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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
17 octobre 2024 (17.10.2024)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2024/213667 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A23L 33/105 (2016.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
B01D 61/02 (2006.01) *C02F 9/00* (2023.01)
B01D 61/14 (2006.01) *B01D 71/02* (2006.01)
B01D 61/58 (2006.01) *C02F 1/38* (2023.01)
C02F 1/44 (2023.01) *C02F 1/66* (2023.01)
A61K 8/37 (2006.01) *C02F 3/34* (2023.01)
A61K 8/9789 (2017.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2024/059896

(22) Date de dépôt international :
11 avril 2024 (11.04.2024)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR2303576 11 avril 2023 (11.04.2023) FR

(71) Déposants : **UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER** [FR/FR] ; Etablissement public, 163 Rue Auguste Broussonnet, 34090 MONTPELLIER (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR] ; 3 Rue Michel-Ange, 75016 PARIS (FR). **CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT (CIRAD)** [FR/FR] ; 42 Rue Scheffer, 75116 Paris (FR). **ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CHIMIE DE MONTPELLIER (ENSCM)** [FR/FR] ; 240 Avenue du Professeur Emile Jeanbrau, 34296 Montpellier Cedex 5 (FR). **INSTITUT NATIONAL D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET L'ENVIRONNEMENT** [FR/FR] ; 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier (FR).

(72) Inventeurs : **DORNIER, Manuel** ; 85 allée du Bois du Prieur, 34830 CLAPIERS (FR). **MARGOUT-JANTAC, Delphine** ; 134 chemin des cactus, 34380 VIOLS-LE-FORT (FR). **SERVENT, Adrien** ; 3000 route de Mende, Résidence le pont des arômes, Apt 517, 34980 Montferrier sur lez (FR). **CUQ, Pierre** ; 1 plan des foulques, 34970 MAURIN (FR). **CARRARA, Morgane** ; 347 avenue de Saint Maurice, 34250 Palavas les Flots (FR). **GALAS, Simon** ; 17B, Route de la Taillade, Les Granges, 34150 La Boissière (FR). **RICHAUD, Myriam** ; 100 Rue des Genêts, 34270 St Mathieu de Tréviers (FR).

(74) Mandataire : **CABINET NONY** ; 11 rue Saint-Georges, 75009 PARIS (FR).

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

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

Publiée:
— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*
— *en noir et blanc ; la demande internationale telle que déposée était en couleur ou en échelle de gris et est disponible sur PATENTSCOPE pour téléchargement.*

WO 2024/213667 A1

(54) **Title:** OLIVE OIL LEES

(54) **Titre :** MARGINES D'HUILE D'OLIVE

(57) **Abstract:** Method for extracting oleacein. The present invention relates to a method for treating co-products formed during olive oil production. The present invention also relates to a method for extracting active substances of cosmetic, therapeutic and/or nutritional interest.

(57) **Abrégé :** Procédé d'extraction d'Oléacéine. La présente invention concerne un procédé de traitement de co-produits issus de la production d'huile d'olive. La présente invention concerne également un procédé d'extraction d'actifs d'intérêt cosmétique, thérapeutique et/ou alimentaire.

Description

Titre : Margines d'huile d'olive

Domaine technique

La présente invention concerne un procédé de traitement de co-produits issus de la production d'huile d'olive.

La présente invention concerne également un procédé d'extraction d'actifs d'intérêt cosmétique, thérapeutique et/ou alimentaire.

Technique antérieure

Depuis quelques décennies, la filière oléicole européenne et mondiale s'est métamorphosée. En 2022/2023, la production mondiale d'huile d'olive représentait 2,5 millions de tonnes. Petit producteur, la France se distingue par un autre paramètre que le volume de production : la qualité, le haut de gamme, de nombreux produits de variétés identifiées.

De manière générale, les procédés d'extraction d'huile d'olive se caractérisent par trois étapes principales, incluant une étape de broyage, une étape de malaxage, puis une étape de séparation. Cette dernière étape peut être réalisée selon plusieurs méthodes.

Ainsi, quatre principales méthodes d'extractions de l'huile d'olive sont actuellement utilisées dans le monde (méthode traditionnelle, en 2 phases, 2 phases ½ et 3 phases).

Le procédé traditionnel discontinu dit par pressage est le plus ancien mais n'a pas permis de répondre à la demande croissante des consommateurs en huile d'olive.

Ainsi, dans les années 1970, est apparu un procédé d'extraction en continu par décantation centrifuge, dit « en trois phases », qui utilise une grande quantité d'eau pour extraire l'huile d'olive. Cependant, l'augmentation du rendement de production d'huile d'olive engendre un volume très important de co-produits, dont un effluent aqueux très polluant, les margines, ou eaux de végétations.

Les margines issues de l'extraction par pressage, dite « traditionnelle », demeurent des sous-produits à très forte charge polluante mais du fait des faibles ajouts d'eau au cours de l'extraction de l'huile, les volumes de margines produites restent relativement limités par rapport aux autres procédés comme la méthode en trois phases qui est celle générant des quantités de margines allant jusqu'à 1200 L pour une tonne d'olive triturée.

La méthode d'extraction utilisant des décanteurs dits « *à économie d'eau* », ou deux phases ½, nécessite des ajouts d'eau moins importants, ce qui limite les volumes de margines rejetés (550 à 750 L pour une tonne d'olives).

Afin de limiter l'émission de cet effluent, un nouveau système a été mis en place, le système continu d'extraction en deux phases qui consomme beaucoup moins d'eau. Le système d'extraction en deux phases est très similaire au système d'extraction en trois phases ou, deux phases ½, mais ne requiert pas d'ajout d'eau avant, ou durant, l'étape de malaxage. Contrairement aux procédés de type trois phases ou deux phases ½, les grignons issus de la méthode en deux phases sont humides. Toutefois, mêmes les grignons humides sont apparentés aux margines, car ils présentent une forte charge polluante proche de celle observée avec les autres méthodes d'extraction selon le rapport de France Olive publié en 2011.

Aussi, même fortement diluées par les grandes quantités d'eau ajoutée au niveau du décanteur, et quelle que soit la méthode d'extraction mise en œuvre, ce type de margines reste un sous-produit à forte charge polluante.

Des solutions de retraitement des déchets (compostages, épandages, destructions…) ont été mises en place par la filière oléicole mais le dernier bulletin (Guide des bonnes pratiques d'élimination des sous-produits octobre 2011) de France Olive fait état à travers son audit des volumes très importants et des charges polluantes propres aux margines.

La composition de l'huile d'olive et des margines peut varier avec la variété des oliviers, la maturité du fruit, les conditions climatiques, le temps de stockage ainsi que la méthode d'extraction utilisée. La majorité des polyphénols se retrouve dans les margines (40%) et seulement 0,3 à 1,5% des phénols disponibles ont été trouvés dans l'huile d'olive selon le système utilisé.

Le composé phénolique prépondérant dans les margines est l'hydroxytyrosol, un composé comportant un seul groupement phénol. D'autres composés phénoliques simples sont fréquemment trouvés dans l'huile d'olive et dans les margines, mais à de plus faibles

concentrations ; notamment le tyrosol, l'acide élénolique, l'oleuropéine, l'acide protocatéchique, l'acide vératrique, l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide 4-hydroxyacétique, l'acide cinnamique, l'acide paracoumarique et l'acide syringique.

Ces molécules sont des composés d'acide ou d'alcool phénoliques possédant une ou plusieurs fonctions phénols. Ils dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque (C6-C1) ou de l'acide cinnamique (C6-C3) (famille des phénylpropanoïdes). D'autres composés phénoliques plus complexes sont également retrouvés, les sécoiridoïdes, tel l'oleuropéine qui est un ester de l'acide élénolique et de l'hydroxytyrosol, ou des molécules ayant une structure de base similaire à celle de l'acide coumarique glycosylé.

WO2005/123603 rapporte un procédé d'extraction de composés chimiques à partir de co-produits issus de la production d'huile d'olive.

Il demeure un besoin de traitement des effluents toxiques issus de la production d'huile d'olive ; en particulier de traitement des margines issues de procédés d'extraction d'huile d'olive de type 2 phases ½ et 3 phases.

WO2010/094860 rapporte un procédé d'extraction de composés phénoliques de faible masse moléculaire à partir d'eaux de végétation d'olive ou de raisin.

Il demeure un besoin de nouveaux procédés de production de l'huile d'olive écologiquement acceptables et adaptés aux besoins du marché.

En particulier, il demeure un besoin de procédés de production applicables industriellement.

Il demeure un besoin de valorisation des co-produits issus de la production d'huile d'olive.

Il demeure donc également un besoin de traitement des co-produits issus de la production d'huile d'olive ; et tout particulièrement des margines.

En particulier, il demeure un besoin de détoxification des margines d'huile d'olive, dont la toxicité est attribuée à leurs constituants phénoliques.

Il demeure également un besoin d'identification des propriétés pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires de l'huile d'olive, et de ses co-produits.

EP1773721 décrit un procédé de traitement de margines d'huile d'olive aux fins de récupérer les composants chimiques de la margine.

WO2022/219581 décrit un procédé de traitement de margines d'huile d'olive pour obtenir une fraction concentrée d'oléacéine. Ce document décrit une composition destinée à être utilisée comme complément nutritionnel et/ou alimentaire pour réduire les effets du stress oxydatif chez un individu, ainsi que son utilisation dans des préparations médicale et cosmétiques.

WO2021/180996 décrit des extraits phénoliques de margines d'huile d'olive comprenant de l'oléacéine, lesquels peuvent être utilisés comme produits nutraceutiques et comme additifs alimentaires, en raison de leur effet antioxydant.

Zbakh et al. (2012, J Functional Foods, Vol. 4 (1) : 53-65) décrit l'utilisation de margines d'huile d'olive dans la préparation de boissons ayant un impact sur la santé.

Il demeure également un besoin d'extraction de composés d'intérêts pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

La présente invention a pour objet de satisfaire ces besoins.

Résumé de l'invention

Les inventeurs ont identifié la présence d'oléacéine (3,4 DHPEA-EDA), un composé phénolique de la famille des sécoiridoïdes, dans des margines d'huile d'olive.

A la connaissance des inventeurs, la présence d'oléacéine dans de telles margines n'avait, jusqu'ici été identifiée qu'à l'état de traces, et non valorisée industriellement.

Les inventeurs ont ainsi pu évaluer l'impact de paramètres influençant la teneur en oléacéine dans ces margines, et un protocole d'échantillonnage a été mis en œuvre pour en minimiser la variabilité ; à la fois dans la matière première et dans un procédé d'extraction.

Ces procédés mis en œuvre demeurent applicables à une échelle industrielle.

Les inventeurs ont enfin pu confirmer la présence d'une activité biologique des fractions obtenues, induite par la présence d'oléacéine en tant qu'actif principal.

Ce procédé d'extraction peut donc concerner à la fois des procédés de traitement de margines d'huile d'olive, mais également des procédés d'extraction d'oléacéine, ainsi que la valorisation des fractions obtenues, tout particulièrement, dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

Selon l'un de ses objets principaux, la présente invention concerne un procédé de traitement de margines d'huile d'olive, comprenant les étapes suivantes :

a) fourniture d'une composition de margine d'huile d'olive, la margine étant caractérisée par une teneur en matière sèche comprise entre 3% et 20% de la masse totale de la composition;

b) ajustement du pH de la composition à un pH acide, compris entre 3,5 et 5,5;

c) traitement enzymatique de la composition ajustée ;

d) traitement de la composition par microfiltration (MF) à une température allant de 45°C à 55°C, et recueil de la fraction microfiltrée, en particulier du perméat microfiltré ;

e) traitement de la fraction microfiltrée par nanofiltration (NF), et recueil de la fraction nanofiltrée, en particulier du rétentat nanofiltré ;

f) optionnellement, traitement de la fraction nanofiltrée par chromatographie de partage centrifuge (CPC) et recueil de la fraction purifiée.

Il est montré dans les exemples que la réalisation de l'étape d) de traitement de la composition par microfiltration à une température supérieure à 30°C, de préférence à une température allant de 45°C à 55°C, permet d'accroitre le facteur de purification de l'oléacéine par rapport à la matière sèche FP_{MS}) de 17% à 22%, par comparaison avec une mise en œuvre du procédé dans laquelle l'étape d) est réalisée à la température de 30°C. De la même manière, lorsque l'étape d) de traitement de la composition par microfiltration est réalisée à une température supérieure à 30°C, de préférence à une température allant de 45°C à 55°C, le facteur de purification de l'oléacéine par rapport aux polyphénols totaux (FP_{PPT}) augmente de 10% à 32%, par comparaison avec une mise en œuvre du procédé dans laquelle l'étape d) est réalisée à la température de 30°C.

De plus, la réalisation de l'étape d) de traitement de la composition par microfiltration à une température allant de 45°C à 55°C permet de faciliter la mise en œuvre du procédé en accroissant la performance de l'étape de microfiltration, comme cela est montré par un accroissement de la densité de flux moyenne.

