

# THÈSE

*Présentée devant*

L'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

*Pour obtenir le grade de*

DOCTEUR de L'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

Mention Biochimie, Chimie et Technologie des aliments

*Par*

**Charlotte SY**

École Doctorale Sciences des Procédés, Sciences des Aliments,  
de Montpellier (ED 306)

TITRE DE LA THÈSE :

**Nouveaux caroténoïdes issus de bactéries marines :  
étude de leur stabilité, de leur pouvoir antioxydant et de leur  
biodisponibilité à l'aide de modèles chimiques et biologiques.  
Comparaison avec les propriétés fonctionnelles de  
caroténoïdes de référence.**

Soutenue le 13 décembre 2011 devant la commission d'examen :

P. BOREL	Directeur de Recherches, INRA Marseille	Directeur de thèse
C. CARIS-VEYRAT	Chargée de Recherches, INRA Avignon	Directrice de thèse
O. DANGLES	Professeur, Université D'Avignon et des Pays de Vaucluse	Examinateur
J.M. LECERF	Professeur, Institut Pasteur Lille	Rapporteur
M. REGLIER	Directeur de Recherches, CNRS Marseille	Rapporteur
E. ROCK	Directeur de Recherches, INRA Clermont-Theix	Examinateur
M. SABATIER	Manager de Projet, Nestlé Research Center Lausanne	Membre invité



# THÈSE

*Présentée devant*

L'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

*Pour obtenir le grade de*

DOCTEUR de L'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

Mention Biochimie, Chimie et Technologie des aliments

*Par*

**Charlotte SY**

École Doctorale Sciences des Procédés, Sciences des Aliments,  
de Montpellier (ED 306)

TITRE DE LA THÈSE :

**Nouveaux caroténoïdes issus de bactéries marines :  
étude de leur stabilité, de leur pouvoir antioxydant et de leur  
biodisponibilité à l'aide de modèles chimiques et biologiques.  
Comparaison avec les propriétés fonctionnelles de  
caroténoïdes de référence.**

Soutenue le 13 décembre 2011 devant la commission d'examen :

P. BOREL	Directeur de Recherches, INRA Marseille	Directeur de thèse
C. CARIS-VEYRAT	Chargée de Recherches, INRA Avignon	Directrice de thèse
O. DANGLES	Professeur, Université D'Avignon et des Pays de Vaucluse	Examinateur
J.M. LECERF	Professeur, Institut Pasteur Lille	Rapporteur
M. REGLIER	Directeur de Recherches, CNRS Marseille	Rapporteur
E. ROCK	Directeur de Recherches, INRA Clermont-Theix	Examinateur
M. SABATIER	Manager de Projet, Nestlé Research Center Lausanne	Membre invité



# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>7</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION : PRESENTATION DE LA THESE</b> .....	<b>17</b>
1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....	19
2. APPROCHE RETENUE ET ETAPES DE LA THESE .....	24
3. RESULTATS PRELIMINAIRES .....	27
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE GÉNÉRALE</b> .....	<b>31</b>
1. GENERALITES SUR LES CAROTENOÏDES .....	33
2. LES CAROTENOÏDES, DES MOLECULES FONCTIONNELLES DE L'ALIMENTATION .....	59
3. DEVENIR ET ENVIRONNEMENT DES CAROTENOÏDES DANS LE TUBE DIGESTIF HUMAIN .....	68
4. EVALUATION DES PROPRIETES DES CAROTENOÏDES DANS DES MILIEUX D'ETUDE MODELES .....	80
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>91</b>
1. PRODUITS CHIMIQUES ET SOLUTIONS .....	95
2. METHODES DE PREPARATION ET D'IDENTIFICATION DES EXTRAITS DE CAROTENOÏDES BACTERIENS	105
3. MODES OPERATOIRES ET EQUIPEMENTS POUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE .....	110
4. MODES OPERATOIRES ET EQUIPEMENTS POUR L'ETUDE NUTRITIONNELLE .....	136
5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES .....	162
<b>PROBLEMATIQUE A : STABILITÉ ET MÉCANISMES RÉACTIONNELS DES CAROTÉNOÏDES..</b>	<b>163</b>
1. ÉTAT DE L'ART : DEGRADATION NON ENZYMATIQUE DES CAROTENOÏDES, EXEMPLES .....	165
2. PUBLICATION I - IRON-INDUCED AUTOXIDATION OF (ALL-E)-B-CAROTENE IN MODEL GASTRIC CONDITIONS: KINETICS, PRODUCTS AND MECHANISM .....	183
3. PUBLICATION II - STABILITY OF NOVEL BACTERIAL CAROTENOIDS IN THE PRESENCE OF IRON IN A MICELLAR MODEL OF THE GASTRIC COMPARTMENT: COMPARISON WITH COMMON CAROTENOIDS.....	215
4. AUTRES RESULTATS.....	245
5. SYNTHÈSE DE LA PROBLEMATIQUE A.....	253
<b>PROBLEMATIQUE B : RÔLE DES CAROTÉNOÏDES CONTRE L'OXYDATION LIPIDIQUE</b> .....	<b>257</b>
1. ÉTAT DE L'ART : PEROXYDATION LIPIDIQUE ET POUVOIR ANTIOXYDANT.....	259
2. PUBLICATION III - INHIBITION BY NOVEL BACTERIAL CAROTENOIDS OF IRON-INDUCED PEROXIDATION OF LINOLEIC ACID IN MODEL GASTRIC ONDITIONS: COMPARISON WITH COMMON CAROTENOIDS .....	277
3. PUBLICATION IV - INTERACTIONS BETWEEN CAROTENOIDS OF A NOVEL BACTERIAL EXTRACT AND THEIR IMPACT ON STABILITY, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND SYNERGISM WITH PHENOLIC ANTIOXIDANTS .....	307
4. AUTRES RÉSULTATS.....	335
5. SYNTHÈSE DE LA PROBLEMATIQUE B.....	341

<b>PROBLEMATIQUE C : BIOACCESSIBILITÉ ET BIODISPONIBILITÉ DES CAROTÉNOÏDES .....</b>	<b>347</b>
1. ÉTAT DE L'ART : BIOACCESSIBILITE, ABSORPTION ET DISTRIBUTION TISSULAIRE.....	349
2. PUBLICATION V - BIOAVAILABILITY OF CAROTENIDS FROM SPORE-FORMING <i>BACILLUS</i> STRAINS, USING <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> MODELS .....	367
3. PUBLICATION VI - CHEMICAL STRUCTURE OF CAROTENIDS, BY AFFECTING THEIR HYDROPHOBICITY, IS A KEY FACTOR THAT MODULATE THEIR BIOACCESSIBILITY, ABSORPTION EFFICIENCY AND TISSUE DISTRIBUTION .....	399
4. AUTRES RESULTATS.....	429
5. SYNTHÈSE DE LA PROBLEMATIQUE C.....	441
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>445</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>457</b>
1. BILAN DE L'ETUDE .....	459
2. PERSPECTIVES : COMPLEXIFICATION DES MODELES ET POURSUITE DE L'ETUDE .....	461
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>465</b>
<b>COMMUNICATIONS.....</b>	<b>479</b>

# TABLE DES MATIERES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>7</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION : PRESENTATION DE LA THESE.....</b>	<b>17</b>
<b>1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....</b>	<b>19</b>
<b>2. APPROCHE RETENUE ET ETAPES DE LA THESE .....</b>	<b>24</b>
<b>3. RESULTATS PRELIMINAIRES .....</b>	<b>27</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE GÉNÉRALE.....</b>	<b>31</b>
<b>1. GENERALITES SUR LES CAROTENOÏDES .....</b>	<b>33</b>
1.1. Définition.....	33
1.2. Origine, organismes producteurs et principaux caroténoïdes.....	33
1.3. Caractéristiques structurales .....	37
1.3.1. Classification, structure générale et isomérisation.....	37
1.3.2. Spécificités des caroténoïdes bactériens .....	38
1.4. Caractérisation des caroténoïdes .....	40
1.4.1. Spectroscopie .....	40
1.4.2. Chromatographie .....	41
1.5. Propriétés physico-chimiques .....	42
1.5.1. Solubilité .....	42
1.5.2. Interactions moléculaires .....	42
1.5.3. Réactivité .....	44
1.6. Fonctions biologiques .....	44
1.6.1. Rôle dans la photosynthèse .....	44
1.6.2. Rôles de signalisation et de reproduction.....	46
1.6.3. Rôle dans l'organisation des membranes cellulaires .....	47
1.6.4. Défenses antioxydantes .....	49
1.6.5. Photorécepteurs et rôle dans la vision .....	49
1.6.6. Photoprotection .....	50
1.7. Rôle en nutrition préventive chez l'homme.....	51
1.7.1. Modes d'action des caroténoïdes dans l'organisme .....	51
1.7.1.1. Activité provitaminique A.....	52
1.7.1.2. Activités de prévention contre certaines maladies .....	54
1.7.1.3. Données d'études épidémiologiques et d'intervention avec les principaux caroténoïdes de l'alimentation .....	55
1.7.2. Implications potentielles des métabolites non-rétinoïques des caroténoïdes .....	56
<b>2. LES CAROTENOÏDES, DES MOLECULES FONCTIONNELLES DE L'ALIMENTATION .....</b>	<b>59</b>
2.1. Ingrédients fonctionnels, aliments fonctionnels et compléments alimentaires.....	59
2.2. Utilisation des caroténoïdes en formulation, comme additifs ou compléments alimentaires .....	60
2.2.1. Applications des caroténoïdes .....	60
2.2.2. Recommandations et réglementation .....	63
2.2.3. Problématiques nutritionnelles liées à la stabilité et à la biodisponibilité des caroténoïdes .....	64
2.3. Intérêts des caroténoïdes bactériens dans l'industrie agroalimentaire, avantages des biotechnologies .....	65
<b>3. DEVENIR ET ENVIRONNEMENT DES CAROTENOÏDES DANS LE TUBE DIGESTIF HUMAIN .....</b>	<b>68</b>
3.1. Caractéristiques physico-chimiques du bol alimentaire dans le compartiment gastrique .....	68
3.1.1. Volume de l'estomac .....	68

3.1.2. pH du bol alimentaire au sein de l'estomac .....	69
3.1.3. Teneur en oxygène dans l'estomac .....	69
3.1.4. Le fer, une molécule pro-oxydante importante dans l'estomac .....	70
3.1.5. Organisation des lipides dans le compartiment gastrique : suspensions simples et émulsification .....	71
<b>3.2. Caractéristiques physico-chimiques dans le duodénum .....</b>	<b>73</b>
3.2.1. pH au niveau du duodénum .....	73
3.2.2. Sécrétions biliaires et pancréatiques, formation de micelles mixtes .....	73
3.2.3. Teneur en oxygène dans le compartiment intestinal .....	74
<b>3.3. Métabolisme des caroténoïdes dans le tube digestif .....</b>	<b>75</b>
3.3.1. Dans le compartiment gastro-intestinal .....	75
3.3.2. Dans les entérocytes de la muqueuse intestinale .....	76
3.3.3. De l'intestin vers le foie, puis les tissus cibles .....	78
<b>4. EVALUATION DES PROPRIETES DES CAROTENOÏDES DANS DES MILIEUX D'ETUDE MODELES .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1. Comportement des caroténoïdes dans divers milieux et matrices .....</b>	<b>80</b>
4.1.1. Aux interfaces eau / huile .....	80
4.1.2. Dans les bicouches lipidiques .....	81
4.1.3. En dispersion .....	82
<b>4.2. Cas des systèmes modèles adaptés à l'étude des caroténoïdes au niveau du tube digestif .....</b>	<b>83</b>
4.2.1. Modèles chimiques du contenu du compartiment gastrique .....	83
4.2.1.1. Influence du choix des tensioactifs .....	83
4.2.1.2. Modèles micellaires mimant les suspensions simples dans l'estomac .....	85
4.2.1.3. Complexification du modèle : milieu émulsionné .....	87
4.2.2. Modèles biologiques du compartiment gastro-intestinal .....	88
4.2.2.1. Modèles des digestions gastrique et duodénale .....	88
4.2.2.2. Modèle Caco-2 de l'absorption intestinale .....	89
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>91</b>
<b>1. PRODUITS CHIMIQUES ET SOLUTIONS .....</b>	<b>95</b>
<b>1.1. Sources de caroténoïdes et autres antioxydants .....</b>	<b>95</b>
1.1.1. Solutions tampon .....	97
1.1.2. Stabilisants et émulsifiants .....	97
1.1.3. Sources d'acides gras poly-insaturés .....	98
1.1.4. Initiateurs d'oxydation .....	99
1.1.5. Réactifs utilisés pour le suivi de l'état redox du fer .....	99
<b>1.3. Composants utilisés dans les modèles d'études nutritionnelles .....</b>	<b>100</b>
1.3.1. Produits alimentaires utilisés dans les digestions <i>in vitro</i> .....	100
1.3.2. Composants du système de digestion <i>in vitro</i> .....	100
1.3.3. Kits utilisés pour le dosage des composants des micelles mixtes .....	101
1.3.4. Composants des micelles mixtes artificielles .....	101
1.3.5. Solutions utilisées pour la culture des cellules Caco-2 TC-7 .....	102
1.3.6. Produits utilisés pour le dosage des protéines dans les tissus de rat .....	102
1.3.7. Produits utilisés pour l'étude de l'expression des gènes dans les tissus de rat .....	102
<b>1.4. Produits utilisés pour la caractérisation des caroténoïdes et de leurs dérivés par analyses HPLC et GC-MS .....</b>	<b>103</b>
<b>1.5. Solvants .....</b>	<b>103</b>
<b>2. METHODES DE PREPARATION ET D'IDENTIFICATION DES EXTRAITS DE CAROTENOÏDES BACTERIENS .....</b>	<b>105</b>
<b>2.1. Détermination qualitative de la composition des extraits bactériens de HU36 et de GB1 par analyse UPLC-MS .....</b>	<b>105</b>
<b>2.2. Séparation et purification des extraits bruts de caroténoïdes bactériens .....</b>	<b>106</b>
2.2.1. Purification par chromatographie liquide sur colonne ouverte .....	106
2.2.2. Analyse des fractions d'élution par UPLC-MS .....	107
<b>2.3. Détermination quantitative de la composition des extraits bactériens .....</b>	<b>108</b>
2.3.1. Évaluation des coefficients d'extinction molaire moyens des cocktails de caroténoïdes bactériens .....	108

2.3.2. Quantification des caroténoïdes et des autres isoprénoïdes présents dans les extraits bruts de HU36 et de GB1 .....	109
<b>3. MODES OPERATOIRES ET EQUIPEMENTS POUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE .....</b>	<b>110</b>
3.1. Préparation des solutions stocks de caroténoïdes .....	110
3.2. Préparation des solutions de fer .....	111
3.3. Elaboration des systèmes chimiques modèles du compartiment gastrique .....	112
3.3.1. Elaboration du modèle micellaire .....	112
3.3.1.1. Préparation de la solution .....	112
3.3.1.2. Etude de l'effet de divers tensioactifs sur les caractéristiques de l'émulsion .....	113
3.3.2. Elaboration du modèle émulsionné huile/eau .....	113
3.3.2.1. Purification de l'huile .....	113
3.3.2.2. Préparation de l'émulsion .....	114
3.3.2.3. Caractérisation du modèle : microscopie optique et granulométrie laser .....	115
3.4. Initiation de l'oxydation .....	116
3.4.1. En milieu micellaire, en l'absence de sources d'acides gras .....	116
3.4.2. En milieu micellaire, en présence d'acide linoléique .....	118
3.4.3. En émulsion huile/eau, en présence des acides gras de l'huile de tournesol .....	118
3.5. Suivi de la composition des milieux chimiques modèles en présence de fer .....	119
3.5.1. Mesure de la stabilité des caroténoïdes par spectrophotométrie .....	119
3.5.2. Dosages du fer et du peroxyde d'hydrogène .....	122
3.5.3. Mesure de l'oxygène dissous .....	125
3.5.4. Mesure des produits primaires de l'oxydation lipidique .....	126
3.5.4.1. Enregistrement des spectres d'absorption des hydroperoxydes en milieu micellaire .....	126
3.5.4.2. Enregistrement des spectres d'absorption des diènes conjugués en émulsion huile/eau .....	126
3.5.5. Mesure des produits secondaires de l'oxydation lipidique par GC-MS .....	127
3.6. Caractérisation des produits de dégradation des caroténoïdes par UPLC-MS .....	129
3.6.1. Préparation des échantillons .....	129
3.6.2. Méthode d'analyse .....	130
3.6.3. Confirmation de l'identification des produits de dégradation du $\beta$ -carotène .....	132
3.7. Modélisation mathématique des cinétiques de réaction entre les caroténoïdes et le fer .....	133
3.8. Calcul du pouvoir antioxydant par inhibition de la peroxydation lipidique .....	133
<b>4. MODES OPERATOIRES ET EQUIPEMENTS POUR L'ETUDE NUTRITIONNELLE .....</b>	<b>136</b>
4.1. Préparation des solutions mères de caroténoïdes .....	136
4.2. Digestions <i>in vitro</i> .....	137
4.2.1. Préparation des repas tests .....	137
4.2.2. Préparation des homogénats .....	138
4.2.3. Digestion simulée des repas tests .....	138
4.2.4. Extraction de la fraction micellaire des digestats .....	140
4.2.5. Mesures granulométriques sur les fractions micellaires .....	140
4.2.6. Dosage de la composition des micelles mixtes .....	140
4.3. Etude microbiologique sur le matériel bactérien au cours des digestions <i>in vitro</i> .....	142
4.3.1. Dénombrement du contenu bactérien total et des spores aux différentes étapes de la digestion .....	142
4.3.2. Détermination de la sensibilité des spores de HU36 et GB1 à la concentration de sels biliaires du milieu de digestion .....	144
4.4. Etudes sur micelles mixtes artificielles .....	145
4.4.1. Préparation des micelles mixtes artificielles .....	145
4.4.2. Etude cinétique du transfert des cristaux de caroténoïdes vers des micelles mixtes préformées .....	146
4.4.3. Mesure de l'incorporation des caroténoïdes dans des micelles artificielles .....	146
4.5. Expérimentations d'absorption intestinale <i>in vitro</i> .....	147
4.5.1. Culture cellulaire .....	147
4.5.2. Mesure de l'absorption des caroténoïdes par le modèle cellulaire Caco-2 .....	148
4.6. Expérimentations <i>in vivo</i> chez le rat .....	149
4.6.1. Gavages à base d'huile d'arachide enrichie en caroténoïdes .....	149
4.6.2. Dosage des protéines sur les échantillons de tissus prélevés chez le rat .....	151
4.6.3. Etude de l'expression génétique dans les cellules du tissu adipeux et du foie .....	152
4.6.3.1. Extraction des ARN totaux .....	152

4.6.3.2. Transcription reverse des ADNc .....	153
4.6.3.3. Réaction quantitative de polymérisation en chaîne (Q-PCR) .....	154
<b>4.7. Quantification des caroténoïdes par analyse HPLC.....</b>	<b>155</b>
4.7.1. Extraction des caroténoïdes lors des expérimentations <i>in vitro</i> .....	155
4.7.2. Extraction des caroténoïdes lors des expérimentations <i>in vivo</i> .....	156
4.7.2.1. A partir des échantillons de sang .....	156
4.7.2.2. A partir des échantillons de foie .....	157
4.7.2.3. A partir des échantillons de tissu adipeux épидидymal.....	158
4.7.3. Méthode d'analyse .....	159
<b>4.8. Calculs de bioaccessibilité, de taux de micellarisation, d'efficacité d'absorption intestinale et de biodisponibilité.....</b>	<b>161</b>
<b>5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES .....</b>	<b>162</b>

## PROBLEMATIQUE A : STABILITÉ ET MÉCANISMES RÉACTIONNELS DES CAROTÉNOÏDES.. 163

<b>1. ÉTAT DE L'ART : DEGRADATION NON ENZYMATIQUE DES CAROTENOÏDES, EXEMPLES .....</b>	<b>165</b>
1.1. Autoxydation .....	165
1.1.1. Mécanismes réactionnels .....	165
1.1.2. Données cinétiques .....	168
1.2. Sensibilité à la chaleur .....	169
1.3. Sensibilité à la lumière .....	171
1.3.1. Par réaction directe avec l'énergie lumineuse.....	171
1.3.2. En présence de réactifs photosensibilisateurs .....	172
1.4. Dégradation chimique.....	173
1.4.1. Réaction avec les acides .....	173
1.4.2. Réactions en présence d'oxydants.....	173
1.5. Réactions avec les radicaux libres : transferts d'électrons, déprotonation et adduits .....	176
1.5.1. Mécanismes réactionnels .....	176
1.5.2. Données cinétiques .....	178
1.6. Réactions avec les métaux de transition, transferts d'électrons .....	179
1.6.1. Mécanismes réactionnels .....	179
1.6.2. Effets d'autres facteurs d'oxydation .....	181
<b>2. PUBLICATION I - IRON-INDUCED AUTOXIDATION OF (ALL-E)-B-CAROTENE IN MODEL GASTRIC CONDITIONS: KINETICS, PRODUCTS AND MECHANISM .....</b>	<b>183</b>
2.1. Abstract.....	183
2.2. Introduction .....	184
2.3. Experimental procedures .....	187
2.4. Results .....	192
2.4.1. Choice of the surfactant .....	192
2.4.2. Influence of dioxygen on kinetics of iron-induced $\beta$ -carotene oxidation .....	193
2.4.3. Influence of iron concentration on kinetics of iron-induced $\beta$ -carotene oxidation .....	194
2.4.4. Non-volatile products of $\beta$ -carotene oxidation.....	196
2.4.5. Volatile products of $\beta$ -carotene oxidation .....	199
2.4.6. Hydroperoxide formation during $\beta$ -carotene oxidation .....	200
2.4.7. Changes in the iron redox state during $\beta$ -carotene oxidation.....	201
2.4.8. Kinetic analysis .....	204
2.5. Discussion: proposed mechanism for iron-induced $\beta$ -carotene autoxidation .....	205
2.6. Conclusion .....	209
2.7. References .....	210
<b>3. PUBLICATION II - STABILITY OF NOVEL BACTERIAL CAROTENOIDS IN THE PRESENCE OF IRON IN A MICELLAR MODEL OF THE GASTRIC COMPARTMENT: COMPARISON WITH COMMON CAROTENOIDS.....</b>	<b>215</b>
3.1. Abstract.....	215
3.2. Introduction .....	216
3.3. Materials and methods.....	218
3.4. Results .....	223
3.4.1. Influence of iron on carotenoid autoxidation in Brij <sup>®</sup> 35 micelles .....	223
3.4.2. Mathematic modelling of the reaction kinetics .....	230

3.4.3. Identification of soluble carotenoid derivatives formed in the presence of iron.....	233
3.4.4. Identification of volatile compounds .....	235
3.5. Discussion: Carotenoid structure impacts kinetics of autoxidation in several different ways in micellar systems .....	237
3.6. Conclusion .....	240
3.7. References .....	241
<b>4. AUTRES RESULTATS.....</b>	<b>245</b>
4.1. Tables complètes des données cinétiques obtenues par modélisation des réactions d'oxydation des caroténoïdes en présence de fer .....	245
4.2. Comparaison de la capacité des caroténoïdes de référence à recycler Fe <sup>II</sup> .....	250
<b>5. SYNTHÈSE DE LA PROBLÉMATIQUE A.....</b>	<b>253</b>
<b>PROBLÉMATIQUE B : RÔLE DES CAROTÉNOÏDES CONTRE L'OXYDATION LIPIDIQUE .....</b>	<b>257</b>
<b>1. ÉTAT DE L'ART : PEROXYDATION LIPIDIQUE ET POUVOIR ANTIOXYDANT.....</b>	<b>259</b>
1.1. L'alimentation et le stress oxydatif .....	259
1.1.1. Définition du stress oxydatif .....	259
1.1.2. Réactions radicalaires et effets toxiques des radicaux libres chez l'homme .....	260
1.1.2.1. Les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) dans la cellule .....	260
1.1.2.2. Production des ERO et des ERA dans la cellule et catalyseurs métalliques .....	261
1.1.2.3. Aspects chimiques et biologiques du stress oxydant chez l'Homme .....	262
1.1.3. Cas particulier de la peroxydation lipidique, cibles et conséquences .....	263
1.2. Mécanismes d'action des antioxydants d'origine alimentaire contre l'oxydation lipidique, cas des caroténoïdes.....	269
1.2.1. Les antioxydants, définition et variabilité de leurs mécanismes d'action .....	269
1.2.2. Effets des caroténoïdes contre l'oxydation lipidique .....	269
1.2.2.1. Piégeage de l'oxygène singulet.....	270
1.2.2.2. Blocage des radicaux libres par addition .....	270
1.2.2.3. Effets mécaniques .....	272
1.2.3. Hypothèses sur les interactions entre antioxydants .....	272
1.3. Les tests de compétition pour la mesure du pouvoir antioxydant .....	274
1.3.1. De nombreux tests disponibles selon les études à réaliser .....	274
1.3.2. Inhibition de la peroxydation lipidique.....	276
<b>2. PUBLICATION III - INHIBITION BY NOVEL BACTERIAL CAROTENOIDS OF IRON-INDUCED PEROXIDATION OF LINOLEIC ACID IN MODEL GASTRIC CONDITIONS: COMPARISON WITH COMMON CAROTENOIDS .....</b>	<b>277</b>
2.1. Abstract.....	277
2.2. Introduction .....	278
2.3. Materials and methods.....	280
2.4. Results .....	285
2.4.1. Inhibition of lipid peroxidation by carotenoids in the micellar model.....	285
2.4.2. Reduction of ferrylmyoglobin by the carotenoids.....	291
2.4.3. Changes in the iron redox state during Fe <sup>II</sup> -induced linoleic acid peroxidation .....	291
2.4.4. Physical characteristics of emulsions .....	293
2.4.5. Inhibition of lipid peroxidation by carotenoids in the emulsion model .....	294
2.4.6. Characterisation of volatile oxidation products.....	297
2.4.7. Distribution of the carotenoids between the oil and aqueous phases of the emulsions.....	298
2.5. Discussion .....	299
2.6. Conclusion .....	304
2.7. References .....	305
<b>3. PUBLICATION IV - INTERACTIONS BETWEEN CAROTENOIDS OF A NOVEL BACTERIAL EXTRACT AND THEIR IMPACT ON STABILITY, ANTIOXYDANT ACTIVITY AND SYNERGISM WITH PHENOLIC ANTIOXYDANTS .....</b>	<b>307</b>
3.1. Abstract.....	307
3.2. Introduction .....	308
3.3. Materials and methods.....	311
3.4. Results .....	317

3.4.1. Composition of the HU36 carotenoid extract.....	317
3.4.2. Influence of MQ-7 on the stability and antioxidant properties of carotenoids .....	318
3.4.2.1. Stability and antioxidant activity of MQ-7.....	318
3.4.2.2. Stability of HU36 bacterial carotenoids towards iron.....	318
3.4.2.3. Stability of $\beta$ -carotene towards iron .....	319
3.4.2.4. Antioxidant activity of HU36 bacterial carotenoids in micelles .....	320
3.4.2.5. Antioxidant activity of lycopene in micelles .....	321
3.4.3. Stability and antioxidant activity of combinations of carotenoids .....	322
3.4.3.1. Stability of $\beta$ -carotene and lycopene alone and in combination .....	322
3.4.3.2. Antioxidant activity of $\beta$ -carotene and lycopene alone and in combination.....	324
3.4.4. Interactions between carotenoids and phenolic antioxidants.....	325
3.4.4.1. Antioxidant capacities of phenolic antioxidants.....	325
3.4.4.2. Impact of phenolic antioxidants on the antioxidant activity of HU36 carotenoids .....	326
3.4.5. Reduction of ferrylmyoglobin by antioxidants.....	329
<b>3.5. Discussion .....</b>	<b>330</b>
<b>3.6. References .....</b>	<b>332</b>
<b>4. AUTRES RÉSULTATS.....</b>	<b>335</b>
4.1. Composition des extraits de caroténoïdes de GB1, avant et après purification par chromatographie liquide .....	335
4.2. Influence de la présence de MQ-7 sur le pouvoir antioxydant des caroténoïdes de GB1 .....	336
4.3. Réduction de la ferrylmyoglobine par GB1 .....	337
4.4. Interactions entre le lycopène et d'autres molécules antioxydantes dans l'inhibition de la peroxydation lipidique.....	338
<b>5. SYNTHÈSE DE LA PROBLÉMATIQUE B.....</b>	<b>341</b>
<b>PROBLÉMATIQUE C : BIOACCESSIBILITÉ ET BIODISPONIBILITÉ DES CAROTÉNOÏDES .....</b>	<b>347</b>
<b>1. ÉTAT DE L'ART : BIOACCESSIBILITE, ABSORPTION ET DISTRIBUTION TISSULAIRE.....</b>	<b>349</b>
1.1. Facteurs influençant l'absorption des caroténoïdes .....	349
1.1.1. Effets de la structure chimique des caroténoïdes .....	350
1.1.1.1. Hydrophobicité et isomérisation des caroténoïdes ( <i>S</i> ) .....	350
1.1.1.2. Cas des formes estérifiées des caroténoïdes ( <i>L</i> ).....	351
1.1.2. Effets des quantités ingérées ( <i>A</i> ) .....	352
1.1.3. Facteurs liés à la matrice alimentaire ( <i>M</i> ).....	352
1.1.3.1. Forme et localisation des caroténoïdes.....	352
1.1.3.2. Effets des procédés de transformation .....	353
1.1.4. Effet des nutriments pouvant modifier l'absorption des caroténoïdes ( <i>E</i> ) .....	354
1.1.4.1. Interactions entre caroténoïdes .....	354
1.1.4.2. Effets d'autres composants de l'alimentation : lipides et fibres.....	354
1.1.5. Facteurs biologiques .....	355
1.1.5.1. Transporteurs membranaires des cellules .....	355
1.1.5.2. Effets du statut nutritionnel en micronutriments ( <i>N</i> ).....	356
1.1.5.3. Effets de facteurs génétiques ( <i>G</i> ) .....	357
1.1.5.4. Variabilité inter-individuelle ( <i>H</i> ).....	358
1.1.6. Interactions mathématiques entre les facteurs ( <i>I</i> ) .....	359
1.2. Données sur l'accumulation des caroténoïdes et la distribution dans les tissus.....	359
1.2.1. Caroténoïdes circulants .....	360
1.2.2. Répartition dans les tissus de réserve et les organes cibles.....	360
1.3. Méthodes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> pour évaluer la biodisponibilité, pertinence .....	362
1.3.1. Méthodes de digestion et d'absorption <i>in vitro</i> .....	363
1.3.2. Bilans organiques chez l'animal .....	365
<b>2. PUBLICATION V - BIOAVAILABILITY OF CAROTENOIDS FROM SPORE-FORMING <i>BACILLUS</i> STRAINS, USING <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> MODELS .....</b>	<b>367</b>
2.1. Abstract.....	367
2.2. Introduction .....	368
2.3. Materials and methods.....	370
2.4. Results .....	380
2.4.1. Bioaccessibility of pure carotenoids as measured by the <i>in vitro</i> digestion model .....	380

2.4.2. Bioaccessibility of $\beta$ -carotene from a carrot purée and of carotenoids from HU36 and GB1 lyophilised cells in yogurt .....	382
2.4.3. Number of bacterial vegetative cells / spores from HU36 or GB1 during the digestion process .....	383
2.4.4. Incorporation efficiency of pure carotenoids during the preparation of artificial mixed micelles .....	385
2.4.5. Kinetics of transfer of pure carotenoids from crystals into pre-formed artificial mixed micelles .....	386
2.4.6. Uptake of carotenoids by Caco-2 cells .....	386
2.4.7. <i>In vivo</i> bioavailability of carotenoids in rats.....	389
2.5. Discussion .....	392
2.6. References .....	395
<b>3. PUBLICATION VI - CHEMICAL STRUCTURE OF CAROTENOIDS, BY AFFECTING THEIR HYDROPHOBICITY, IS A KEY FACTOR THAT MODULATE THEIR BIOACCESSIBILITY, ABSORPTION EFFICIENCY AND TISSUE DISTRIBUTION .....</b>	<b>399</b>
3.1. Abstract.....	399
3.2. Introduction .....	400
3.3. Materials and methods.....	402
3.4. Results .....	412
3.4.1. Bioaccessibilité de caroténoïdes purs, mesurée par digestion <i>in vitro</i> .....	412
3.4.2. Bioaccessibility of food carotenoids as measured by the <i>in vitro</i> digestion model .....	413
3.4.3. incorporation efficiency of pure carotenoids during the preparation of synthetic mixed micelles .....	414
3.4.4. Kinetics of transfer of pure carotenoids from carotenoids crystals to pre-formed synthetic mixed micelles.....	414
3.4.5. Uptake of carotenoids by Caco-2 cells .....	415
3.4.6. <i>In vivo</i> bioavailability of carotenoids in rats.....	416
3.4.7. Relative gene expression of SR-BI and CD36 in rat adipose tissue and liver .....	419
3.5. Discussion .....	420
3.6. References .....	425
<b>4. AUTRES RESULTATS.....</b>	<b>429</b>
4.1. Comparaison de différents modèles de digestion <i>in vitro</i> .....	429
4.2. Mesures granulométriques sur les micelles mixtes issues de la digestion <i>in vitro</i> d'aliments riches en caroténoïdes.....	430
4.3. Etude des produits de dégradation des caroténoïdes de référence au cours de la digestion <i>in vitro</i> .....	433
4.4. Régulation de l'expression des transporteurs membranaires SR-BI et CD36 dans le foie et le tissu adipeux, chez les rats gavés avec différents caroténoïdes .....	436
4.5. Régulation de l'expression de protéines du tissu adipeux, chez les rats gavés avec différents caroténoïdes.....	438
<b>5. SYNTHESE DE LA PROBLEMATIQUE C.....</b>	<b>441</b>
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>445</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>457</b>
1. BILAN DE L'ETUDE .....	459
2. PERSPECTIVES : COMPLEXIFICATION DES MODELES ET POURSUITE DE L'ETUDE .....	461
2.1. Etude quantitative de la stabilité et du pouvoir antioxydant des caroténoïdes dans des modèles plus biomimétiques .....	461
2.2. Etude de propriétés nutritionnelles des caroténoïdes bactériens chez l'homme grâce à des études cliniques.....	462
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>465</b>
<b>COMMUNICATIONS.....</b>	<b>479</b>



## REMERCIEMENTS

La présentation de cette thèse aujourd'hui conclut trois années de travail et de rigueur pour explorer des problématiques stimulantes, mais aussi de rencontres, qui ont contribué à faire de cette étude une expérience constructive.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Catherine Caris et Patrick Borel, et Olivier Dangles, qui m'ont donné l'opportunité de mener ces recherches et m'ont fait bénéficier de leur expérience.

