiacrown ethers as regulator of lipase-catalyzed transesterification in organic media : practical optical resolution of allyl alcohols. *Tetrahedron Lett.*, 37 : 4991-4992, 1996.

Terao J, Karasawa H, Arai H, Nagao A, Suzuki T, Takama K. Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 57 : 1204-1205, 1993.

Therisod M, Klibanov AM. Facile enzymatic preparations of mono-acylated sugars in Pyridine. *J. Am. Chem. Soc.*, 108 : 5638-5640, 1986.

Tomás-Barberán FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 80 : 1073-1080, 2000.

Topakas E, Stamatis H, Biely P, Kekos D, Macris BJ, Christakopoulos P. Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *J. Biotechnol.*, 102 : 33-44, 2003.

Torres de Pinedo A, Peñalver P, Rondón D, Morales JC. Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure. *Tetrahedron*, 61 : 7654-7660, 2005.

Trujillo M, Mateos R, Teran LC, Espartero JL, Cert R, Jover M, Alcudia F, Bautista J, Cert A, Parrado J. Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *J. Agric. Food Chem.*, 54 : 3779-3785, 2006.

Tubaro F, Micossi E, Ursini F. The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 : 173-179, 1996.

Ujang Z, Vaidya AM. Stepped water activity control for efficient enzymatic interesterification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50 : 318-322, 1998.

Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2 : 293–308, 1994.

Vafiadi C, Topakas E, Alissandratos A, Faulds CB, Christakopoulos P. Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation. *J. Biotechnol.*, 133 : 497-504, 2008.

van Unen DJ, Engbersen JFJ, Reinhoudt DN. Why do crown ethers activate enzyme in organic solvents ? *Biotechnol. Bioeng.*, 77 : 248-255, 2002.

Vásquez-Lima F, Pyle DL, Asenjo JA. Factors affecting the esterification of lauric acid using an immobilized biocatalyst : enzyme characterization and studies in a well-mixed reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 46 : 69-79, 1995.

Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Molec. Cat. : B Enz.*, 9 : 113-148, 2000.

Villeneuve P. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechn. Adv.* 25 : 515-536, 2007.

Walters KA, Bialik W, Brain KR. The effects of surfactants on penetration across the skin. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 15 : 260-270, 1993.

Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77 : 355-360, 2000.

Watanabe Y, Fang X, Minemoto Y, Adachi S, Matsuno R. Suppressive effect of saturated acyl L-Ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrin or gum arabic by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 3984-3987, 2002.

Wehtje E, Svensson I, Adlercreutz P, Mattiasson B. Continuous control of water activity during biocatalysis in organic media. Biotechnol. Lett., 7 : 873-878, 1993.

Wehtje E, Kaur J, Adlercreutz P, Chand S, Mattiasson B. Water activity control in enzymatic esterification processes. Enz. Microb. Techn., 21 : 502-510, 1997.

Weitkamp P, Vosmann K, Weber N. Highly efficient preparation of lipophilic hydroxycinnamates by solvent-free lipase-catalyzed transesterification. J. Agric. Food Chem., 54 : 7062-7068, 2006.

Weitkamp P, Weber N, Vosmann K. Lipophilic (hydroxyl)phenylacetates by solvent-free lipase-catalyzed esterification and transesterification in vacuo. J. Agric. Food Chem., 56 : 5083-5090, 2008.

Wellwood CRL, Cole RA. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. J. Agric. Food Chem., 52 : 6101-6107, 2004.

Won K, Jeong JC, Lee SB. Computer-aided real-time estimation of reaction conversion systems with water activity control. Biotechnol. Bioeng., 79 : 795-803, 2002.

Won K, Lee SB. Computer-aided control of water activity for lipase-catalyzed esterification in solvent-free systems. Biotechnol. Prog., 17 : 258-264, 2001.

Xiang Z, Ning Z. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in south-China honeysuckle. Swiss Soc. Food Sci. Techn., 41 : 1189-1203, 2008.

Xu X. Modification of Oils and Fats by lipase-catalyzed interesterification: aspects of process engineering. In : UT Bornscheuer ed. Enzymes in Lipid Modification. Weinheim :Wiley-VCH, 190-215, 2000.

Yahya ARM, Anderson WA, Moo-Young M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. Enz. Microb. Technol., 23 : 438-450, 1998.

Yan Y, Bornscheuer UT, Cao L, Schmid RD. Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters, removal of byproducts by azeotropic distillation. Enz. Microb. Tech., 25 : 725-728, 1999.

Yuji H, Weiss J, Villeneuve P, López-Giraldo LJ, Figueroa-Espinoza MC, Decker E. Ability of surface-active antioxidants to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsion. J. Agric. Food. Chem., 55 : 11052-11056, 2007.

Zang LY, Cosma G, Gardner H, Castranova V, Vallyathan V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. Mol. Cell. Biochem., 247 : 205-210. 2003.

Zhang HY, Sun YM, Wang XL. Substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols : a DFT study and its implications in the rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure-activity relationships for flavonoid antioxidants. Chem. Eur. J., 9 : 502-508, 2003.

Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem., 49 : 5165–5170, 2001.

Zhu B, Panek JS. Methodology based on chiral silanes in the synthesis of polypropionate-derived natural products-total synthesis of epothilone A. Eur. J. Org. Chem., 1 : 1701-1714, 2001.

Zhu H, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. J Agric. Food Chem., 52 : 7272-7278, 2004.