Egalement, la réalisation de l'étape d) de traitement de la composition par microfiltration à une température allant de 45°C à 55°C ne provoque pas de dégradation significative de l'oléacéine, puisque moins de 10% de l'oléacéine est dégradée à la température de 50°C, par comparaison avec la mise en œuvre du procédé dans laquelle l'étape d) de traitement de la composition par microfiltration est réalisée à 30°C.

Selon l'un de ses autres objets principaux, la présente invention concerne un procédé d'extraction d'oléacéine, comprenant la mise en œuvre d'un procédé de traitement de margines d'huile d'olive, tel que défini précédemment, et la présence d'au moins une étape de recueil d'une fraction comprenant de l'oléacéine.

Selon l'un de ses autres objets principaux, la présente invention concerne une composition d'oléacéine obtenue par un procédé d'extraction, tel que défini précédemment, caractérisée en ce qu'elle comprend ladite fraction de margine d'huile d'olive.

Selon l'un de ses autres objets principaux, la présente invention concerne une composition d'oléacéine telle que définie précédemment, caractérisée en ce qu'elle comprend ladite fraction de margine d'huile d'olive ; pour son utilisation en tant que médicament.

Selon l'un de ses autres objets principaux, la présente invention concerne une utilisation cosmétique ou alimentaire d'une composition d'oléacéine telle que définie précédemment.

Brève description des dessins

[Fig 1] représente un protocole de pré-traitement de margines d'huile d'olives jusqu'à l'étape de microfiltation. Les étapes de collecte des margines, en sortie de décanteur, puis d'ajustement des margines collectées à un pH acide.

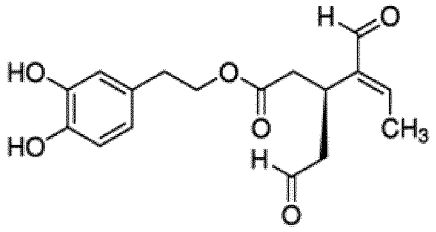
[Fig 2] représente une comparaison de la viscosité avec et sans traitement enzymatique (300 ppm, 30 °C, 1 h), les fractions traitées incluant quatre préparations enzymatiques à activité pectinolytique d'une margine déshuilée issue d'un mélange variétal d'olives après extraction trois-phases. En ordonnée, figure la viscosité correspondante, exprimée en mPa·s (à 100 s^{-1}). Les margines testées correspondent, de gauche à droite, à : (i) une margine sans traitement enzymatique, (ii) une margine enzymée avec Pectinex Ultra SPL, (iii) une margine enzymée avec Pectinex Ultra Pulp, (iv) une margine enzymée avec Ultrazyme AFP, (v) une margine enzymée avec Rhodopect 100 PTE.

[Fig. 3] représente un graphe de la stabilité de l'oléacine à 50°C. En ordonnées : pourcentage d'oléacéine restante. En abscisses : durée, exprimée en minutes.

Description détaillée

Le terme « ***oléacéine*** » désigne ici spécifiquement le composé phénolique de la famille des sécoiridoïdes, 3,4-DHPEA-EDA, dont le numéro CAS est le 149183-75-5, de formule développée suivante :

[Chem 1]



Ce terme est susceptible d'englober l'ensemble des sels d'oléacéine, et en particulier l'ensemble des sels pharmaceutiquement acceptables d'oléacéine.

Sauf indication contraire, ce terme n'englobe pas les analogues de l'oléacéine retrouvés, notamment, dans les margines ou l'huile d'olive, telles que l'oleuropéine et l'oleuropéine aglycone, qui sont susceptibles d'être à l'origine de la formation de l'oléacéine lors du pressage des olives.

Le document **WO2017122034** enseigne des procédés permettant d'augmenter les niveaux de certains polyphénols, dont l'oléacéine, dans l'huile d'olive.

Le document **WO2014012871** enseigne des propriétés biologiques, notamment pharmaceutiques, de l'oléacéine en tant qu'actif.

Comme détaillé dans les exemples ci-après, les inventeurs démontrent que les margines d'huile d'olive, normalement considérées comme des effluents toxiques, sont susceptibles de contenir des quantités importantes d'oléacéine.

De manière également surprenante, les inventeurs mettent en évidence un procédé de traitement de ces margines d'huile d'olive, dont les produits finaux sont caractérisés par de fortes teneurs en oléacéine, compatibles avec une valorisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

Ce procédé de traitement permet ainsi d'obtenir des compositions enrichies en oléacéine, à fort potentiel biologique, stables et présentant une bonne reproductibilité.

Ce point est d'autant plus surprenant que plusieurs analogues de l'oléacéine, et produits de dégradation, ont déjà été rapportés dans les margines ou l'huile d'olive.

A cet égard, et à la connaissance des inventeurs, l'oléacéine n'a été jusqu'ici caractérisée dans les margines d'huile d'olive qu'en faibles quantités.

La dégradation de l'oléacéine peut, en particulier, produire deux sous-produits : EDA et hydroxytyrosol. Enfin l'oléocanthal, retrouvé dans l'huile d'olive, est l'analogue le plus proche structurellement de l'oléacéine.

Ainsi, le document **WO2017122034** enseigne des procédés permettant d'augmenter les niveaux de certains polyphénols, dont l'oléacéine, dans l'huile d'olive.

Le document **WO2014012871** enseigne des propriétés biologiques, notamment pharmaceutiques, de l'oléacéine en tant qu'actif.

Les inventeurs proposent donc un procédé de traitement de ces margines, en vue d'aboutir à un produit à fort potentiel biologique ; le cas échéant, ce procédé de traitement peut donc être associé à un procédé d'extraction et/ou de préparation de l'oléacéine, en tant qu'actif.

Ce procédé de traitement de margines d'huile d'olive est caractérisé, au moins, par :

(i) la fourniture d'une composition de margine d'huile d'olive caractérisée par une teneur en matière sèche comprise entre 3% et 20% de la masse totale de la composition ; et

(ii) la mise en œuvre d'une étape de traitement enzymatique, d'une étape de microfiltration (MF), et d'une étape de nanofiltration (NF).

Ainsi, selon l'un de ses objets principaux, la présente invention concerne un procédé de traitement de margines d'huile d'olive, comprenant les étapes suivantes :

a) fourniture d'une composition de margine d'huile d'olive, la margine étant caractérisée par une teneur en matière sèche comprise entre 3% et 20% de la masse totale de la composition;

b) ajustement du pH de la composition à un pH acide, compris entre 3,5 et 5,5;

c) traitement enzymatique de la composition ajustée ;

d) traitement de la composition par microfiltration (MF) à une température allant de 45°C à 55°C, et recueil de la fraction microfiltrée ;

e) traitement de la fraction microfiltrée par nanofiltration (NF), et recueil de la fraction nanofiltrée.

En fonction de la matière première et des caractéristiques des fractions collectées, ce procédé de traitement est également susceptible d'inclure d'autres étapes.

Avantageusement, ledit procédé est susceptible d'inclure une étape de traitement par chromatographie de partage centrifuge (CPC) et recueil de la fraction purifiée.

Selon ce mode de réalisation particulier, la présente invention concerne un procédé de traitement de margines d'huile d'olive, comprenant les étapes suivantes :

a) fourniture d'une composition de margine d'huile d'olive, la margine étant caractérisée par une teneur en matière sèche comprise entre 3% et 20% de la masse totale de la composition ;

b) ajustement du pH de la composition à un pH acide, compris entre 3,5 et 5,5 ;

c) traitement enzymatique de la composition ajustée ;

d) traitement de la composition par microfiltration (MF) à une température allant de 45°C à 55°C, et recueil de la fraction microfiltrée ;

e) traitement de la fraction microfiltrée par nanofiltration (NF), et recueil de la fraction nanofiltrée ;

f) traitement de la fraction nanofiltrée par chromatographie de partage centrifuge (CPC) et recueil de la fraction purifiée.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, le dit procédé comprend en outre une ou plusieurs étapes de tamisage ; en particulier une ou plusieurs étapes de tamisage avant l'étape de traitement par microfiltration.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, le dit procédé comprend une ou plusieurs étapes de tamisage après l'étape de traitement enzymatique, et avant l'étape de traitement par microfiltration.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, le dit procédé consiste en les étapes a), b), c), d) et e).

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, le dit procédé consiste en les étapes a), b), c), d), e) et f).

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, l'étape b) suit immédiatement l'étape a), sans étape intermédiaire.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, l'étape c) suit immédiatement l'étape b), sans étape intermédiaire.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, l'étape d) suit immédiatement l'étape c), sans étape intermédiaire.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, l'étape e) suit immédiatement l'étape d), sans étape intermédiaire.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement de margines d'huile d'olive, l'étape f) suit immédiatement l'étape e), sans étape intermédiaire.

Ladite fraction microfiltrée, ladite fraction nanofiltrée, et le cas échéant ladite fraction purifiée peuvent être caractérisées par la présence d'oléacéine.

Les fractions caractérisées par la présence d'oléacéine sont choisis parmi : le perméat microfiltré, le perméat nanofiltré, le rétentat microfiltré et le rétentat nanofiltré.

Les fractions caractérisées par la présence d'oléacéine sont, en particulier, le perméat microfiltré et le rétentat nanofiltré issus des dits procédés de traitement et d'extraction.

Une composition de margine d'huile d'olive, caractérisée par une teneur en matière sèche comprise entre 3% et 20% de la masse totale de ladite composition, est susceptible d'être caractérisée par une teneur en matière sèche de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20% de la masse totale de ladite composition.

Selon certains modes de réalisations particuliers du procédé de traitement selon l'invention, ladite composition de margines est susceptible d'être caractérisée par une teneur en matière sèche égale ou supérieure à 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, ou 19% de la masse totale de ladite composition.

Selon certains modes de réalisations particuliers du procédé de traitement selon l'invention, ladite composition de margines est susceptible d'être caractérisée par une teneur en matière sèche égale ou inférieure à 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20% de la masse totale de ladite composition.

Selon certains modes de réalisations particuliers du procédé de traitement selon l'invention, ladite composition de margines d'huile d'olive est caractérisée par une teneur en masse sèche comprise entre 4% et 13% de la masse totale de la composition.

Selon certains modes de réalisations particuliers du procédé de traitement selon l'invention, les dites margines sont issues d'un procédé de production d'huile d'olive en système deux phase, deux-phase ½ ou trois-phases ; en particulier issu d'un procédé en système deux-phase ½ ou trois-phases.

Selon certains modes de réalisations particuliers du procédé de traitement selon l'invention, les dites margines sont issues d'une variété choisie parmi : Aglandau, Bouteillan, Cailletier, Cayet roux, Cayon du Var, Clermontaise, Ghjermana, Grossane, Olivière, Lucques, Négrette, Petit Ribier, Picholine, Rougette de l'Ardèche, Sabine, Salonenque, Tanche, Verdale de l'Hérault, Zinzala; en particulier choisie parmi : Bouteillan, Négrette, Aglandau, Picholine, Lucques et Olivière ; ou d'un mélange variétal, tel qu'un mélange comprenant l'une quelconque des dites variétés.

Selon certains modes de réalisations préférés du procédé de traitement selon l'invention, les dites margines sont issues de la variété Picholine, ou d'un mélange variétal comprenant la variété Picholine.

L'étape d'ajustement du pH de la composition à un pH acide, comprise dans le procédé de traitement selon l'invention, peut inclure un ajustement à un pH acide quelconque compris entre 3,5 et 5,5 ; ceci inclut l'ensemble des pH compris entre ces deux intervalles, soit notamment : 3,5 ; 3,6 ; 3,7 ; 3,8, 3,9 ; 4,0 ; 4,1 ; 4,2 ; 4,3 ; 4,4 ; 4,5 ; 4,6 ; 4,7 ; 4,8 ; 4,9 ; 5,0 ; 5,1 ; 5,2 ; 5,3 ; 5,4 ; 5,5.
Selon certains modes de réalisation particuliers du procédé de traitement selon l'invention, le pH de la composition est ajusté entre 4,0 et 4,5.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement selon l'invention, l'étape de traitement enzymatique, en particulier par macération, est réalisée en présence d'une ou plusieurs enzymes pectinolytiques, ou pectinases.

Des exemples d'enzymes pectinolytiques, ou mélanges enzymatiques selon l'invention, sont connus de l'homme du métier. De tels mélanges enzymatiques peuvent, avantageusement comprendre une ou plusieurs enzymes pectinolytiques, choisies parmi des polygalacturonases, des pectine-lyases, des pectine-méthyl-estérases, ou l'une quelconque de leur(s) combinaisons.

En particulier, des exemples de compositions commerciales pouvant être mises en œuvre dans un procédé de l'invention peuvent être choisies parmi : Pectinex® Ultra SP-L (Novozymes), Pectinex® Ultra Pulp (Novozymes), Pectinex® Ultra AFP, Rohapect® MC (AB Enzymes).

Selon un mode de réalisation exemplifié, une composition enzymatique pouvant être mise en œuvre dans un procédé de l'invention peut être constitué de, ou comprendre, une composition Rohapect® PTE100 (AB Enzymes).

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement selon l'invention, l'étape de traitement enzymatique étant réalisée à une température supérieure à 30°C, par exemple comprise entre 45°C et 55°C ; ce qui est donc susceptible d'englober 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C.