Au cours des deux années que j'ai passées à l'INRA d'Avignon, j'ai été particulièrement bien intégrée dans l'équipe du laboratoire SQPOV chimie, où j'ai trouvé une ambiance agréable auprès de personnes que j'ai pris plaisir à cotoyer et qui ont toujours permis que mes travaux se fassent dans les meilleures conditions. Je les en remercie. Je remercie particulièrement ma directrice de m'avoir offert la possibilité de participer à de nombreux congrès, pour certains à l'autre bout du monde, où j'ai pu faire des rencontres particulièrement enrichissantes.

J'ai reçu le même accueil sympathique au sein de l'unité NLPMM de l'INRA de Marseille, où j'ai pu apprécier les conseils et la gentillesse de toute l'équipe. Je remercie vivement mon directeur qui m'a beaucoup encouragée.

J'ai une pensée particulière pour les étudiants avec qui j'ai partagé un bureau, une paillasse, une machine... , un peu de stress et surtout des moments de bonne humeur.

Je tiens enfin à remercier les personnalités qui ont accepté de juger ce travail et de constituer le jury de cette thèse.



---

# **INTRODUCTION : PRESENTATION DE LA THESE**

---



## 1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Les travaux menés depuis plusieurs dizaines d'années sur les caroténoïdes ont permis d'établir que ce sont des éléments constitutifs importants de l'organisme des êtres vivants (ex : dans les membranes), qui participent à plusieurs processus physiologiques (ex : photoprotection, respiration chez les végétaux et microorganismes) et qui jouent un rôle dans le statut nutritionnel chez l'homme (ex : sources de vitamine A). Ils auraient aussi un effet bénéfique sur la santé en prévenant l'apparition de certaines maladies.

Par ailleurs, de nombreuses études ont fait état de l'existence de bactéries pigmentées, en particulier au stade de spores. Jusque dans les années 1980, ces pigments étaient surtout connus pour leurs propriétés défensives antimicrobiennes. Le plus connu était un pigment noir (la désoxynojirimycine) produit par *Bacillus subtilis var niger* (ou *Bacillus atrophaeus*), qui a des fonctions antiglycosidase chez la bactérie et s'est révélé avoir des propriétés antibiotiques (antibactérien et antimycosique) importantes ([Nakamura 1989](#)). Autres exemples : la prodigiosine est un pigment antibactérien rouge à base de pyrrole, synthétisé par des bactéries des genres *Serratia* (gram-négatif), *Streptomyces* (gram-positif) et *Vibrio* (gram-négatif) ([Lewis and Corpe 1964](#)), et la violacéine, identifiée chez des espèces *Chromobacterium* (gram-négatif) ([Dessaux, Elmerich et al. 2004](#)), a des propriétés antibiotiques. Au cours du temps, des travaux ont mis en évidence des souches bactériennes synthétisant d'autres pigments, et en particulier des caroténoïdes. Certaines espèces sont des pathogènes, comme *Staphylococcus aureus* ([Marshall and Wilmoth 1981](#)) ou *Mycobacterium* spp. D'autres ne présentent pas de toxicité, comme des espèces *Bacillus* (gram-positif), qui ont fait l'objet de recherches importantes, à l'origine essentiellement effectuées par des équipes asiatiques. Une grande variété de colonies colorées ont ainsi été mises en évidence (tableau I). Ces espèces semblent toutes présenter une résistance importante aux conditions environnementales. Elles sont par exemple tolérantes à de fortes concentrations de NaCl et les formes sporulées survivent mieux que d'autres espèces aux rayonnements UV, à la fois grâce à un effet protecteur au niveau de leurs membranes et plus particulièrement de leur membrane interne, et par des processus de réparation de l'ADN ([Nicholson, Munakata et al. 2000](#)).

Tableau I : Exemples de colonies colorées du genre *Bacillus*.

Couleur des colonies	Espèces/souches	Références
rouges	<i>B. megaterium</i>	( <a href="#">Mitchell, Iyer et al. 1986</a> )
roses	<i>B. firmus</i> sp	( <a href="#">Pane, Radin et al. 1996</a> )
	<i>B. firmus</i> sp	( <a href="#">Rüger and Koploy 1980</a> )
	<i>B. clarkii</i>	( <a href="#">Nielsen, Fritze et al. 1995</a> )
	<i>B. pseudofirmus</i>	( <a href="#">Nielsen, Fritze et al. 1995</a> )
	<i>B. vedderi</i>	( <a href="#">Agnew, Koval et al. 1995</a> )
jaunes et jaune-orangé	<i>B. jeotgali</i>	( <a href="#">Yoon, Kang et al. 2001</a> )
	<i>B. okuhidensis</i>	( <a href="#">Li, Kawamura et al. 2002</a> )
	<i>B. indicus</i> sp	( <a href="#">Suresh, Prabakaran et al. 2004</a> )
	<i>B. cibi</i>	( <a href="#">Yoon, Lee et al. 2005</a> )
	<i>B. atrophaeus</i>	( <a href="#">Moeller, Horneck et al. 2005</a> )

Plus particulièrement, des bactéries pigmentées, formatrices de spores, ont été isolées au Viêt Nam en 2005 ([Duc, Fraser et al. 2006](#)). Elles appartiennent au genre *Bacillus*. Des analyses phylogénétiques ont été effectuées afin de déterminer les degrés de parenté entre les différentes souches pigmentées isolées. Enfin, un large screening des isolats pigmentés a permis de sélectionner les souches les plus productrices de caroténoïdes et possédant de nombreux composés colorés ([Khaneja, Perez-Fons et al. 2010](#)). Deux souches ont ainsi été sélectionnées pour leur potentiel colorant et leur affiliation à des bactéries connues, bien caractérisées et non pathogènes :

- HU36 est une souche aérobie qui forme des colonies rondes et brillantes jaune orangé (figure 1), chez laquelle les endospores sont à l'extrémité des cellules, dont les spores sont elliptiques et dont 65 % d'entre eux résistent à un traitement thermique prolongé. Elle a été isolée à partir de fèces humaines et est phylogénétiquement fortement corrélée aux souches de *B. indicus* ( $R^2 = 0,998$ ).
- GB1 est une souche aérobie qui forme des colonies rondes et mates roses, chez laquelle les endospores sont en position centrale, dont les spores sont elliptiques et dont le nombre de spores augmente lors de traitements thermiques prolongés. Elle a été isolée à partir de biopsies de l'ileum humain et est phylogénétiquement fortement corrélée aux souches de *B. firmus* ( $R^2 = 0,987$ ).



**Figure 1** : Aspect des colonies de HU36 cultivées sur milieu nutritif minimal LB (bouillon lysogène).

Il s'agit de deux souches d'origine marine et absorbées avec une alimentation à base de poissons, coquillages, crustacés, huîtres ou d'œufs de poissons. Elles ont notamment été retrouvées dans le tube digestif de crevettes ([Duc, Fraser et al. 2006](#)). Le fait que ces bactéries soient déjà présentes dans l'alimentation de certaines populations asiatiques est un élément important qui soutient l'hypothèse de leur innocuité (à confirmer, notamment par des études métabolomiques). De façon générale, la biosphère marine est une source importante d'espèces qui synthétisent des composés chimiques n'existant pas dans l'écosystème terrestre et laissant entrevoir des applications pharmaceutiques, nutraceutiques, biomédicales ou industrielles innovantes. En effet, elle représente une grande diversité de niches environnementales caractérisées par des conditions extrêmes de température, de pression et d'exposition aux rayonnements et aux stress chimiques, qui ont induit l'évolution d'espèces végétales et animales capables de résister à ces contraintes. Les chances de découvrir de nouveaux composés bioactifs dans l'environnement marin sont particulièrement importantes puisque moins de 1 % des microorganismes disponibles ont été cultivés avec succès jusqu'à présent. Chez ces organismes, ce sont plus précisément les métabolites secondaires (leur permettant entre autres de survivre en conditions hostiles) qui sont recherchés et étudiés pour leurs propriétés à usages innovants ([Cutting 2008](#)).

Cette découverte est à l'origine du projet collaboratif "Colorspore", soutenu par la Commission Européenne sur une durée de 3 ans (2008-2011) et coordonné par l'Université Royal Holloway, à Londres. Les partenaires publics du projet sont les unités "Sciences Biomédicales" et "Sciences Bioanalytiques et Chimiques" de l'Université Royal Holloway and Bedford à Londres (Egham, Angleterre), l'Université J.W. Goethe à Frankfurt (Allemagne), l'Université Federico II à Naples (Italie), l'Université de Médecine et de Pharmacie d'Hô Chi Minh City (Viêt Nam), l'Université Technique d'Istanbul (Turquie) et les unités mixtes "Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale" et "Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques" de l'INRA PACA (France). Les partenaires privés du projet sont Aquapharm Biodiscovery (Ecosse) et Nestec, le centre de recherche de Nestlé à Lausanne (Suisse). La finalité du projet "Colorspore" est, d'une part de caractériser les microorganismes marins découverts ainsi que les caroténoïdes qu'ils produisent et, d'autre part, d'évaluer leur potentiel à être utilisés comme nouveaux additifs fonctionnels naturels, selon des considérations physico-chimiques (pouvoir colorant, stabilité, pouvoir antioxydant), biologiques (biodisponibilité, effet anti-inflammatoire, effet anticancérigène, innocuité), techniques (optimisation de la fermentation industrielle, extraction, formulation alimentaire) et économiques. Les résultats et la possibilité de développer de nouveaux additifs issus d'une synthèse naturelle et durable présentent un intérêt important pour les industriels de l'agroalimentaire, par exemple.

Les différents axes de recherche du projet Colorspore ont été étudiés par les partenaires microbiologistes, biochimistes et technologues alimentaires. Tout d'abord, les souches sélectionnées (HU36 et GB1) ont été caractérisées afin d'optimiser des procédés de fermentation à l'échelle pilote. Puis, les caroténoïdes produits ont été identifiés et les voies de biosynthèse impliquées ont été explorées. HU36 produit deux classes de pigments : des pigments jaunes ( $\lambda_{\text{MAX}} = 430, 454, 484 \text{ nm}$ ) correspondant à des esters 1-glycosyl-3-4-déshydro-8'-apolycopène avec des chaînes secondaires d'acides gras saturés en C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14 ou C15 ; et des pigments orange ( $\lambda_{\text{MAX}} = 440, 466, 494 \text{ nm}$ ) correspondant à des esters 1-glycosyl-3-4-déshydro-8'-apolycopenoate de méthyl avec des chaînes secondaires d'acides gras saturés en C9, C10 et C11 ([Perez-Fons, Steiger et al. 2010](#)). La synthèse de ces pigments implique une voie en C30 à partir du 8'-apophytoène, ensuite glycosylé et estérifié ([Duc, Fraser et al. 2006](#); [Perez-Fons, Steiger et al. 2010](#)). De plus, une variation de la pigmentation a été observée au cours du cycle de développement de la bactérie. En effet, des dérivés métyloxy-carotènes ont tendance à se former au cours de la sporulation (induite par un état de stress, par exemple une privation de nutriments). Il y a ainsi davantage de pigments jaunes au stade de cellules végétatives, mais plus de

pigments orange dans les spores ([Duc, Fraser et al. 2006](#)). GB1 produit majoritairement le diester 4,4'-diglycosyle-4,4'-diapolycopèneoate ( $\lambda_{\text{MAX}} = 463, 492, 524 \text{ nm}$ , ([Khaneja, Perez-Fons et al. 2010](#))). De plus, les formes sporulées présentent une résistance particulièrement importante au peroxyde d'hydrogène. Des extraits bactériens (spores et cellules végétatives lyophilisées), ainsi que les caroténoïdes isolés par extraction ont ensuite été étudiés afin d'évaluer leur intérêt nutritionnel : stabilité, pouvoir antioxydant, biodisponibilité, effets anti-inflammatoires ou anticancérigènes... En effet, la structure originale de ces pigments bactériens, plus polaire que celle des caroténoïdes habituels de l'alimentation, est susceptible de leur conférer des propriétés spécifiques et les spores peuvent favoriser leur résistance en conditions gastriques. Enfin, la possibilité d'utiliser ces caroténoïdes en tant qu'additifs ou colorants a été testée grâce à des essais de formulation de produits alimentaires et une évaluation toxicologique. Deux formes sont envisagées pour de futures applications alimentaires : la bactérie entière, en tant que probiotique, et des extraits purifiés. L'innocuité des extraits est essentiellement validée par des tests chez l'animal, alors que la sécurité des aliments à base de micro-organismes doit être validée par des processus approfondis basés sur la nutriginomique ([FAO/WHO 2002](#); [SCAN 2003](#); [EFSA 2005](#)).

Les réponses aux problématiques de stabilité et de l'activité antioxydante des caroténoïdes bactériens en conditions gastriques, et de leur biodisponibilité sous forme extraite ou probiotique ont notamment été apportées par ce travail de thèse, qui s'appuie sur plusieurs modèles chimiques et biologiques.

## 2. APPROCHE RETENUE ET ETAPES DE LA THESE

Les deux premières années de cette thèse ont été effectuées sous la direction du D<sup>r</sup> Catherine Caris dans le laboratoire "Chimie des Antioxydants" de l'unité mixte de recherche INRA/UAPV "Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale" sur le centre INRA d'Avignon. Les études ont porté dans un premier temps sur la mesure de la stabilité des caroténoïdes en présence de fer, source de stress oxydant *in vivo* et en particulier dans le compartiment gastro-intestinal. Dans un deuxième temps, l'activité antioxydante des caroténoïdes a été évaluée au moyen de tests d'inhibition de la peroxydation lipidique effectués dans différents milieux modèles. Puis, la troisième année a été effectuée sous la direction du D<sup>r</sup> Patrick Borel et a eu lieu à Marseille, au sein de l'unité mixte INRA/INSERM/Université de Méditerranée "Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques". Des modèles *in vitro* et *in vivo* ont permis de déterminer la biodisponibilité des caroténoïdes et d'évaluer l'effet de certains facteurs déterminants (structure, matrice alimentaire) aux différents stades de la digestion et du métabolisme des lipides (digestion, absorption, distribution tissulaire). Toutes les étapes du travail ont fait l'objet d'études comparatives entre les cocktails\* de caroténoïdes bactériens synthétisés par les souches *Bacillus* HU36 et GB1 et des caroténoïdes de référence de l'alimentation :  $\beta$ -carotène, lycopène, astaxanthine et lutéine.

Des systèmes chimiques modèles à pH 4 (acidité moyenne du bol alimentaire au cours de la digestion gastrique) ou pH 5,8 (pH juste après ingestion d'un repas, puis au niveau du duodénum) ont été adaptés et utilisés pour mener les études comparatives de stabilité et de pouvoir antioxydant des caroténoïdes : une solution micellaire aqueuse, puis un modèle d'émulsion. Il s'agissait tout d'abord de mesurer les cinétiques de dégradation des différents caroténoïdes en présence de fer ionique (ions  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  libres) ou hémique (hématine de metmyoglobine). De plus, des méthodes de dosage des concentrations en  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de mesure de la consommation d'oxygène ont été mises en place avec le  $\beta$ -carotène dans le but de proposer un mécanisme réactionnel du catabolisme de la molécule. En parallèle, un travail de caractérisation des produits de dégradation a été effectué par analyse UPLC/MS. Les caroténoïdes stables en conditions gastriques peuvent s'accumuler à de fortes concentrations dans le tube digestif et avoir un

---

\* Ce terme sera utilisé dans l'ensemble de ce document pour désigner le mélange de tous les caroténoïdes synthétisés par une souche bactérienne (HU36 ou de GB1) et qui composent les échantillons étudiés au cours de cette thèse.

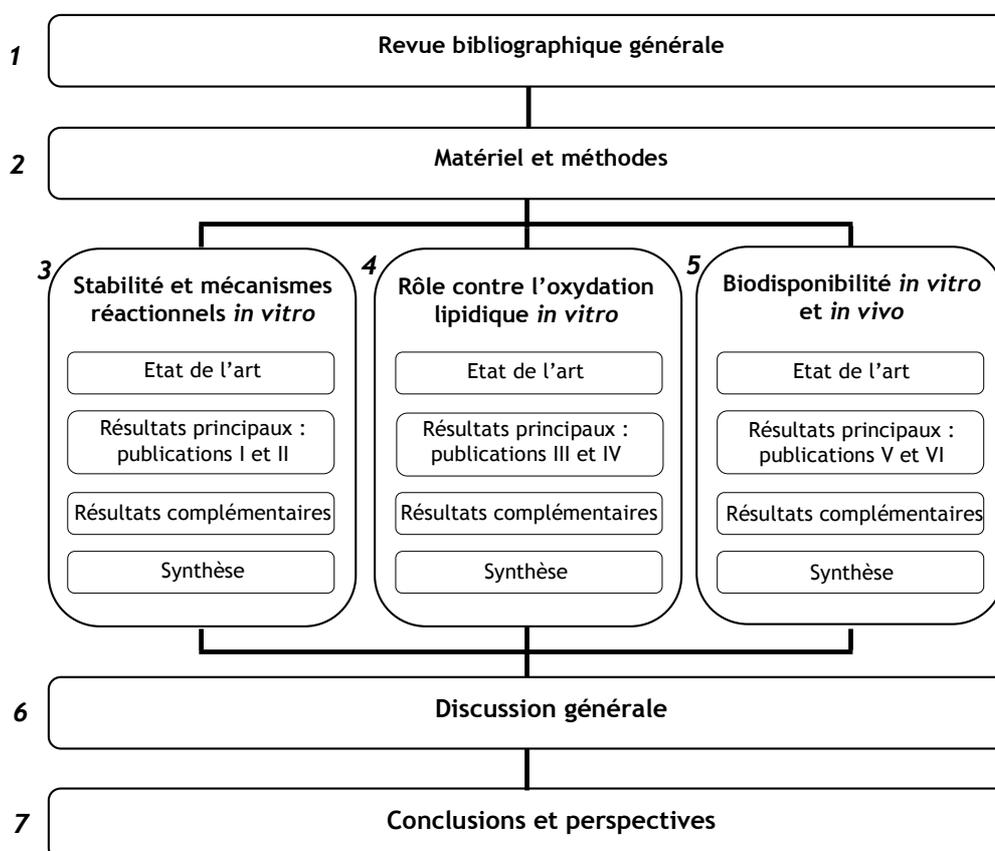
effet biologique dans ce compartiment de l'organisme. Par conséquent, le pouvoir antioxydant avant absorption intestinale a été mesuré. La méthode la plus significative dans le cas d'un modèle biomimétique incluant des antioxydants de l'alimentation consiste à mesurer l'inhibition de l'oxydation de lipides polyinsaturés. L'oxydation a été initiée par différentes formes de fer. Les effets d'interactions entre plusieurs molécules antioxydantes ont aussi été explorés. Enfin, la biodisponibilité, et donc le potentiel de ces mêmes caroténoïdes à agir sur les cellules cibles et au niveau des tissus de réserve de l'organisme, a été étudiée en deux étapes. Une première série de mesures a été effectuée *in vitro* grâce à l'utilisation d'un modèle de digestion associé à des cultures de cellules Caco-2 : calcul des teneurs incorporées à chaque étape, bilan de matière. Ce travail a été complété par une étude des propriétés de solubilisation et de transfert des caroténoïdes dans des modèles de micelles mixtes artificielles. Puis un régime alimentaire enrichi en caroténoïdes a été administré à des rats afin de réaliser une étude *in vivo* en mesurant la concentration et la distribution des caroténoïdes dans les différents tissus chez l'animal.

Tous ces aspects sont abordés dans ce manuscrit, qui s'organise en sept parties (voir schéma) :

- La première partie souligne les caractéristiques générales des caroténoïdes mises en évidence jusqu'à aujourd'hui, l'intérêt de leur apport naturel ou par supplémentation dans l'alimentation, leur devenir dans l'organisme au cours de la digestion et du métabolisme et enfin les divers milieux modèles permettant de comprendre les mécanismes en jeu par des études en laboratoire. Cette partie ne se veut pas exhaustive mais permet de présenter les molécules étudiées et les principaux enjeux pris en compte dans ce travail.
- La deuxième partie est consacrée à la description du matériel et des méthodes expérimentales mises en application pour les différentes étapes de l'étude.
- Les troisième, quatrième et cinquième parties sont consacrées à chacune des trois grandes problématiques de cette étude et sont construites sur un même modèle en cinq sous-parties. La première sous-partie apporte des informations plus approfondies, illustrées par de nombreux exemples, sur les différentes causes de la dégradation des caroténoïdes et les mécanismes réactionnels impliqués ; l'effet des caroténoïdes contre la peroxydation lipidique et le stress oxydant et les méthodes de mesure de l'oxydation ; les divers facteurs influençant la biodisponibilité des caroténoïdes et les possibilités de mesure de l'absorption et de la distribution tissulaire. Les

deuxième et troisième sous-parties présentent les résultats de la thèse dans deux articles\* sur le sujet, soumis à publication. La quatrième sous-partie présente des résultats complémentaires non abordés dans les articles. La cinquième sous-partie résume les étapes du travail et les principales mises au point expérimentales et fait la synthèse des résultats obtenus.

- La sixième partie permet de confronter et de discuter l'ensemble des résultats et leurs relations.
- La septième partie fait le bilan de l'étude et des nouvelles connaissances établies et propose des perspectives de recherche.



**Schéma** : Illustration de la démarche générale de ce travail de thèse.

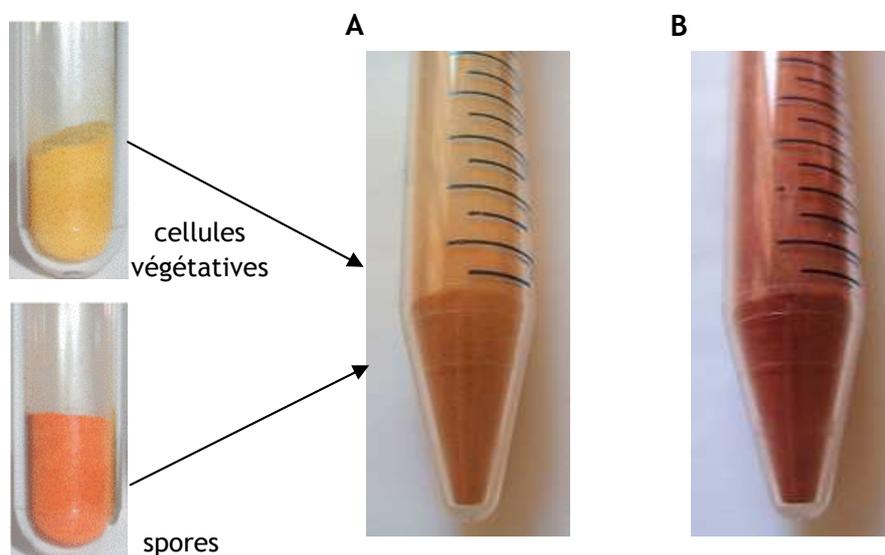
---

\* La forme des articles tels qu'ils ont été intégrés dans la thèse est légèrement différente de celle qui a été/sera soumise à la publication, dans un souci de clarté et d'homogénéité avec le reste du document. En effet, la taille et la police de caractères ont été harmonisées et les tables et figures sont ici insérées dans le texte. De plus, les figures sont en couleur et plus nombreuses que dans les versions finales des articles. Enfin, souhaitant faire apparaître le contenu des articles dans la table des matières de cette thèse, les titres et sous-titres correspondant aux parties résultats et discussion y ont été rapportés numérotés.

### 3. RESULTATS PRELIMINAIRES

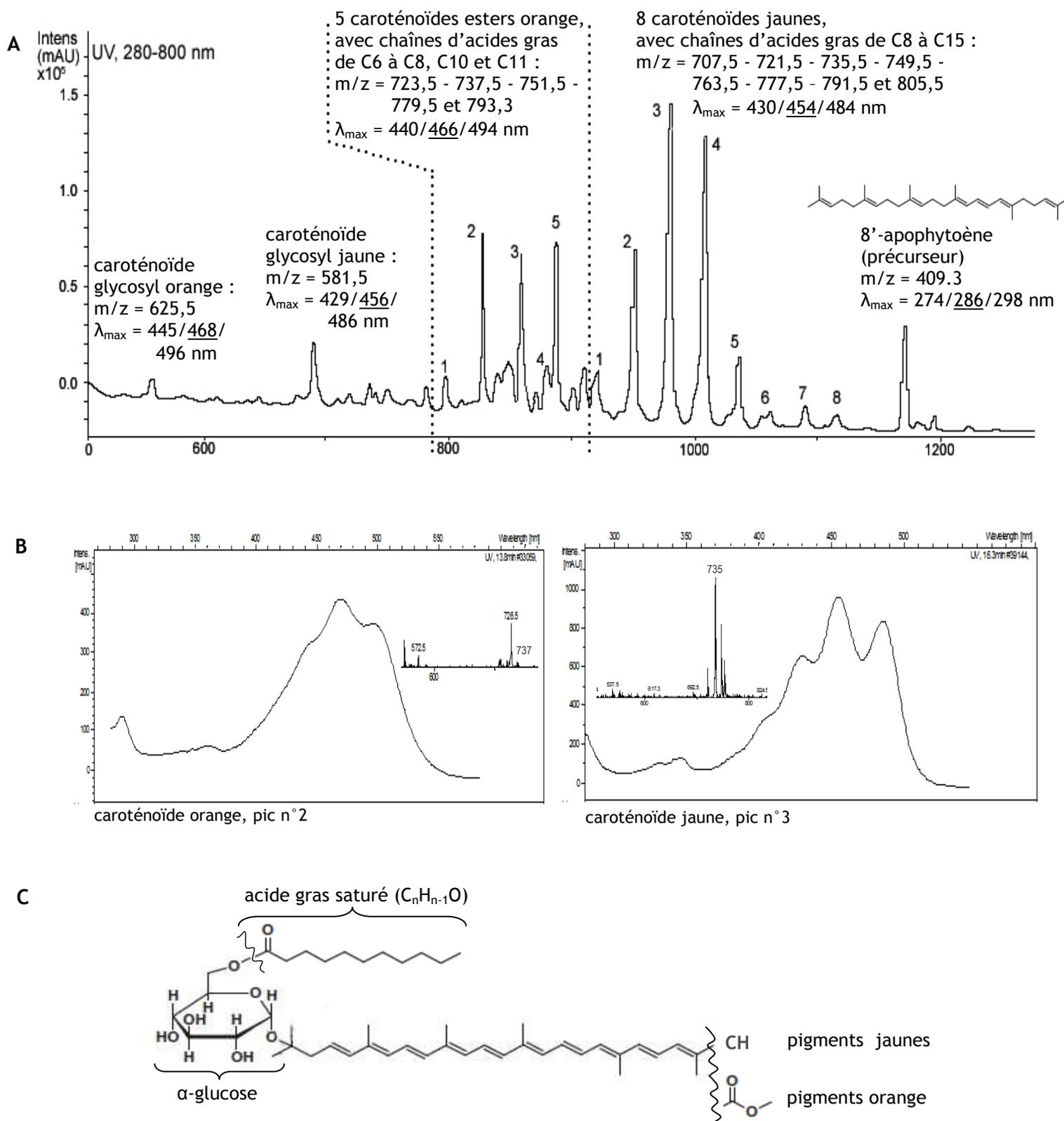
Une description des échantillons d'extraits de caroténoïdes et des bactéries sous forme lyophilisée a été effectuée dès le début du travail de thèse à partir des informations fournies par les partenaires du projet européen Colorsore.

Le matériel lyophilisé composé de cellules végétatives et de spores de HU36 est jaune orangé (figure 2 A). Lorsque la culture est menée dans un milieu favorisant la forme végétative, la coloration du lyophilisat est jaune ; alors qu'elle est orange lorsque la culture est menée dans des conditions favorisant la sporulation. Le matériel lyophilisé composé de cellules végétatives et de spores de GB1 est rouge (figure 2 B).