Résumé :

L'oxydation des lipides insaturés, qui constitue l'une des causes majeures de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques, peut être limitée par l'emploi d'antioxydants. Les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant pour leurs propriétés antioxydantes. Cependant, la mise en œuvre de ces molécules polaires dans les matrices lipidiques (de type émulsion ou autre) est délicate et peut s'accompagner d'une diminution de leur efficacité. Pour contourner ce problème, l'une des stratégies consiste à ajuster la polarité de ces molécules par le greffage de chaînes aliphatiques de longueurs différentes. La première partie de ce travail a été consacrée à la synthèse enzymatique d'une série d'esters lipophiles des acides chlorogénique et rosmarinique. Concernant l'acide chlorogénique, les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant une stratégie en deux étapes. Cette stratégie correspond à une estérfication préalable au méthanol en présence d'une résine sulfonique suivie d'une transestérfication enzymatique (lipase B de *Candida antarctica*) du chlorogénate de méthyle en milieu fondu, avec des alcools de longueurs de chaîne comprise entre 4 et 16 atomes de carbone. En conditions optimales, les vitesses initiales de transestérfication s'avèrent jusqu'à deux fois supérieures aux vitesses d'estérfication enzymatique directe. Par ailleurs, la stratégie en deux étapes conduit à des rendements globaux de 61 à 93% contre 40 à 60% dans le cas de l'estérfication directe. Concernant l'acide rosmarinique, seule l'estérfication directe en présence de résine sulfonique a permis d'atteindre des rendements satisfaisants (de 82% à 99%, selon la longueur de la chaîne greffée). Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons évalué, d'un point de vue cinétique et stationnaire, l'impact de la lipophilisation sur la capacité des nouvelles molécules à piéger le radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Les données cinétiques montrent que l'acide chlorogénique se stabilise sous sa forme quinone, tandis que les esters tendent à former des dimères à partir de leurs formes semi-quinone. Les résultats obtenus à l'état stationnaire indiquent que les acides chlorogénique et rosmarinique, mais également leurs esters respectifs, ont une capacité réductrice supérieure à la capacité théorique imputable aux nombre d'hydroxyles phénoliques. Ces résultats peuvent être expliqués en considérant l'existence de réactions de régénération et/ou de dimérisation. Enfin, la troisième partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation de la capacité antioxydante des dérivés lipophilisés d'acides chlorogénique et rosmarinique en milieu émulsionné, par une nouvelle méthodologie appelée test des triènes conjugués autoxydables (CAT). Les résultats ont montré que l'augmentation de la longueur de chaîne aliphatique ne conduisait pas forcement à une amélioration de la capacité antioxydante comme le prédit le « Paradoxe Polaire ». En effet, un maximum de la capacité antioxydante pour des longueurs de chaîne de 12 et 8 atomes de carbone a été observé pour les dérivés lipophiles des acides chlorogénique et rosmarinique respectivement. Les principales hypothèses avancées pour expliquer ce comportement inattendu sont basées sur la répartition des antioxydants et de leurs formes oxydées entre les diverses phases du système réactionnel.

Mots-clés : Lipase, acides phénoliques, lipophilisation, antioxydant, DPPH[•], milieu hétérogène.

Summary:

The oxidation of unsaturated lipids, which is one of the major causes of foods and cosmetics adulteration, may be limited by the use of antioxidants. Nowadays, phenolic compounds (particularly phenolic acids and flavonoids) generate a growing interest owing to their antioxidant properties. However, the implementation of such polar molecules in lipid-based systems (emulsion or other) is difficult and can lead to a decrease of their efficiency. To solve this issue, one strategy consists in adjusting the polarity of these molecules by the grafting of aliphatic chains of different lengths. The first part of this work has been dedicated to the enzymatic synthesis of a series of chlorogenate and rosmarinate alkyl esters. Regarding chlorogenic acid, the best results were obtained using a two-steps strategy. This strategy involves a preliminary esterification with methanol in presence of a sulfonic resin followed by an enzymatic transesterification (*Candida antarctica* B lipase) of methyl chlorogenate, with alcohols of 4-16 carbon chain lengths. Under optimal conditions, the initial rates of transesterification were up to two-fold higher than that of direct enzymatic esterification. Furthermore, the two-steps strategy led to overall yields of 61% to 93% against 40% to 60% in the case of direct esterification. With regard to rosmarinic acid, only the direct esterification in the presence of sulfonic resin leads to satisfactory yields (82% to 99%, depending on alkyl chain length). In the second part of this work, we evaluated, from kinetic and stationary point of view, the impact of hydrophobation on the ability of new molecules to scavenge the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). The kinetic data showed that chlorogenic acid was stabilized in its quinone form, while esters tend to form dimers from their semi-quinone form. The results obtained at stationary state indicated that both acids, but also their corresponding esters, have a radical scavenging activity greater than the theoretical capacity attributable to the number of phenolic hydroxyl. These results can be explained considering the existence of regeneration and /or dimerization mechanisms. In the third part of this work the antioxidant capacity of lipophilic derivatives of chlorogenic and rosmarinic acids was evaluated in emulsified systems by a new methodology called conjugated autoxidizable triene (CAT). The results showed that the increase of alkyl chain length did not necessarily lead to an improvement in the antioxidant capacity as predicted the so called "Polar Paradox". Indeed, maximum antioxidant capacities for chain length of 12 and 8 carbon atoms were observed for fatty esters of chlorogenic and rosmarinic acid, respectively. The main hypotheses proposed to explain this unexpected behaviour were based on the distribution of antioxidants and their oxidized forms in the different phase of the system.

Keywords: Lipase, phenolic acids, lipophilization, antioxidant, DPPH[•], heterogeneous media.