Selon certains modes de réalisation particuliers du procédé de traitement selon l'invention, l'étape de traitement enzymatique est réalisée à une température égale ou supérieure à 45°C.

Selon certains modes de réalisation dudit procédé, l'étape de microfiltration (MF) peut être réalisée à travers une membrane en céramique.

Selon certains modes de réalisation particuliers du dit procédé, l'étape de microfiltration (MF) peut être réalisée à travers une membrane en céramique choisie parmi :

- une membrane caractérisée par une couche active de type Al_2O_3 ;
- une membrane caractérisée par une couche active de type TiO_2 ;
- une membrane caractérisée par une couche active de type ZrO_2 ;
- une membrane caractérisée par couche active de type SiC.

Selon certains modes de réalisation particuliers dudit procédé, l'étape de microfiltration (MF) est réalisée à travers une membrane présentant un diamètre moyen de pores compris entre 0,1 et 2 µm; en particulier compris entre 0,1 et 1,4 µm.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement selon l'invention, l'étape de microfiltration (MF) étant réalisée à travers une membrane en céramique ; de diamètre moyen de pores compris entre 0,1 et 1,4 µm ; l'étape de microfiltration (MF) étant en particulier une étape de microfiltration tangentielle (MFT).

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement selon l'invention, ledit procédé ne comprend pas d'étape de séparation de la phase solide et de la phase liquide avant l'étape de microfiltration.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement selon l'invention, l'étape de nanofiltration est réalisée à travers une membrane ayant un seuil de coupure inférieur à 1000 Da, en particulier compris entre 100 et 1000 Da ; par exemple inférieur à 500 Da, en particulier compris entre 100 et 500 Da.

Selon certains modes de réalisation particuliers du procédé de traitement selon l'invention, l'étape de nanofiltration est réalisée à travers une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 100 Da et 500 Da, par exemple entre 200 et 500 Da.

Des exemples de membranes de nanofiltration peuvent être choisis parmi le groupe suivant : NF270 (Dow Filmtec), NF200 (Dow Filmtec), NF90 (Dow Filmtec), TS80 (TriSep), TS40 (TriSep), XN45 (TriSep), UTC20 (Toray), TR60 (Toray), DK (SUEZ ((GE)), DL (SUEZ ((GE)), GE (SUEZ ((GE)), HL (SUEZ ((GE)), NFX (Synder), NFW (Synder), NFG (Synder), TFC SR100 (Koch), SR3D (Koch), SPIRAPRO (Koch) ESNA1 (Nitto-Denko), NTR7450 (Nitto-Denko).

Des exemples de membranes de nanofiltration peuvent être choisis parmi des membranes de type polyamides, polypiperazineamides, polysulfones, polyéthersulfones, et composites de celles-ci.

Selon certains modes de réalisation du procédé de traitement selon l'invention, ledit composé comprend au moins une étape de recueil d'une fraction comprenant de l'oléacéine ; en particulier au moins une étape de recueil d'une fraction comprenant l'oléacéine à partir de la fraction nanofiltrée.

L'invention concerne également, selon un de ses objets principaux, un procédé d'extraction d'oléacéine, comprenant la mise en œuvre d'un procédé de traitement de margines d'huile d'olive selon l'une quelconque des revendications précédentes, et la présence d'au moins une étape de recueil d'une fraction comprenant de l'oléacéine.

Selon certains modes de réalisation du procédé d'extraction selon l'invention, ledit procédé d'extraction est caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de recueil d'une fraction comprenant l'oléacéine à partir de la fraction nanofiltrée.

Selon certains modes de réalisation particuliers, lesdits procédés de traitement et d'extraction sont également susceptibles d'inclure une ou plusieurs étapes supplémentaires. En particulier, lesdits procédés sont également susceptibles d'inclure une ou plusieurs étapes supplémentaires choisies parmi : une étape additionnelle de microfiltration, une étape additionnelle de nanofiltration, une étape d'ultrafiltration, une étape d'osmose inverse.

L'invention concerne également, selon un de ses objets principaux, une composition d'oléacéine obtenue par ledit procédé d'extraction.

Applications de l'oléacéine, en tant qu'actif

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne la mise en œuvre d'oléacéine, à titre d'actif, pour son utilisation en tant que médicament.

Selon un mode de réalisation alternative, l'invention concerne une méthode de préparation d'un médicament, et/ou d'une composition pharmaceutique comprenant la mise en œuvre d'oléacéine à titre d'actif.

De manière très avantageuse, l'oléacéine mise en œuvre à titre d'actif pour comprendre, voire être constituée, d'une fraction issue de margines d'huile d'olive, et tout particulièrement une fraction issue de margines d'huile d'olive obtenue selon un procédé de l'invention.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne donc la mise en œuvre d'oléacéine, à titre d'actif, pour le traitement ou la prévention d'un désordre chez un individu.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne donc la mise en œuvre d'oléacéine, à titre d'actif, pour le traitement ou la prévention d'un désordre chez un individu, le dit désordre étant choisi parmi :

- les désordres associés au stress thermique:
- les désordres associés au stress oxydant, tel que le stress oxydant endogène ou exogène.

Lesdits désordres peuvent être, notamment, des désordres de nature pathologique ou non-pathologique, tels que des désordres de nature cosmétique.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne la mise en œuvre d'oléacéine, à titre d'actif, pour le traitement ou la prévention d'un désordre choisi parmi : un désordre inflammatoire, un désordre cardiovasculaire, un désordre de la peau, un désordre prolifératif, par exemple un cancer, un désordre neurologique, un diabète, une athérosclérose, une obésité.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne la mise en œuvre d'oléacéine, à titre d'actif, pour le traitement ou la prévention d'un désordre inflammatoire ; par exemple un désordre inflammatoire immuno-médié et/ou un désordre inflammatoire intestinal, choisi parmi : une maladie chronique de l'intestin, une sclérose en plaques, une maladie pulmonaire obstructive chronique, une maladie de Crohn, une spondylarthrite ankylosante, un lupus erythémateux disséminé, un psoriasis, un rhumatisme psoriasique et une myocardite.

Selon un mode de réalisation alternatif, l'invention concerne la mise en œuvre d'oléacéine, à titre d'actif, pour une utilisation non-thérapeutique.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne une méthode de préparation d'une composition alimentaire, et/ou d'une composition cosmétique comprenant la mise en œuvre d'oléacéine à titre d'actif.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne donc une utilisation cosmétique ou alimentaire d'une composition d'oléacéine, en tant qu'actif, telle qu'une composition d'oléacéine obtenue à partir de margines d'huile d'olive, et tout particulièrement obtenue à partir de margines, selon un procédé de l'invention.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne donc la mise en œuvre d'oléacéine, à titre d'actif, pour le traitement ou la prévention d'un désordre cosmétique associé à l'âge, tel

qu'un désordre cutané, choisi parmi : les rides, les ridules, le relâchement de la peau, la perte de densité de la peau, la perte de fermeté de la peau, le photo-vieillissement.

Définitions

Les termes utilisés dans la présente description sont utilisés avec leur signification habituelle dans le domaine technique considéré, et au regard du contexte de la description dans lesquelles les termes sont utilisés. Certains termes sont davantage discutés ci-dessous, ou ailleurs dans la description, pour fournir des indications supplémentaires au regard de l'invention et de sa mise en œuvre. Les définitions qui suivent sont fournies pour la description et les revendications.

La description des différents modes de réalisation de l'invention comprend les modes de réalisation incluant « **comprenant** », « **ayant** », « **consistant en** » et « **consistant essentiellement en** ». Les mots « **avoir** » et « **comprendre** », ou des variantes telles que « a », « ont », « comprend » ou « comprenant » doivent être compris comme impliquant l'inclusion du ou des éléments indiqués (comme un élément d'une composition ou une étape de méthode) mais pas l'exclusion d'autres éléments. Le terme « consistant en » implique l'inclusion du ou des éléments indiqués, à l'exclusion de tout élément supplémentaire. L'expression « consistant essentiellement en » implique l'inclusion des éléments indiqués, et éventuellement d'autres éléments lorsque les autres éléments n'affectent pas matériellement les caractéristiques fondamentales et nouvelles de l'invention. Selon le contexte, le terme « comprendre » peut également indiquer strictement les caractéristiques indiquées, les nombres entiers, les étapes ou les composants indiqués et, par conséquent, dans ce cas, il peut être remplacé par « consister en ».

Le terme « **environ** » ou « **approximativement** » tel qu'utilisé ici au regard d'une valeur numérique se réfère à la plage d'erreur habituelle pour la valeur considérée, telle qu'elle habituellement identifiée par l'homme du métier dans le domaine technique considéré. La mention du terme « environ » au regard d'une valeur ou d'un paramètre spécifique inclut et décrit en tant que tel cette valeur ou ce paramètre. Le terme « environ » fait référence à ± 10 % d'une valeur donnée. Cependant, chaque fois que la valeur en question se réfère à un objet

indivisible qui perdrait son identité une fois subdivisé, alors « environ » fait référence à ± 1 de l'objet indivisible.

Le terme « **individu** » ou « **patient** » tel qu'utilisé dans le présent texte désigne en particulier un mammifère. Les mammifères considérés incluent, en particulier, les animaux domestiques (par exemple, bovins, ovins, chats, chiens, et chevaux), les primates (par exemple humains et non-humains), les lapins et les rongeurs (par exemple, les souris et les rats). Selon un mode de réalisation particulier, un individu, ou patient, est un être humain.

Dans le contexte de la présente invention, les termes « **prévenir** », « **prévention** » (et les variantes de ces expressions) au regard d'un désordre physiologique ou d'une maladie concerne le traitement prophylactique de la maladie ou du désordre, par exemple chez un individu suspecté d'avoir cette maladie ou ce désordre, ou étant à risque de développer cette maladie ou ce désordre. Prévenir inclut, mais n'est pas limité à, la prévention ou le ralentissement du développement de la maladie, et/ou le maintien d'un ou plusieurs symptômes de maladie à un niveau désiré ou un niveau moindre. Le terme « prévenir » ne requiert pas l'élimination à 100 % de la possibilité ou de la probabilité de survenue de la maladie ou du désordre. Ce terme désigne plutôt la réduction à un degré moindre du risque ou de la probabilité d'occurrence d'un phénomène donné. Comme indiqué, la prévention peut être complète, c'est-à-dire l'absence de symptômes ou de maladie détectable, ou partielle, de telle qu'il y ait moins de symptômes ou que les symptômes soient d'intensité moindre.

Dans le contexte de la présente invention, les termes « **quantité thérapeutiquement efficace** » et « **quantité prophylactiquement efficace** » se réfèrent à une quantité qui fournit un avantage thérapeutique dans le traitement, la prévention ou la gestion des processus pathologiques considérés. La quantité spécifique qui est thérapeutiquement efficace peut être facilement déterminée par un médecin et peut varier en fonction de facteurs tels que le type et le stade des processus pathologiques considérés, les antécédents médicaux, le sexe, le poids et l'âge du patient, son régime alimentaire, et l'administration d'autres agents thérapeutiques.

Au sens de l'invention, le terme « **significativement** » ou tous termes dérivés, utilisé dans le contexte d'un changement, signifie que le changement observé est notable ou qu'il a une signification statistique.

Dans le contexte de la présente invention, les termes « **traiter** », « **traitement** », « **thérapie** » ou « **thérapeutique** » se réfèrent à l'administration ou la consommation d'un actif à des fins curatives, de soulagement, de réduction, d'atténuation, ou d'amélioration d'une maladie ou d'un désordre pathologique, ou d'un ou plusieurs symptômes associés, ou pour prévenir ou ralentir la progression de ce ou ces symptômes ou de cette maladie, ou pour arrêter le développement de ce ou ces symptômes, ou de cette maladie ou de ce désordre pathologique d'une manière statistiquement significative. Plus particulièrement, « traiter » ou « traitement » incluent toute approche pour obtenir un effet bénéfique ou un résultat désiré à l'égard d'une maladie chez un individu. Les résultats cliniques bénéfiques ou souhaités peuvent inclure, mais sans s'y limiter, l'atténuation ou l'amélioration de la maladie ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie ; la diminution ou la réduction de l'étendue de la maladie, la stabilisation, c'est-à-dire l'absence d'aggravation d'une maladie, ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie ; la prévention d'une maladie, ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie ; la prévention de la propagation d'une maladie, ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie ; le ralentissement d'une maladie, ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie ou de la progression d'un ou des symptômes d'un telle maladie ; la diminution de la réapparition d'une maladie associée, ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie ; et l'interruption d'une maladie, ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie. En d'autres termes, le « traitement » tel qu'utilisé ici comprend toute guérison, amélioration, réduction ou interruption d'une maladie, ou d'un ou de plusieurs symptômes d'une telle maladie. Une « réduction » d'un symptôme ou d'une maladie signifie une diminution de la gravité ou de la fréquence de la maladie ou du symptôme, ou l'élimination de la maladie ou du symptôme.

Tel qu'utilisé dans la présente description et les revendications, les formes singulières « **un** », « **une** », « **le** » et « **la** » incluent la pluralité, sauf indication contraire et explicite du contexte.