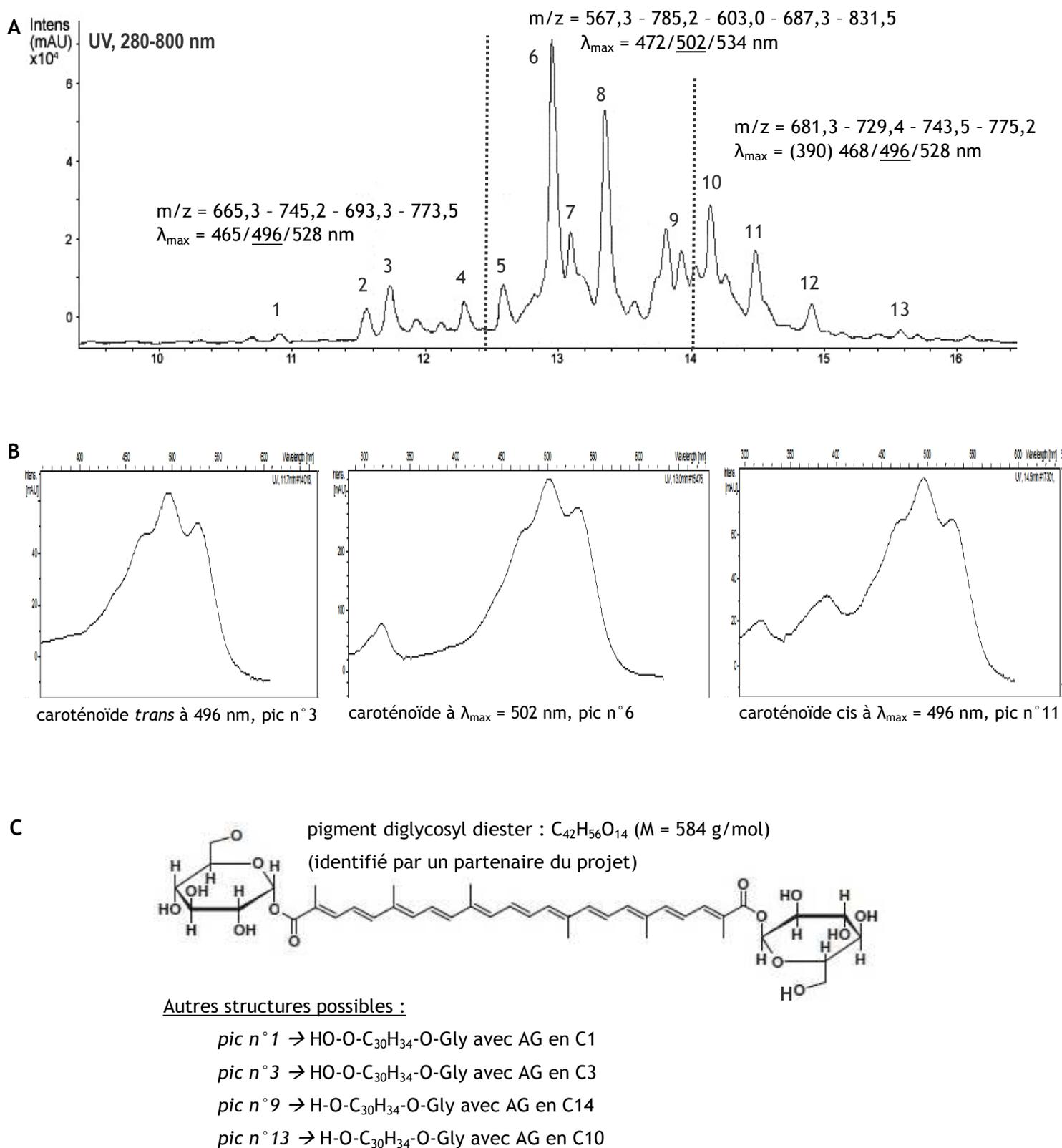


**Figure 2** : Matériel bactérien lyophilisé, issu de la culture en batch (A) de HU36 et (B) de GB1.

Le contenu des extraits bruts de caroténoïdes bactériens a été analysé par UPLC-MS. Les chromatogrammes obtenus ont permis de voir que chaque extrait contient un mélange de caroténoïdes ainsi qu'un autre isoprénoïde, la ménaquinone-7 (forme polymérisée de la vitamine K<sub>2</sub>, ayant un rôle dans la chaîne respiratoire chez *Bacillus*). Cette vitamine a été éliminée lors d'étapes préparatoires avant tous les tests consistant à comparer les propriétés des cocktails de caroténoïdes bactériens avec celles des caroténoïdes alimentaires de référence (Cf. Matériel et méthodes § 2.2 et Publication IV). Pour HU36, la présence des divers caroténoïdes déjà décrits par les partenaires du projet a été confirmée (figure 3). Pour GB1, l'analyse a également montré la présence de plusieurs caroténoïdes (structures non élucidées) synthétisés à partir d'un pigment principal de 784 g/mol (figure 4).



**Figure 3 :** (A) Chromatogramme UV/vis entre 280 et 800 nm obtenu par analyse UPLC sur les échantillons de caroténoïdes de HU36 utilisés pendant la thèse (extraits purifiés). Les données spectrales des principaux caroténoïdes sont indiquées. (B) Spectres UV/vis des deux catégories de pigments. (C) Structures des caroténoïdes majoritaires de l'extrait ([Perez-Fons, Steiger et al. 2010](#)).



**Figure 4 :** (A) Chromatogramme UV/vis entre 280 et 800 nm obtenu par analyse UPLC sur les échantillons de caroténoïdes de GB1 utilisés pendant la thèse (extraits purifiés). Les données spectrales des principaux caroténoïdes sont indiquées. (B) Spectres UV/vis des différents pigments. (C) Structures possibles des caroténoïdes de l'extrait.

Les données numériques suivantes ont par ailleurs été considérées pour toutes les expérimentations:

- les masses molaires moyennes des cocktails de caroténoïdes ont été estimées à 750 g/mol pour HU36 (calcul de moyennes sur les masses, pondérées par les aires des pics) et à 784 g/mol pour GB1 (masse du composé principal identifié par les partenaires du projet, car l'identification des autres pics est incertaine),
- les coefficients d'extinction molaire moyens des cocktails de caroténoïdes bactériens ont été estimés à 165 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 454 nm dans le dichlorométhane pour HU36 ; et à 225 300 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 502 nm dans le dichlorométhane pour GB1 (Cf. Matériel et méthodes § 2.3),
- le rendement d'extraction de caroténoïdes produits par des cultures de bactéries en batch est d'environ 95 µg pour 100 mg de matériel lyophilisé pour HU36 et d'environ 120 µg pour 100 mg de matériel lyophilisé pour GB1 (il faut noter que la souche de GB1 utilisée dans cette étude est une souche mutante, chez laquelle la synthèse de caroténoïdes a été renforcée par rapport à la souche sauvage qui, à l'origine, a un rendement de production inférieur à celui de HU36).

---

**REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE  
GÉNÉRALE**

---



## 1. GENERALITES SUR LES CAROTENOÏDES

### 1.1. Définition

Les caroténoïdes sont des pigments absorbant la lumière entre 380 et 750 nm. Ils regroupent les carotènes (caroténoïdes hydrocarbonés) et les xanthophylles (caroténoïdes porteurs de fonctions alcool, cétone, époxy...). Les caroténoïdes sont des métabolites secondaires principalement synthétisés par les végétaux et, dans une moindre mesure, par des levures, champignons, algues marines, microalgues ou certaines espèces bactériennes. Ils sont absorbés par les animaux dans leur nourriture et sont en général assimilables par les organismes : ils suivent des voies métaboliques étroitement liées à celles des lipides. Plus de 600 caroténoïdes naturels, ayant des structures très variées, ont été décrits à ce jour ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 a](#)), et 40 environ sont présents dans l'alimentation humaine.

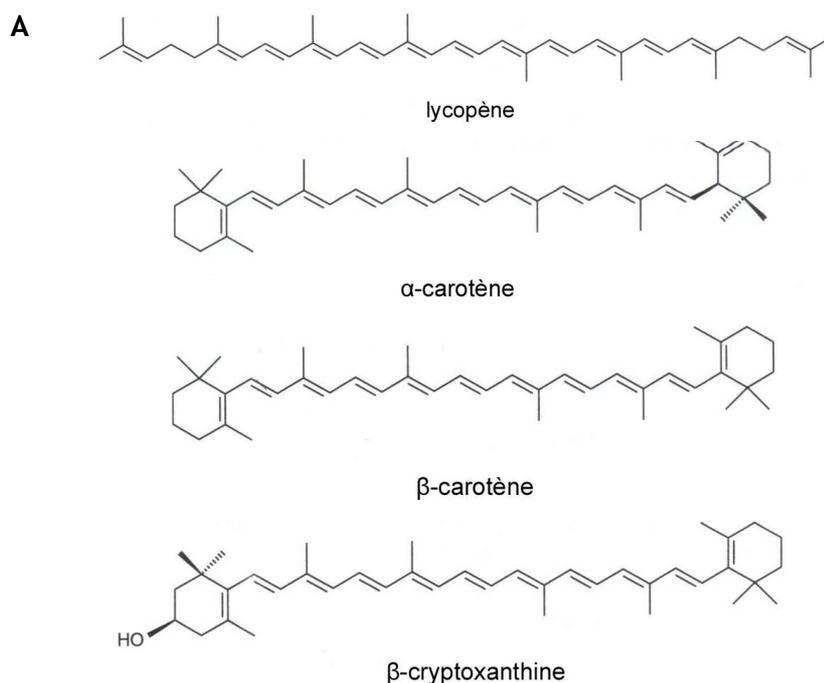
### 1.2. Origine, organismes producteurs et principaux caroténoïdes

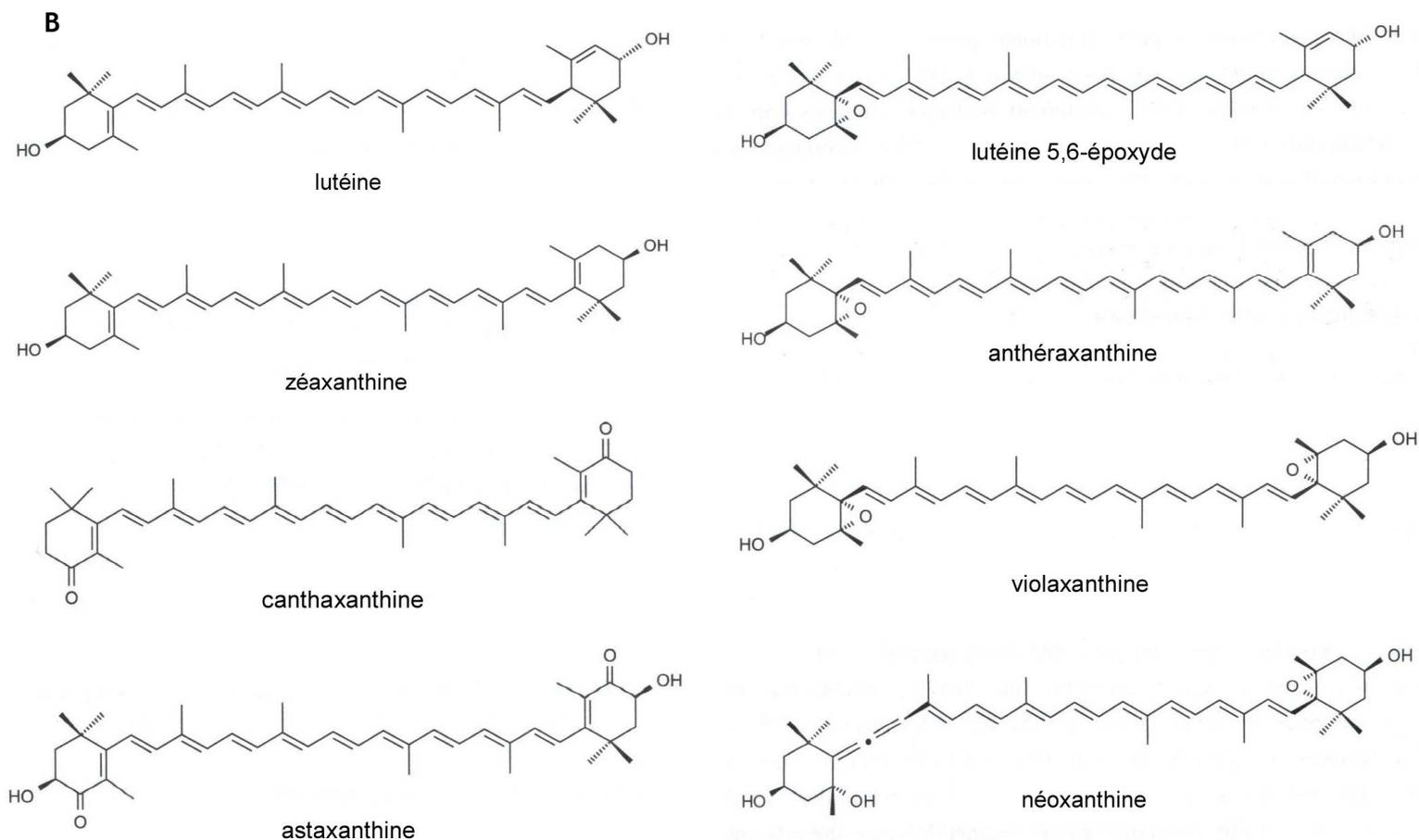
Les caroténoïdes sont produits en grande quantité chez les organismes photosynthétiques (procaryotes et eucaryotes). Ils sont aussi présents, mais à des teneurs beaucoup plus faibles, chez les organismes non photosynthétiques ([Duc, Fraser et al. 2006](#)).

Chez les végétaux, il a été largement démontré que les caroténoïdes sont responsables des couleurs rouge, orangée ou jaune de nombreuses plantes, repérables au niveau des fruits (ex : la tomate), fleurs (ex : les soucis) ou racines (ex : la carotte). Ils sont également présents dans les tissus verts, mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle. Il faut attendre la disparition de celle-ci, à l'automne, pour voir les caroténoïdes. Ils sont synthétisés et localisés dans les chromoplastes (organites dérivés des chloroplastes lors du mûrissement des fruits, par exemple), au niveau de diverses structures : des gouttelettes lipidiques sphériques, les plastoglobules (où les caroténoïdes à de fortes concentrations cristallisent) et des chromoplastes tubulaires (dans lesquels se trouvent des superstructures de caroténoïdes, dont des esters de xanthophylles).

Les fruits et légumes consommés dans l'alimentation humaine apportent majoritairement certains caroténoïdes (figure 5) ([Britton and Khachik 2009](#)) :

- les végétaux verts riches en caroténoïdes peuvent en contenir des quantités totales variables selon leur nature (ex : environ 20 mg / 100 g dans les épinards, 5 mg / 100 g dans les pois, 2 mg / 100 g dans les brocolis ([USDA](#))), et les proportions des différents caroténoïdes sont d'environ 25 à 30 % de  $\beta$ -carotène, 40 à 50 % de lutéine, 15 % de violaxanthine, 15 % de néoxanthine et de petites quantités d' $\alpha$ -carotène, de zéaxanthine, d'anthéroxanthine et de lutéine 5,6-époxyde dans les chloroplastes ([Britton and Khachik 2009](#)),
- certains fruits rouges sont riches en lycopène (ex : 30 mg / 100 g dans la tomate ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)), 4,5 mg / 100 g dans la pastèque ([USDA](#))),
- les fruits et légumes jaunes et orangés sont riches en  $\beta$ -carotène (ex : environ 3 mg / 100 g dans la courge ([USDA](#)), mangue, abricot),  $\beta$ -cryptoxanthine (ex : environ 0,2 mg / 100 g dans l'orange ([USDA](#)), pannique), zéaxanthine (ex : poivron rouge, baie de Goji) en  $\alpha$ -carotène (ex : abricot, courge), et en leurs dérivés époxy,
- les racines et tubercules (ex : carotte, patate douce) contiennent essentiellement de l' $\alpha$ -carotène (5 à 50 % des caroténoïdes totaux, soit environ 3,5 g / 100 g dans les carottes), du  $\beta$ -carotène (environ 8 mg / 100 g dans les carottes ([USDA](#))) et leurs intermédiaires de biosynthèse,
- les graines jaune orangé (ex : maïs, blé) accumulent de la lutéine (de l'ordre de 1 mg / 100 g ([USDA](#))), du  $\beta$ -carotène, de la zéaxanthine et des cryptoxanthines.





**Figure 5 :** Structure des principaux caroténoïdes synthétisés par les végétaux et retrouvés chez les animaux. (A) Carotène. (B) Xanthophylles.

Des espèces productrices de caroténoïdes sont présentes chez de nombreuses familles bactériennes, identifiables par la coloration de leurs cellules végétatives et/ou de leurs formes de conservation (spores). Parmi les caroténoïdes identifiés chez les eucaryotes, la plupart (à l'exception des dérivés époxy) sont également synthétisés par les bactéries. Toutefois, certains ne sont synthétisés naturellement que par un nombre très restreint d'espèces bactériennes. La zéaxanthine, par exemple, est principalement produite par les genres *Flavobacterium* et *Paracoccus*. Des études ont notamment décrit la synthèse de zéaxanthine par *Flavobacterium multivorum* et par les sous-espèces de *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (Berry, Bretzel et al. 2003). Les principales espèces bactériennes productrices des caroténoïdes majeurs sont présentées dans le tableau II.

**Tableau II :** Principaux caroténoïdes présents chez les bactéries, et leurs principales sources bactériennes.

Caroténoïdes	Souches bactériennes	Milieus de synthèse
Astaxanthine	<i>Paracoccus haeundaensis</i> sp. <i>Paracoccus carotinifaciens</i> sp. nov <i>Agrobacterium auranticum</i>	marin (côte coréenne) terrestre (Japon) marin (côte japonaise)
Zéaxanthine	<i>Flavobacterium multivorum</i> Aquapharm AQP096 <i>Paracoccus zeaxanthinifacien</i>	terrestre marin (côte britannique) terrestre
Canthaxanthine	<i>Halobacterium</i> sp. Aquapharm AQP002 <i>Gordonia jacobaea</i> <i>Brevibacterium</i> sp. KY-4313	sols de marais salants (Egypte) marin (côte britannique) aérien (Espagne) terrestre
$\beta$ -cryptoxanthine	<i>Flavobacterium lutescens</i>	terrestre
Adonixanthine diglucoside	<i>Paracoccus schoinia</i>	marin (côte japonaise)

En outre, d'autres caroténoïdes sont spécifiques aux bactéries, qui en synthétisent une plus grande variété que les espèces eucaryotes.

Les animaux sont incapables de synthétiser des caroténoïdes. Leur présence en fortes quantités, visible au niveau de certains organes chez les crustacés (carapace), les insectes (ailes), les poissons (chair), ou les oiseaux (plumes) résulte d'une absorption alimentaire. Par exemple :

- les œufs sont riches en lutéine et esters de lutéine, ils contiennent de la zéaxanthine lorsque les volailles sont nourries avec du maïs (en moyenne 350  $\mu$ g de lutéine et zéaxanthine pour 100 g ([USDA](#))),
- les bovins absorbent essentiellement du  $\beta$ -carotène (95 % des caroténoïdes totaux absorbés) et de la lutéine (environ 3 % des caroténoïdes) au niveau intestinal, qui se retrouve en faibles concentrations dans le lait ([Graulet, Chauveau-Duriot et al. 2006](#)),
- les crustacés et poissons à chair rose contiennent de l'astaxanthine et de la canthaxanthine, absorbées lorsqu'ils ingèrent des bactéries aquatiques.

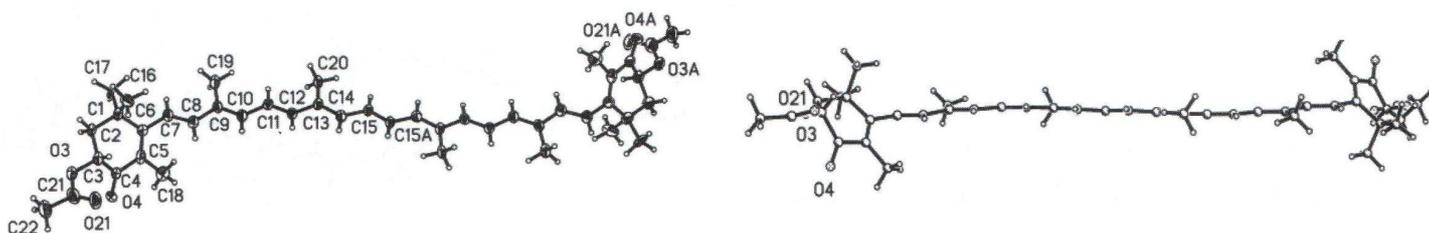
### 1.3. Caractéristiques structurales

#### 1.3.1. Classification, structure générale et isomérisation

Les caroténoïdes sont des molécules apolaires hydrophobes, appartenant à la famille des terpènes. Les terpènes représentent une grande classe de composés à fonctions très variées. L'appartenance à cette catégorie est établie sur des critères de structure et de biosynthèse ([Tapiero, Townsend et al. 2004](#)). L'unité de base de ces structures est l'isoprène composé de cinq atomes de carbone (C5). La plupart des caroténoïdes sont des tétraterpènes, issus de la condensation de huit unités en C5 et ont donc une structure hydrocarbonée composée de 40 atomes de carbone (structure en C40) ([Stahl and Sies 2003](#); [Stahl and Sies 2005](#); [Cuttriss, Cazzonelli et al. 2011](#)). Toutefois il existe aussi des structures en C30 ou C50 ([Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)).

Il existe une grande variété de structures parmi les caroténoïdes, en particulier pour ceux synthétisés par les bactéries ([Stahl and Sies 2003](#)), mais toutes dérivent des chaînes hydrocarbonées précédentes, lesquelles sont fortement insaturées. La variabilité de configuration des doubles liaisons induit la formation de plusieurs isomères *cis-trans* à partir d'un même caroténoïde ([Faure 2006](#)). En outre, la plupart des caroténoïdes portent des cycles  $\alpha$ - ou  $\beta$ -ionone en positions terminales, dont les modifications de structure déterminent la nature des divers caroténoïdes : position de la double liaison, ouverture des cycles, présence ou non de groupements hydroxyles ou oxo (ex : 3-hydroxy, 4-céto ou 5,6-époxy). Les caroténoïdes comportant des atomes d'oxygène constituent la classe des xanthophylles, alors que ceux composés uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène sont des carotènes.

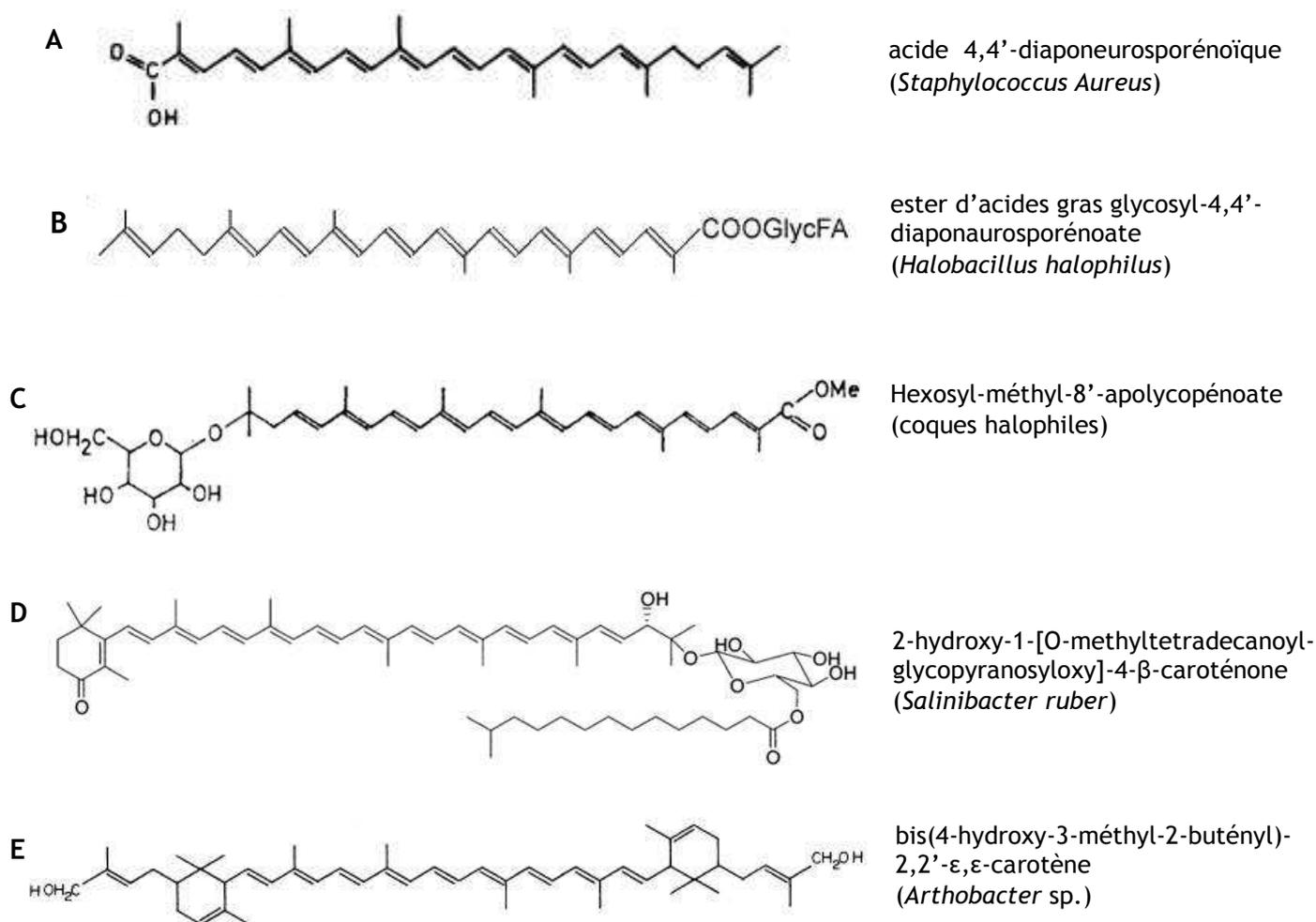
Les caroténoïdes sont des molécules avec une structure tridimensionnelle précise (figure 6), qui est déterminante pour leurs propriétés physico-chimiques et nutritionnelles ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 b](#)). Tout d'abord, les différents isomères géométriques *cis* (à des niveaux variables de la molécule) possèdent des propriétés de solubilité et de stabilité différentes par rapport à l'isomère *trans*. Par ailleurs, la plupart des caroténoïdes connus ont au moins un carbone asymétrique, pouvant induire des isomères optiques variés, dont des énantiomères ([Liaaen-Jensen 2008](#)). Enfin, même si théoriquement des rotations de la molécule sont possibles au niveau de toutes les simples liaisons C-C, les caroténoïdes prennent préférentiellement une conformation linéaire, à basse énergie.



**Figure 6 :** Exemples de représentation tridimensionnelle d'un dérivé de caroténoïde (diacétate de 6-*cis*-astaxanthine) ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 b](#)). En représentation spatiale, on voit ici que la chaîne isoprénoïde est linéaire, mais que les deux cycles en positions terminales ne sont pas dans le même plan.

### 1.3.2. Spécificités des caroténoïdes bactériens

Alors que les végétaux et les algues produisent des caroténoïdes à partir de chaînes en C40, les bactéries synthétisent des caroténoïdes à la fois à partir de chaînes en C40 et de chaînes en C30 (figure 7) ([McDermott, Ben-Aziz et al. 1973](#); [Sandmann 1993](#); [Köcher, Breitenbach et al. 2009](#)). Cette plus grande diversité parmi les caroténoïdes bactériens est due aux précurseurs prényl diphosphates (IPP : isopentényl diphosphate en C10, FPP : farnésyl diphosphate en C15 ; et GGPP : géranyl géranyl diphosphate en C20), qui entrent en jeu aux premiers stades de la biosynthèse des caroténoïdes. La liaison de deux molécules de prényl diphosphate est catalysée par des enzymes phytoène synthases, formant des phytoènes, 8'-apophytoènes et 4,4'-diapophytoènes ([Perez-Fons, Steiger et al. 2010](#)). D'autres enzymes catalysent ensuite l'addition de groupements hydroxy ou céto sur les chaînes acycliques en C40 (ex : chez les protéobactéries pourpres), ou sur les chaînes acycliques en C30 (ex : chez *Heliobacter*, *Staphylococcus*). Les chaînes acycliques peuvent par ailleurs être prolongées par une ou deux unités supplémentaires en C5 (ex : chez *Brevibacterium*, *Corynebacterium*), formant des molécules en C45 ou C50 (figure 7 E) ([Pfander 1976](#); [Cutting 2008](#)). La cyclisation des chaînes précédentes donne un certain nombre de caroténoïdes inconnus chez les autres organismes ([Yoshida, Ueda et al. 2009](#)). Enfin, les caroténoïdes bactériens peuvent être glycosylés et/ou sous forme d'esters d'acides gras ([Aasen, Francis et al. 1969](#); [Pfander 1976](#); [Marshall and Wilmoth 1981](#); [Lutnaes, Oren et al. 2002](#)).



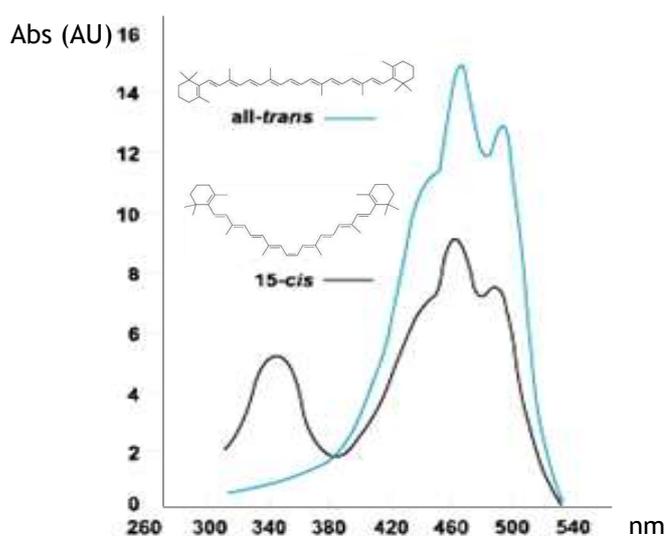
**Figure 7 :** Exemples de caroténoïdes bactériens. (A) C30, linéaire, hydroxylé ([Marshall and Wilmoth 1981](#)) (B) C30, linéaire, glycosylé et estérifié avec chaîne secondaire saturée ([Köcher, Breitenbach et al. 2009](#)) (C) C30, linéaire, glycosylé, estérifié ([Aasen, Francis et al. 1969](#)) (D) C40, cyclique, glycosilé et estérifié avec chaîne secondaire saturée ([Lutnaes, Oren et al. 2002](#)), (E) C50, linéaire, hydroxylé ([Pfander 1976](#))

## 1.4. Caractérisation des caroténoïdes

### 1.4.1. Spectroscopie

Le premier critère pour la détermination des caroténoïdes est leur spectre UV/visible ([Liaaen-Jensen and Lutnoes 2008](#)), qui possède souvent trois bandes entre 400 et 500 nm (certains, comme l'astaxanthine, n'en possèdent qu'une). Le degré de conjugaison du chromophore détermine les propriétés d'absorption du caroténoïde ([Niva 2007](#)). Un composé doit comporter au moins sept doubles liaisons conjuguées (cas du  $\zeta$ -carotène) pour absorber la lumière visible. Au-delà de sept, plus le nombre de doubles liaisons conjuguées est important plus la longueur d'onde d'absorption maximale du caroténoïde ( $\lambda_{\max}$ ) est grande et plus sa couleur tend vers le rouge foncé ([Morin-Savy 2007](#)). Les mesures d'absorbance à  $\lambda_{\max}$  permettent en outre l'analyse quantitative des caroténoïdes dont le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  est connu.

Les isomères *cis* se distinguent des molécules linéaires par une absorption à des longueurs d'onde légèrement plus basses (hypsochromie de 2 à 6 nm), avec des coefficients d'extinction molaire plus faibles et des spectres ayant une structure fine moins nette. Ils sont parfois également reconnaissables par un pic *cis*, qui apparaît 142 nm plus bas que le pic d'absorbance à la plus haute longueur d'onde (figure 8). La hauteur relative entre le pic *cis* et le maximum d'absorbance du caroténoïde permet de distinguer ses différents isomères *cis* ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 1994](#)).



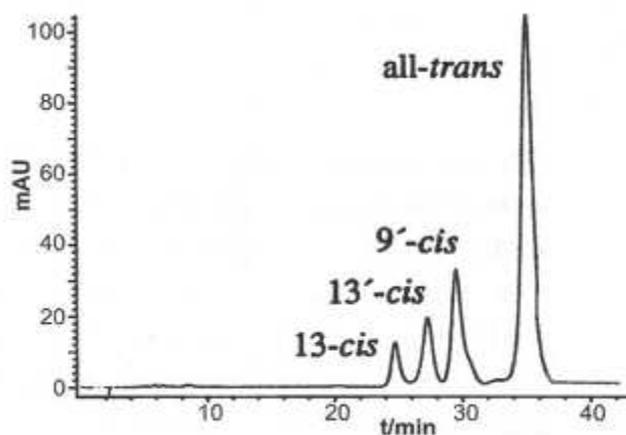
**Figure 8** : Différences spectrales en UV/visible, entre les isomères *trans* et 15-*cis* du  $\beta$ -carotène. L'isomère *cis* absorbe moins la lumière à 460 nm et une bande supplémentaire apparaît vers 340 nm.

La confirmation de la structure des isomères *cis* peut être obtenue par spectroscopie de résonance Raman ou par spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C ([Hengartner, Bernhard et al. 1992](#); [Britton, Liaaen-Jensen et al. 1994](#); [Liaaen-Jensen and Lutnoes 2008](#)).

#### 1.4.2. Chromatographie

L'identification et la séparation de caroténoïdes ou de différents isomères sont couramment conduites par analyse HPLC en phase inverse ou phase nitrile ([Khachik 2009](#)). La distinction entre les divers carotènes et xanthophylles se fait le plus souvent sur des colonnes de silice greffée en C18. Toutefois, les colonnes en C30 sont particulièrement efficaces pour la séparation des isomères *cis/trans* (exemple de séparation des isomères en figure 9 ([Liaaen-Jensen and Lutnoes 2008](#))).

La combinaison à la spectrométrie de masse est un outil efficace pour confirmer l'identification d'un composé caroténoïde ([Careri, Elviri et al. 1999](#); [Rodriguez-Amaya 2010](#)). L'ionisation par impact électronique induit la détection d'ions caractéristiques d'isomères *cis* en M-92 et M-106 (expulsion de toluène ou xylène à partir de la chaîne polyène). En revanche, cette technique ne donne pas d'information supplémentaire permettant de localiser les doubles liaisons *cis* des isomères.



**Figure 9** : Chromatogramme à 490 nm, de 4 isomères géométriques (*cis/trans*) de la fucoxanthine, séparés par HPLC en phase inverse sur colonne en C30, avec un flux de solvants hexane/acétate d'isopropyle/isopropanol/N-éthyl-diisopropylamine ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 b](#)).

L'identification par spectroscopie de résonance Raman ([El-Abassy, Donfack et al. 2010](#)) et par spectroscopie proche infra-rouge (NIRS) ([Sun, Ma et al. 2010](#)) est très prometteuse et ne nécessite pas de solvants. Mais ces techniques restent peu employées et

requièrent encore de valider les méthodes pour généraliser leur utilisation ([Rodriguez-Amaya 2010](#)).

Les analyses quantitatives sont quant à elles généralement conduites en couplant l'HPLC à un détecteur à barrette de diode (DAD).

## 1.5. Propriétés physico-chimiques

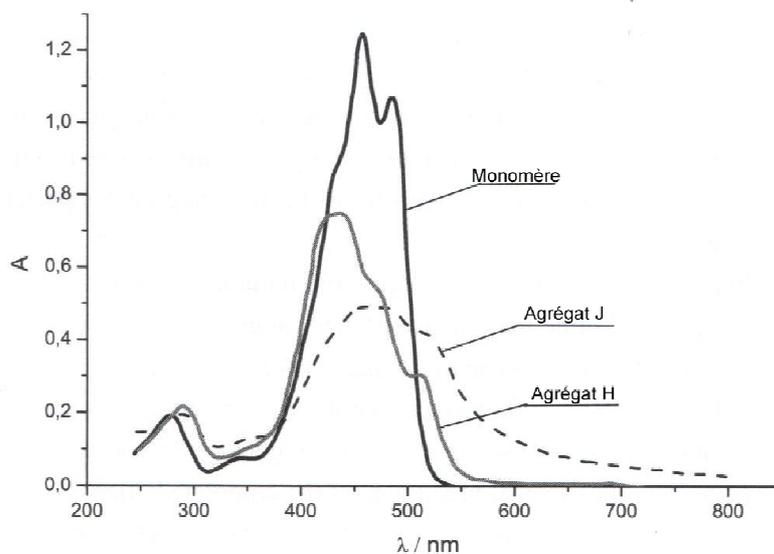
### 1.5.1. Solubilité

De nature lipidique, les caroténoïdes sont solubles dans des solvants organiques plus ou moins polaires (hexane, dichlorométhane, tétrahydrofurane, acétone, méthanol, éthanol, ...) en fonction du degré d'oxydation ou de substitution des caroténoïdes.

### 1.5.2. Interactions moléculaires

*In situ* dans les organismes vivants et en formulation dans les aliments, les caroténoïdes sont localisés dans des systèmes complexes (notamment avec des protéines et des lipides) et sont présents dans des structures subcellulaires organisées. Leurs propriétés physico-chimiques apparentes sont alors influencées par leurs interactions avec les molécules environnantes ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 b](#)). À l'inverse, les caroténoïdes modifient également les propriétés des matrices dans lesquelles ils sont contenus.

De par leur caractère fortement hydrophobe, les caroténoïdes ont tendance à s'agréger et à cristalliser, en particulier dans des milieux aqueux ([Köhn, Kolbe et al. 2008](#)). L'agrégation fait varier l'absorption de la lumière (figure 10), la réactivité chimique et la solubilité des caroténoïdes. Les agrégats "H" sont caractérisés par une organisation à peu près parallèle et très serrée des chaînes conjuguées des molécules ; et sont reconnaissables par un décalage hypsochromique (vers le bleu) du spectre d'absorption (perte de la structure vibrationnelle à l'état excité). Les agrégats "J" sont caractérisés par une organisation en tête-à-queue des chaînes conjuguées, formant un assemblage beaucoup plus lâche des molécules ; et sont reconnaissables par un décalage bathochromique (vers le rouge) du spectre d'absorption. En fonction de leur densité, des agrégats de 30 nm par exemple sont formés d'un maximum de 10 000 molécules.



**Figure 10 :** Exemple des spectres d'absorption UV/visible du  $\beta$ -carotène dissous dans le dichlorométhane (monomère), sous forme de cristaux formés à faible concentration de  $\beta$ -carotène dans l'huile végétale (agrégats H) et sous forme de cristaux formés à forte concentration dans l'huile végétale (agrégat J) ([Köhn, Kolbe et al. 2008](#)).

Les caroténoïdes ont par ailleurs tendance à s'associer à d'autres lipides (triglycérides, acides gras, phospholipides) et à des structures hydrophobes comme les membranes biologiques. En fonction de leur taille et de leur configuration, ils prennent une orientation spécifique au cœur des bicouches lipidiques et modifient ainsi leurs propriétés.

Des interactions entre les caroténoïdes et des protéines ont lieu dans tous types d'organismes vivants (ex : association avec la sérum albumine dans le sang, par liaisons hydrophobes) ([Wackerbarth, Stoll et al. 2009](#)). Ces interactions stabilisent fortement les caroténoïdes et modifient également leurs propriétés, en particulier leur absorption de la lumière (ex : les caroténoprotéines bleues formées par interaction avec la chitine dans la carapace de certains invertébrés, comme le homard) ([Britton and Helliwell 2008](#)). Des enregistrements du spectre de dichroïsme circulaire, associés à la détection par fluorescence donnent des indications sur les associations caroténoïde/protéine qui se forment en solutions (liaison de forme monomérique, assemblages macromoléculaires...) ([Zsila, Simonyi et al. 2003](#)).

### 1.5.3. Réactivité

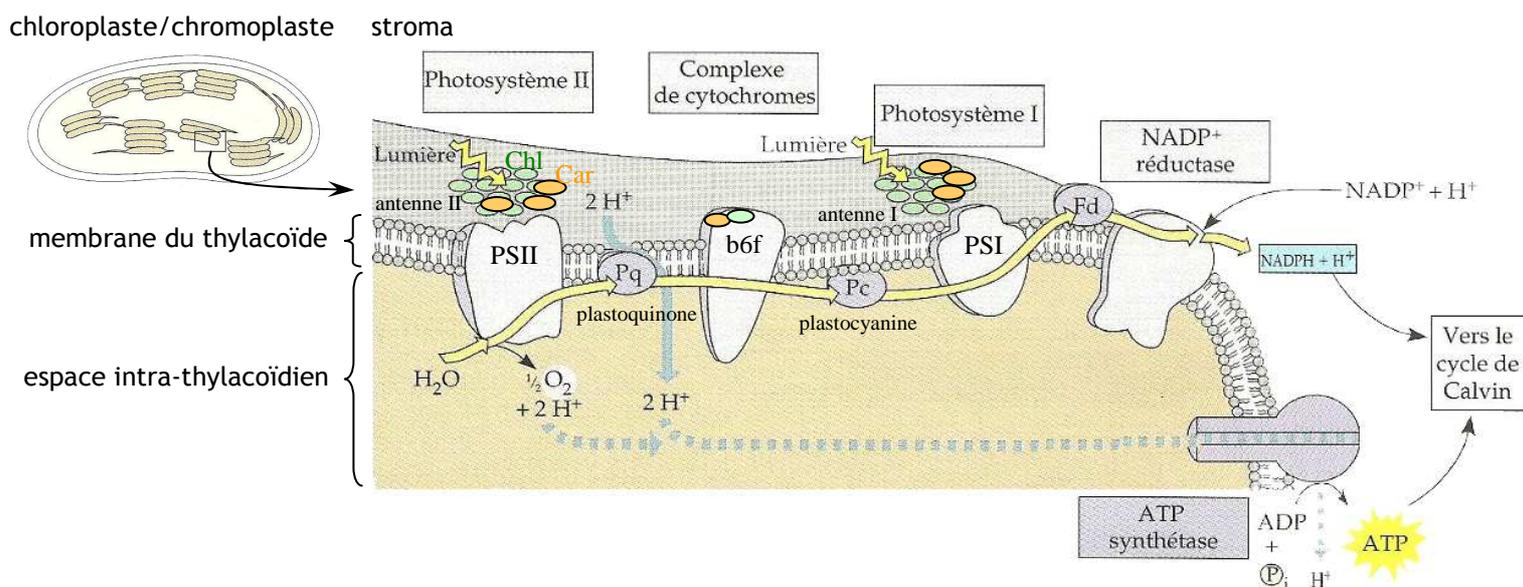
Les caroténoïdes sont sensibles à la lumière (surtout aux UV), au chauffage, à l'oxygène, à certains réactifs chimiques (acides et dans quelques cas des bases), et aux espèces oxydantes (métaux de transition, hydroxydes lipidiques). En effet, la chaîne polyène riche en électrons est la cible d'attaque par des réactifs électrophiles ou des radicaux oxydants ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 b](#)).

Tous ces facteurs peuvent induire l'isomérisation de certaines des doubles liaisons *trans* de la chaîne, mais aussi induire des réactions qui dégradent les caroténoïdes, libérant des produits de coupure, des dérivés d'oxydation, des peroxydes de caroténoïdes... Même sous forme cristalline, les caroténoïdes peuvent être dégradés rapidement dès qu'ils sont stockés en présence d'oxygène.

### 1.6. Fonctions biologiques

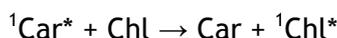
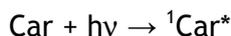
#### 1.6.1. Rôle dans la photosynthèse

Chez les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes interviennent essentiellement au niveau de l'antenne photosynthétique (figure 11). Ils sont impliqués dans la photosynthèse selon plusieurs mécanismes ([Telfer, Pascal et al. 2008](#)).



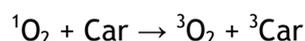
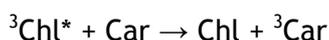
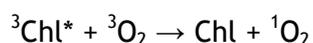
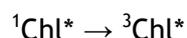
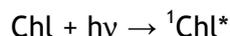
**Figure 11 :** Localisation des caroténoïdes dans les thylakoïdes, au niveau de l'antenne des photosystèmes I et II et du cytochrome b6f dans la chaîne photosynthétique chez les végétaux supérieurs. **Chl** : chlorophylle. **Car** : caroténoïdes. D'après ([Campbell 1993](#)).

Leur rôle principal consiste à capter l'énergie lumineuse et à la transmettre à la chlorophylle par excitation singulet-singulet ([Britton 2008 a](#)) :



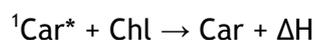
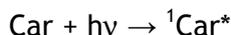
La photosynthèse est alors efficace sur un plus large éventail de longueurs d'ondes.

En conditions aérobies, ils ont une fonction photoprotectrice contre l'oxydation photosensibilisée. Ils limitent la formation de l'oxygène singulet ( ${}^1\text{O}_2$ ), soit en le piégeant directement, soit en séquestrant rapidement les formes excitées (triplets) de la chlorophylle :



L'oxygène singulet est en effet une espèce très réactive de l'oxygène et il induit l'oxydation des pigments, des protéines et des lipides membranaires constitutifs de l'appareil photosynthétique. Dans les conditions naturelles, les complexes pigment-protéine de la chaîne photosynthétique contenant de la chlorophylle renferment presque systématiquement une molécule de caroténoïde pour 3 à 4 molécules de chlorophylle.

Un autre mécanisme protecteur majeur présent dans la plupart des organismes aérobies est la séquestration non-photochimique, au cours de laquelle les caroténoïdes récupèrent l'énergie d'excitation en excès et restituent de la chaleur ([Telfer, Pascal et al. 2008](#)) :



Ceci minimise les réactions de réduction au niveau du cytochrome PSII et la formation ultime de nouvelles espèces oxydatives toxiques (en particulier les superoxydes et les radicaux hydroxyles).

Dans le cytochrome  $b_6f$  (figure 11), une molécule de chlorophylle et une molécule de caroténoïde ont été isolées ([Wenk, Schneider et al. 2005](#)). Elles n'ont pas de rôle dans la captation de l'énergie lumineuse, mais servent plutôt à transférer un signal contrôlant la formation ou la destruction des complexes photosynthétiques. Enfin, les caroténoïdes

agissent comme indicateurs d'un gradient de potentiel membranaire dans les chlorosomes (chez les bactéries photosynthétiques) ou au niveau des thylakoïdes des chloroplastes (chez les plantes et les algues) ([Telfer, Pascal et al. 2008](#)). En effet, un potentiel membranaire dû au transfert des électrons à partir des cytochromes PSI ou PSII modifie l'absorption des caroténoïdes à 515 nm ("effet Stark").

### 1.6.2. Rôles de signalisation et de reproduction

Chez les végétaux, les caroténoïdes participent, avec les bétalaines et les polyphénols, à la couleur des fleurs, des fruits et des racines. Les couleurs attirent les insectes et les oiseaux, favorisant la pollinisation et la dispersion des graines. Les produits enzymatiques et non enzymatiques de la dégradation des caroténoïdes contribuent par ailleurs au parfum et à l'arôme, ainsi qu'à l'attraction ou à la répulsion des insectes ([Blount and McGraw 2008](#); [Britton 2008 a](#); [Cuttriss, Cazzonelli et al. 2011](#)). Les caroténoïdes sont aussi précurseurs de métabolites ayant des fonctions de phytohormones, comme l'acide abscissique (rôle dans l'abscission des feuilles et la dormance des bourgeons), qui est formé à partir de la xanthoxine (produit d'oxydation et de coupure de la 9-*cis*-néoxanthine issue du  $\beta$ -carotène).

Chez les animaux, les couleurs ont de nombreux rôles, dont des fonctions d'avertissement et de reproduction. Les caroténoïdes sont impliqués, avec les phœmélanines (monomères rouges ou jaunes issus de l'oxydation des acides aminés de la mélanine) et les ptérides (composé hétérocyclique à noyau pyrazine), dans la coloration des poils et des plumes rouge orangé. Certains sont associés à la kératine dans les plumes ([Britton 2008 a](#)). Chez les invertébrés et les animaux à sang froid, les caroténoïdes sont souvent localisés dans des gouttelettes lipidiques ou des vésicules au sein des chromophores du derme. L'accumulation ou l'agrégation des caroténoïdes (régulées par la lumière et sous contrôle hormonal) modifient la perception de la couleur et participent au camouflage de ces animaux ([Blount and McGraw 2008](#)).

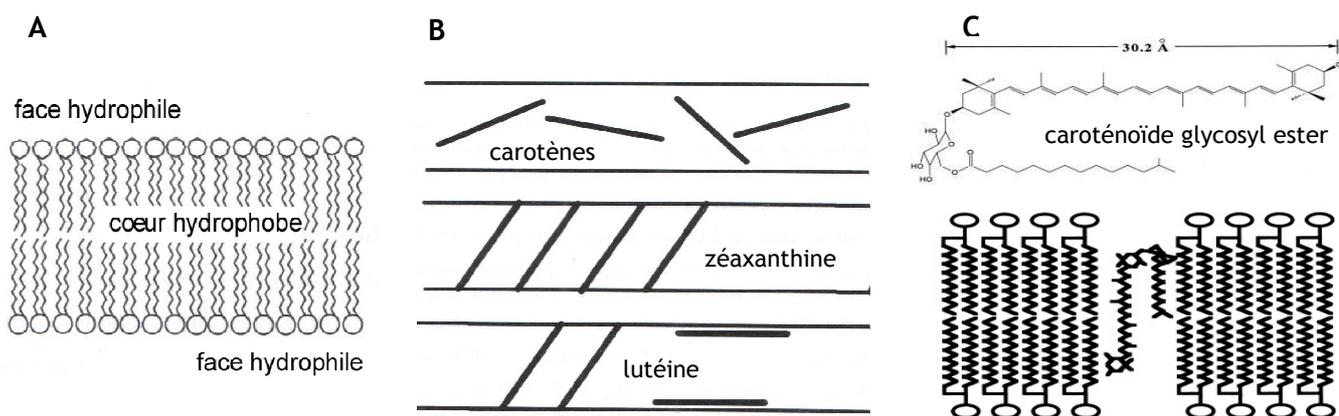
La coloration des champignons, des levures et des bactéries due aux caroténoïdes est souvent fortuite. En effet, la couleur a un rôle mineur chez ces espèces. Les caroténoïdes servent alors surtout à la photoprotection et au renforcement des membranes cellulaires.

### 1.6.3. Rôle dans l'organisation des membranes cellulaires

Plusieurs facteurs déterminent la localisation et l'orientation des caroténoïdes au sein des membranes biologiques (figure 12), influençant alors leur impact sur les propriétés des bicouches lipidiques ([Britton 2008 a](#)) :

- structure linéaire ou coudée (isomères *cis/trans*),
- présence ou pas de groupes polaires en positions terminales,
- structure tridimensionnelle (énantiomères, coplanéité).

Les carotènes comme le  $\beta$ -carotène et le lycopène sont totalement lipophiles et restent dans la couche interne hydrocarbonée de la membrane. Des mesures spectroscopiques sous lumière polarisée (dichroïsme linéaire) montrent que ces caroténoïdes ont une orientation moyenne perpendiculaire aux chaînes acyles des lipides. Les groupements polaires des caroténoïdes (ex : hydroxyles) sont associés aux têtes polaires des phospholipides des membranes. En outre, des différences structurales mineures entre deux caroténoïdes peuvent induire des comportements très distincts dans les membranes. La zéaxanthine et la lutéine, par exemple, ont une stéréochimie légèrement différente, qui modifie leur orientation. La zéaxanthine traverse toujours la membrane, alors que la lutéine peut aussi se trouver parallèle à la membrane, du côté hydrophobe. Les caroténoïdes glycosylés produits par certaines bactéries (figure 12 C) ont tendance à se positionner parallèlement aux phospholipides de la membrane, car leurs extrémités sont attirées vers les faces hydrophiles ; s'ils portent une chaîne secondaire d'acide gras saturé, celle-ci est repliée vers le cœur hydrophobe ([Hara, Yuan et al. 1999](#)).



**Figure 12 :** (A) Représentation d'une bicouche lipidique. (B) Localisation et orientations des carotènes (ex :  $\beta$ -carotène, lycopène) dans le cœur hydrophobe et des xanthophylles (ex : zéaxanthine, lutéine) à travers la membrane ([Britton 2008 a](#)). (C) Localisation et orientation de glycosylesters avec chaîne secondaire d'acide gras (ex : thermozéaxanthine de *Thermus thermophilus*) à travers la membrane ([Hara, Yuan et al. 1999](#)).

Des mesures par colorimétrie et par spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) ou RPE (résonance paramagnétique électronique) donnent des indications sur l'effet (direct ou indirect) des caroténoïdes sur la structure, la fluidité et la perméabilité des membranes ([Britton 2008 a](#)) :

- les plus polaires, comme la lutéine ou la zéaxanthine réduisent la mobilité des lipides et augmentent la rigidité membranaire. Les xanthophylles ont ainsi un rôle stabilisateur,
- le  $\beta$ -carotène augmente la mobilité individuelle des lipides au niveau des régions polaires de la membrane,
- le  $\beta$ -carotène et, dans une moindre mesure, la zéaxanthine, augmentent la pénétrabilité de petites molécules et d'ions dans la région polaire de la membrane,
- les caroténoïdes bactériens glycosyl esters qui réduisent la fluidité membranaire induisent une plus grande résistance à la température et réduisent la perméabilité ([Hara, Yuan et al. 1999](#)),
- les caroténoïdes polaires limitent la pénétrabilité de l'oxygène moléculaire dans la bicouche lipidique de la membrane.

Alors que le cholestérol est le principal facteur de la stabilité membranaire, ce rôle semble être assuré par les caroténoïdes chez les souches bactériennes qui ne produisent pas ou n'accumulent pas de cholestérol. La longueur des caroténoïdes bactériens (la plupart en C40) leur permet par ailleurs de traverser totalement les bicouches lipidiques, contrôlant leur épaisseur. Les bactéries productrices de caroténoïdes en C30 ont ainsi des membranes plus fines, alors que celles synthétisant des caroténoïdes en C45 ou C50 ont des membranes plus épaisses. Enfin, La présence de terminaisons glycosylées favorise l'insertion des caroténoïdes dans des membranes très épaisses de certaines espèces, en renforçant leur liaison avec la face polaire des membranes.

#### 1.6.4. Défenses antioxydantes

L'intérêt des caroténoïdes tient également à leurs propriétés antioxydantes ([Britton 2008 a](#)).

À un stade précoce de l'oxydation, les caroténoïdes peuvent bloquer les composés initiateurs d'oxydation (radiations UV, métaux de transition, réactifs chimiques...) et ainsi empêcher la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

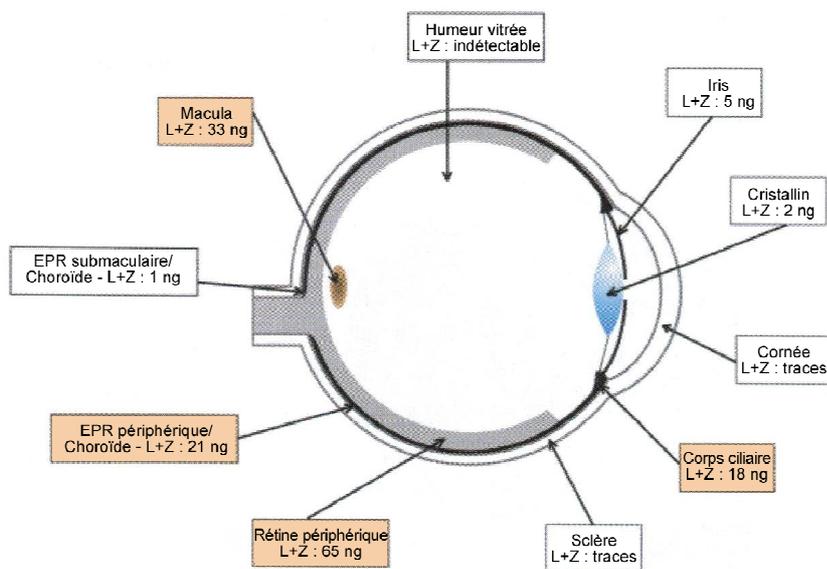
Si des espèces réactives de l'oxygène sont malgré tout formées, la structure des caroténoïdes permet de les piéger, en particulier l'oxygène singulet chez les végétaux, protégeant ainsi la cellule. Cet effet antioxydant présente un avantage pour toutes les espèces aérobies, qu'elles soient ou non photosynthétiques ([Cutting 2008](#)).

Lorsque l'oxydation est déjà initiée, les caroténoïdes peuvent interrompre la propagation en piégeant les radicaux libres formés (peroxydes...). Au niveau des membranes, par exemple, les caroténoïdes protègent les chaînes acyles insaturées de la peroxydation, et donc évitent leur dénaturation et la déstructuration des membranes. Les carotènes localisés dans le cœur hydrophobe protègent essentiellement des radicaux libres de cette zone. Les xanthophylles en revanche sont capables d'avoir un rôle protecteur également sur la face polaire en contact avec la phase aqueuse.

#### 1.6.5. Photorécepteurs et rôle dans la vision

La capacité de voir nécessite la présence de photorécepteurs. Chez les animaux, les photorécepteurs des yeux sont des métabolites du rétinal ou un dérivé proche complexé à une protéine d'opsine. Le principal pigment de la vue est la rhodopsine. Certains caroténoïdes natifs sont également indispensables dans le processus de la vision. La fovéa est la région la plus sensible de la rétine de l'œil chez l'homme et les primates. Elle comprend une petite zone jaune, la macula lutea (zone de la rétine assurant la vision centrale, figure 13), qui contient de fortes concentrations de zéaxanthine, de lutéine et de méso-zéaxanthine (isomère 3R, 3'S, métabolite de la lutéine) ([Britton 2008 a](#)). Ces xanthophylles protègent la rétine de l'intensité lumineuse et limitent notamment les risques de développement d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). En particulier, les caroténoïdes jouent un rôle de filtre contre la lumière bleue (la plus

dangereuse, car celle qui contient le plus d'énergie) et leur fonction protectrice contre les dommages oxydants est importante.



**Figure 13** : Anatomie de l'œil humain et distribution des xanthophylles maculaires (lutéine et zéaxanthine) dans les différentes parties de l'œil ([Schalch, Landrum et al. 2009](#)). Quantités moyennes pour un œil.

Chez certains oiseaux et reptiles, les cellules de la rétine contiennent des gouttelettes lipidiques riches en caroténoïdes en plus des photorécepteurs. Les principaux sont l'astaxanthine, la galloxanthine et le  $\epsilon$ -carotène. Ils servent de filtre à la lumière bleue et améliorent la perception des couleurs.

### 1.6.6. Photoprotection

Le rôle de protection des caroténoïdes contre les dommages causés aux organismes vivants par la lumière est essentiel. En effet, l'énergie lumineuse, associée à l'oxygène est le principal initiateur de l'oxydation *via* la formation de radicaux libres. Les caroténoïdes agissent essentiellement comme des filtres ([Britton 2008 a](#)). En présence de composés photosensibilisants endogènes (ex : chez certaines bactéries ; ou protoporphyrines produites dans le sang chez les personnes atteintes d'une maladie génétique, la protoporphyrine érythropoïétique) ou exogènes (présents dans l'environnement), de l'oxygène singulet est très facilement formé par transfert d'énergie et devient toxique pour les organismes. Or, les caroténoïdes peuvent récupérer l'énergie lumineuse et la dissiper, évitant ainsi la formation d' $^1O_2$ . Ils peuvent aussi neutraliser  $^1O_2$  en récupérant son énergie excédentaire pour donner  $O_2$ . Puis, ils dissipent cette énergie sous forme de

chaleur. Chez l'homme, cette protection se manifeste par exemple en retardant l'inflammation de la peau (érythème) en présence de soleil ([Krinsky 1989](#)).

## 1.7. Rôle en nutrition préventive chez l'homme

Comme les autres animaux, l'homme est incapable de synthétiser des caroténoïdes. Ils doivent donc être absorbés via l'alimentation. Parmi les nombreux caroténoïdes naturels identifiés (au moins 600), environ une quarantaine seraient présents dans l'alimentation humaine et seulement une vingtaine d'entre eux sont retrouvés dans le corps humain à des concentrations détectables par les méthodes analytiques courantes. Les plus fortes concentrations de caroténoïdes sont retrouvées dans le tractus gastro-intestinal ([Halliwell, Zhao et al. 2000](#)). Après absorption intestinale, ils s'accumulent dans les compartiments lipophiles (membranes, lipoprotéines...) ([Tapiero, Townsend et al. 2004](#); [McNulty, Jacob et al. 2008](#); [Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)). Le plus haut taux de caroténoïdes se trouve alors dans le foie et le tissu adipeux, mais ils sont également présents entre autres dans le côlon, le pancréas, la prostate, la macula de l'œil et la peau. Les caroténoïdes les plus couramment retrouvés dans le sang sont le lycopène, l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -carotène (formes *trans* et *cis*), la  $\beta$ -cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine ([Krinsky and Johnson 2005](#)).

### 1.7.1. Modes d'action des caroténoïdes dans l'organisme

Les propriétés nutritionnelles des caroténoïdes *in vivo* peuvent être expliquées par divers mécanismes ([Faure, Fayol et al. 1999](#)). Leur activité antioxydante serait un des principaux mais a probablement lieu essentiellement au niveau du tractus gastro-intestinal, là où la concentration des caroténoïdes est la plus importante. En effet, vu leur faible biodisponibilité, leur teneur dans le sang et les tissus est environ 50 fois plus faible. Or, il est aujourd'hui admis que dans ces conditions l'activité antioxydante des caroténoïdes est mineure au regard des autres défenses antioxydantes de l'organisme ; et que d'autres activités prévalent, comme par exemple la régulation de l'expression génétique, induisant entre autres des mécanismes cellulaires anti-inflammatoires et/ou anticancérogènes.

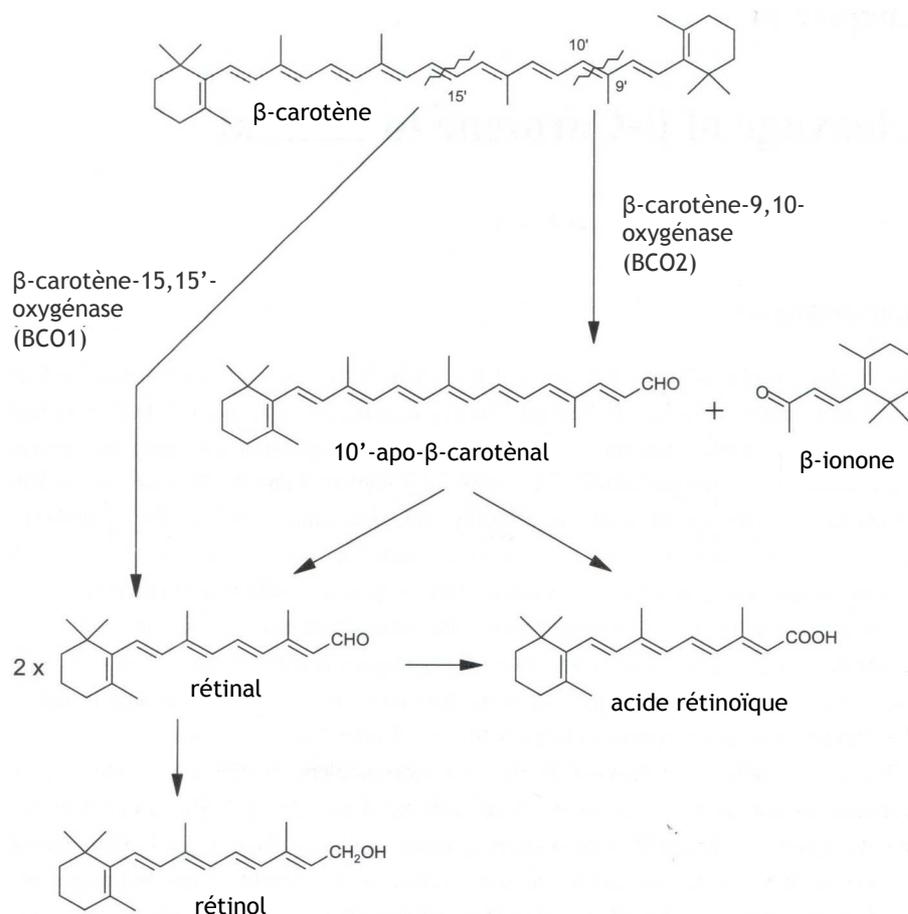
#### 1.7.1.1. Activité provitaminique A

Certains caroténoïdes sont des éléments nutritifs importants pour l'organisme ([Paiva and Russell 1999](#)), notamment en raison de leur rôle en tant que précurseurs de la vitamine A (rétinol), que l'on retrouve dans la circulation sanguine après l'ingestion de ces caroténoïdes. Dans les pays en voie de développement, 70 % de la vitamine A ingérée provient des caroténoïdes contenus dans les fruits et légumes de l'alimentation. En revanche, dans les pays occidentaux où la consommation d'autres sources de vitamine A est importante (ex : œufs, viande, poisson), moins de 30 % de la vitamine A ingérée provient des caroténoïdes végétaux ([Tang and Russell 2009](#)). La conversion des caroténoïdes en vitamine A a essentiellement lieu dans l'intestin grêle, au niveau de l'entérocyte. Elle peut aussi se produire après l'absorption, au niveau des tissus de réserve et notamment du foie, du tissu adipeux, des poumons et des reins.