Par « **pharmaceutiquement acceptable** » ou « **physiologiquement acceptable** » on entend signifier que le véhicule (support, diluant, ou excipient) doit être compatible avec les autres ingrédients de la formulation, et non nocif pour l'individu à qui la composition le comprenant est administrée. Un véhicule pharmaceutiquement acceptable est un véhicule reconnu comme satisfaisant, notamment, aux critères d'innocuité, de compatibilité, et d'inertie requis pour une mise en œuvre dans le domaine pharmaceutique. A titre d'exemples de véhicule pharmaceutiquement acceptable, il est possible de citer l'eau stérile, les saccharides tels que le sucrose ou le saccharose, les amidons, les sucres alcools tels que le sorbitol, les polymères tels que le PVP ou le PEG, les agents lubrifiants, tels que le stéarate de magnésium, les conservateurs, les agents colorants ou de saveurs.

Dans le contexte de la présente invention, l'expression « **véhicule physiologiquement acceptable** » vise à désigner toute substance ou composition compatible avec l'organisme de l'individu auquel un actif de l'invention doit être administré. En particulier, un véhicule physiologiquement acceptable est une substance ou composition dont l'administration à un individu ne s'accompagne pas d'effets délétères significatifs. Il peut s'agir, par exemple, d'un solvant non toxique tel que l'eau ou une solution aqueuse saline. En particulier, un tel véhicule est compatible avec une administration orale ou rectale, et de préférence est adapté à une administration par la voie orale.

Par "**sel pharmaceutiquement acceptable**", on entend un sel qui conserve l'activité biologique souhaitée du composé d'origine et qui ne communique pas d'effets toxiques indésirables. Les sels d'addition d'acide et les sels d'addition de base sont des exemples de tels sels. Les sels d'addition d'acide comprennent les acides inorganiques non toxiques tels que l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique, l'acide sulfurique, l'acide bromhydrique, l'acide iodhydrique, l'acide phosphorique, et les acides mono- et dicarboxyliques aliphatiques, les acides alcanoïques substitués par un phényle, les hydroxyalcanes Les sels dérivés d'acides organiques non toxiques tels que les acides, les acides aromatiques, les acides sulfoniques aliphatiques et aromatiques sont inclus. Les sels d'addition aux bases comprennent, par exemple, les métaux alcalino-terreux tels que le sodium, le potassium, le magnésium et le calcium, ainsi que le N,N′-dibenzyléthylènediamine, N-méthylglucamine, chloroprocaïne, choline, diéthanolamine,

éthylènediamine, procaïne et autres. Les sels dérivés d'amines organiques toxiques sont inclus.

La liste des sources, ingrédients et composants indiqués ci-après sont compris comme étant décrits de telle sorte que toutes combinaisons et mélanges de ceux-ci sont également envisagés dans le cadre de la présente invention.

Il est entendu que chaque limitation numérique maximale donnée dans la description comprend chaque limitation numérique inférieure, comme si ces limitations numériques inférieures étaient expressément écrites. Chaque limitation numérique minimale donnée dans cette description comprend toute limitation numérique supérieure, comme si ces limitations numériques supérieures étaient expressément écrites ici. Chaque plage numérique donnée tout au long de la description comprend chaque plage numérique plus étroite incluse dans une telle plage numérique plus large, comme si ces plages numériques plus étroites étaient toutes expressément écrites.

Toutes les listes indiquées dans la description, telles que, par exemple, les listes d'ingrédients, sont destinées et doivent être interprétées comme des groupes Markush. Ainsi, toutes les listes peuvent être lues et interprétées comme des éléments « sélectionnés dans le groupe constitué de » ... liste des éléments ... « et leurs combinaisons et mélanges ».

Il peut être fait référence ci-après à des noms commerciaux de composants comprenant divers ingrédients utilisés dans la présente description. Les inventeurs n'ont pas l'intention d'être limités à des matériaux sous un nom commercial particulier. Des matériaux équivalents (par exemple, ceux obtenus d'une source différente sous un nom ou un numéro de référence différent) à ceux indiqués ici par un nom commercial peuvent être substitués et utilisés dans la description ci-après.

Les compositions pharmaceutiques décrites ici peuvent également être mis en oeuvre en thérapie combinée, c'est-à-dire en combinaison avec d'autres agents actifs.

Dans certains cas, les compositions pharmaceutiques décrites ici peuvent inclure d'autres composés, agents et/ou médicaments utilisés pour traiter des pathologies telles qu'un cancer, une maladie auto-immune ou une maladie inflammatoire. Ces composés, agents et/ou médicaments peuvent inclure, par exemple, des agents chimiothérapeutiques, des agents à petites molécules ou des anticorps qui stimulent une réponse immunitaire contre un cancer donné.

Les compositions pharmaceutiques décrites ici peuvent comprendre un ou plusieurs sels pharmaceutiquement acceptables.

Les compositions pharmaceutiques décrites ici peuvent également inclure un antioxydant pharmaceutiquement acceptable. Les exemples d'antioxydants pharmaceutiquement acceptables comprennent (1) les antioxydants hydrosolubles tels que l'acide ascorbique, le chlorhydrate de cystéine, le bisulfate de sodium, le métabisulfite de sodium, le sulfite de sodium, etc. (2) les antioxydants solubles dans l'huile, les agents oxydants tels que le palmitate d'ascorbyle, l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), la lécithine, le gallate de propyle, l'alpha-tocophérol et autres ; et (3) les chélateurs de métaux tels que l'acide citrique, l'acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA), le sorbitol, l'acide tartrique, l'acide phosphorique et autres sont inclus.

Les exemples de supports aqueux ou non aqueux appropriés qui peuvent être utilisés dans les compositions pharmaceutiques décrites ici comprennent l'eau, l'éthanol, les polyols (par exemple, glycérol, propylène glycol, polyéthylène glycol, etc.) et leurs mélanges appropriés, les huiles végétales telles que l'huile d'olive et les esters organiques injectables tels que l'oléate d'éthyle. La fluidité appropriée peut être maintenue, par exemple, en conservant la taille de particules requise dans le cas d'une dispersion et en utilisant des agents de surface.

Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants tels que des conservateurs, des agents mouillants, des agents émulsifiants et des agents dispersants. La prévention de la présence de micro-organismes peut être assurée à la fois par les méthodes de stérilisation décrites ci-dessus et par l'inclusion de divers agents antibactériens et antifongiques tels que les parabènes, le chlorobutanol, le phénol, l'acide sorbique et autres. Il peut également être

souhaitable d'inclure dans la composition des agents isotoniques tels que les sucres, le chlorure de sodium. En outre, l'inclusion d'agents qui retardent l'absorption, tels que le monostéarate d'aluminium et la gélatine, peut retarder l'absorption de formes pharmaceutiques injectables.

Les supports pharmaceutiquement acceptables comprennent les solutions ou dispersions aqueuses stériles et les poudres stériles pour la préparation extemporanée de solutions ou dispersions injectables stériles. L'utilisation de tels supports et agents pour les substances pharmaceutiquement actives est bien connue dans le domaine. Sauf dans la mesure où un milieu ou agent conventionnel est incompatible avec le principe actif, son utilisation dans les compositions pharmaceutiques décrites ici est envisagée. Des substances actives supplémentaires peuvent également être incorporées dans les compositions.

Une composition pharmaceutique doit généralement être stérile et stable dans les conditions de fabrication et de stockage. La composition peut être formulée sous forme de solution, microémulsion, solution, microémulsion, liposome ou autre structure ordonnée adaptée à une concentration élevée de médicament. Le support peut être un solvant ou un milieu de dispersion contenant, par exemple, de l'eau, de l'éthanol, du polyol (par exemple, du glycérol, du propylène glycol et du polyéthylène glycol liquide, et autres), et des mélanges appropriés de ceux-ci. La fluidité appropriée peut être maintenue, par exemple, par l'utilisation d'un revêtement tel que la lécithine, par le maintien de la taille de particules requise dans le cas d'une dispersion et par l'utilisation d'agents de surface. Dans de nombreux cas, il sera préférable d'inclure des agents isotoniques, par exemple des sucres, des polyalcools tels que le mannitol et le sorbitol, ou du chlorure de sodium dans la composition. L'absorption retardée des compositions injectables peut être provoquée par l'inclusion dans la composition d'un agent qui retarde l'absorption, par exemple, les sels de monostéarate et la gélatine.

Les solutions injectables stériles peuvent être préparées en incluant le composé actif, en quantité requise dans un solvant approprié, éventuellement avec un ou une combinaison des ingrédients énumérés ci-dessus, puis en stérilisant par microfiltration. En général, les dispersions sont préparées en incorporant le composé actif dans un véhicule stérile qui contient un milieu de dispersion de base et les autres ingrédients nécessaires parmi ceux

énumérés ci-dessus. Dans le cas des poudres stériles pour la préparation de solutions injectables stériles, la méthode de préparation préférée est une méthode de séchage sous vide, dans laquelle une poudre du principe actif plus tout autre ingrédient souhaité est produite à partir de la solution filtrée préalablement stérilisée, et la lyophilisation.

La quantité de principe actif qui peut être combinée avec les matériaux de support pour produire une forme de dosage unique peut varier selon le sujet traité et le mode d'administration particulier. La quantité de principe actif qui peut être combinée avec un matériau de support pour produire une forme de dosage unique sera généralement la quantité de la composition qui produit un effet thérapeutique. Selon certains modes de réalisation, la quantité de principe actif est d'environ 0,01 % à environ 99 % par rapport à la quantité de composition finale, de préférence d'environ 0,1 % à environ 70 % par rapport à la quantité de composition finale, la plupart du temps combinée avec un support pharmaceutiquement acceptable

Les schémas posologiques sont ajustés pour obtenir la réponse optimale souhaitée (par exemple, une réponse thérapeutique). Selon certains modes de réalisation, une seule administration en bolus est possible et plusieurs doses divisées peuvent être administrées sur une longue période de temps, ou la dose peut être réduite ou augmentée proportionnellement comme indiqué dans une situation de traitement imminent. De préférence, la formulation de compositions parentérales est sous forme de doses unitaires, notamment pour faciliter l'administration et l'uniformité du dosage.

Selon certains modes de réalisation, une forme de dosage unitaire désigne une unité physiquement qui convient comme dose unique pour l'individu à traiter ; chaque unité, associée au support pharmaceutique requis, produit l'effet thérapeutique souhaité.

Selon certains modes de réalisation, la composition pharmaceutique est utilisée pour un traitement prophylactique ou thérapeutique. Le dosage et la fréquence d'administration peuvent varier selon que le traitement est prophylactique ou thérapeutique. Dans les applications prophylactiques, des doses relativement faibles sont administrées sur de longues périodes à des intervalles relativement peu fréquents. Certains patients continuent à recevoir un traitement pour le reste de leur vie. Dans les applications thérapeutiques, des doses

relativement élevées à des intervalles relativement courts peuvent être nécessaires jusqu'à ce que la progression de la maladie soit réduite ou interrompue, de préférence jusqu'à ce que le patient présente une amélioration partielle ou complète des symptômes de la maladie. Par la suite, le patient peut se voir administrer un régime prophylactique.

Les niveaux de dosage réels des principes actifs des compositions pharmaceutiques selon l'invention ne sont pas toxiques pour le patient afin d'obtenir la réponse thérapeutique souhaitée pour l'individu, en particulier la composition et le mode d'administration. Il est possible de les faire varier pour obtenir une quantité efficace de principe actif. Le niveau de dosage sélectionné dépend de la composition particulière utilisée, ou de l'activité de son ester, sel ou amide, de la voie d'administration, du temps d'administration, du taux d'élimination du composé particulier utilisé, de la durée du traitement, des autres médicaments, composés et/ou substances utilisés en combinaison avec une composition particulière, de l'âge, du sexe, du poids, de l'état, de la santé générale et des antécédents médicaux de l'individu à traiter, ainsi que de facteurs similaires bien connus dans le domaine médical. Le niveau de dosage peut également varier en fonction de divers facteurs pharmacocinétiques.

Selon certains modes de réalisation, une dose thérapeutiquement efficace peut prévenir ou retarder l'apparition d'une pathologie. Par exemple, les tests de laboratoire utilisés pour diagnostiquer une maladie comprennent la chimie, l'hématologie, la sérologie et la radiologie. En conséquence, les essais cliniques ou biochimiques qui surveillent l'un des éléments ci-dessus peuvent être utilisés pour déterminer si un traitement particulier est une dose thérapeutiquement efficace pour traiter la maladie. Un homme de l'art peut déterminer de telles quantités en fonction de facteurs tels que la taille de l'individu, la gravité des symptômes de l'individu, et la composition particulière ou la voie d'administration choisie.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées selon une ou plusieurs méthodes connues dans le domaine, par une ou plusieurs voies d'administration. Comme l'appréciera l'homme du métier, la voie d'administration et/ou le mode d'administration variera en fonction du résultat souhaité.

Les composés actifs peuvent être préparés avec des supports qui protégeront le composé contre une libération rapide, comme une formulation à libération contrôlée, y compris les implants, les timbres transdermiques et les systèmes de délivrance microencapsulés. Des polymères biodégradables et biocompatibles peuvent être utilisés, tels que l'éthylène-acétate de vinyle, les polyanhydrides, l'acide polyglycolique, le collagène, les polyorthoesters et l'acide polylactique. La composition thérapeutique peut être administrée à l'aide de dispositifs médicaux connus dans le domaine.