Le rôle provitaminique A du  $\beta$ -carotène a été mis en évidence en premier, en 1930 ([Moore 1930](#)). La conversion du  $\beta$ -carotène en vitamine A peut se faire selon deux voies (figure 14) :

- la coupure centrale du  $\beta$ -carotène sous l'effet de l'enzyme  $\beta$ -carotène-15,15'-oxygénase forme deux molécules de rétinal, ensuite réduites en rétinol (qui est stocké dans le foie sous forme de rétinyl esters),
- la coupure asymétrique du  $\beta$ -carotène sous l'effet de l'enzyme  $\beta$ -carotène-9,10-oxygénase forme une molécule de  $\beta$ -ionone et une molécule de 10'-apo- $\beta$ -caroténal, lui-même ensuite clivé en acide rétinoïque ou en rétinal (ensuite réduit en rétinol ou oxydé en acide rétinoïque).

Ces deux enzymes (et donc les deux voies de conversion) coexistent à la fois dans l'intestin et dans les autres tissus. L'activité relative des deux enzymatiques dépend de la présence d'antioxydants comme l' $\alpha$ -tocophérol ([Tang and Russell 2009](#)).



**Figure 14 :** Formation de la vitamine A (rétinol) à partir du  $\beta$ -carotène, par coupure enzymatique centrale (libération de deux molécules de rétinol) ou asymétrique (libération de  $\beta$ -ionone et d'une molécule de rétinol ou d'une molécule d'acide rétinolique) ([Tang and Russell 2009](#)).

D'autres caroténoïdes comme l' $\alpha$ -carotène, la  $\beta$ -cryptoxanthine ou les isomères *cis* du  $\beta$ -carotène sont aussi des précurseurs importants de la vitamine A (l' $\alpha$ -carotène libère de l' $\alpha$ -rétinol). L'efficacité relative des différents caroténoïdes à fournir de la vitamine A est exprimée par rapport au  $\beta$ -carotène. Le 9-*cis*- $\beta$ -carotène et le 13-*cis*- $\beta$ -carotène, par exemple, libèrent respectivement 32 % et 62 % de la quantité de vitamine A produite à partir du  $\beta$ -carotène (en quantités égales) ([Deming, Baker et al. 2002](#)).

La conversion enzymatique des caroténoïdes en vitamine A est contrôlée, notamment par la concentration de rétinol dans le sang. Un statut normal en vitamine A correspond à une concentration plasmatique de 0,4 à 0,7  $\mu\text{mol/L}$ . Un excès de vitamine A est toxique (démangeaisons, nausées, problèmes musculaires), mais peut être rapidement corrigé. À l'inverse, une carence en vitamine A entraîne de sérieux problèmes de vue. Le rétinol joue aussi un rôle dans l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses ([Wang 2009](#)). Le rétinol est, quant à lui, essentiellement combiné à des protéines par liaison

covalente avec des résidus lysine, pour former des photorécepteurs (pigments de l'œil chez les animaux). Enfin, l'acide rétinoïque a un rôle important dans la reproduction, l'embryogénèse, la différenciation cellulaire et dans la régulation de gènes (action sur certaines réponses hormonales ou à la vitamine D) *via* les récepteurs RAR (récepteurs de l'acide rétinoïque) et RXR (récepteurs rétinoïques) ([Britton 2008 b](#); [Tang and Russell 2009](#)).

#### 1.7.1.2. Activités de prévention contre certaines maladies

Les caroténoïdes seraient également impliqués dans la prévention de certaines maladies ([Paiva and Russell 1999](#); [Britton 2008 a](#)). Ces problématiques sont étudiées chez l'animal et font l'objet d'études cliniques chez l'homme. L'effet bénéfique des caroténoïdes a été démontré dans des cas de maladies de l'œil dont la DMLA, de l'érythème induit par la lumière, pour la réduction de l'incidence de maladies associées au syndrome métabolique (inflammation du tissu adipeux, maladies cardiovasculaires) et de certains cancers ([Tapiero, Townsend et al. 2004](#); [Krinsky and Johnson 2005](#); [Stahl and Sies 2005](#); [Britton, Liaaen-Jensen et al. 2009](#); [Rock 2009](#)). Enfin les caroténoïdes auraient un rôle dans la régulation du système immunitaire, dans la protection de la stabilité génomique ([Stahl and Sies 2003](#)) et dans la fertilité (ex : accumulation dans le *corpus luteum* des ovaires).

L'action des caroténoïdes dans la prévention de ces maladies serait liée en particulier à leur pouvoir antioxydant ([Boon, McClements et al. 2010](#)) (effets sur l'initiation et/ou la propagation de réactions oxydantes : absorption de la lumière, inhibition d'enzymes oxydantes, interaction avec des métaux de transition, piégeage de l'oxygène singulet et de certaines espèces oxydantes réactives comme les radicaux peroxytes, protection des LDL contre l'oxydation cellulaire...) ([Stahl and Sies 2003](#); [Tapiero, Townsend et al. 2004](#); [Stahl and Sies 2005](#); [Yeum, Aldini et al. 2009](#)). Cependant, d'autres propriétés biochimiques telles que l'induction ou la stimulation de la communication intercellulaire *via* les jonctions communicantes (régulation de la multiplication cellulaire) ([Tapiero, Townsend et al. 2004](#)) ou la régulation de voies signalétiques ou de l'expression de gènes ([Stahl and Sies 2005](#); [Palozza, Serini et al. 2009](#)) sont de plus en plus souvent mises en évidence ([Rodriguez-Amaya 2010](#)), induisant divers mécanismes : inhibition de la prolifération cellulaire, augmentation de la différenciation des cellules, régulation des mécanismes de réparation de l'ADN, induction de l'activité d'enzymes détoxifiantes ([Palozza, Serini et al. 2009](#)).

### 1.7.1.3. Données d'études épidémiologiques et d'intervention avec les principaux caroténoïdes de l'alimentation

Le  $\beta$ -carotène est le principal précurseur de la vitamine A (rétinol) ([Johnson 2002](#); [Krinsky and Johnson 2005](#); [Palozza, Serini et al. 2009](#); [Cuttriss, Cazzonelli et al. 2011](#)). En effet, la double liaison centrale du  $\beta$ -carotène est clivée en deux molécules de rétinol, ensuite réduites en rétinol ([Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)). Le  $\beta$ -carotène est également un composé bioactif important. Une étude a montré un effet positif possible du  $\beta$ -carotène sur la réduction de l'athérosclérose *via* l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines LDL ([Dugas, Morel et al. 1999](#)). Son effet protecteur contre certains cancers ([Peto, Doll et al. 1981](#)), et en particulier le cancer de la prostate ([Matos, Marques et al. 2006](#)), a aussi été étudié. Toutefois, l'effet préventif du  $\beta$ -carotène dépend beaucoup des doses ingérées et de facteurs externes tels que le tabac ([Gerber, Boutron-Ruault et al. 2002](#)). Lors d'études de l'effet du  $\beta$ -carotène sur le cancer du poumon, il s'est par exemple révélé pro-oxydant et dangereux à fortes doses chez des fumeurs ([Group 1994](#)), résultats qui ont conduit à émettre davantage de réserves vis-à-vis de la supplémentation en  $\beta$ -carotène chez l'homme ([Bast, Haenen et al. 1998](#)).

L' $\alpha$ -carotène est aussi un précurseur important de la vitamine A ([Krinsky and Johnson 2005](#); [Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 b](#)). Il a une structure asymétrique qui libère par clivage une molécule de vitamine A, qui a notamment un effet réducteur sur le diabète de type I.

La  $\beta$ -cryptoxanthine est surtout présente dans les agrumes. C'est le second caroténoïde provitaminique A après le  $\beta$ -carotène ([Simpson 1983](#); [Britton, Liaaen-Jensen et al. 2008 b](#)). Elle présente aussi un effet antioxydant et un effet stimulant sur les os par inhibition du métabolisme osseux.

Le lycopène est le second caroténoïde le plus répandu. Il est essentiellement absorbé *via* la consommation de produits dérivés de la tomate et a fait l'objet d'études épidémiologiques démontrant une corrélation entre son ingestion et un risque plus faible de déclarer un cancer de la prostate ([Matos, Marques et al. 2006](#)). Des effets positifs ont également été montrés contre les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II (associé au syndrome métabolique), l'ostéoporose et l'infertilité masculine. *In vitro*, le lycopène est l'un des caroténoïdes les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet et pourrait donc être un antioxydant puissant ([Matos, Di Mascio et al. 2000](#)). Le lycopène est très présent

dans le sang et les tissus de réserve, il se retrouve aussi au niveau des poumons, où il protège les lymphocytes de la toxicité du NO<sub>2</sub>. Il semblerait que les cellules cancéreuses soient plus sensibles à l'effet inhibiteur de croissance du lycopène que les cellules saines de l'organisme.

Chez l'homme, la lutéine se concentre essentiellement dans la macula de l'œil. Elle protège les cellules de l'œil des stress oxydants dus à la lumière, en particulier la lumière bleue. De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation entre l'ingestion de lutéine et l'augmentation de la pigmentation de la rétine. La lutéine pourrait améliorer la capacité de l'œil humain à percevoir les contrastes et donc avoir un rôle dans la vision spatiale ([Stringham, Bovier et al. 2010](#)). De plus, il a été démontré qu'une augmentation de la pigmentation de l'œil suite à une consommation de produits riches en lutéine (œufs, épinards, autres légumes verts) est associée à une diminution du risque de maladies dégénératives de l'œil, en particulier la DMLA et la cataracte (opacité du cristallin). Un apport de lutéine associée à la zéaxanthine serait particulièrement bénéfique car elles auraient des fonctions protectrices complémentaires, en raison notamment de leur orientation différente dans les membranes cellulaires. Une consommation quotidienne de 10 mg de lutéine et 2 mg de zéaxanthine (apportés par 100 g d'épinards), par exemple, augmenterait les performances visuelles et diminuerait la sensibilité à la lumière ([Stringham, Bovier et al. 2010](#)). Elle pourrait aussi participer à la réduction de l'athérosclérose ([Bradbury 2001](#)).

L'astaxanthine est un antioxydant modéré comparé à d'autres caroténoïdes ([Mortensen and Skibsted 1997 b](#)). La consommation d'astaxanthine a été corrélée avec une diminution des risques de maladies cardiovasculaires, et des pathologies immunitaires, inflammatoires ou neurodégénératives ([Fassett and Coombes 2009](#)). Chez les crustacés, truites et saumons, elle est souvent absorbée en association avec la canthaxanthine, qui est un puissant antioxydant piègeur des radicaux libres et qui recyclerait la vitamine E. Toutefois, une ingestion excessive de canthaxanthine peut induire une coloration dorée de la peau et de la rétine, associée à des problèmes de santé (urticaire, rétinopathie) et peut être toxique pour le foie.

### 1.7.2. Implications potentielles des métabolites non-rétinoïques des caroténoïdes

La dégradation oxydante des caroténoïdes, par mécanismes enzymatiques, chimiques ou radicalaires, libère de nombreux produits qui peuvent différer selon les

conditions (pendant les procédés de transformation des fruits et légumes, pendant la digestion...) ([Fleischmann and Zorn 2008](#); [Britton 2008 b](#)).

Certains produits de dégradation, même en faibles concentrations, ont une activité biologique et peuvent avoir un impact sur l'organisme ([Britton 2008 a](#); [Britton 2008 b](#)). Des apocaroténals (issus de la coupure oxydante de caroténoïdes), ainsi que des acides apocaroténoïques, par exemple, modifient significativement les mécanismes moléculaires dans les cellules des tissus cibles :

- l'acide 14'-apo- $\beta$ -caroténoïque et l'acide acyclorétinoïque issu du lycopène ont un léger effet anti-inflammatoire en activant l'expression des gènes RAR $\beta$  et RXR $\alpha$ , respectivement ([Wang 2009](#)),
- des produits d'oxydation du lycopène induisent l'apoptose des cellules cancéreuses HL-60 (caractéristiques de la leucémie) ([Zhang, Kotake-Nara et al. 2003](#)),
- les apolycopénals et acides apolycopénoïques issus de la dégradation du lycopène ont un effet antioxydant (ex : l'acide 10'-apolycopénoïque active des enzymes antioxydantes comme la glutathione S-tranférése ou la NADPH-quinone oxydoréductase) ([Wang 2009](#)).

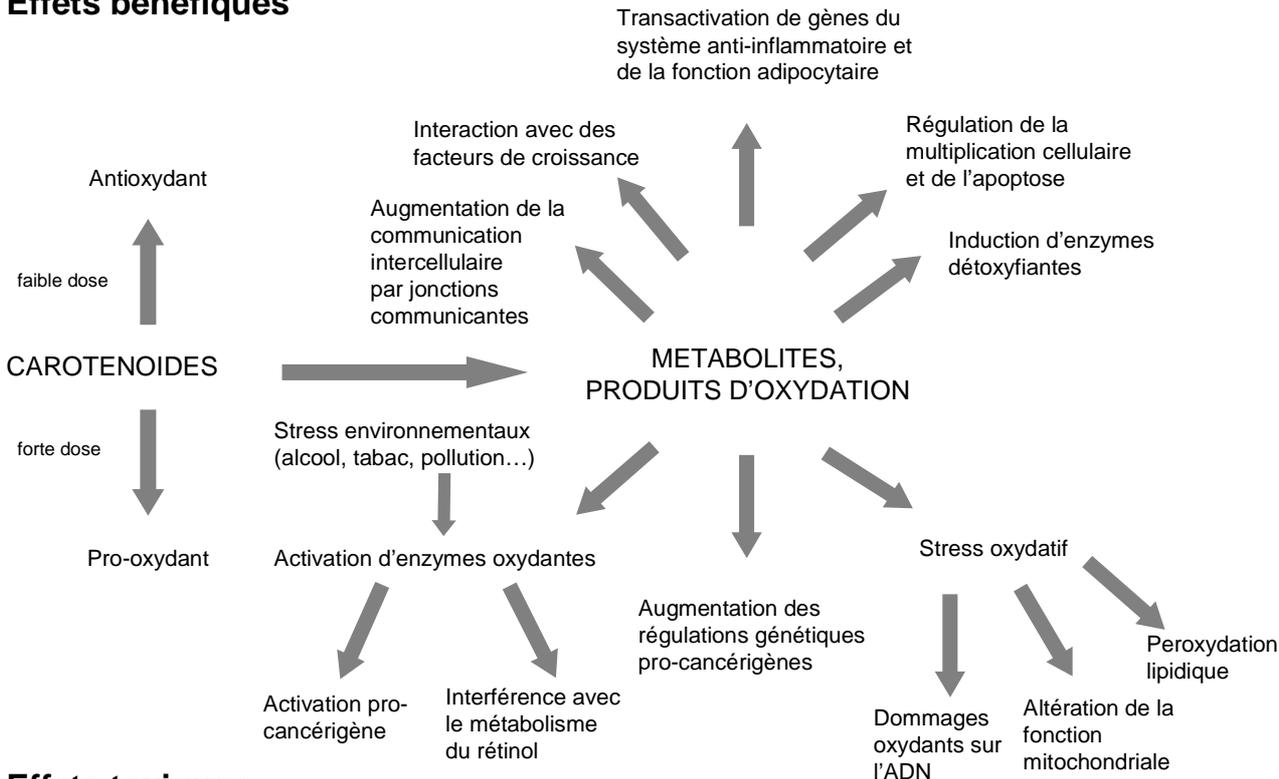
Leurs effets protecteurs contre des maladies (cancers,...) pourraient être plus importants que ceux des caroténoïdes natifs.

En revanche, certains métabolites de caroténoïdes sont soupçonnés d'être toxiques, car ils induiraient des effets pro-oxydants, par exemple ([Wang 2009](#)) :

- le 14'-apo- $\beta$ -caroténal a un effet pro-inflammatoire en inhibant la réponse des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  ou RXR,
- des produits d'oxydation toxiques du  $\beta$ -carotène inhibent l'expression de gènes du système anti-inflammatoire, activent des enzymes cancérigènes, altèrent la multiplication cellulaire, inhibent les communications par jonctions communicantes au niveau de cellules cancéreuses ou altèrent les fonctions mitochondriales.

Ainsi, comme les caroténoïdes natifs, les métabolites des caroténoïdes peuvent avoir des effets bénéfiques ou néfastes, en fonction de leur nature, de leur concentration et de la présence ou pas de facteurs oxydants (figure 15).

## Effets bénéfiques



## Effets toxiques

Figure 15 : Représentation de quelques mécanismes pouvant expliquer les effets bénéfiques ou toxiques des caroténoïdes et de leurs métabolites (Britton 2008 b).

## 2. LES CAROTENOÏDES, DES MOLECULES FONCTIONNELLES DE L'ALIMENTATION

### 2.1. Ingrédients fonctionnels, aliments fonctionnels et compléments alimentaires

Compte tenu des tendances de consommation, l'industrie agroalimentaire a aujourd'hui largement recours à des ingrédients fonctionnels, c'est-à-dire qui apportent des propriétés spécifiques aux produits, en plus de leurs fonctions nutritionnelles de base. Leur intérêt est soit technologique (arôme, couleur, conservation, texture...), soit nutritionnel et bénéfique pour la santé (vitamines, probiotiques, alimentation dédiée aux enfants ou aux personnes hospitalisées, récupération après un exercice physique, produits de régime...). Ces additifs naturels ou synthétiques destinés à l'alimentation peuvent être incorporés dans tous types d'aliments (ex : boissons, céréales, yaourts, produits surgelés, plats préparés...). Ils sont réglementés par les instances gouvernementales et sont soumis à des contrôles d'innocuité. Ils doivent, de plus, être correctement mentionnés par l'étiquetage en fonction de leur origine (naturels ou synthétiques).

Les aliments fonctionnels quant à eux, désignent par définition des produits faisant partie de l'alimentation normale, qui procurent des bienfaits physiologiques précisés dans la documentation scientifique et qui réduisent certains risques de maladies chroniques ([Niva 2007](#); [Urala and Lähteenmäki 2007](#)). Il s'agit soit d'aliments naturellement riches en composés bénéfiques pour la santé, soit d'aliments conventionnels qui ont été modifiés (enrichissement, conversions enzymatiques...). Parmi les substances qui entrent dans la composition des aliments fonctionnels on trouve en majorité : des fibres solubles (fructo-oligosaccharides, mono-oligosaccharides, inuline), des polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes, acide gallique, théogalline, catéchine, phytostérols, tocophérols), des acides gras (oméga-3, oméga-6), des caroténoïdes (lutéine,  $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène, lycopène), des minéraux, ou encore des microorganismes (probiotiques) ([Krystallis, Maglaras et al. 2008](#)). Les molécules bioactives extraites agissent soit directement au niveau du tube digestif en ayant un rôle sur la digestion ou la composition du compartiment gastro-intestinal, soit au niveau de cellules cibles de l'organisme après passage de la barrière intestinale. Dans le cas des probiotiques, ce sont des bactéries vivantes (le plus souvent des bactéries lactiques *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* spp.), qui participent à la constitution de la microflore intestinale et dont la consommation de doses régulières pourrait avoir des effets bénéfiques, en particulier chez les populations fragiles (ex : reconstitution de la flore intestinale chez les malades de gastroentérites ou lors de traitements antibiotiques,

renforcement du système immunitaire chez les personnes âgées, prévention de l'eczéma atopique chez les enfants à risque). En effet, la flore du tube digestif est un écosystème composé en moyenne de  $10^{28}$  cellules, à considérer comme un organe à part entière et dont le maintien en bon état est indispensable à la santé ([Sanders 2003](#); [Hong, Duc et al. 2005](#)).

Enfin, les compléments alimentaires (ou nutraceutiques) sont des produits fabriqués à partir d'ingrédients fonctionnels, dont il a été démontré qu'ils procurent des effets physiologiques bénéfiques, mais commercialisés sous des formes qui ne sont généralement pas associées à des aliments (ampoules, pilules, poudres).

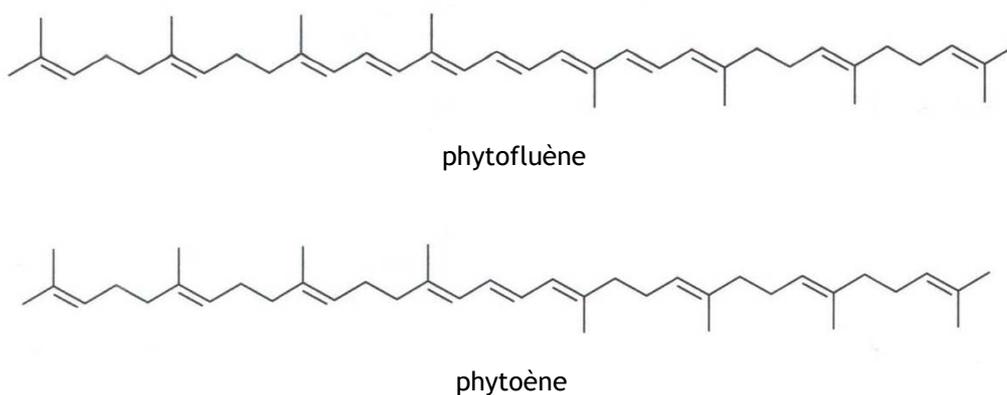
Le marché des aliments fonctionnels et des compléments alimentaires est très dynamique depuis plus de 15 ans et connaît une croissance régulière dans le monde entier. Des produits innovants sont lancés continuellement, et la concurrence est importante. En 2009, le marché global atteignait environ 182 milliards de dollars US (chiffre variable selon la source des données et la définition de cette catégorie de produits) ([Cutting 2008](#)).

## **2.2. Utilisation des caroténoïdes en formulation, comme additifs ou compléments alimentaires**

### **2.2.1. Applications des caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont utilisés dans de nombreux secteurs, sous leur forme naturelle ou comme molécules synthétiques : par l'industrie pharmaceutique (dans certains cas de pathologies humaines), en cosmétique (sous forme de capsules ou incorporés dans des crèmes), dans l'agroalimentaire (pour augmenter la perception de la couleur des aliments) et dans l'élevage (compléments pour les volailles, truites et saumons) ([Devcich, Pedersen et al. 2007](#)). En alimentation humaine et animale les caroténoïdes figurent en tête des ingrédients fonctionnels ([Spence 2006](#)). Ils sont utilisés couramment pour leurs propriétés technologiques (coloration, limitation de l'oxydation des aliments) et servent surtout à augmenter l'impression de qualité, perçue par le consommateur, des aliments auxquels ils sont incorporés (travail sur l'image du produit, compensation d'atténuations ou de variations naturelles de la couleur, ou encore protection d'arômes ou de vitamines sensibles à la lumière...). Par exemple, l'ajout de caroténoïdes dans l'alimentation destinée aux saumons d'élevage renforce la coloration rose de la chair du poisson.

L'intérêt pour les caroténoïdes s'est énormément accentué ces dix dernières années, en particulier suite à la mise en évidence des bénéfices pour la santé d'une alimentation riche en fruits et légumes. Utilisés en tant que compléments dans les aliments, ils sont censés avoir un effet protecteur contre certaines maladies ([Mortensen 2009](#)). Certains caroténoïdes connaissent ainsi un développement très dynamique en formulation dans les produits dits « enrichis en... ». Les six principaux caroténoïdes commercialisés à l'heure actuelle sont le  $\beta$ -carotène (forme synthétique ou naturelle), l'astaxanthine (synthétique ou naturelle), la lutéine (naturelle uniquement), le lycopène (synthétique ou naturel), la canthaxanthine (synthétique uniquement) et la zéaxanthine (synthétique ou naturelle). Le phytoène et le phytofluène (figure 16), intermédiaires incolores de la biosynthèse des caroténoïdes, sont également envisagés comme possibles nouveaux ingrédients nutraceutiques ([Cutting 2008](#)). Ils ont en effet des propriétés antioxydantes par inhibition des radicaux hydroxyles (limitent l'oxydation des LDL) et interagissent avec l'ubiquinone et les caroténoïdes (effets synergiques). Le marché des caroténoïdes a dépassé le seuil du milliard de dollars en 2009 (tableau III) et les ventes de lycopène représentaient plus de 26 millions de dollars. Ne serait-ce qu'en Europe, le marché des caroténoïdes s'élevait à environ 420 millions de dollars en 2010, essentiellement soutenu par les problématiques de santé et de vieillissement. En 2003, il valait 348,5 millions de dollars en Europe et 950 millions de dollars au niveau mondial, la part principale étant systématiquement représentée par le  $\beta$ -carotène (suivi par l'astaxanthine, la zéaxanthine et le lycopène) ([Cutting 2008](#); [Mortensen 2009](#)).



**Figure 16 :** Structure de deux intermédiaires incolores de la biosynthèse des caroténoïdes, envisagés comme nouveaux ingrédients nutraceutiques.

**Tableau III** : Principaux caroténoïdes utilisés dans les industries agroalimentaires et valeurs du marché mondial par application (en millions de dollars US) ([Cutting 2008](#); [Mortensen 2009](#)).

Caroténoïdes	Sources	Applications	Valeur du marché en 2009 (millions \$)
<b>β-carotène</b>	- Abondant dans les fruits et légumes	- Nutraceutique	128
	- Aussi extrait des algues ( <i>Dunalliena salina</i> ), des champignons et de l'huile de palme rouge	- Additif et colorant alimentaire orangé	103
	- Synthétisé chimiquement à partir de 8 unités isoprènes : E160a	- Ingrédient cosmétique	7
		- Alimentation animale	15
<b>Astaxanthine</b>	- Naturelle dans les microalgues, levures, saumons, truites, krill, crevettes, écrevisses, plumes de certains oiseaux	- Nutraceutique	4,8
	- Synthétique : E161j	- Additif colorant rose réservé à l'alimentation animale et l'aquaculture	252,2
<b>Canthaxanthine</b>	- Naturelle dans le champignon chanterelle, dans les plumes d'oiseaux exotiques (flamand, ibis rouge, spatule rosée), dans les crustacés et certains poissons - Synthétique : E161g	- Nutraceutique (doses très limitées : 0,03 mg/kg/j)	3
		- Additif et colorant alimentaire jaune	8
		- Alimentation animale : truite, saumon, volaille (selon des quantités limitées entre 8 et 25 mg/kg d'aliment)	135
		- Interdite en cosmétique comme agent bronzant	
<b>Lutéine</b>	- Abondante dans les légumes verts - Aussi extraite des fleurs d'œillets - Synthétique : E161b	- Nutraceutique (pour les yeux)	85
		- Additif et colorant alimentaire jaune	20
		- Alimentation animale (surtout pour les volailles)	82
<b>Lycopène</b>	- Extrait des tomates ou du champignon <i>Blakeslea trispora</i> - Synthétique : E160d	- Nutraceutique	68,7
		- Additif et colorant alimentaire rouge	9,3
		- Ingrédient cosmétique	3
<b>Zéaxanthine</b>	- Abondante dans les légumes verts et le maïs ( <i>Zea mays</i> ) - Aussi extraite des baies de Goji - Synthétique : E161h	- Nutraceutique (pour les yeux)	35
<b>Phytoène, Phytofluène</b>	- Carotènes linéaires incolores	- Nutraceutiques - Additifs stabilisateurs de couleur et activateurs de l'effet antioxydant des autres additifs dans l'alimentation	-

### 2.2.2. Recommandations et réglementation

Les caroténoïdes ne font pas partie des nutriments essentiels, il n'existe donc pas de doses journalières recommandées. Des doses maximales acceptables ont en revanche été évaluées ([Mortensen 2009](#)). En 2000, le Comité Scientifique Européen pour l'Alimentation a estimé que les données scientifiques étaient insuffisantes pour établir une dose maximale de  $\beta$ -carotène. Le seuil précédent de 5 mg/kg corporel/jour a donc été confirmé pour le  $\beta$ -carotène. Aux Etats-Unis, l'Institut de Médecine a fait un constat similaire et n'a établi de seuil maximal ni pour l'ingestion de  $\beta$ -carotène ni pour celle des caroténoïdes totaux. En revanche, au Royaume-Uni, le Groupe d'Experts sur les Vitamines et Minéraux a estimé en 2003 que l'apport maximal de  $\beta$ -carotène à partir de compléments alimentaires devrait être de 7 mg par jour chez une personne de taille et de poids moyens.

Par ailleurs, les aliments enrichis en caroténoïdes, ou les compléments alimentaires à base de caroténoïdes, ne peuvent pas aujourd'hui porter d'allégations santé ([Mortensen 2009](#)). En 1998, l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC) a conclu que les preuves d'un effet préventif du  $\beta$ -carotène ou d'autres antioxydants, considérés individuellement (consommés comme compléments à fortes doses ou dans l'alimentation), contre certains cancers étaient insuffisantes. De même, l'Institut de Médecine américain a estimé que des supplémentations à l'aide de caroténoïdes purs ( $\beta$ -carotène, canthaxanthine,  $\alpha$ -carotène, lutéine ou lycopène) ne doivent pas être recommandées comme agents de prévention dans la population globale, mais devraient plutôt être utilisées par des personnes ayant des symptômes précis tels qu'une carence en vitamine A ou une sensibilité pathologique à la lumière (protoporphyrine érythropoïétique). L'American Heart Association (AHA) a également décidé que les données scientifiques ne justifient pas l'utilisation de micronutriments antioxydants sous forme de compléments alimentaires pour réduire les risques de maladies cardiovasculaires. Les services américains de prévention se positionnent même contre l'utilisation de compléments à base de  $\beta$ -carotène, seuls ou en combinaison avec d'autres caroténoïdes, dans le cadre de la prévention de maladies. Ils estiment en effet que ces compléments n'apportent pas suffisamment de bénéfices alors qu'ils pourraient être néfastes pour certains consommateurs (ex : fumeurs, sujets exposés à l'amiante). Aux Etats-Unis, la FDA (Food and Drug Administration) s'est également opposée à l'utilisation d'allégations santé pour des produits à base de lycopène revendiquant un effet contre le cancer ou ceux à base d'esters de lutéine revendiquant une réduction des risques de DMLA ou de cataracte.

Le marché des compléments alimentaires est très variable et son évolution dépendra à la fois de l'évolution des législations, qui se veulent de plus en plus sévères en Europe, et de l'accumulation de données scientifiques obtenues à partir d'essais et d'expériences effectués de façon rigoureuse.

### 2.2.3. Problématiques nutritionnelles liées à la stabilité et à la biodisponibilité des caroténoïdes

La structure des caroténoïdes leur confère une très grande réactivité et les rendent particulièrement sensibles aux phénomènes de dégradation. Lors des procédés de transformation et des périodes de stockage, la dégradation des caroténoïdes dépend des conditions de température, d'oxygénation et de lumière et est très courante dans le cas des produits en conserve (présence d'ions métalliques) ou des boissons gazeuses ([Britton and Khachik 2009](#)). Absorbés avec l'alimentation, les caroténoïdes sont également susceptibles d'être dégradés au cours de la digestion. Dans l'estomac par exemple, les conditions sont particulièrement propices aux réactions oxydatives : présence d'oxygène, température de 37°C, un pH variant entre 6 (en postprandial) et 2 (lorsque l'estomac est vide), agitation mécanique constante ([Kanner and Lapidot 2001](#)) et hautes concentrations d'hydroperoxydes ([Kanner and Lapidot 2001](#)). Les caroténoïdes peuvent alors être oxydés par divers composants des aliments ([Boon, McClements et al. 2010](#)). Le fer alimentaire, par exemple, est nettement présent, à la fois sous forme hémique (surtout dans la viande rouge) et sous forme d'ions libres ([Igene, King et al. 1979](#); [Garcia, Martinez-Torres et al. 1996](#)) et représente une des principales sources de stress oxydant dans le tube digestif ([Baron and Andersen 2002](#)). En outre, les caroténoïdes utilisés comme additifs dans les aliments, ou comme compléments alimentaires incorporés dans des solutions organiques, sont moins stables que ceux naturellement présents dans les fruits et légumes.