Exemples.

Exemple 1 : validation du procédé d'extraction d'oléacéine à partir de margines.

Après avoir évalué l'impact de différents paramètres pouvant influencer la teneur en oléacéine dans les margines, un protocole d'échantillonnage a été mis en œuvre afin de minimiser la variabilité de teneur du composé dans la matière première : les margines.

L'objectif était de déterminer la présence et la quantité d'oléacéine dans plusieurs margines variétales (Bouteillan, Négrette, Aglandau, Picholine, Lucques et Olivière) et selon plusieurs paramètres (la maturité et la méthode d'extraction).

Les résultats ont montré que la variété Picholine était celle qui permettait d'obtenir la plus grande quantité du composé cible quelle que soit la méthode d'extraction utilisée (2 phases, 2 phases ½ ou 3 phases) et ce quel que soit le niveau de maturité des olives.

L'objectif principal étant d'obtenir un extrait purifié d'oléacéine, plusieurs méthodes d'extraction et de purification ont été testées, en prenant pour matière première commune les margines issues de cette variété Picholine.

Etape de pré-traitement : stabilisation des margines par acidification.

Cette étape débute au niveau des décanteurs (les margines sont directement prélevées à la sortie des centrifugeuses ou décanteurs). Les margines caractérisées par une teneur en matière sèche comprise entre 3% et 20% de leur masse totale sont collectées.

La première étape commune à l'ensemble des méthodes de pré-traitement permet d'obtenir un extrait purifié dont la stabilité du principe actif cible (l'oléacéine) est maitrisée.

L'acidification des margines contribue à stabiliser le produit aux niveaux microbiologiques et chimiques, l'oléacéine étant plus stable en milieu acide.

Cette étape de stabilisation nécessite ici une acidification des margines à pH acide (4,3), en particulier à l'aide d'acide sulfurique.

Immédiatement après l'étape d'ajustement du pH, une étape de déshuilage peut avantageusement être mise en œuvre par centrifugation.

L'utilisation d'un système de centrifugation permet, selon un mode de réalisation particulier, de réaliser une extraction supplémentaire de l'huile résiduelle présente dans les margines. Dans l'exemple comparatif décrit ici, il s'agit de centrifuger les margines à 34000 g pendant 10 minutes à 4 °C puis d'enlever le surnageant huileux à l'aide d'une trompe à vide.

Etape de traitement enzymatique

L'intérêt de l'étape de traitement/liquéfaction **enzymatique** est évalué au travers de la mesure de la viscosité des margines, facteur impactant directement les performances des étapes de filtration membranaire. Les mesures de viscosité à une vitesse de cisaillement de 100 s^{-1} effectuées sur un Rhéomètre Anton Paar MCR 301 sont illustrées dans la **figure 2**.

Elles sont représentatives d'une amélioration des propriétés physico-chimiques des margines testées après mise en contact avec une préparation enzymatique à activités pectinolytiques. Ces résultats mettent en évidence une nette diminution de viscosité (d'un facteur 2,7 à 2,1 selon le type de pectinases utilisées) après liquéfaction enzymatique dans le cas de margines provenant d'une extraction 3 phases à partir d'olives issues d'un mélange variétal. Les préparations **Pectinex Ultra SPL et Rohapect 100PTE,** qui présentent des compositions différentes en enzymes pectinolytiques, sont particulièrement performantes. Elles permettent une diminution significative de la viscosité (2,7 à 2,2), associée à une augmentation importante de la densité du flux de filtration.

Etape de microfiltration

Pour évaluer les conditions opératoires de l'étape de microfiltration tangentielle permettant d'obtenir les meilleures densités de flux de filtration, des essais sans concentration, c'est-à-dire avec un facteur de réduction massique de 1, ont été réalisés dans une installation de laboratoire ayant un volume nominal de 3 L.

Plusieurs couples membrane-pression transmembranaire ont été sélectionnés. Quatre membranes tubulaires ont été testées à des pressions transmembranaires variant entre 1 et 4 bar avec une vitesse tangentielle proche de 5 m/s et une température de 30 °C.

Les membranes testées, en particulier de type céramique, comprennent :

- une couche active de type Al_2O_3, caractérisée par un diamètre de pores de 0,2 µm et une surface membranaire de 55 cm^2 ;
- une couche active de type TiO_2, caractérisée par un diamètre de pores de 0,2 µm et une surface membranaire de 55 cm^2 ;
- une couche active de type ZrO_2, caractérisée par un diamètre de pores de 0,2 µm et une surface membranaire de 55 cm^2 ;
- couche active de type SiC, caractérisée par un diamètre de pores de 0,6 µm et une surface membranaire de 42 cm^2.

Afin de confirmer les résultats obtenus, les performances de l'étape de microfiltration ont été évaluées en fonction du type de prétraitement des margines (2 phases ½ ou 3 phases).

Ces résultats confirment l'intérêt du traitement enzymatique qui permet d'augmenter la densité de flux de perméat ; en particulier avec les membranes de type TiO_2, car les densités de flux obtenues demeurent élevées, même à des pressions faibles (2 bar) ce qui présente un intérêt au niveau énergétique.

Avec cette membrane, la densité de flux de perméat après macération enzymatique est comprise entre 90 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ sans déshuilage et 130 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ avec déshuilage, valeurs toutes deux compatibles avec une application industrielle.

Compte-tenu de ces bonnes performances, il est ainsi possible de ne choisir que le prétraitement enzymatique afin de limiter le nombre d'étapes préliminaires à la filtration et ainsi de limiter le coût et la complexité du procédé (étapes préliminaires applicables directement en moulin).

En effet, selon un mode de réalisation, il est avantageux de s'affranchir de l'étape d'élimination de l'huile résiduelle qui entraine des pertes massiques (évaluées à 10-15 %), et peut favoriser la dégradation du composé cible.

Ne pas déshuiler/centrifuger les margines, préalablement à l'étape de traitement enzymatique et/ou de microfiltration permet également un important gain de temps, une amélioration du rendement et un gain économique sur le procédé proposé.

Dans les conditions opératoires optimisées, l'étape de microfiltration n'entraine pas de perte d'oléacéine, sa rétention étant inférieure à 8 %. Les matières sèches et autres polyphénols

sont davantage retenus, ce qui permet une purification du composé cible. Enfin, la clarification des margines brutes enzymées est totale.

Il a été également étudié l'influence du type de margines collectée (2 phases ½ et 3 phases) sur les performances de la microfiltration sachant que les caractéristiques de la margine brute initiale peuvent varier en fonction de la variété d'olives, de leur stade de maturité ou du processus d'extraction de l'huile réalisé au moulin.

L'étude a mis en évidence que la teneur en matières sèches totales (MS) semble augmenter légèrement avec la maturité des olives et diffère en fonction du processus d'extraction au moulin. La matière sèche des margines testées dans cette étude est généralement comprise entre 4 à 9,3%, en particulier entre 4 et 7 %, dans les margines issues d'une extraction deux phases ½ et de 7,9 à 12,4 % avec une extraction 3 phases.

De plus, la concentration de l'oléacéine est environ deux fois moins importante dans les margines issue d'une extraction deux phases ½ (0,2 à 1,2 g/kg) qu'avec une extraction 3 phases (1,8 à 2,6 g/kg).

Sachant qu'une variation de teneur en matières sèches peut impacter significativement l'étape de microfiltration tangentielle, une étude comparative des performances de la microfiltration a été réalisée, et est reproduite ci-après dans le **tableau 1**.

[Tableau 1]

Type d'extraction	3 phases	deux phases ½
Matière sèche de margines brutes (%)	8,9	3,0
Oléacéine (g/kg de margines brutes)	1,9	0,2
Densité de flux de perméat J_p moyen standard ($kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)	88	170
Rétention des matières sèches (%)	25	30
Rétention de l'oléacéine (%)	2	0
Stabilité de l'oléacéine (%)	100	82

L'étape de microfiltration/extraction est réalisée à partir d'une membrane TiO_2 (TAMI) à 30 °C, sans concentration et après pré-traitement de margine brute par 300 ppm de mélange

Pectinex Ultra SPL pendant 30 min à 30 °C. Les margines testées sont toutes issues de la variété Picholine.

Optimisation du couplage traitement enzymatique/ microfiltration tangentielle

La température utilisée pour le pré-traitement enzymatique, en amont de l'étape de microfiltration a déjà été optimisée. Une étude de l'influence de la température sur les performances de la microfiltration a été réalisée.

Les résultats du tableau 2 confirment qu'une augmentation de la température de filtration de 30 à 50 °C améliore les performances en augmentant la densité de flux sans affecter la stabilité du composé cible. Les résultats de l'étude comparative figurent en **tableau 2.**

[Tableau 2]

Température (°C)	**J_p moyen ($kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)**	**Rétention des matières sèches (%)**	**Rétention de l'oléacéine (%)**	**Stabilité de l'oléacéine 1 à 2 h (%)**	**Rétention des polyphénols totaux (%)**
30	129	19	6	98	22
50	164	27	0	100	35

L'étape de microfiltration est réalisée comme indiqué dans le tableau 1. La valeur de rétention en polyphénols totaux est évaluée par le dosage de la méthode de Folin-Ciocalteu. L'augmentation de la densité de flux moyenne est expliquée par une diminution de la viscosité des margines à 50 °C. La rétention de l'oléacéine n'est pas affectée par la température du procédé, en opposition avec les rétentions des matières sèches et polyphénols totaux qui sont légèrement augmentées, ce qui est favorable à la purification du composé cible.

De plus, il est montré que la réalisation de l'étape de microfiltration à une température supérieure à 30°C, telle qu'à la température de 50°C, accroit significativement le facteur de purification de l'oléacéine par rapport à la matière sèche, comme cela est montré dans le tableau 3 ci-dessous.

[Tableau 3]

Température (°C)	Margine traitée	FRV = 6		FRV = 8	
		FP_{MS}	FP_{PPT}	FP_{MS}	FP_{PPT}
30	3 phases 8,9 %MS	1,16	1,20	1,20	1,25
50		1,37	1,51	1,46	1,65
	3 phases 12,4 %MS	1,40	1,50		
	3 phases 9,2 %MS			1,40	1,37

Le tableau 3 représente les facteurs de purification de l'oléacéine par rapport à la matière sèche FP_{MS} et aux polyphénols totaux FP_{PPT} obtenus lors de la microfiltration de margines 3 phases, à la température de 30°C et à la température de 50°C.

La comparaison des facteurs de purification obtenus à 30 °C avec ceux obtenus à 50 °C lors de la microfiltration de margines 3 phases à FRV 6 et 8 (tableau 3), montre que l'augmentation de température permet d'améliorer le facteur de purification de l'oléacéine par rapport à la matière sèche de 17 à 22 % et le facteur de purification de l'oléacéine par rapport aux polyphénols totaux de 10 à 32 %.

De plus, il est montré que la réalisation de l'étape de microfiltration à une température supérieure à 30°C, telle qu'à la température de 50°C, permet une meilleure productivité, c'est-à-dire permet d'accroître les performances de la microfiltration, par comparaison à 30°C, en particulier grâce à une densité de flux moyenne qui est accrue.

En outre, il est montré que la réalisation de l'étape de microfiltration à une température supérieure à 30°C, telle qu'à 50°C, n'entraîne pas une dégradation importante de l'oléacéine dans la margine. Ainsi, comme cela est montré dans la **Figure 3**, un traitement à la température de 50°C n'entraîne qu'une dégradation minime de l'oléacéine contenue dans la margine, inférieure à 10%.

Une étude de stabilité de l'oléacéine dans la margine à 50°C a ainsi été réalisée par UPLC-UV-MS pendant 120 min, temps suffisant pour réaliser la microfiltration. Les résultats sont présentés dans la **Figure 3**

Comme observé sur le graphe de la **Figure 3**, la teneur en oléacéine dans la margine reste inchangée pendant les 30 premières minutes du traitement puis diminue progressivement jusqu'à 120 min avec 7.2 ± 1.7 % de perte, ce qui reste inférieur à la limite des 10% fixée.

La microfiltration pourra donc être réalisée à 50°C pour améliorer la performance. Nous pouvons par ailleurs constater qu'une augmentation plus importante de la température risquerait d'engendrer des pertes significatives d'oléacéine, la perte actuellement constatée s'approchant déjà de la limite fixée.

Ces résultats mettent donc en évidence les propriétés avantageuses du couplage traitement enzymatique/microfiltration tangentielle sur une préparation de margines comprenant un pourcentage en matière sèche conforme à l'invention.

Le procédé de microfiltration proposé est suffisamment robuste pour permettre le traitement de différents types de margines (en particulier 3 phases et 2 phases ½). Ainsi, pour tous les types de margines, les densités de flux cumulées sont supérieures à 50 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ et donc compatibles avec une application industrielle. De plus, les résultats confirment que les margines moins chargées en matières sèches totales (extraction 2 phases ½), sont plus favorables en termes de flux.