Par ailleurs, la biodisponibilité des caroténoïdes, molécules essentiellement hydrophobes, est très variable et limite considérablement leur concentration circulante dans le plasma sanguin et donc leurs effets potentiels dans l'organisme ([Paiva and Russell 1999](#)). Elle dépend notamment de deux facteurs : d'une part la bioaccessibilité des molécules, c'est-à-dire leur capacité à être extraites des aliments sources et à être solubilisées dans les gouttelettes lipidiques de l'estomac puis dans les micelles mixtes de l'intestin, d'autre part la capacité d'absorption des cellules épithéliales de l'intestin, c'est-à-dire la faculté de ces molécules à passer la barrière intestinale. Lorsqu'ils sont absorbés sous forme de compléments alimentaires, pour être efficaces, les caroténoïdes

doivent être sous une forme absorbable par l'intestin. De plus, ils sont souvent formulés avec des matières grasses (ex : suspensions dans l'huile ou des oléorésines, à l'intérieur de capsules ou de gélules), des tensioactifs (ex : suspensions ou nanodispersions avec des émulsifiants ([Yin, Chu et al. 2009](#)), poudres constituées d'un mélange de caroténoïdes, d'hydrocolloïdes polymères, d'esters d'acides gras et de maltodextrine), ou des protéines ([Wackerbarth, Stoll et al. 2009](#)), qui augmentent leur solubilité dans les micelles de digestion. L'effet sur la biodisponibilité dépend à la fois de l'augmentation de la solubilité et de la taille des cristaux de caroténoïdes obtenus. Les nanodispersions et les poudres, par exemple, permettent en général d'obtenir une meilleure biodisponibilité que les suspensions huileuses car les cristaux de caroténoïdes y sont d'environ 25 nm et 0,1 µm respectivement (contre 1 à 5 µm dans les huiles et oléorésines). Ces formulations ralentissent également un peu la dégradation des caroténoïdes au cours du temps ([Cao-Hoang, Fougère et al. 2011](#); [Silva, Cerqueira et al. 2011](#)).

Ces deux facteurs (stabilité et biodisponibilité) limitent la possibilité des caroténoïdes d'être actifs au niveau des cellules des tissus de réserve de l'organisme. Il est donc tout à fait justifié d'étudier les propriétés des caroténoïdes dans le compartiment gastro-intestinal, en amont de l'absorption, où ils sont présents à leurs plus fortes concentrations ([Vulcain, Goupy et al. 2005](#); [Goupy, Reynaud et al. 2011](#)). Par exemple, il a été montré que la consommation de 33,6 g de tomates cuites (contenant 10 mg de lycopène) entraîne des concentrations de lycopène entre 40 et 25 µmol/L dans l'estomac pendant la digestion ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)). En outre, l'évaluation de leur potentiel au niveau des cellules des tissus de réserve de l'organisme doit nécessairement être accompagnée par des études de biodisponibilité.

### **2.3. Intérêts des caroténoïdes bactériens dans l'industrie agroalimentaire, avantages des biotechnologies**

Il existe une demande croissante des consommateurs visant à remplacer les ingrédients synthétiques par leurs équivalents naturels et, de ce fait, l'utilisation de sources naturelles de caroténoïdes destinés à l'alimentation humaine a nettement augmenté. La perspective est alors de commercialiser des produits bénéficiant d'une meilleure image : pas de mention d'additifs chimiques sur les étiquetages, abandon d'un mode de production polluant et gourmand en solvants organiques ([Cutting 2008](#)). Cependant, les molécules synthétiques issues de la pétrochimie restent très peu coûteuses. Pour être compétitifs sur le marché, les caroténoïdes naturels ne doivent pas seulement

apporter un label "naturel", mais également être économiquement intéressants. De plus, une autre difficulté de la science des colorants réside dans le fait de produire des molécules efficaces à faibles concentrations, stables dans le temps et de qualité constante.

La plupart des caroténoïdes naturels commercialisés aujourd'hui proviennent de sources végétales. Par exemple, le lycopène est extrait de la tomate et la lutéine de l'œillet d'Inde (*Tagetes patula*). Cependant, la qualité et la forme du produit fini varient énormément en fonction des conditions de culture des plantes (climat, température, luminosité, disponibilité en nutriments dans le sol...).

La production de caroténoïdes grâce aux biotechnologies et à la fermentation représente un très gros potentiel. De nombreux caroténoïdes ont déjà été isolés à partir de bactéries, de levures ou de champignons ([Dufossé 2009](#)) et la fermentation offre à l'industrie une importante source alternative de molécules naturelles à haute valeur commerciale. Les caroténoïdes issus de microorganismes peuvent en effet être utilisés comme nouveaux additifs et ingrédients fonctionnels naturels, présentant plusieurs avantages par rapport aux sources végétales : augmentation considérable de l'échelle de production, standardisation de la qualité et de la pureté du produit. Toutefois, la rentabilité des cultures et de l'isolation des molécules d'intérêt est très variable selon les souches de microorganismes. Elle exige une sélection importante en amont d'espèces à forts rendements, ainsi que l'optimisation des conditions de fermentation et d'extraction afin d'obtenir des produits moins chers que ceux extraits de plantes.

Un grand nombre de caroténoïdes ainsi produits ont déjà été validés par l'Union Européenne pour des usages alimentaires innovants ([Cutting 2008](#)). Par exemple, le lycopène issu de la fermentation du champignon unicellulaire *Blakeslea trispora* a été accepté en octobre 2006 et le  $\beta$ -carotène produit par l'algue *Dunaliella salina* est également autorisé (il bénéficie aussi de l'agrément GRAS aux Etats-Unis). Les autorisations obtenues concernent des caroténoïdes courants ( $\beta$ -carotène, lycopène, astaxanthine, cantaxanthine ou zéaxanthine) qui sont déjà autorisés dans l'alimentation et pour lesquels il existe des microorganismes producteurs (la lutéine en revanche n'est synthétisée par aucun microorganisme connu).

L'intérêt des microorganismes, et en particulier des bactéries, réside également dans le fait que ce sont des sources de nouveaux caroténoïdes qui ne sont produits ni par

les végétaux ni de façon synthétique. L'identification, la caractérisation et l'étude des voies de biosynthèse de ces molécules innovantes ont commencé dans les années 1980. De nombreuses souches colorées ont été décrites et référencées. Toutefois, les propriétés fonctionnelles de ces caroténoïdes n'ont encore été que peu évaluées et elles ne sont pour le moment pas utilisées dans l'alimentation. Des études d'innocuité très complètes sont requises par les agences réglementaires avant d'envisager un usage alimentaire. En effet, ces molécules qui n'ont pas d'historique de consommation humaine sont soumises à la réglementation « nouveaux ingrédients » (novel food ingredients) qui évalue les enjeux sanitaires, toxicologiques et environnementaux de leur formulation. Pour être approuvées comme additifs alimentaires, les études de toxicité et d'efficacité sont encore plus poussées ([Mortensen 2009](#)).

### 3. DEVENIR ET ENVIRONNEMENT DES CAROTENOÏDES DANS LE TUBE DIGESTIF HUMAIN

#### 3.1. Caractéristiques physico-chimiques du bol alimentaire dans le compartiment gastrique

Le bol alimentaire est une masse alimentaire mastiquée, imprégnée de salive, prête à être digérée. Depuis la bouche jusqu'à l'entrée dans l'estomac, les aliments mettent de cinq à dix secondes pour descendre le long de l'œsophage, puis ils séjournent entre deux et six heures dans l'estomac pour être partiellement digérés. L'estomac est un milieu complexe dont les caractéristiques de pH, volume et composition varient en fonction de son état (à jeun ou en postprandial) et du repas ingéré.

Les aliments se retrouvent dans l'estomac principalement sous la forme d'une émulsion de lipides dispersés dans une phase aqueuse contenant des enzymes, des ions métalliques, du dioxygène, des protéines et des polysaccharides ([Lorrain 2008](#)). Le pH décroît au cours de la phase gastrique, variant entre environ 6 immédiatement après l'ingestion d'un repas et environ 1,5 quatre heures plus tard. Le dioxygène y est présent en quantité non limitante.

##### 3.1.1. Volume de l'estomac

Chez l'adulte, l'estomac est un réservoir extensible d'une capacité de 1 à 1,5 L. Il mesure environ 25 cm de haut, 12 cm de large et 8 cm d'épaisseur.

Le contenu moyen de l'estomac représente environ 200 mL à jeun et passe, par exemple, à environ 800 mL 15 minutes après l'ingestion d'un repas de 400 mL ([Burton, Kim et al. 2005](#)). La différence (environ 400 mL) est due à l'air avalé ainsi qu'aux diverses sécrétions gastriques (sucs gastriques contenant de l'HCl, du mucus et des enzymes : pepsine, lipase, autres enzymes). Quatre heures plus tard, le contenu de l'estomac retrouve quasiment son niveau basal (320 mL), ce qui indique une vidange gastrique totale. La vitesse de la vidange gastrique a été estimée de façon plus précise à partir de la digestion de pain chez le porc ([Hoebler, Lecannu et al. 2002](#)). Dans ce cas, la vidange gastrique était terminée après 4 heures de digestion et environ 56 % du contenu stomacal avait été éliminé au cours de la première heure.

### 3.1.2. pH du bol alimentaire au sein de l'estomac

Plusieurs études ont décrit le suivi du pH de l'estomac chez l'homme au cours de la digestion grâce à l'utilisation d'électrodes de pH chez des personnes intubées après l'ingestion d'un repas.

En conditions de repos, le pH intra-gastrique est nettement acide : inférieur à 2. Toutefois, les repas tamponnent cette acidité. Le pH augmente alors pendant les 30 premières minutes jusqu'à 5 ou 6 avant de rediminuer rapidement ([Vo, Simonian et al. 2005](#)). Une variabilité interindividuelle doit aussi être considérée.

En outre, chaque aliment et sa composition influencent de façon différente l'évolution du pH de l'estomac en postprandial. Par exemple, après un repas composé d'huile de tournesol et de purée de légumes, le pH stomacal est passé de 1,8 à 5,4, 5,8 ou 6,2 dans le cas de purées de tomates, d'épinards ou de carottes respectivement, avant de revenir à sa valeur initiale ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)). L'ingestion de 130 g de pain et 430 mL d'eau a induit un pH maximal moyen de 5,1, qui est retombé à 1,7 environ 80 minutes plus tard ([Hoebler, Lecannu et al. 2002](#)). Des solutions protéiques à pH 7 ont conduit à une diminution plus progressive du pH au cours de la vidange gastrique : après une augmentation à 7, il a rediminué jusqu'à 6 en 30 minutes puis a atteint une valeur d'environ 4 une heure après ([Calbet and Holst 2004](#)). Un repas test à base d'huile d'olive, d'œufs et de saccharose (volume = 400 mL, pH 7,5) a provoqué au cours de la première heure de digestion une augmentation nette du pH, qui a rediminué progressivement jusqu'à 1,5 en environ 4 heures ([Armand, Borel et al. 1994](#)).

Par ailleurs, le pH acide de l'estomac au cours de la digestion est un facteur accélérateur de la génération d'hydroperoxydes lipidiques et de la co-oxydation des composés de l'alimentation ([Halliwell, Zhao et al. 2000](#); [Kanner and Lapidot 2001](#)).

### 3.1.3. Teneur en oxygène dans l'estomac

Peu d'études se sont intéressées à la mesure de la teneur en dioxygène de l'estomac. Toutefois, celui-ci est ouvert à l'air durant le temps du repas et peut donc être perçu comme un environnement aérobie. De plus, la mastication des aliments participe à l'apport en dioxygène dans l'estomac. Une expérience réalisée avec 20 g de pain mastiqué et placé dans 100 mL d'eau désoxygénée (mimant la masse du bol alimentaire dans le

volume de l'estomac) a entraîné une concentration en dioxygène dissous de 250  $\mu\text{mol/L}$ , ce qui correspond à la saturation de la solution en  $\text{O}_2$  ([Gorelik, Lapidot et al. 2005](#)). Donc, la quantité d'oxygène n'est pas affectée.

Par ailleurs, des mesures effectuées chez le porc, en dehors des repas, à l'aide de sondes à oxygène, ont montré que la concentration de dioxygène dans l'estomac est d'environ 105 à 159  $\mu\text{mol/L}$  ([Hillman, Whyte et al. 1993](#)).

### 3.1.4. Le fer, une molécule pro-oxydante importante dans l'estomac

Le fer, comme d'autres métaux tels que le cuivre, le cobalt ou le chrome, est absorbé avec l'alimentation et joue un rôle essentiel dans l'organisme. Leur homéostasie est indispensable pour assurer un certain nombre de fonctions biologiques. Toutefois, ce sont aussi des éléments oxydo-réducteurs actifs dans les réactions de peroxydation et les mécanismes de formation de radicaux libres.

Le fer est le métal de transition le plus présent dans l'alimentation et se trouve sous différentes formes. Dans les viandes, il est principalement stocké dans des métalloprotéines, l'hémoglobine et les myoglobines, transporteurs qui favorisent son absorption dans l'organisme. Dans la viande de bœuf, par exemple, la concentration en fer est d'environ 3  $\mu\text{g/g}$  et 60 % de celle-ci est du fer héminique (ou metmyoglobine, notée  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ) ([Garcia, Martinez-Torres et al. 1996](#)). Une partie du fer, à la fois sous forme libre et sous forme héminique, est perdue à la cuisson mais cette diminution influence peu les teneurs absorbées au cours de la digestion. Dans les végétaux (en particulier les légumes feuilles et les pois), le fer est surtout sous forme libre (par exemple environ 33  $\mu\text{g/g}$  dans les lentilles, ([USDA](#))). Les phytates (molécules hexaphosphoriques) présents dans les graines de nombreuses céréales et légumineuses peuvent toutefois former des sels insolubles avec le fer (ce qui diminue son absorption), qui sont en partie détruits par la cuisson. Les végétaux contiennent essentiellement du fer ferrique ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ), qui est ensuite réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) dans l'intestin et absorbé, avant d'être à nouveau oxydé en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dans le sang et transporté.

Les concentrations de fer dans l'estomac, sous ces différentes formes, sont très variables en fonction des aliments ingérés. Un repas type composé de 200 g de légumes, 50 g de féculents et 125 g de viande, par exemple, apporte entre 2,5 et 12,5 mg de fer dans l'estomac, environ (tableau IV).

**Tableau IV** : Exemple des quantités de fer libre et hémunique apportées par différents aliments au cours d'un repas type. Pour chaque catégorie d'aliments, deux exemples sont indiqués : un aliment plutôt pauvre en fer et un aliment plutôt riche en fer ([USDA](#)).

Sources de fer alimentaire		fer libre (mg)	fer hémunique (mg)
200 g de légumes	- carottes	0,70	-
	- épinards	7,20	-
50 g de féculents	- riz	0,60	-
	- lentilles	1,65	-
125 g de viande	- poulet	0,5	0,75
	- bœuf	1,5	2,25

Des molécules antioxydantes, notamment, celles ayant des poids moléculaires modérés (acide ascorbique,  $\alpha$ -tocophérol, glutathion, caroténoïdes, flavonoïdes...) peuvent interagir avec le fer et la metmyoglobine et limiter leur activité catalytique productrice d'espèces réactives oxydantes (ROS) ([Halliwell, Zhao et al. 2000](#); [Kanner and Lapidot 2001](#); [Lapidot, Granit et al. 2005](#); [Jomová, Kysel et al. 2009](#)).

### 3.1.5. Organisation des lipides dans le compartiment gastrique : suspensions simples et émulsification

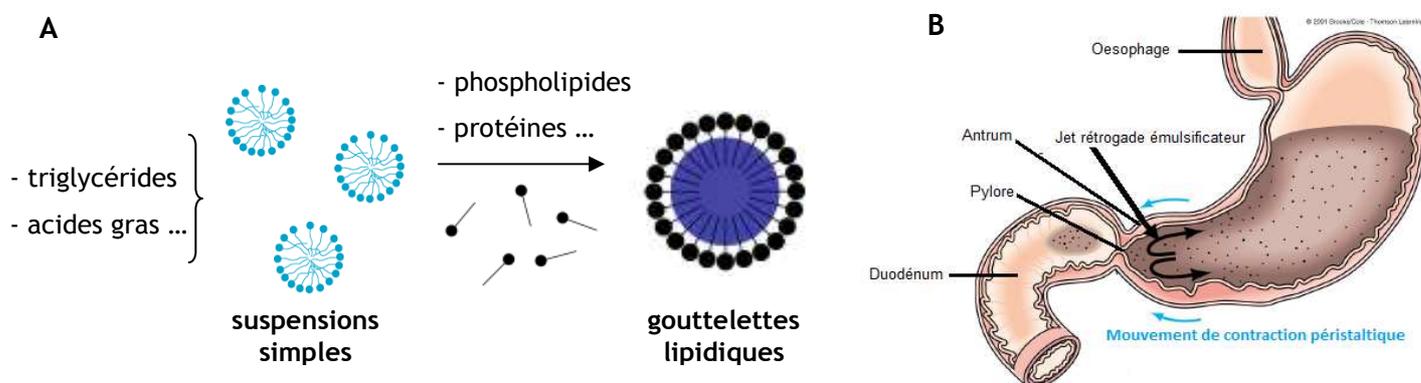
Dans le régime alimentaire occidental, la part des lipides ingérés représente plus de 30 % de l'apport calorique total. Un adulte consomme en moyenne 100 à 150 g de triglycérides, 2 à 10 g de phospholipides et 500 mg de cholestérol par jour ([Carey, Small et al. 1983](#); [Armand, Borel et al. 1994](#)). La quantité de caroténoïdes consommée est beaucoup plus faible (2 à 10 mg par jour).

Les lipides libérés des matrices alimentaires sous l'effet de la mastication, des acides gastriques et des enzymes de digestion (ex : pepsine, une endoprotéase) se retrouvent dispersés dans le bol alimentaire. Dans cet environnement majoritairement aqueux, ils ont tendance à se regrouper, formant tout d'abord des structures simples (composées uniquement de lipides : caroténoïdes, acides gras...), de petite taille (figure 17 A), en suspension dans la phase aqueuse. Ces suspensions sont stabilisées grâce à la présence conjointe d'agents tensioactifs dans l'estomac, dont les molécules s'intercalent entre celles des caroténoïdes pour former des sphères : phospholipides, protéines...

Les lipides se regroupent ensuite rapidement pour former des gouttelettes lipidiques de plus grosse taille. Il se forme alors une émulsion "huile dans eau", au sein de laquelle les gouttelettes lipidiques (figure 17 A) sont composées d'un cœur hydrophobe contenant des chaînes grasses apolaires, et d'une interface intercalant des acides gras et des composés amphiphiles (essentiellement des phospholipides). Les études portant sur la digestion des lipides ont suggéré ([Carey, Small et al. 1983](#)) puis confirmé ([Armand, Borel et al. 1994](#)) que l'estomac joue un rôle dans cette émulsification des lipides grâce à plusieurs facteurs coexistants (figure 17 B) :

- forces mécaniques de contraction antrales (péristaltiques),
- présence de molécules amphiphiles comme les phospholipides, de protéines et d'acides gras libres ou, en quantités plus limitées, de monoglycérides,
- phénomène de lipolyse gastrique, qui génère d'autres produits amphiphiles (acides gras...) et réduit le diamètre des gouttelettes lipidiques au sein de l'estomac.

L'analyse du contenu gastrique une heure après ingestion d'un repas test contenant de l'huile d'olive, des œufs et du saccharose, a par exemple montré que la plupart des gouttelettes lipidiques (50 %) ont un diamètre compris entre 1 et 10  $\mu\text{m}$  ([Armand, Borel et al. 1994](#)). Les autres catégories de particules sont minoritaires : 5 % ont un diamètre supérieur à 100  $\mu\text{m}$ , 25 % ont un diamètre compris entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  et 12 % ont un diamètre inférieur à 1  $\mu\text{m}$ . Les résultats d'une autre étude considérant des repas tests à base de légumes ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)) ont révélé des distributions monodales de la taille des gouttelettes lipidiques, avec des diamètres moyens de 15,6 et 8  $\mu\text{m}$  dans le cas de repas à base de carottes, de tomates ou d'épinards, respectivement.



**Figure 17 :** (A) Regroupement des lipides alimentaires dans des structures simples, puis localisation au sein de gouttelettes lipidiques plus grosses et stabilisées en émulsion par des phospholipides et des protéines. (B) Représentation de l'estomac humain et des mouvements induisant l'émulsification du bol alimentaire.

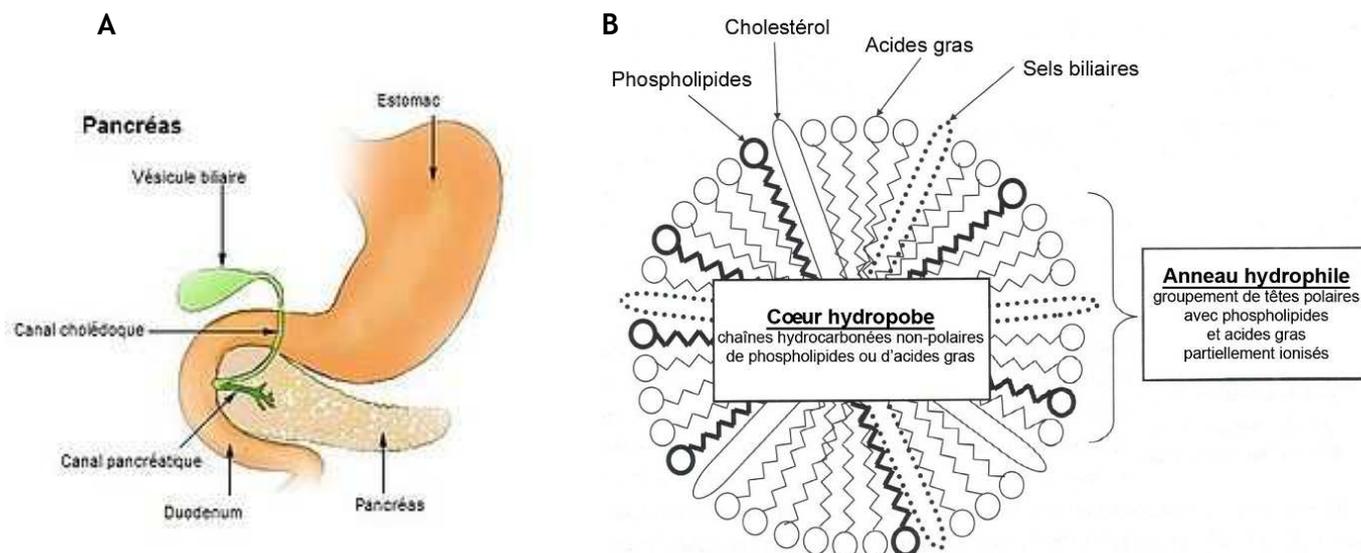
## 3.2. Caractéristiques physico-chimiques dans le duodénum

### 3.2.1. pH au niveau du duodénum

Le pH du duodénum est beaucoup plus stable que celui de l'estomac. Des mesures réalisées sur des prélèvements obtenus par aspiration du contenu duodéal chez l'homme ont montré que le pH est d'environ 5 au repos et augmente dans les premières 20 minutes suivant un repas, jusqu'à 6,1 ou 6,6 selon la composition des repas tests, puis reste constant pendant toute la durée de la digestion ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)).

### 3.2.2. Sécrétions biliaires et pancréatiques, formation de micelles mixtes

Lorsque le chyme gastrique est perçu par la paroi du duodénum, celle-ci provoque la contraction de la vésicule biliaire, qui déverse son contenu dans le duodénum. Simultanément, le pancréas sécrète des proenzymes activées par les sucs gastriques contenus dans le chyme (libération de trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, RNase, DNase, lipases et amylases) (figure 18 A). Les lipases pancréatiques (lipase classique et lipase apparentée de type 2) participent à la dissolution des graisses (libération d'acides gras libres et de monoacylglycérols), réduisant ainsi la taille des gouttelettes lipidiques de l'émulsion formée dans l'estomac. Au fur et à mesure de la déstructuration de l'émulsion, les sels biliaires s'intercalent entre les phospholipides, le cholestérol et les acides gras, formant des micelles mixtes (figure 18 B), c'est-à-dire des micro-amas (3 à 6 nm) de produits de dégradation des lipides ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)). Ces micelles mixtes sont la principale forme de transport des micronutriments lipidiques dans la lumière intestinale. Des structures plus grosses, (des vésicules ou des liposomes multilamellaires) pourraient aussi transporter une fraction de ces micronutriments ([Pintea, Diehl et al. 2005](#)).

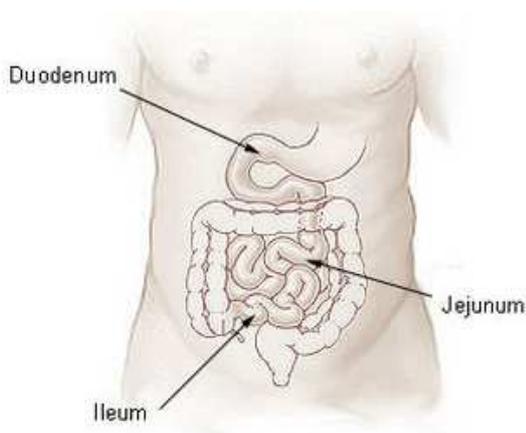


**Figure 18 :** (A) Représentation des organes responsables de la sécrétion des sels biliaires (vésicule biliaire) et du suc pancréatique (pancréas) dans l'intestin. (B) Organisation théorique des micelles mixtes présentes dans l'intestin ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

### 3.2.3. Teneur en oxygène dans le compartiment intestinal

Des mesures effectuées chez le porc, en dehors des repas, à l'aide de sondes à oxygène, ont montré que la concentration de dioxygène dans le duodénum est d'environ 109 à 135  $\mu\text{mol/L}$  ([Hillman, Whyte et al. 1993](#)), c'est-à-dire à peu près la même que dans l'estomac.

La concentration d'oxygène diminue ensuite le long de l'intestin (figure 19). Elle est d'environ 97 à 127  $\mu\text{mol/L}$  dans le jéjunum et de seulement 47 à 98  $\mu\text{mol/L}$  dans l'iléon ([Hillman, Whyte et al. 1993](#)).



**Figure 19 :** Représentation des trois parties principales de l'intestin grêle humain.

### 3.3. Métabolisme des caroténoïdes dans le tube digestif

#### 3.3.1. Dans le compartiment gastro-intestinal

Les caroténoïdes de l'alimentation sont libérés de la matrice alimentaire sous l'effet de la mastication, de l'acidité de l'estomac ([Rich, Fillerey-Travis et al. 1998](#)) et des enzymes de digestion. Ils sont alors dispersés avec les autres lipides dans le bol alimentaire. Au cours de l'émulsification du contenu gastrique, les caroténoïdes se positionnent ensuite dans les gouttelettes lipidiques en fonction de leur polarité ([Borel, Grolier et al. 1996](#)) : les carotènes dans le cœur hydrophobe ; et les caroténoïdes les plus polaires (*i.e.* certains xanthophylles, des caroténoïdes glycosilés...) intercalés entre les acides gras et les phospholipides au niveau de l'interface. Au cours de la digestion, seules des quantités traces de caroténoïdes (0 à 1,2 %) restent dans la phase aqueuse du contenu gastrique ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)). Les caroténoïdes sont relativement protégés des conditions oxydantes de l'estomac ([Kanner and Lapidot 2001](#)) tant qu'ils sont inclus dans la matrice alimentaire, mais sont plus sensibles à la dégradation dès qu'ils sont dispersés dans l'huile ([Boon, McClements et al. 2010](#)). Il y a peu de données sur la stabilité des caroténoïdes *in vivo* au niveau de l'estomac. Une étude chez l'homme n'a cependant observé qu'une faible isomérisation du  $\beta$ -carotène et du lycopène dans la lumière gastrique ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)). De plus, divers tests *in vitro* ont montré une stabilité des carotènes supérieure à 75 % ([Granado-Lorencio, Olmedilla-Alonso et al. 2007](#)). L'hydrolyse des esters de xanthophylles est aussi inférieure à 40 % ([Chureeporn and Failla 2006](#)).

Au fur et à mesure de la vidange gastrique, et sous l'effet des sécrétions biliaires et pancréatiques, les caroténoïdes sont progressivement incorporés dans la structure des micelles mixtes formées dans l'intestin. Certains caroténoïdes encore localisés dans la matrice alimentaire sont alors transférés directement dans les micelles mixtes ; mais la plupart sont transférés dans les micelles mixtes à partir des gouttelettes lipidiques ([Tyssandier, Lyan et al. 2001](#)). La part des caroténoïdes natifs présents en phase aqueuse (*i.e.* dans les micelles mixtes, et peut-être dans des vésicules) dans le duodénum reste toutefois limitée ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)). Les sels biliaires sont un élément constitutif des micelles mixtes et leur concentration détermine la quantité de micelles formées. Les lipases pancréatiques qui assurent l'hydrolyse des gouttelettes lipidiques jouent aussi un rôle dans le transfert des carotènes vers les micelles mixtes, mais n'ont pas d'effet sur celui des xanthophylles ([Borel 2005](#)). De plus, le pH est un facteur

important du transfert des caroténoïdes de la phase lipidique vers les micelles mixtes ([Tyssandier, Lyan et al. 2001](#)). La localisation des caroténoïdes pourrait à nouveau dépendre de leur polarité : les carotènes dans le cœur des micelles mixtes, riche en cholestérol esters et autres lipides apolaires ; les xanthophylles inclus dans la monocouche externe avec les protéines, les phospholipides et les acides gras partiellement ionisés ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

Les micelles mixtes intestinales véhiculent ensuite les caroténoïdes jusqu'à la couche aqueuse adjacente aux microvillosités de la paroi intestinale.

### 3.3.2. Dans les entérocytes de la muqueuse intestinale

Au niveau de la paroi intestinale, les caroténoïdes et les autres lipides passent à travers la membrane des cellules mucosales de l'intestin, selon des cinétiques qui peuvent être saturables, dépendantes du temps et de la concentration (ex :  $\beta$ -carotène, ([During, Hussain et al. 2002](#))). Cette absorption est, au moins en partie, assurée ou facilitée par des transporteurs membranaires ([Reboul and Borel 2011](#)) (ex : SR-BI pour le lycopène ([Moussa, Landrier et al. 2008](#)), la lutéine ([Reboul, Abou et al. 2005](#)) et les caroténoïdes pro-vitaminiques A ([During and Harrison 2007](#)) ; CD36 pour le  $\beta$ -carotène ([van Bennekum, Werder et al. 2005](#))).

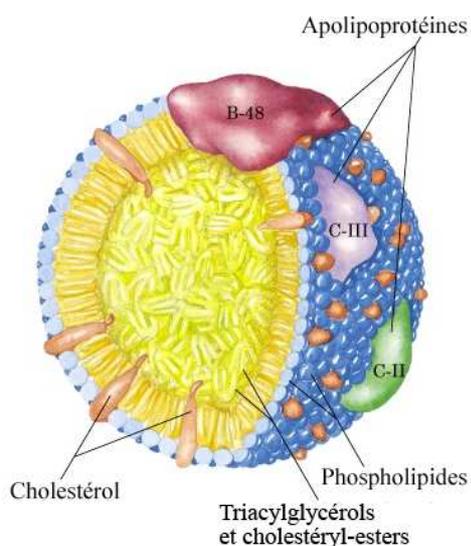
Une fois dans l'entérocyte, les caroténoïdes diffusent dans le cytosol. Étant peu solubles, ils doivent être transportés par des protéines intracellulaires pour traverser les compartiments aqueux de la cellule ([Reboul and Borel 2011](#)). Le transport intracellulaire des caroténoïdes reste toutefois peu connu.

À l'intérieur des entérocytes, les caroténoïdes peuvent être partiellement métabolisés par des enzymes protéiques ([Reboul and Borel 2011](#)). Le clivage oxydatif de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -carotène ou la  $\beta$ -cryptoxanthine sous l'effet d'une enzyme cytosolique, la  $\beta$ -carotène-15,15'-monooxygénase (BCMO1), libère du rétinol. Cette activité pro-vitaminique A est exprimée en équivalents rétinol : le  $\beta$ -carotène forme deux molécules de rétinol et l' $\alpha$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine libèrent une molécule de rétinol ([Borel 2005](#)). Par ailleurs, des clivages enzymatiques asymétriques libèrent des apocaroténals, partiellement oxydés en apocaroténones. Par exemple, la  $\beta$ -carotène-9',10'-dioxygénase (BCDO2) est une enzyme membranaire mitochondriale, ([Amengual, Lobo et al. 2010](#)) active sur le  $\beta$ -carotène, qui entraîne la formation de  $\beta$ -apo-10'-caroténal et de  $\beta$ -ionone. Le

lycopène peut aussi être clivé par l'enzyme spécifique de la liaison 9'-10' du  $\beta$ -carotène ([Borel 2005](#)). Les apocaroténals à longue chaîne produits peuvent par la suite donner de l'acide rétinoïque par un mécanisme comparable à la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Des clivages non enzymatiques peuvent en outre être produits par des réactions chimiques directes, ou par les radicaux libres produits par action de la lipoxygénase sur les acides gras, ou par autoxydation ([Borel 2005](#)). Les produits du  $\beta$ -carotène sont surtout des apo- $\beta$ -caroténals. L'autoxydation du lycopène entraîne la formation d'acyclorétinal (ensuite converti en acide acyclorétinoïque par réaction enzymatique dans les tissus biologiques) ainsi qu'une série d'apocaroténals (14', 12', 10', 8' et 6') ([Kim, Nara et al. 2001](#)). La canthaxanthine produit aussi des composés similaires (4-oxo- $\beta$ -caroténals, acide 4-oxorétinoïque...) par oxydation.

Les mécanismes de scission semblent dépendre des conditions dans lesquelles se réalise le clivage ([Yeum and Russell 2002](#)). Les clivages symétriques et asymétriques peuvent se produire simultanément dans l'intestin. Toutefois, les radicaux libres, par exemple, inhibent le clivage central du  $\beta$ -carotène au profit de clivages asymétriques ([Gessler, Gomboeva et al. 2001](#)). À l'inverse, les inhibiteurs de la lipoxygénase et les antioxydants comme l' $\alpha$ -tocophérol favorisent le clivage central ([Yeum, Lee-Kim et al. 1995](#)).

Les caroténoïdes (et leurs éventuels métabolites) sont ensuite acheminés vers l'appareil de Golgi, où ils sont encapsulés dans les chylomicrons (lipoprotéines sécrétées par l'intestin, figure 20), et transférés vers la face basolatérale des entérocytes.



**Figure 20** : Représentation de la structure type des lipoprotéines permettant le transport des caroténoïdes dans la circulation sanguine.

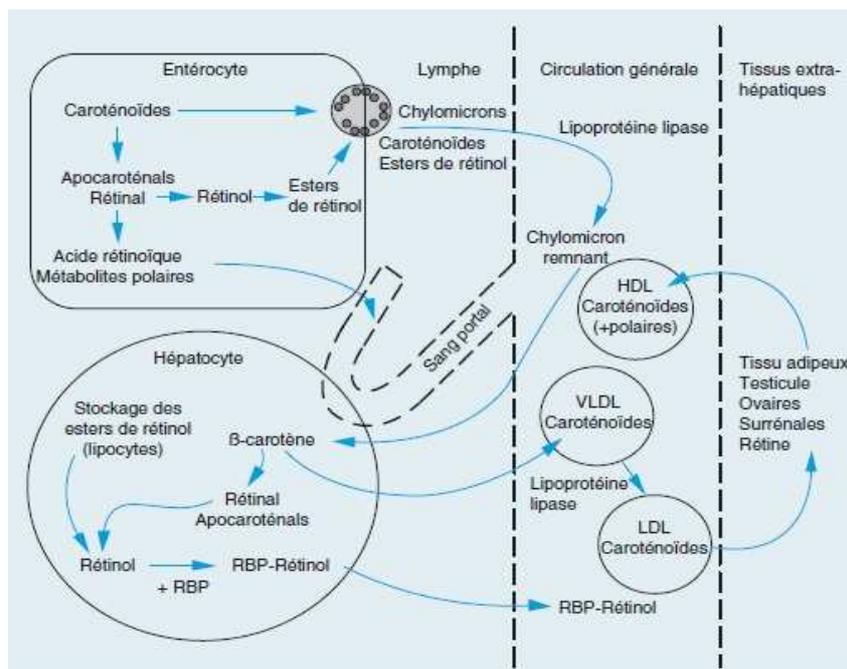
Les caroténoïdes absorbés par les entérocytes mais qui ne sont pas incorporés dans les chylomicrons sont rejetés dans la lumière intestinale au moment du renouvellement cellulaire ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

### 3.3.3. De l'intestin vers le foie, puis les tissus cibles

Au niveau de la face basolatérale des entérocytes, les caroténoïdes incorporés dans les chylomicrons, sont sécrétés dans le système lymphatique puis passent dans la circulation sanguine *via* la canal thoracique. Dans la circulation, les triglycérides des chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase, ce qui les transforme en chylomicrons résiduels, rapidement pris en charge par le foie ([Borel 2005](#)).

Dans le sang (figure 21), les caroténoïdes sont transportés par trois autres types de lipoprotéines riches en triacylglycérols. Les proportions des lipoprotéines varient avec l'état physiologique ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)) :

- en postprandial, les caroténoïdes sont essentiellement sécrétés dans le sang puis le foie grâce aux chylomicrons et chylomicrons résiduels, puis relargués dans le sang par le foie dans des VLDL.
- à jeun, les caroténoïdes circulent surtout entre le plasma et les tissus de réserve dans les LDL (lipoprotéines de basse densité, produites à partir des VLDL) et les HDL (lipoprotéines de haute densité, qui assurent le retour des lipides vers le sang puis le foie en vue de leur élimination). Les LDL (et donc les caroténoïdes qu'elles contiennent) sont susceptibles d'être oxydées au niveau de la paroi vasculaire.



**Figure 21** : Sécrétion des caroténoïdes (et de leurs métabolites) dans le sang et transport des caroténoïdes entre le sang, le foie et les tissus de réserve grâce aux lipoprotéines (Borel 2005).

Les LDL, HDL et VLDL transportent environ 55 %, 31 % et 14 % des caroténoïdes totaux circulants, respectivement (Canene-Adams and Erdman Jr 2009). Les carotènes sont localisés dans le cœur hydrophobe des lipoprotéines, alors que les xanthophylles sont plus près de la surface (Borel, Grolier et al. 1996). De plus, cette répartition entre les différentes classes de lipoprotéines varie selon les caroténoïdes (Clevidence and Bieri 1993). Par exemple, l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -carotène se retrouvent à environ 67 % dans les LDL, 22 % dans les HDL et 11 % dans les VLDL (à peu près comme le cholestérol) ; le lycopène se retrouve à 73 % dans les LDL, 17 % dans les HDL et 10 % dans les VLDL ; la lutéine et la zéaxanthine se retrouvent à 53 % dans les HDL, 31 % dans les LDL et 16 % dans les VLDL.

Les transferts entre le sang, le foie et les tissus de réserve se prolongent largement après l'ingestion des caroténoïdes (métabolisme complet en environ 48 h) et assurent leur distribution tissulaire (Cf. Problématique C, § 1.2.2), qui évolue au cours du temps.

## 4. EVALUATION DES PROPRIETES DES CAROTENOÏDES DANS DES MILIEUX D'ETUDE MODELES

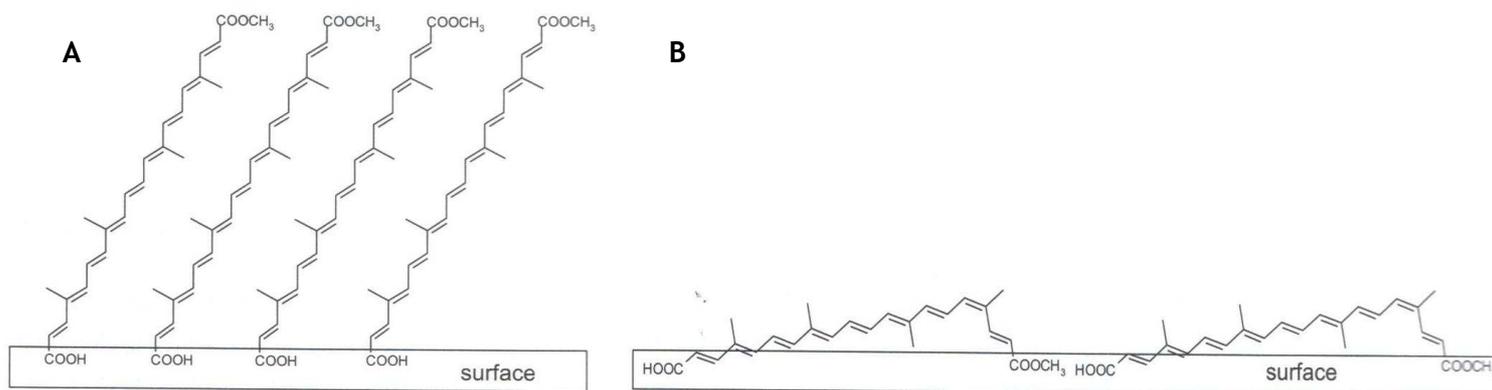
Chez les bactéries, les plantes et les animaux, les caroténoïdes sont présents dans les membranes cellulaires. Dans les aliments, ils se trouvent dans les compartiments hydrophobes. Les études du comportement des caroténoïdes *in vitro* sont effectuées avec des liposomes, ou des solutions stabilisées grâce à des tensioactifs ([Köhn, Kolbe et al. 2008](#)).

### 4.1. Comportement des caroténoïdes dans divers milieux et matrices

#### 4.1.1. Aux interfaces eau / huile

Les caroténoïdes s'orientent à l'interface des milieux aqueux et lipidiques en fonction de leur hydrophobicité et de leurs interactions avec les autres composants du milieu. Globalement, seules les parties polaires des molécules sont au contact de l'interface. Des films de carotènes et xanthophylles natifs interagissent peu avec les surfaces aqueuses, alors que leurs dérivés acides, méthylés, glycosylés... se positionnent à l'interface.

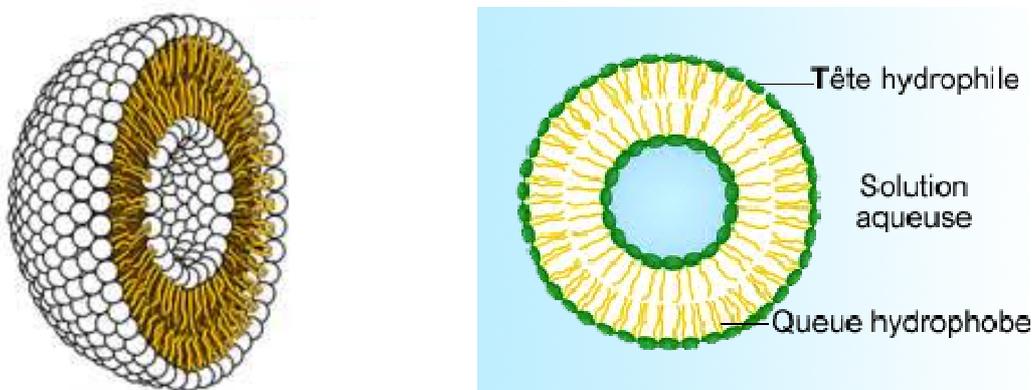
Les molécules amphiphiles sont orientées perpendiculairement à l'interface. Les bola-amphiphiles sont des molécules amphiphiles spécifiques, possédant deux têtes polaires, une à chaque extrémité de la chaîne hydrophobe (ex : bixine, crocine...) ([Köhn, Kolbe et al. 2008](#)). Si ces molécules sont linéaires, elles se positionnent comme des amphiphiles classiques (figure 22 A). En revanche, dans le cas où elles sont coudées (isomère *cis*), les deux têtes peuvent se placer à l'interface, augmentant la surface du film de caroténoïdes au contact de l'interface (figure 22 B).



**Figure 22** : Orientation des caroténoïdes de type bola-amphiphiles (A) linéaires ou (B) coudés, aux interfaces (Köhn, Kolbe et al. 2008).

#### 4.1.2. Dans les bicouches lipidiques

Les liposomes unilamellaires (ou vésicules) sont constitués de deux couches de molécules amphiphiles (acides gras, phospholipides...) positionnées queue-à-queue, les têtes hydrophiles étant positionnées vers l'extérieur de la bicouche. La courbure de ces bicouches forme des structures globulaires en milieux aqueux ; la solution aqueuse se retrouve tout autour et au centre de la structure (figure 23).



**Figure 23** : Représentation des structures de type liposomes unilamellaires, pouvant contenir des caroténoïdes.

Pour étudier leurs propriétés, des liposomes unilamellaires peuvent être formés avec de la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC, phospholipide) ou de la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), par exemple. Des travaux avec ces structures artificielles ont montré que des xanthophylles (zéaxanthine, astaxanthine ou leurs homologues en C<sub>50</sub>) peuvent être incorporés à des concentrations molaires entre 2,5 et 15 %. Au-delà de 23°C, la membrane est à l'état de gel. À plus basse température, elle

forme un liquide semi-cristallin, dans lequel les caroténoïdes sont agrégés. L'incorporation de lutéine ou de zéaxanthine dans ces structures engendre des agrégats moléculaires H (chaînes parallèles, très serrées) dès de faibles concentrations (1 à 5 %). De plus, la lutéine s'agrège environ 10 à 30 % plus que la zéaxanthine dans les mêmes conditions (Köhn, Kolbe et al. 2008). Le  $\beta$ -carotène ou la  $\beta$ -cryptoxanthine, quant à eux, sont systématiquement agrégés (agrégats J, lâches), que les bicouches lipidiques soient à l'état de gel ou de liquide cristallin. Les monomères non agrégés interagissent par ailleurs avec les lipides environnants.

#### 4.1.3. En dispersion

En milieu aqueux, la solubilité des caroténoïdes est quasi-nulle. On peut toutefois disperser les caroténoïdes en milieu aqueux en présence de colloïdes (ex : protéines, tensioactifs). Les particules obtenues (figure 24) ont des tailles de l'ordre du micromètre (50 à 500 nm) (Köhn, Kolbe et al. 2008). Les caroténoïdes sont alors localisés à l'intérieur de ces petites structures et les molécules prennent deux conformations possibles : elles sont soit isolées (dites amorphes), soit agrégées et organisées en cristaux. La ratio entre ces deux formes dépend de la solubilité des caroténoïdes et de la linéarité de leur structure (les caroténoïdes les plus linéaires cristallisent plus facilement).

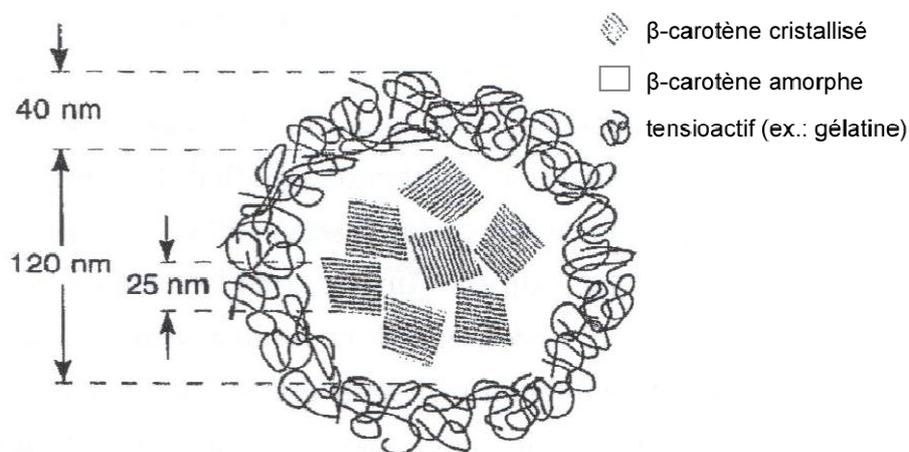


Figure 24 : Représentation des structures de type colloïdes, contenant des caroténoïdes (Mortensen 2009)

## 4.2. Cas des systèmes modèles adaptés à l'étude des caroténoïdes au niveau du tube digestif

Les propriétés physico-chimiques des caroténoïdes (stabilité, solubilité, hydrophobicité), leur micellarisation, émulsification, absorption..., ainsi que certaines de leurs activités biologiques (pouvoir antioxydant, régulation génétique...) peuvent être étudiées par des tests *in vitro* dans des modèles conçus pour mimer les caractéristiques et les conditions à différents niveaux du tractus digestif ou dans les organes cibles (pH, oxygène, température, composition du milieu, fonctionnement cellulaire...).

### 4.2.1. Modèles chimiques du contenu du compartiment gastrique

Les modèles chimiques sont destinés à mimer les situations biologiques mais sont des formes très simplifiées du contenu de l'estomac, ce qui permet d'évaluer l'effet de facteurs spécifiques (ex : ici, les formes et la concentration du fer).

Les caroténoïdes n'étant pas solubles dans l'eau, il est nécessaire d'utiliser des macromolécules amphiphiles pour les disperser dans l'eau, afin de les étudier *in vitro* dans des conditions comparables aux conditions biologiques. Il peut s'agir de protéines (complexes formés entre les caroténoïdes et de l'albumine d'œuf ou de sérum bovin), de phospholipides (phosphoacylglycérols, phosphosphingolipides, phosphosaccharolipides) ou de polymères synthétiques (ex : poly-N-vinylpyrrolidone (PVP), polyéthylène glycol (PEG), polyvinyl alcool (PVA), dextrane ou triton X-100) ([Inamura, Isshiki et al. 1989](#)).

#### 4.2.1.1. Influence du choix des tensioactifs

La nature du tensioactif utilisé a une influence importante sur le comportement des caroténoïdes en solution. Tout d'abord, le spectre d'absorption du caroténoïde varie ( $\lambda_{\max}$ ,  $\epsilon$ , structures fines d'absorption). Dans les cas où de petites structures cristallines se forment par association tête-queue des molécules de caroténoïdes, c'est la propension des tensioactifs à former des complexes avec ces structures qui détermine la dispersion du pigment dans l'eau ([Inamura, Isshiki et al. 1989](#); [Barreto, Smith et al. 1992](#)). Par ailleurs, le taux de dégradation des caroténoïdes en conditions oxydantes (irradiation lumineuse...) est modifié par les tensioactifs. Par exemple, le blanchiment du  $\beta$ -carotène à la lumière est plus fort dans des solutions micellaires aqueuses que dans les solvants organiques et est

décroissant avec le dextrane puis le PVA, la BSA, le PEG et le PVP (vitesse divisée jusqu'à 100 fois environ avec ce dernier) ([Inamura, Isshiki et al. 1989](#)).

Une émulsion huile dans l'eau contenant du fer est aussi le lieu d'une oxydation différente selon le tensioactif utilisé pour la stabiliser. De façon générale, plus les métaux de transition interagissent à l'interface avec le tensioactif, plus l'oxydation est importante dans le milieu ([Roy 1999](#)). Notamment, les molécules seront plus oxydées en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS, anionique) qu'avec du Tween 20 (non ionique) ou du bromure de dodécyltriméthylammonium (DTBA, cationique), en particulier à pH acide ([Mancuso, McClements et al. 1999](#)). La mesure des potentiels électriques de charge à la surface des gouttelettes lipidiques est un bon indicateur des interactions entre les ions fer et l'interface stabilisée par un tensioactif ([Mei, Decker et al. 1998](#)). En effet, en fonction de la charge du tensioactif, les ions fer, par exemple, interagissent plus ou moins avec le tensioactif : ils s'associent plus facilement à des molécules anioniques (surtout le fer III). Ainsi, les ions  $Fe^{3+}$  et  $Fe^{2+}$  interagissent avec le SDS et le Tween, mais pas avec le DTAB ni avec le Brij10 (non ionique) ([Mei, Decker et al. 1998](#)). De plus, les émulsions stabilisées par du Tween 20 s'oxydent plus vite à pH 7 qu'à pH 3. En effet, le fer III n'est pas très soluble à pH neutre ([Mancuso, McClements et al. 1999](#); [Jomova 2011](#)) et a alors tendance à s'associer aux gouttelettes formées par le Tween 20.

Enfin, des tensioactifs polyéthers tels que le Tween 20 ou certains Brij ont la particularité d'accumuler des peroxydes, qui peuvent eux-mêmes induire l'oxydation des caroténoïdes et d'autres antioxydants ([Roy 1999](#)). De l' $\alpha$ -tocophérol, par exemple, mis en solution micellaire de Tween 20 à pH 3 se dégrade en l'absence ou en présence de  $Fe^{II}$  (250  $\mu\text{mol/L}$ ), alors qu'il reste constant dans une solution micellaire de Brij 10. Avec du  $Fe^{III}$  (250  $\mu\text{mol/L}$ ) le tocophérol est encore plus vite dégradé dans la solution micellaire de Tween 20. À pH 7 et sans fer, le tocophérol dans les micelles de Brij se dégrade moins vite que dans les micelles de Tween 20 ([Mancuso, McClements et al. 1999](#)). Les émulsifiants tels que les Brij (non ioniques), Tween (non ioniques) et lécithines (anioniques) peuvent contenir des concentrations de peroxydes entre 0,4 à 35  $\mu\text{mol/g}$  (tableau V).

**Tableau V** : Exemple de teneurs en hydroperoxydes mesurées dans divers tensioactifs synthétiques commerciaux ([Mancuso, McClements et al. 1999](#))

Tensioactifs synthétiques	Teneurs en hydroperoxydes (µmol/g)
Tween 20 (conservé à T <sub>AMB</sub> )	34,9
Tween 80	26,0
Tween 20 (flacon neuf)	16,8
Lécithine	13,0
Tween 40	11,6
Brij 10-lauryl éther	4,0
Brij 35	3,7
SDS (sodium dodécyl sulfate)	0,6
DTAB (dodécyl triméthyl ammonium bromide)	0,4

De plus, en milieu aqueux la teneur en peroxydes a tendance à augmenter naturellement au cours du temps, et légèrement plus vite à pH 7 qu'à pH 3 ([Mancuso, McClements et al. 1999](#)). L'ajout de fer dans le milieu peut encore amplifier cet impact, car le fer peut, selon les cas, accélérer soit la formation soit la décomposition des peroxydes. Par exemple, la concentration en peroxydes dans des micelles de Tween augmente après l'ajout de fer à faible concentration (10 à 50 µmol/L de Fe<sup>II</sup> pour 100 mmol/L de Tween 20), mais diminue après l'ajout de fer à forte concentration (250 µmol/L), et n'est pas modifiée par l'ajout de fer à des concentrations intermédiaires (100 µmol/L). À pH 3, l'ajout de 250 µmol/L de fer commence par faire baisser lentement le taux de peroxydes, puis il remonte après 2 heures. Alors qu'à pH 7, la diminution est immédiate après l'ajout du fer, mais moins importante (le fer est moins soluble), puis le taux de peroxydes remonte lentement pendant 4 heures. En conclusion, des tensioactifs sensibles à la peroxydation pourraient engendrer des radicaux libres et promouvoir des oxydations lipidiques, et ces effets sont pH-dépendants ([Mancuso, McClements et al. 1999](#); [Mancuso, McClements et al. 1999](#)).

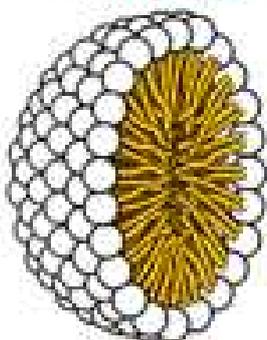
#### 4.2.1.2. Modèles micellaires mimant les suspensions simples dans l'estomac

Un modèle simple consiste en une dispersion de micelles lipidiques dans une solution aqueuse tamponnée, stabilisée par un tensioactif.

Dans un système micellaire, la tension de surface d'une solution aqueuse d'agent tensioactif monocaténaire (une seule chaîne hydrocarbonée) diminue quand la concentration augmente. Au-delà d'une valeur limite dite "concentration micellaire

critique" (CMC), le tensioactif s'agrège de façon réversible pour donner des micelles sphériques, la tension de surface changeant seulement légèrement ([Vulcain 2005](#)). De plus, le ratio molaire tensioactif/caroténoïde doit être optimisé pour obtenir une micellisation stable. Il détermine aussi la présence ou pas d'une bande d'absorbance au-delà de 535 nm ([Inamura, Isshiki et al. 1989](#)).

Dans une micelle (figure 25), les queues hydrocarbonées sont séquestrées au centre, tandis que les groupes polaires sont situés sur la surface de la sphère située dans un environnement aqueux.



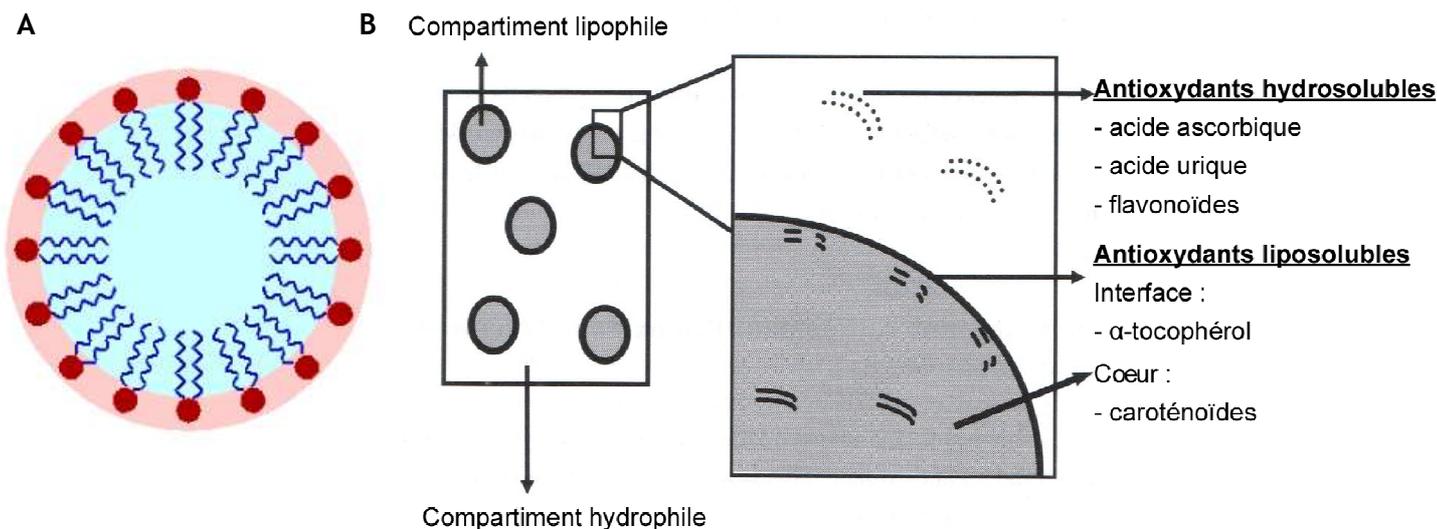
**Figure 25** : Représentation des structures de type micelles simples stabilisées par un tensioactif, pouvant contenir des caroténoïdes.

En fonction des tensioactifs utilisés, la préparation des solutions micellaires diffère. En effet, le caroténoïde est dissous dans un solvant organique et homogénéisé dans une solution aqueuse ou organique contenant la macromolécule amphiphile. Puis les solvants sont évaporés sous pression réduite et le mélange est repris dans un petit volume d'eau. Les solvants choisis pour solubiliser le caroténoïde et le tensioactif dépendent du tensioactif utilisé. Par exemple ([Inamura, Isshiki et al. 1989](#)) :

- pour le PEG, le tensioactif et les caroténoïdes sont dissous dans du benzène,
- pour le PVP, ils sont dissous dans du chloroforme,
- pour le Triton X-100, ils sont dissous dans de l'acétone,
- pour le PVA ou le dextrane, le tensioactif est dissous dans l'eau et le caroténoïde dans de l'acétone,
- pour la BSA, le tensioactif est dissous dans l'eau et le caroténoïde dans de l'éthanol.

#### 4.2.1.3. Complexification du modèle : milieu émulsionné

Les émulsions d'huile dans l'eau sont constituées de trois composants différents : l'eau (phase dispersante), l'huile (phase dispersée) et l'agent tensioactif (interface). La teneur et la composition de la phase huileuse dans une émulsion sont des facteurs importants qui influencent la sensibilité des lipides à l'oxydation et la répartition des produits d'oxydation entre la phase huileuse et la phase aqueuse (figure 26).



**Figure 26 :** (A) Représentation des structures de type gouttelettes lipidiques en émulsion huile dans l'eau, pouvant contenir des caroténoïdes. (B) Localisation des divers antioxydants entre les deux compartiments de l'émulsion (Köhn, Kolbe et al. 2008).

Ces émulsions peuvent être stabilisées soit par des tensioactifs synthétiques, soit par des protéines (ex: sérum albumine bovine), soit par des phospholipides d'origine alimentaire (d'œuf ou de soja) (Lorrain, Dangles et al. 2010). Dans cette étude, les phospholipides de soja ont été préférés, car ils risquent moins d'interagir avec les caroténoïdes que les protéines.

La partie hydrophobe de l'agent tensioactif est constituée de résidus alkyles à longue chaîne, tandis que la partie hydrophile est constituée de groupements polaires ioniques ou neutres (groupes hydroxyles ou éther de polyéthylène glycol). Un agent tensioactif possédant une vaste partie lipophile et une petite partie hydrophile est principalement soluble dans l'huile et stabilise préférentiellement une émulsion "huile dans eau", et *vice versa*. L'activité relative des parties hydrophiles et lipophiles des émulsifiants peut être évaluée par l'HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) (Vulcain 2005).

#### 4.2.2. Modèles biologiques du compartiment gastro-intestinal

La reproduction *in vitro* du compartiment gastro-intestinal est basée sur des modèles standards, pouvant convenir à l'étude de tous types d'aliments ou de nutriments et pouvant être légèrement adaptés en fonction des objectifs (pH, enzymes, ajout d'autres nutriments, fibres, substituts de sucre ou de matière grasse...) ([Fernández-García, Carvajal-Lérída et al. 2009](#)).

##### 4.2.2.1. Modèles des digestions gastrique et duodénale

La composition de ces modèles représente au mieux les conditions physico-chimiques et enzymatiques qui existent aux trois premiers niveaux du tube digestif humain ([Fernández-García, Carvajal-Lérída et al. 2009](#); [Rodriguez-Amaya 2010](#); [Van Buggenhout, Alminger et al. 2010](#)) :

- pour mimer la mastication dans la bouche, le milieu est enrichi en salive artificielle à pH 7 ([Arvisenet, Billy et al. 2008](#)), composée de nombreux sels minéraux, de mucine (protéine glycosylée du mucus) et d' $\alpha$ -amylase (enzyme participant au catabolisme des glucides),
- pour mimer la digestion gastrique, le pH est légèrement acide (conditions post-prandiales) et le milieu est enrichi en pepsine, qui est la principale endoprotéase digestive du suc gastrique,
- pour la digestion duodénale, le pH est d'environ 6 (pH stable au début de l'intestin) et le milieu est enrichi en bile et en pancréatine simulant la sécrétion de sels biliaires et d'enzymes digestives (protéases, lipases, amylases...) par la vésicule biliaire et le pancréas.

Ces modèles, qui incluent aussi des facteurs physiques tels que l'homogénéisation ou l'agitation, sont dits "semi-dynamiques" car on fait évoluer leur composition et leur pH au cours du temps. Par comparaison, les modèles chimiques décrits plus haut sont des systèmes "statiques", sans intervention sur le milieu au cours du temps.

Des systèmes plus sophistiqués peuvent également reproduire certaines modifications physiques du bol alimentaire, comme les phénomènes continus de vidange gastrique (avec utilisation de plusieurs compartiments, variation de la viscosité...). Ils sont alors dits "dynamiques" ([Fernández-García, Carvajal-Lérída et al. 2009](#)).

#### 4.2.2.2. Modèle Caco-2 de l'absorption intestinale

Différentes lignées cellulaires peuvent être utilisées pour mimer la muqueuse intestinale. Elles se distinguent notamment par leur niveaux d'expression de transporteurs et des conditions de culture différentes ([Fernández-García, Carvajal-Lérida et al. 2009](#)). Les cellules Caco-2 appartiennent à une lignée continue de cellules épithéliales humaines hétérogènes de l'adénocarcinome colorectal, à l'origine isolées par le Sloan-Kettering Institute for Cancer Research (New York, USA). Des lignées commerciales sont disponibles auprès de l'American Type Culture Collection (Manassas, USA).