L'analyse des margines avant et après microfiltration permet aussi de s'assurer qu'il n'y a pas ou peu de rétention ou de dégradation du composé cible pendant chacun des essais. Les caractéristiques de ces margines, issues des essais de microfiltration en concentration dans les conditions optimisées (moyennes et écarts types sur 3 répétitions), sont reproduites en **tableau 4 et 5** ci-après, respectivement en mettant en œuvre une margine brute ou clarifiée après microfiltration.

[Tableau 4]

Origine des margines	margines brutes initiales					
	MS (%)	SIS (%)	PPT (g/kg de MF)	Oléacéine		
				concentration (g/kg de MF)	pureté moyenne par rapport à MS (g/kg de MS)	pureté moyenne par rapport aux PPT (g/100g PPT)
extraction 2 phases ½	6,2 *(0,1)*	1,0 *(0,1)*	6,9 *(0,2)*	1,1 *(0,1)*	18,3 *(0,6)*	16,4 *(1,0)*
extraction 2 phases ½	7,7 *(0,1)*	0,9 *(0,1)*	7,9 *(0,1)*	0,8 *(0,1)*	10 *(0,2)*	9,7 *(0,3)*

extraction 3 phases	9,2 *(0,1)*	1,1 *(0,1)*	11,4 *(0,1)*	1,1 *(0,1)*	11,6 *(1,3)*	9,4 *(1,1)*
extraction 3 phases	12,4 *(0,1)*	2,0 *(0,1)*	12,6 *(0,5)*	3,3 *(0,1)*	26,7 *(1,2)*	26,3 *(2,1)*

[Tableau 5]

Origine des margines	margines clarifiées après microfiltration				
	MS (%)	PPT (g/kg de MF)	Oléacéine		
			concentration (g/kg de MF)	pureté moyenne MS (g/kg de MS)	pureté moyenne PPT (g/100g PPT)
extraction 2 phases ½	4,6 *(0,1)*	5,0 *(0,2)*	0,9 *(0,1)*	19,9 *(0,4)*	18,4 *(1.0)*
extraction 2 phases ½	6,0 *(0,1)*	6,4 *(0,4)*	0,9 *(0,1)*	15,0 *(0,7)*	14,0 *(1,3)*
extraction 3 phases	7,7 *(0,1)*	9,7 *(0,1)*	1,3 *(0,2)*	16,2 *(2,2)*	12,9 *(1,9)*
extraction 3 phases	10,1 *(0,1)*	9,6 *(0,2)*	3,8 *(0,1)*	37,3 *(0,3)*	39,4 *(1,2)*

MS : matière sèche totale ; SIS : solides insolubles en suspension ; PPT : polyphénols totaux ; MF : matière fraîche.

Avec les données obtenues sur les 4 essais en concentration réalisés, aucune libération ou dégradation du composé cible n'a pu être mise en évidence pendant la microfiltration (test de Student pour données appariées, p-value = 0,38).

Une augmentation de 10 à 50 % de la pureté de l'oléacéine a été mise en évidence dans les margines clarifiées. Elle est liée notamment à une rétention en MS comprise entre 42 et 65 %. La concentration en oléacéine dans les margines clarifiées varie globalement de 0,9 à 3,8 g/kg et dépend principalement du type de margines initiales.

A l'échelle semi-industrielle, comme à l'échelle pilote, les margines moins chargées en matières sèches totales continuent à être plus favorables en termes de flux. Comme les margines plus chargées sont susceptibles de présenter des concentrations initiales en composé cible supérieures, un mode de réalisation particulier peut inclure une étape de mélange de margines, telles que des margines brutes ; par exemple un mélange de margines issues de procédés d'extraction 3 phases (P3) et 2 phases ½ (type P2,5).

Ainsi, un mélange de margines très chargées (type P3 avec MS > 10 %) avec des margines peu chargées (type P2,5 avec MS < 6 %) permet avantageusement de standardiser les margines à filtrer en termes de matière sèche et de contenu en oléacéine afin de maximiser densité de flux de perméat et concentration d'oléacéine dans le perméat.

Etape de nanofiltration tangentielle

Pour le choix du type de membranes, des essais préliminaires réalisés à partir de margines récoltées l'année précédente ont permis de montrer la possibilité de développer deux types de stratégies en fonction du type de membrane sélectionnée : une stratégie d'enrichissement centrée sur la valorisation du rétentat et une stratégie de purification centrée sur la valorisation du perméat.

Pour cela, deux membranes planes (SUEZ™) de sélectivités différentes ont été testées à l'échelle du laboratoire à des pressions de filtration variant de 15 à 30 bar : la membrane DK a un seuil de coupure estimé à 200 Da alors qu'il estimé à 1000 Da pour la membrane GE. Les margines clarifiées par microfiltration sont utilisées comme jus initial de nanofiltration et on souhaite comparer des margines issues d'olives de variété Picholine provenant d'extraction 3 phases (P3) et 2 phases ½ (P2,5). La nanofiltration est réalisée à 50 °C.
Des essais sans concentration (avec un facteur de réduction massique de 1) ont été réalisés en laboratoire sur un pilote de volume nominal de 3 L et de surface membranaire de 0,0125 m^2. L'objectif de ces essais est d'optimiser les conditions d'utilisation de chacune des deux membranes et de déterminer si dans ces conditions optimales, les performances obtenues sont compatibles avec une application industrielle.

A - Nanofiltration avec membrane polyamide-TFC

La pression sélectionnée suite à cette optimisation est de 30 bar : cette pression permet d'atteindre des densités de flux de l'ordre de 50 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ pour des margines clarifiées de type P3 et de l'ordre de 75 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ pour des margines clarifiées de type P2,5. A cette pression de travail, l'oléacéine est presque entièrement retenue (98 %) dans les deux cas, ce qui est très satisfaisant. En effet, il n'y a pas de différence significative en termes de rétention entre les margines clarifiées issues de P3 ou de P2,5.

Les matières sèches totales sont elles aussi majoritairement retenues (98 %) alors qu'une petite partie des polyphénols totaux est entrainée dans le perméat (retenus à 87 %).

La validation du procédé avec une membrane DK (Suez™) de type polyamide-TFC, est réalisée en confirmant que les densités de flux cumulées sont supérieures à 10 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ donc compatibles avec une application industrielle. Comme précédemment, les margines moins chargées telles que les margines P2,5 sont plus favorables en termes de densité de flux. En fonction du type de margine clarifiée utilisée, un facteur de réduction massique (FRM) de 2 à 3 peut être atteint ce qui est conforme avec les applications usuelles en nanofiltration. Le tableau 6 résume les caractéristiques des produits de filtration.

[Tableau 6]

	margines clarifiées initiales			rétentat après nanofiltration					facteur de concentration			FRM
	MS (%)	PPT (g/kg de MF)	Oléacéine C (g/kg de MF)	MS (%)	PPT (g/kg de MF)	Oléacéine C (g/kg de MF)	Oléacéine P_{MS} (g/kg de MS)	Oléacéine P_{PPT} (g/100g PPT)	MS	PPT	Oléacéine	
2 phases ½	5,1 *(0,0)*	4,8 *(0,0)*	0,9 *(0,0)*	12,9 *(0,0)*	10,6 *(0,2)*	1,8 *(0,0)*	13,9 *(0,2)*	16,9 *(0,5)*	2,5 *(0,0)*	1,4 *(0,0)*	2,1 *(0,0)*	2,6
3 phases	9,0 *(0,0)*	9,1 *(0,1)*	1,8 *(0,0)*	16,3 *(0,0)*	15,2 *(0,4)*	2,5 *(0,1)*	15,2 *(0,4)*	16,4 *(0,8)*	1,8 *(0,0)*	1,7 *(0,1)*	1,4 *(0,1)*	1,8

MS : matière sèche totale ; PPT : polyphénols totaux ; C : concentration ; P_{MS} : pureté moyenne de l'oléacéine par rapport aux matières sèches totales ; P_{PPT} : pureté moyenne de l'oléacéine par rapport aux polyphénols totaux ; MF : matière fraîche

La concentration en oléacéine dans le rétentat final varie de 1,8 à 2,5 g/kg en fonction des margines testées avec un facteur de concentration entre 1,4 et 2,1. La nanofiltration tangentielle avec la membrane DK (polyamide-TFC) peut donc être employée pour pré-concentrer les extraits.

Aussi, dans ces conditions lorsque la microfiltration est combinée à la nanofiltration, les performances globales du procédé sont compatibles avec une application industrielle et permettent de **concentrer les margines de 1,7 à 2,4 fois** pour obtenir une concentration massique d'environ 2 $g \cdot kg^{-1}$ pour des margines de type P2,5 par exemple.

B - Nanofiltration avec membrane polyamide composite

L'utilisation d'une membrane GE (SUEZ™) présentant un seuil de coupure plus élevé (1000 Da) permet d'obtenir des écarts entre les rétentions des différents composés plus prononcés et ainsi de tendre vers des stratégies de purification permettant d'obtenir un compromis entre une rétention d'oléacéine la plus basse possible et une densité de flux, rétention en matières sèches et polyphénols les plus hautes possible.
Avec cette membrane, les pressions de travail intéressantes sont situées entre 20 et 25 bar. Dans ces conditions, la rétention en oléacéine est globalement inférieure à 20 % et les rétentions en matières sèches et polyphénols voisines de 60 % et 50 %, ce qui va permettre une purification au moins partielle du composé cible.
A ces pressions, des densités de flux entre 25 et 29 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ sont atteintes pour les margines clarifiées issues de procédés d'extraction en deux phases ½ (P2,5) et 21 et 22 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ pour la margine clarifiée issue d'un procédé d'extraction en trois phases (P3). Nous nous situons donc dans des zones plus basses qu'avec la membrane DK (polyamide-TFC), les valeurs restant compatibles avec une application industrielle.

La validation du procédé avec la membrane GE (polyamide composite), est réalisée en confirmant que les densités de flux initiales sont plus basses avec ce type de membrane, néanmoins elles diminuent moins vite qu'avec la membrane DK (polyamide-TFC). Finalement, la densité de flux cumulée obtenue est de 24 $kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ (donc supérieure à 10) et reste donc compatible avec une application industrielle. Dans ces conditions, il est possible d'atteindre un FRM voisin de 3, correspondant à un rendement de production de perméat de 67 %.

Le tableau 7 permet de comparer les margines P2,5 clarifiées avant et après la nanofiltration : un facteur de purification en oléacéine proche de 2 est obtenu en relation avec les matières

sèches et proche de 1,5 en relation avec la purification par rapport aux polyphénols totaux. Dans ce cas, le perméat final a une pureté en oléacéine de l'ordre de 3 % par rapport à la MS et de 27 % par rapport aux PPT ce qui fait de la nanofiltration une étape adaptée à la pré-purification et/ou à la purification du composé cible dans les margines brutes :

[Tableau 7]

margines clarifiées initiales			perméat après nanofiltration					facteur de purification de l'oléacéine		FRM
MS (%)	PPT (g/kg de MF)	Oléacéine C (g/kg de MF)	MS (%)	PPT (g/kg de MF)	Oléacéine C (g/kg de MF)	Oléacéine P_{MS} (g/kg de MS)	Oléacéine P_{PPT} (g/100g PPT)	MS	PPT	
5,2 *(0,0)*	4,6 *(0,0)*	0,9 *(0,0)*	2,7 *(0,0)*	3,0 *(0,0)*	0,8 *(0,0)*	29,5 *(2,1)*	26,7 *(2,1)*	1,8 *(0,2)*	1,4 *(0,1)*	2,5

Aussi, dans ces conditions lorsque la microfiltration est combinée à la nanofiltration, les performances globales du procédé restent compatibles avec une application industrielle et permettent de **purifier environ deux fois l'oléacéine** dans les margines par rapport aux polyphénols totaux et un peu plus de deux fois par rapport aux matières sèches totales : pour les margines de type P2,5 par exemple la pureté finale de l'oléacéine est de 2,7 - 3,5 % par rapport aux matières sèches et de 20 - 27 % par rapport aux polyphénols totaux.

L'utilisation de la membrane GE dans un procédé de nanofiltration à la suite d'une microfiltration permet avantageusement de pré-purifier les margines d'olives brutes à un moindre coût. De plus, en fonction de la technique choisie pour finaliser la purification du composé cible, la pureté de l'oléacéine par rapport aux polyphénols totaux obtenue à la fin du procédé (proche de 30 % par rapport aux polyphénols totaux) est avantageuse.

La nanofiltration tangentielle avec membrane DK permet ainsi une concentration en oléacéine (x 3) et une diminution de la quantité/du volume de produit à traiter (/ 3), réduisant la quantité de solvant et permettant de minimiser la dépense d'énergie nécessaire à d'éventuelles étapes de traitement additionnelles.

Ces données valident donc le protocole de nanofiltration tangentielle de l'ensemble des margines testées, et l'application industrielle du couplage microfiltration / nanofiltration.

Exemple 2 : validation des propriétés biologiques de l'oléacéine issue de margines.

Les travaux réalisés ont pour objectif d'évaluer l'activité anti-âge et antioxydante de l'oléacéine produite selon un procédé de l'invention, sur le modèle *in vivo* de nématode *Caenorhabditis elegans. C. elegans* est un modèle de choix d'étude du vieillissement. En effet, de nombreuses voies majeures impliquées dans la longévité sont conservées du nématode jusqu'à l'Homme. Parmi elles, la voie Daf-16 (FOXO chez les mammifères), dont l'activation est impliquée dans l'augmentation de la longévité et la réduction du stress oxydant chez *C. elegans*.

Chez l'Homme, les protéines FOXO sont impliquées dans la maintenance des cellules souches et leur activation est également à l'origine de la transcription de gènes protégeant contre le stress oxydant. Plus particulièrement, FOXO3 est un inhibiteur du facteur NF-kB et donc de l'inflammation. La longévité exceptionnelle chez l'Homme a également été associée à un polymorphisme du gène FOXO3.

Matériel et méthodes

Souches *C.elegans*

Toutes les souches de *C. elegans* utilisées ont été fournies par le Caenorhabditis Genetic Center (CGC, Université du Minnesota, USA). Le transgène daf-16:GFP (souche TJ356) est une souche de C. elegans dans laquelle le facteur de transcription DAF-16 est marqué par la protéine fluorescente GFP, permettant de visualiser sa localisation au sein des cellules (localisation cytoplasmique, intermédiaire ou nucléaire).

La souche N2 correspond à la souche sauvage (sans modification). Il s'agit d'une souche référence.

Origine de l'oléacéine

Trois types d'oléacéine sont ici évaluées :

- extrait d'huile commercial (90 % - Toronto Research Chemicals)
- extrait de margines obtenues selon un procédé de l'invention à 93 %
- molécule de synthèse 99 % (Université de Tsukuba)

L'effet des préparations testées sur la longévité de *C. elegans* est comparé à celui de l'hydroxytyrosol (> 98 % - H4291 Sigma Aldrich). Les nématodes sont placés directement en contact avec l'oléacéine en milieu liquide.

Résultats

Influence de l'oléacéine sur la longévité de *C. elegans* :

L'oléacéine de synthèse (99 % Université de Tsukuba) à 5 µg/mL a permis une augmentation significative de l'espérance de vie moyenne du *C. elegans* sauvage (souche N2) de 16 % (*p-value* <0,0001, Kaplan-Meier).

L'oléacéine extraite de l'huile d'olive (90 % Toronto Research Chemicals) à 5 µg/mL a permis une augmentation significative de l'espérance de vie moyenne du *C. elegans sauvage* (souche N2) de 22% (*p-value* <0,0001, Kaplan-Meier).

L'oléacéine extraite de margines de la variété Picholine (93 % / Production propre) à 5 µg/mL a permis une augmentation significative de l'espérance de vie moyenne du C. elegans sauvage (souche N2) de 18 % (*p-value* <0,0001, Kaplan-Meier).

Il n'y a aucune différence significative entre ces trois traitements, ce qui permet de conclure que l'activité observée des extraits d'huile et de margines est due à l'oléacéine et que sa provenance n'a pas d'impact sur l'activité pour des puretés similaires. L'oléacéine a donc un impact positif sur la longévité de *C. elegans* ; cette activité est préservée dans les fractions issues des procédés selon l'invention.

L'activité de l'oléacéine a été comparée à celle de l'hydroxytyrosol (>98%/ H4291 Sigma Aldrich), autre molécule extraite des margines comme ingrédient cosmétique et connue pour son activité antioxydante.

L'hydroxytyrosol à 5 µg/mL n'a quant à lui pas permis une augmentation de l'espérance de vie moyenne du *C.elegans* sauvage (souche N2) (*p-value* = 0,238, Kaplan-Meier).

Brunetti *et al.* (2020) ont précédemment montré qu'un traitement avec l'hydroxytyrosol à 250 µg/mL permet une augmentation significative de l'espérance de vie moyenne du *C. elegans* sauvage (souche N2) de 14%.

Ces résultats nous permettent de conclure à l'efficacité supérieure de l'oléacéine (au moins 50X plus active) par rapport à l'hydroxytyrosol sur la longévité de *C. elegans*.

Identification des voies d'action de l'oléacéine sur la longévité de *C. elegans*.

Pour ces résultats, l'oléacéine extraite de l'huile d'olive (90 % / Toronto Research Chemicals) a été utilisée. Aucune différence d'activité n'a été constatée dans cette expérience avec l'oléacéine extraite des margines, ce qui démontre la préservation des propriétés de l'oléacéine en tant qu'actif principal, à l'issue du procédé d'extraction des margines. L'effet de l'oléacéine à 5 µg/mL sur la longévité a été étudié sur des *C. elegans* mutants où l'expression d'un gène en particulier a été réprimée. Si l'effet constaté sur le sauvage disparait sur le mutant, alors le gène réprimé est impliqué.

L'oléacéine à 5 µg/mL n'a pas permis une augmentation de l'espérance de vie moyenne du mutant *C. elegans Daf-16* (souche GR1307) (*p-value* = 0,291, Kaplan-Meier).

La voie *Daf-16* est donc impliquée dans l'effet positif de l'oléacéine sur la longévité du *C. elegans* sauvage (souche N2).

Le transgène daf-16::GFP (souche TJ356) est une souche de *C. elegans* dans laquelle le facteur de transcription DAF-16 est marqué par la protéine fluorescente GFP, permettant de visualiser sa localisation au sein des cellules (localisation cytoplasmique, intermédiaire ou nucléaire). L'activation de la voie Daf-16 est associée à une translocation nucléaire de son facteur de transcription. Un pré-traitement d'oléacéine à 5 µg/mL a permis une augmentation significative de la translocation nucléaire du facteur de transcription DAF-16::GFP de 10% (multipliée par 2) par rapport au contrôle (*p-value* < 0,0001, test z de comparaison des proportions).

L'oléacéine est donc un activateur de la voie *Daf-16*.

L'activation du facteur de transcription DAF-16/FOXO par l'oléacéine peut être la résultante de son action sur des partenaires de DAF-16/FOXO présents en amont sur la voie. Les expérimentations suivantes explorent la possibilité que l'activation de la voie Daf-16/FOXO par l'oléacéine résulte de son action sur deux partenaires en particulier : *Daf-2* (IGF-1 chez l'homme) et *Sir-2.1* (SIRT1 chez l'homme) :

- *Daf-2*/IGF-1 exerce un effet inhibiteur sur l'activité du facteur de transcription DAF-16/FOXO qui est sa cible principale. Lorsque l'activité du gène *Daf-2* est diminuée, celle du produit du gène *Daf-16* se retrouve donc suractivée.
- le produit du gène *Sir-2.1*/SIRT1 est un modulateur du facteur de transcription DAF-16/FOXO impliqué dans la résistance au stress. Chez l'Homme, SIRT1 accroit la capacité de FOXO à induire la résistance au stress oxydant des cellules et prévient leur apoptose. En l'absence du modulateur SIR-2.1/SIRT1, l'activation de DAF-16/FOXO par le stress induit l'apoptose des cellules endommagées plutôt que leur survie et résistance.

L'oléacéine à 5 µg/mL a permis une augmentation significative de l'espérance de vie moyenne du mutant *C. elegans Daf-2* (souche CB1370) de 21% ce qui est similaire à l'effet constaté sur la souche sauvage (*p-value* < 0,0001, Kaplan-Meier). *Daf-2* n'est donc pas impliqué dans l'effet positif de l'oléacéine sur la longévité du *C. elegans* sauvage (souche N2). L'activation de Daf-16/FOXO par l'oléacéine est donc indépendante de *Daf-2* (insuline/IGF1 indépendante).

L'oléacéine à 5 µg/mL n'a pas permis une augmentation de l'espérance de vie moyenne du mutant *C. elegans Sir-2.1* (souche VC199) (*p-value* = 0,454, Kaplan-Meier). *Sir-2.1* est donc impliqué dans l'effet positif de l'oléacéine sur la longévité du *C. elegans* sauvage (souche N2). L'activation de DAF-16/FOXO par l'oléacéine est donc reliée à l'activation de SIR-2.1/SIRT1.

Influence de l'oléacéine sur le stress thermique et oxydant chez *C. elegans*.

Pour ces résultats, l'oléacéine extraite de l'huile d'olive (90%/Toronto Research Chemicals) a été utilisée. Aucune différence d'activité n'a été constatée avec l'oléacéine extraite des margines.

Le stress thermique provoque chez *C. elegans* une augmentation des radicaux libres endogènes et donc un stress oxydant in situ. Un pré-traitement d'oléacéine à 5 µg/mL a permis une augmentation significative du taux de survie du *C. elegans* sauvage (souche N2) de près de 20% par rapport au contrôle après une exposition à un stress thermique de 35°C pendant 5 heures (*p-value* < 0,0001, test z de comparaison des proportions). L'oléacéine protège donc *C. elegans* du stress thermique et donc d'un stress oxydant endogène.

L'eau oxygénée (H_2O_2) ajoutée dans le milieu provoque chez C. elegans un stress oxydant d'origine exogène. Un pré-traitement d'oléacéine à 5 µg/mL a permis une augmentation significative du taux de survie du *C. elegans* sauvage (souche N2) de 15% par rapport au contrôle après une exposition à 0,6 mM d'H_2O_2 pendant 30 minutes (*p-value* < 0,0001, test z de comparaison des proportions). L'oléacéine protège donc *C. elegans* du stress oxydant exogène.

Revendications

1. Procédé de traitement de margines d'huile d'olive, comprenant les étapes suivantes :

a) fourniture d'une composition de margine d'huile d'olive, la margine étant caractérisée par une teneur en matière sèche comprise entre 3% et 20% de la masse totale de la composition;

b) ajustement du pH de la composition à un pH acide, compris entre 3,5 et 5,5;

c) traitement enzymatique de la composition ajustée ;

d) traitement de la composition par microfiltration (MF) à une température allant de 45°C à 55°C, et recueil de la fraction microfiltrée ;

e) traitement de la fraction microfiltrée par nanofiltration (NF), et recueil de la fraction nanofiltrée.

2. Procédé de traitement de margines d'huile d'olive selon la revendication 1, la margine étant caractérisée par une teneur en masse sèche comprise entre 4% et 13% de la masse totale de la composition.

3. Procédé de traitement de margines d'huile d'olive selon l'une des revendications 1 ou 2, la margine étant issue d'un procédé en système deux phases ½ ou trois phases.

4. Procédé de traitement de margines d'huile d'olive selon l'une quelconque des revendications précédentes, la margine étant issue de la variété Picholine, ou d'un mélange variétal comprenant la variété Picholine.

5. Procédé de traitement de margines d'huile d'olive selon l'une quelconque des revendications précédentes, l'étape de traitement enzymatique étant réalisée en présence d'une ou plusieurs enzymes pectinolytiques.

6. Procédé de traitement de margines d'huile d'olive selon l'une quelconque des revendications précédentes, l'étape de microfiltration (MF) étant réalisée à travers une membrane en céramique de diamètre moyen de pores compris entre 0,1 et 1,4 µm ; l'étape de microfiltration (MF) étant en particulier une étape de microfiltration tangentielle (MFT).

7. Procédé d'extraction d'oléacéine, comprenant la mise en œuvre d'un procédé de traitement de margines d'huile d'olive selon l'une quelconque des revendications précédentes, et la présence d'au moins une étape de recueil d'une fraction comprenant de

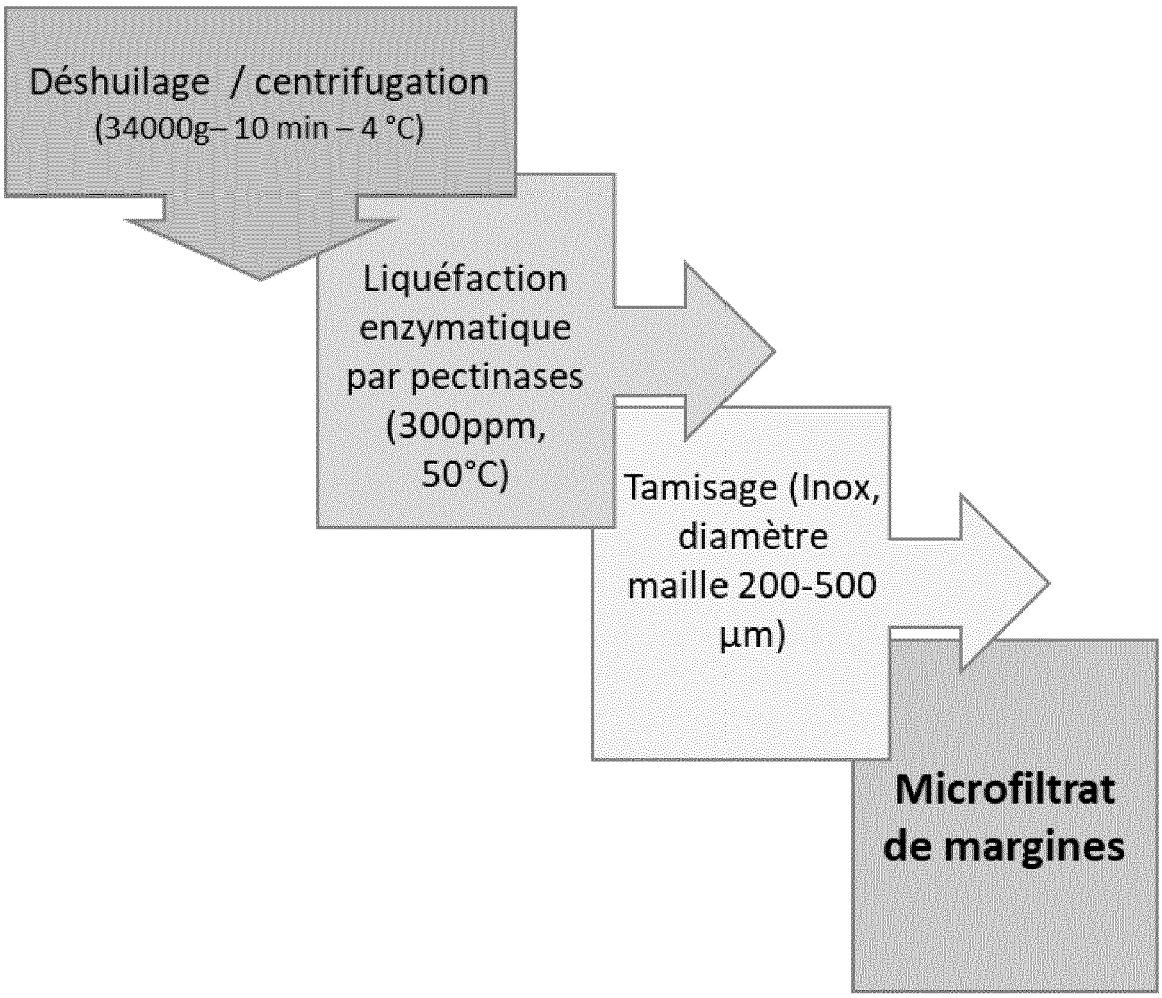
l'oléacéine ; en particulier une étape de recueil d'une fraction comprenant l'oléacéine à partir de la fraction nanofiltrée.

8. Composition d'oléacéine obtenue par un procédé d'extraction selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend ladite fraction de margine d'huile d'olive.

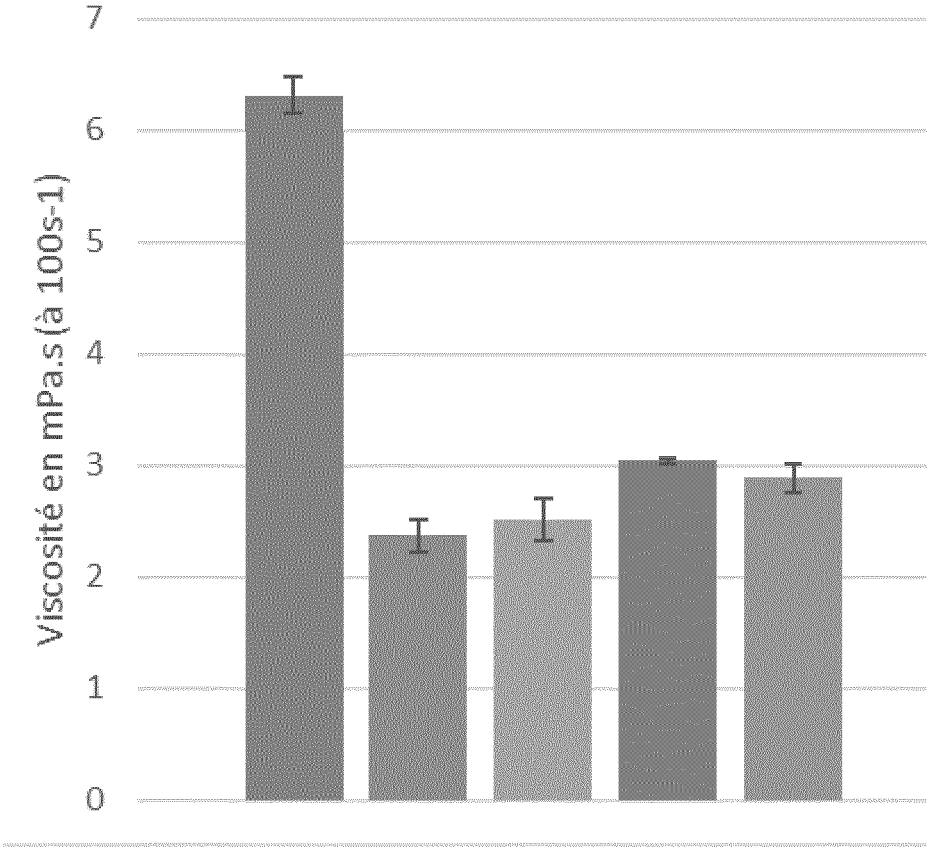
9. Composition d'oléacéine selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle comprend ladite fraction de margine d'huile d'olive ; pour son utilisation en tant que médicament.

10. Utilisation cosmétique ou alimentaire d'une composition d'oléacéine selon la revendication 8.

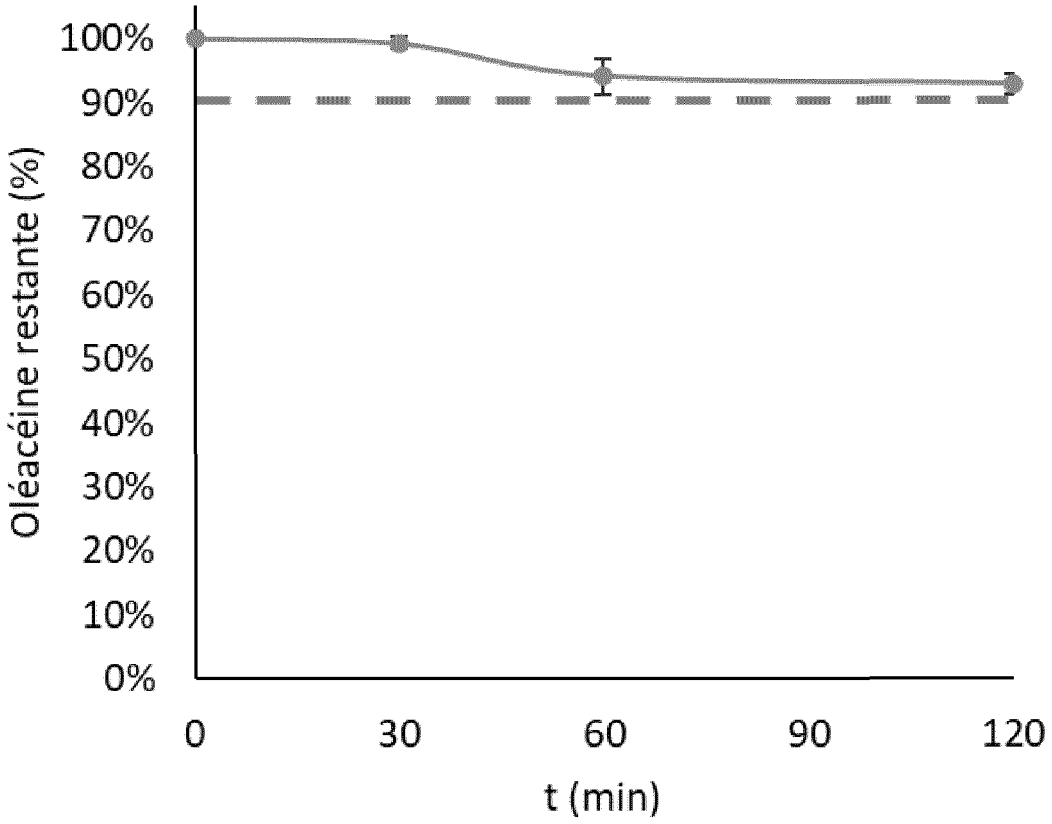
[Fig. 1]


Déshuilage / centrifugation
(34000g– 10 min – 4 °C)
Liquéfaction enzymatique par pectinases (300ppm, 50°C)
Tamisage (Inox, diamètre maille 200-500 µm)
Microfiltrat de margines

[Fig. 2]



[Fig. 3]


100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Oléacéine restante (%)
0
30
60
90
120
t (min)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2024/059896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 33/105(2016.01)i; ***B01D 61/02***(2006.01)i; ***B01D 61/14***(2006.01)i; ***B01D 61/58***(2006.01)i; ***C02F 1/44***(2023.01)i; ***A61K 8/37***(2006.01)i; ***A61K 8/9789***(2017.01)i; ***A61Q 19/00***(2006.01)i; ***C02F 9/00***(2023.01)i; *B01D 71/02*(2006.01)n; *C02F 1/38*(2023.01)n; *C02F 1/66*(2023.01)n; *C02F 3/34*(2023.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01D; C02F; A23L

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1773721 B1 (ENEA ENTE NUOVE TEC [IT]; VERDIANA S R L [IT]) 05 October 2011 (2011-10-05) cited in the application	1-3,5-10
Y	the whole document	4
X	WO 2022219581 A1 (FATTORIA LA VIALLA DI GIANNI ANTONIO E BANDINO LO FRANCO SOC AGRICOLA) 20 October 2022 (2022-10-20) cited in the application the whole document	8-10
X	WO 2021180996 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; UNIV SEVILLA [ES]) 16 September 2021 (2021-09-16) cited in the application	8,10
Y	the whole document	4

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 June 2024	**05 July 2024**
Name and mailing address of the ISA/EP **European Patent Office** **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands (Kingdom of the)** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	Authorized officer **Fiorenza, Francesca** Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MONIKA CZERWISKA ET AL. "A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein" *FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL,* Vol. 131, No. 3, 20 September 2011 (2011-09-20), pages 940-947, [retrieved on 2011-09-28] DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.09.082 ISSN: 0308-8146, XP028104623 the whole document	1-10
A	HANAA ZBAKH ET AL. "Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review" *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS, ELSEVIER BV, NL,* Vol. 4, No. 1, 05 January 2012 (2012-01-05), pages 53-65, [retrieved on 2012-01-13] DOI: 10.1016/J.JFF.2012.01.002 ISSN: 1756-4646, XP028402494 the whole document	1-10
A	EP 3594198 A2 (UNIV SEVILLA [ES]) 15 January 2020 (2020-01-15) the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP2024/059896

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
EP 1773721 B1	05 October 2011	AT E527215 T1	15 October 2011
		AU 2005254342 A1	29 December 2005
		EP 1773721 A1	18 April 2007
		ES 2374280 T3	15 February 2012
		WO 2005123603 A1	29 December 2005
WO 2022219581 A1	20 October 2022	EP 4322764 A1	21 February 2024
		WO 2022219581 A1	20 October 2022
WO 2021180996 A1	16 September 2021	ES 2927301 A2	03 November 2022
		WO 2021180996 A1	16 September 2021
EP 3594198 A2	15 January 2020	EP 3594198 A2	15 January 2020
		ES 2690412 A2	20 November 2018
		WO 2018162769 A2	13 September 2018

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2024/059896

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A23L33/105 B01D61/02 B01D61/14 B01D61/58 C02F1/44
A61K8/37 A61K8/9789 A61Q19/00 C02F9/00
ADD. B01D71/02 C02F1/38 C02F1/66 C02F3/34

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
B01D C02F A23L

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 1 773 721 B1 (ENEA ENTE NUOVE TEC [IT]; VERDIANA S R L [IT]) 5 octobre 2011 (2011-10-05) cité dans la demande	1-3,5-10
Y	le document en entier	4

X	WO 2022/219581 A1 (FATTORIA LA VIALLA DI GIANNI ANTONIO E BANDINO LO FRANCO SOC AGRICOLA) 20 octobre 2022 (2022-10-20) cité dans la demande le document en entier	8-10

X	WO 2021/180996 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; UNIV SEVILLA [ES]) 16 septembre 2021 (2021-09-16) cité dans la demande	8,10
Y	le document en entier	4

	-/--	

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

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

* Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
27 juin 2024	05/07/2024

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

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2024/059896

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MONIKA CZERWISKA ET AL: "A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 131, no. 3, 20 septembre 2011 (2011-09-20), pages 940-947, XP028104623, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.09.082 [extrait le 2011-09-28] le document en entier	1-10

A	HANAA ZBAKH ET AL: "Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review", JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 4, no. 1, 5 janvier 2012 (2012-01-05) , pages 53-65, XP028402494, ISSN: 1756-4646, DOI: 10.1016/J.JFF.2012.01.002 [extrait le 2012-01-13] le document en entier	1-10

A	EP 3 594 198 A2 (UNIV SEVILLA [ES]) 15 janvier 2020 (2020-01-15) le document en entier	1-10

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2024/059896

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1773721 B1	05-10-2011	AT E527215 T1	15-10-2011
		AU 2005254342 A1	29-12-2005
		EP 1773721 A1	18-04-2007
		ES 2374280 T3	15-02-2012
		WO 2005123603 A1	29-12-2005
WO 2022219581 A1	20-10-2022	EP 4322764 A1	21-02-2024
		WO 2022219581 A1	20-10-2022
WO 2021180996 A1	16-09-2021	ES 2927301 A2	03-11-2022
		WO 2021180996 A1	16-09-2021
EP 3594198 A2	15-01-2020	EP 3594198 A2	15-01-2020
		ES 2690412 A2	20-11-2018
		WO 2018162769 A2	13-09-2018