Les cellules sont cultivées dans des conditions qui favorisent leur différenciation, si bien qu'elles sont morphologiquement et physiologiquement similaires à des cellules de la paroi intestinale : formation de jonctions communicantes et de microvillosités, synthèse de nombreuses enzymes et transporteurs (peptidases, estérases, P-glycoprotéines, transporteurs des acides aminés, des lipides et des acides carboxyliques des sels biliaires),... ([During, Albaugh et al. 1998](#); [Grès, Julian et al. 1998](#)). Elles sont utilisées dans le cadres d'études pharmaceutiques et nutritionnelles depuis les années 1980, non pas individuellement, mais en monocouches mimant la muqueuse intestinale, dans le but de prédire l'absorption et le passage dans le sang d'une grande diversité de nutriments ou de molécules chimiques ([Fernández-García, Carvajal-Lérida et al. 2009](#); [Rodriguez-Amaya 2010](#); [Van Buggenhout, Alminger et al. 2010](#)).

Différents clones de la lignée mère des cellules Caco-2 existent. Le clone TC-7 est le plus homogène ([During, Albaugh et al. 1998](#)).



---

# **MATERIEL ET METHODES**

---



Toutes les expérimentations effectuées pour ce travail de thèse ont la particularité d'avoir été menées dans des modèles chimiques ou biologiques afin de déterminer les propriétés physico-chimiques, certaines fonctions nutritionnelles et le devenir des caroténoïdes au cours du tractus digestif.

Deux modèles chimiques du bol alimentaire ont tout d'abord été utilisés pour étudier les processus de dégradation des caroténoïdes et d'inhibition de l'oxydation lipidique pouvant se produire lors de la digestion et en particulier lors de la phase gastrique :

- une solution micellaire simple, limpide, qui permet une observation directe des caroténoïdes par spectrophotométrie. Les caroténoïdes sont dispersés en milieu aqueux. Leur stabilisation en milieu aqueux a été obtenue avec un tensioactif synthétique non-ionique, choisi pour être le plus neutre possible vis-à-vis des caroténoïdes ;
- une émulsion huile dans eau, adaptée d'un modèle développé par l'équipe "Chimie des antioxydants" de l'INRA d'Avignon. Dans cette étude, la faible solubilité des caroténoïdes étudiés a nécessité quelques adaptations afin d'obtenir des émulsions homogènes et stables (choix de l'émulsifiant, ordre d'incorporation des composants de l'émulsion... ). Les caroténoïdes sont localisés au niveau de gouttelettes lipidiques. Leur stabilisation a été obtenue avec des phospholipides d'origine alimentaire.

Ils ont été étudiés à deux pH, 5,8 et 4, simulant deux phases de la digestion gastrique (immédiatement après l'ingestion d'un repas puis à la moitié de la vidange gastrique). Le pH ayant un impact à la fois sur la stabilité des caroténoïdes et sur l'état d'oxydation du fer initiateur de la peroxydation lipidique, les résultats obtenus à ces deux pH sont susceptibles d'être très différents. Par exemple, une faible stabilité et la sensibilité des caroténoïdes à l'oxydation à certains pH peuvent être la cause d'un faible pouvoir antioxydant. De plus, à pH acide (< 5) la metmyoglobine a tendance à se dénaturer, avec relargage de l'hème, ce qui peut modifier l'interaction de ce dernier avec les lipides et les caroténoïdes.

Trois modèles biologiques ont ensuite permis de reconstituer le devenir des caroténoïdes entre l'estomac et leurs principaux organes de stockage (foie et tissu adipeux) :

- un système de digestion en deux phases, mimant les conditions de l'estomac puis du duodénum, où les caroténoïdes dans les aliments ou dans les lipides alimentaires sont inclus dans des micelles mixtes grâce à l'apport de sels biliaires. Il s'agit ici d'un modèle "semi-dynamique" ;
- une culture de cellules Caco-2, qui se différencient en monocouche épithéliale dans un milieu nutritionnel ;
- une étude de gavage chez le rat, pour étudier la distribution tissulaire et la biodisponibilité *in vivo* des caroténoïdes.

Tous les caroténoïdes de l'étude (bactériens et de référence) ont été évalués avec chacun de ces modèles, ce qui permet en outre d'apprécier la validité relative de ceux-ci.

## 1. PRODUITS CHIMIQUES ET SOLUTIONS

### 1.1. Sources de caroténoïdes et autres antioxydants

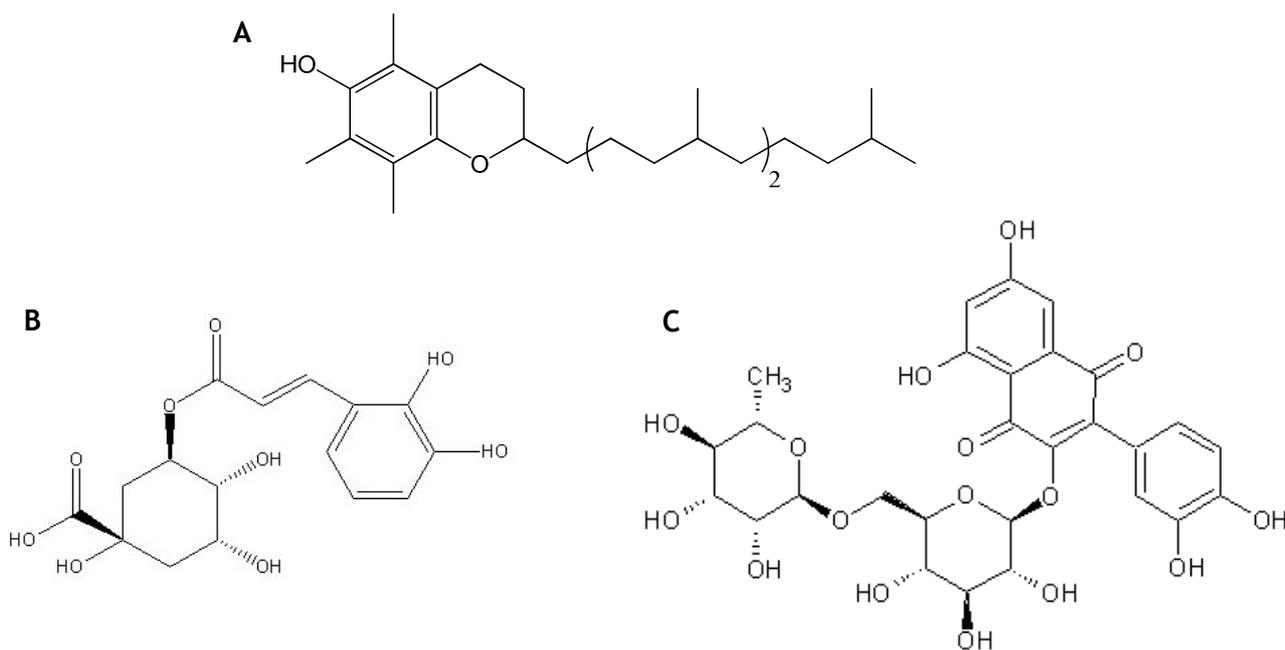
Les caroténoïdes bactériens faisant l'objet de cette thèse ont été fournis par les partenaires du projet européen Colorspore (Cf. Introduction, § 1), sous deux formes : matériel bactérien lyophilisé (poudres contenant essentiellement des cellules végétatives de HU36 et GB1) ; et extraits bruts de caroténoïdes totaux produits par chaque souche *Bacillus*. Les extraits bruts contiennent les caroténoïdes produits par chacune des souches, mais également d'autres isoprénoïdes, notamment de la ménaquinone-7 (forme polymérisée de la vitamine K<sub>2</sub>).

Le  $\beta$ -carotène tout-*trans* (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, type II, > 95%, M = 536 g/mol) et l'astaxanthine tout-*trans* (C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>, > 98 %, M = 596 g/mol), sont caroténoïdes de synthèse provenant de chez Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). La lutéine tout-*trans* (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>, > 95 %, M = 568 g/mol) est une molécule de synthèse donnée par DSM LTD (Suisse). Le lycopène tout-*trans* (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, > 90 %, M = 536 g/mol) est un extrait naturel issu de la tomate, fourni par des partenaires du laboratoire (la société espagnole CONESA pour les études chimiques et DSM LTD, Suisse pour les études nutritionnelles).

Tous les produits alimentaires riches en caroténoïdes utilisés pour les expériences de biodisponibilité ont été achetés en grande surface et choisis sans acidifiants, ni antioxydants, ni conservateurs (de façon à éviter des interactions risquant de modifier les propriétés ou le comportement des caroténoïdes) : carottes en rondelles cuites à la vapeur, conservées avec sucre, sel et eau (Daucy) ; tomates Roma entières pelées concassées en conserve avec leur jus (marque de distributeur, Auchan) ; épinards hachés blanchis et conservés avec sel et eau (Daucy) ; saumon de Norvège non congelé, salé, fumé et conservé sous vide (marque de distributeur, Auchan).

L' $\alpha$ -tocophérol (C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, 95 %) et les deux polyphénols, la rutine (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>, 95 %) et l'acide chlorogénique (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>, 95 %), sont des molécules de synthèse provenant de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L' $\alpha$ -tocophérol (figure 27 A) est une forme tocotriénol liposoluble de la vitamine E. Il présente un fort pouvoir antioxydant par stabilisation des électrons des radicaux libres, en particulier dans les membranes biologiques. Il a aussi un effet bénéfique contre l'agrégation des plaquettes dans le sang et sur le taux de cholestérol. L'acide chlorogénique (figure 27 B) est un acide

hydroxycinnamique majeur de l'alimentation (forme quinique de l'acide caféique). Il est facilement absorbé au niveau de la paroi intestinale et exerce une activité antioxydante dans le plasma. La rutine (figure 27 C) est un des principaux flavonoïdes des végétaux et est présente en grande quantité dans l'alimentation. Elle présente des activités biologiques variées, notamment des effets antioxydants, une activité protectrice contre l'hépatotoxicité et est anti-inflammatoire par activation des enzymes glutathionne peroxydase et glutathionne réductase.



**Figure 27** : Structure de (A) l' $\alpha$ -tocophérol, (B) de l'acide chlorogénique et (C) de la rutine, utilisés dans l'étude lors des tests de combinaison entre les caroténoïdes bactériens et d'autres antioxydants.

## 1.2. Composants utilisés dans les milieux chimiques modèles

### 1.2.1 Solutions tampon

Pour les systèmes micellaires, des solutions tampon à 200 mmol/L ont été préparées à pH 5,8 et pH 4. La phase aqueuse du modèle émulsionné est un tampon aqueux à 20 mmol/L, pH 4. Les solutions tampon ont été préparées avec de l'eau milliQ, purifiée sur cartouches Millipore® QPak-plus (Millipore Corporation, Bedford, USA).

Le tampon phosphate à pH 5,8 a été préparé à partir d'une solution d'acide phosphorique monosodique ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2H<sub>2</sub>O, 99 %, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et d'une solution d'hydrogène phosphate hydraté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 98 %, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les tampons acétate à pH 4 ont été préparés à partir de solutions d'acétate de sodium trihydraté solide ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ , 3H<sub>2</sub>O, 99 %, Prolabo, Fontenay-Sous-Bois, France) et de solutions d'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 100 %, Prolabo, Fontenay-Sous-Bois, France). Le pH a été contrôlé et ajusté à l'aide d'un pH-mètre électronique MetrOhm 744, préalablement étalonné avec deux solutions tampon (pH 4 et pH 7).

Il est important de noter que les tampons phosphates et acétates ne sont pas chélateurs du fer, qui a été utilisé pour initier les réactions d'oxydation.

### 1.2.2. Stabilisants et émulsifiants

Dans le système "micellaire", les caroténoïdes ont été dispersés en solution aqueuse grâce à l'ajout d'agents de surface. Divers produits provenant de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) ont été testés afin d'optimiser le modèle :

- trois tensioactifs non-ioniques de synthèse ; le polyoxyéthylène sorbitan monolaurate (Tween®20), le polyoxyéthylène 10 lauryl ether (Brij®), et le polyoxyéthylenglycol 23 lauryl ether (Brij®35).
- une protéine naturelle, l'albumine de sérum bovin (BSA, > 96 %, sans acides gras).

Seuls des tensioactifs non-ioniques ont été choisis afin d'éviter les interactions entre les tensioactifs et les ions fer ajoutés dans le modèle lors des tests. En outre, le pKa de la BSA est de 10, elle est donc sous forme acide aux deux pH utilisés.

La stabilité du modèle "émulsion" a été assurée par l'ajout de phospholipides de soja, principalement constitués de L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, provenant de chez Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France). La pureté du produit indiquée par le fournisseur, correspondant à la concentration de L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, est de 40 %. Les autres phospholipides contenus dans ce produit sont de la phosphatidylcholine (environ 35 %), de la sphingomyéline (environ 15 %), du phosphatidyl-inositol (environ 5 %) et des lysophospholipides (environ 5 %). La composition en acides gras des phospholipides de soja a par ailleurs été déterminée par analyse en CPG-SM, au sein de l'unité SQPOV de l'INRA d'Avignon (Christian Giniès). Elle est présentée dans le tableau VI.

Tableau VI : Composition en acides gras (AG) des phospholipides de soja utilisés pour stabiliser l'émulsion.

Acides gras	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
% des AG totaux	17,41	4,29	12,97	58,31	7,03

### 1.2.3. Sources d'acides gras poly-insaturés

Dans le système micellaire, l'acide linoléique (acide 9-*cis*, 12-*cis*-octadécadiénoïque, > 99 %) a été utilisé comme substrat d'oxydation. Il provient de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Dans l'émulsion, la phase grasse est de l'huile de tournesol. Elle a été achetée en grande surface (marque de distributeur, Auchan). Sa composition en acides gras a préalablement été analysée en CPG-SM (chromatographie phase gaz couplée à la spectrométrie de masse) au sein de l'unité SQPOV de l'INRA d'Avignon (Christian Giniès) et est donnée dans le tableau VII.

Tableau VII : Composition en acides gras (AG) de l'huile de tournesol utilisée pour la préparation de l'émulsion.

Acides gras	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0
% des AG totaux	0,05	5,96	0,06	0,04	3,82	30,13	59,44	0,12	0,07	0,31

Sa teneur en vitamine E a par ailleurs été mesurée en HPLC-fluo (chromatographie liquide haute performance, couplée à une détection par fluorimétrie) et a révélé la présence de 0,51 mg/mL d' $\alpha$ -tocophérol et de traces de  $\gamma$ - et de  $\delta$ -tocophérol. Or, le tocophérol est un

antioxydant puissant, courant dans les huiles végétales, à éliminer du modèle afin qu'il n'inhibe pas l'oxydation et n'interagisse pas avec les caroténoïdes.

#### 1.2.4. Initiateurs d'oxydation

Le fer, métal de transition, a été choisi comme initiateur de l'oxydation en raison de sa forte présence dans l'alimentation et donc dans le bol alimentaire. Trois formes de fer présentes dans les aliments (Cf. Bibliographie générale, § 3.1.4.) ont été testées dans les modèles chimiques : les ions fer libres ferreux et ferriques, et la forme hémique liée aux protéines de myoglobine.

Le sulfate de fer II ( $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ , > 99,5 %), le nitrate de fer III ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$ , 98 %), et la metmyoglobine (myoglobine de cœur de cheval, type II, > 90 %, sans sels) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

La metmyoglobine ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ), a un poids moléculaire de 17 600 Da. La myoglobine ( $\text{MbFe}^{\text{II}}$ ) est une protéine contenant un cofacteur hématine (porphyrine de Fe II), qui permet le transport intracellulaire du dioxygène dans les tissus musculaires. Sa forme oxydée, la metmyoglobine ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ), qui s'accumule dans le muscle après abattage de l'animal et dans la viande lors de la cuisson, est capable d'initier efficacement la peroxydation lipidique.

#### 1.2.5. Réactifs utilisés pour le suivi de l'état redox du fer

Le xylénol orange (sel tetrasodium  $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$ , 90 %), réactif spécifique du fer III, et le butyl hydroxytoluène (BHT, 2,6-Di-tert-Butyl-p-cresol,  $[(\text{CH}_3)_3\text{C}]_2\text{C}_6\text{H}_2(\text{CH}_3)\text{OH}$ , > 99 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). La ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4'-4"-disulfonic acid monosodium,  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_2, x\text{H}_2\text{O}$ , 97 %), réactif spécifique du fer II, provient de chez Fluka. L'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 60 %) est de chez Fisher-Scientific (Loughborough, UK). Le sulfate de fer(II)-ammonium hexahydraté (sel de Mohr,  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2, 6\text{H}_2\text{O}$ , > 99,0 %) provient de chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

### 1.3. Composants utilisés dans les modèles d'études nutritionnelles

#### 1.3.1. Produits alimentaires utilisés dans les digestions *in vitro*

Les aliments utilisés pour les études *in vitro* ou *in vivo* ont été achetés en grande surface : l'huile d'arachide était destinée à tous usages (Lesieur, composition dans le tableau VIII), l'huile d'olive était de type vierge extra, extraite à froid (marque de distributeur, Casino, composition dans le tableau 8), les pommes de terre étaient de variété Marabel, la viande de bœuf était du steak haché à 5 % de matières grasses (marque de distributeur, Auchan), les yaourts utilisés pour homogénéiser les cellules bactériennes lyophilisées étaient des produits nature fermes demi-écrémés sans ajout de bifidus actif (Le yoghourt nature, Danone).

Tableau VIII : Composition en acides gras de l'huile d'olive et de l'huile d'arachide utilisées lors des expériences de digestion *in vitro* (et pour les gavages chez le rat).

Acides gras	saturés	mono-insaturés	poly-insaturés
	C14:0, C16:0, C18:0, C20:0	essentiellement C18:1	essentiellement C18:2
Huile d'olive (% des AG totaux)	15	75	10
Huile d'arachide (% des AG totaux)	20	48	30

#### 1.3.2. Composants du système de digestion *in vitro*

Les sels carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , >99,5%) et bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ , > 99,5 %) viennent de Sigma-Ultra (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le chlorure de calcium dihydraté ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ~ 99 %), le phosphate de potassium dibasique dihydraté ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , > 99 %) et le citrate de sodium trihydraté ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ~99,8%) sont de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ , > 99,5 %) a été acheté chez Merck (Darmstadt, Allemagne) et le chlorure de potassium ( $\text{KCl}$ , > 99,5 %) chez Prolabo Normapur (Paris, France). L'acide chloridrique fumant ( $\text{HCl}$ , 37-38 % = 10 N) est de chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

La mucine (mucine d'estomac de porc, type III, 0,5-1,5 % de liaisons acide sialique) provient de chez Sigma Life Science (Saint-Quentin-Fallavier, France). Il s'agit d'une protéine gastrique glycosylée d'un poids moléculaire de 75 kDa, constituée de quatre

chaînes d'acides aminés sur lesquelles sont fixés environ 160 oligosaccharides. La mucine est hydrolysée par la pepsine.

Les enzymes  $\alpha$ -amylase ( $\alpha$ -amylase de *Bacillus subtilis*, activité = 59,2 U/mg) et pepsine (pepsine de muqueuse gastrique porcine, activité = 2546 U/mg poudre ou 2913 U/mg protéine) sont de chez Sigma Life Science (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'amylase (EC 3.2.1.1) est une saccharidase digestive, présente dans le suc pancréatique et la salive. L' $\alpha$ -amylase brise les liens  $\alpha(1-4)$ glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amylose et de l'amylopectine pour donner des molécules de maltose (disaccharides de  $\alpha$ -glucose). Elle ne peut attaquer que l'amidon cuit. La pepsine (EC 3.4.23.1) est une endoprotéase digestive du suc gastrique, sécrétée sous forme pepsinogène au moment de la digestion et activée par hydrolyse de l'acide chlorhydrique de la muqueuse gastrique. Le pH optimum d'action de la pepsine se situe entre 1,8 et 4,4.

L'extrait de bile (extrait biliaire de porc, contenant des conjugués de glycine et taurine et d'acide hyodeoxycholique ou autres sels biliaires) et la pancréatine (pancréatine de pancréas de porc, contenant de nombreuses enzymes, dont des amylases, trypsines, lipases, ribonucléases et protéases) proviennent de chez Sigma Life Science (Saint-Quentin-Fallavier, France).

### 1.3.3. Kits utilisés pour le dosage des composants des micelles mixtes

Le kit de dosage des sels biliaires totaux (réf. DZ042A) provient de chez Diazyme (Dresde, Allemagne). Les kits de dosage des monoglycérides (réf. 87319), des phospholipides et lysophospholipides (réf. 99105) et du cholestérol total (méthode CHOD-PAD, réf. 87345) proviennent de chez Biolabo (Maizy, France).

### 1.3.4. Composants des micelles mixtes artificielles

La phosphatidylcholine (2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine,  $C_{42}H_{82}NO_8P$ , ~ 99 %), la lysophosphatidylcholine (1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine,  $C_{24}H_{50}NO_7P$ , > 99 %), la mono-oléine (1-oléoyl-*rac*-glycerol,  $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOCH_2CHOHCH_2OH$ , > 99 %), le cholestérol libre ( $C_{27}H_{46}O$ , > 95 %), l'acide oléique ( $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$ , > 99 %), et le taurocholate de sodium (sel taurocholate hydraté,  $C_{26}H_{44}NNaO_7S, xH_2O$ , > 95 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

### 1.3.5. Solutions utilisées pour la culture des cellules Caco-2 TC-7

Le sérum foetal bovin (FBS) provient de chez Biomedica (Issy-les-Moulineaux, France). Le DMEM (milieu de culture, Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 4,5 g/L de glucose, 500 mg/L de trypsine et 200 mg/L d'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique), les acides aminés non-essentiels, le mélange d'antibiotiques pénicilline / streptomycine et la solution tampon phosphate (PBS-CM, phosphate buffered saline) contenant 0,1 mmol/L de  $\text{CaCl}_2$  et 1 mmol/L de  $\text{MgCl}_2$  proviennent de chez Gibco® BRL (Cergy-Pontoise, France).

### 1.3.6. Produits utilisés pour le dosage des protéines dans les tissus de rat

La quantification des protéines a été effectuée à l'aide d'un kit de dosage à l'acide bicinchoninique (Uptima® BC assay), provenant de chez Interchim (Montluçon, France). Il se compose d'une solution d'acide bicinchoninique, d'une solution de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 4 % (m/v) et d'une solution standard de protéines (albumine de sérum bovin, BSA).

### 1.3.7. Produits utilisés pour l'étude de l'expression des gènes dans les tissus de rat

Le trizol (TRIzol® Reagent) utilisé pour l'extraction des ARN ; et le tampon 5X (first strand buffer, 250 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ), la reverse transcriptase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, 200 U/ $\mu\text{L}$ ), le DL-dithiothreitol (DTT,  $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$ , 0,1 mol/L), le set de désoxynucléotides triphosphates (dNTP, 10 mmol/L) et les hexamères (amorces aléatoires, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) utilisés pour la transcription reverse en ADNc proviennent de chez Invitrogen (life technologies, Villebon-sur-Yvette, France). L'intercalant fluorescent SYBR green (qPCR Mastermix Plus for SYBR® green I, NO ROX, RT-SN2X-03+NR) et les primers « sens » et « antisens » (oligonucléotides en tampon aqueux) du gène de référence et de chaque gène d'intérêt proviennent de chez Eurogentec (Angers, France). Les primers ont été définis à l'aide du site support de Roche ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)).

L'eau stérile ("solution stérile, exempte d'endotoxines bactériennes"), utilisée pour toutes les étapes de l'étude de biologie moléculaire, est pure, ne contient ni ADN ni ARN et provient de chez Fresenius Kabi (Sèvres, France).

#### 1.4. Produits utilisés pour la caractérisation des caroténoïdes et de leurs dérivés par analyses HPLC et GC-MS

L'acide formique ( $\text{HCOOH}$ , > 98 %) et le thiosulfate de sodium pentahydraté ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 99,5 %) proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Le formate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{COOH}$ , 99,995 %), le bromure de cétyltriméthylammonium ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ , > 99 %), l'acide 3-chloroperoxybenzoïque (MCPBA,  $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CO}_3\text{H}$ , ~ 77 %), le sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , > 99 %), et le chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ , > 99,5 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ , > 99,5 %) et le bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ , > 99,5 %), proviennent de chez Prolabo (Paris, France).

Le  $\beta$ -cyclocitral ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ , > 90 %), la  $\beta$ -ionone ( $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}$ , > 96 %) et le 6-méthyl-5-heptèn-2-one ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$ , > 98 %) proviennent de chez sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

La ménaquinone-4 (forme moyennement polymérisée de la vitamine  $\text{K}_2$ , 99,9 %) provient de chez Supelco Analytical (Bellefonte, USA). Le 8'-apo- $\beta$ -caroténal ( $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}$ , ~ 95 %) utilisé comme étalon interne pour le dosage des caroténoïdes en analyse HPLC provient de chez Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le pyrogallol (benzène-1,2,3-triol,  $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$ , > 98 %), antioxydant utilisé lors des extractions nécessitant une étape de saponification, provient de chez Sigma Life science (Saint-Quentin-Fallavier, France).

#### 1.5. Solvants

Tous les solvants utilisés lors des étapes de mesure et d'extraction sont au minimum de qualité analytique (> 99,4 %). L'acétone provient de chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) et le n-hexane proviennent de chez Carlo Erba Reactifs SDS (Val-de-Reuil, France). L'isopropanol et le méthanol ( $\text{MeOH}$ ) proviennent de chez Scientific Bioblock (Illkirch, France). Le toluène provient de chez Fisher-Scientific (Loughborough, UK). Le tétrahydrofurane (THF), préalablement stabilisé sur alumine basique, est de qualité HPLC et provient de chez Prolabo Normapur (Fontenay sous Bois, France).

Pour les analyses en UPLC-MS, le méthanol (MeOH) est de qualité LC-MS et provient de chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Tous les autres solvants proviennent de chez Fisher-Scientific (Loughborough, UK). L'acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN, ou Acn) est de qualité LC-MS, le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) est de qualité HPLC, l'acétate d'éthyle (EtOAc) est de qualité analytique.

Pour les analyses en HPLC, le méthanol (MeOH) et le méthyl-tert-butyl-éther (MTBE) sont de qualité HPLC et proviennent de chez Carlo Erba Réactifs SDS (Val-de-Reuil, France).

## 2. METHODES DE PREPARATION ET D'IDENTIFICATION DES EXTRAITS DE CAROTENOÏDES BACTERIENS

### 2.1. Détermination qualitative de la composition des extraits bactériens de HU36 et de GB1 par analyse UPLC-MS

Les extraits bruts contenant les caroténoïdes bactériens des souches HU36 et GB1 ont été dissous dans un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v) et filtrés à travers du coton de verre afin d'éliminer les résidus du milieu de culture. Puis les solvants ont été évaporés à température ambiante à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (Rotavapor Büchi EL 131, avec bain-marie Büchi 461, Suisse, couplé à une pompe à vide Julabo F12, Colmar, France).

Le contenu des extraits bruts de caroténoïdes bactériens a ensuite été caractérisé par chromatographie liquide ultra-haute performance (UPLC<sup>®</sup> Acquity Waters, Guyancourt, France) à barrette de diode UV-visible, couplée à un spectromètre de masse à analyseur Q-TOF (HCT<sup>™</sup> high capacity trap Ultra MS<sup>®</sup>, Brüker Daltonics, Billerica, USA) et les caroténoïdes ont été élués à 35 °C sur une colonne greffée en C<sub>18</sub> (2,1 x 150 mm, type HSS T3, porosité 1,8 µm, Waters Acquity<sup>™</sup>, Guyancourt, France), à l'aide d'un gradient de deux solvants (A : acétonitrile:MeOH:H<sub>2</sub>O (60:20:20, v/v/v), HCOOH 5 µmol/L et HCOONH<sub>4</sub> 10 mmol/L ; B : EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20, v/v), HCOOH 5 µmol/L), à 0,5 mL/min (Cf. § 3.6.2). Le profil de caroténoïdes a été caractérisé par les spectres UV et de masse de chacun des pics élués. Puis, des masses molaires moyennes ont pu être calculées pour les deux cocktails, à partir des masses de chaque caroténoïde, pondérées par les aires des pics (Cf. § 2.3).

Par ailleurs, d'autres composés lipidiques ont également été identifiés, indiquant que les extraits bruts nécessitaient une étape de purification avant d'évaluer les propriétés des caroténoïdes bactériens. En particulier, la ménaquinone MQ-7 (figure 28, une forme polymérisée de la vitamine K<sub>2</sub>) est constitutive des membranes cytoplasmiques des bactéries (rôle dans le transfert d'électrons, la phosphorylation oxydative, le transport actif et la formation des endospores ([Das, Hhugenholtz et al. 1989](#))) et est extraite avec les caroténoïdes dans les extraits bruts non purifiés.

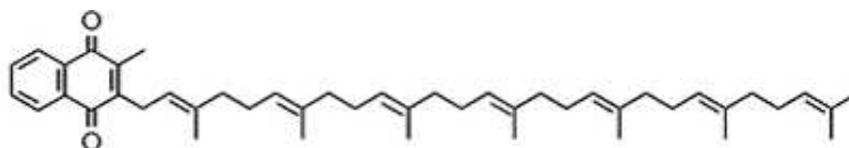


Figure 28 : Structure de la ménaquinone MQ-7 produite par les bactéries du genre *Bacillus*.

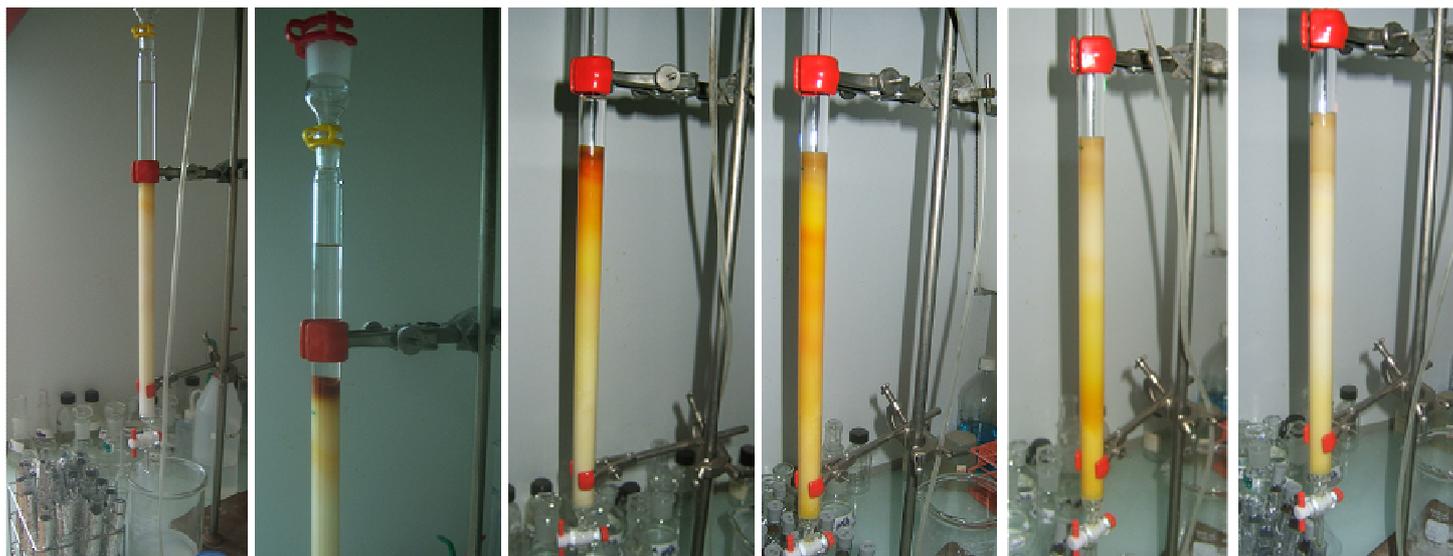
## 2.2. Séparation et purification des extraits bruts de caroténoïdes bactériens

### 2.2.1. Purification par chromatographie liquide sur colonne ouverte

Après filtration sur coton de verre, les extraits bruts de caroténoïdes ont été purifiés par chromatographie liquide sur une colonne de silice greffée en C18 (47 x 60  $\mu\text{m}$  A.P.S., DAVISIL<sup>®</sup> Chromatographic Silica Media pour séparation et purification, grade 633N, GRACE VYDAC, Maryland, USA), formée dans une burette équipée d'un filtre en verre fritté (longueur 30 cm, diamètre 2 cm). Le gel de silice a été préalablement mouillé avec du méthanol à 1 % d'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) et la colonne a été rincée avec un mélange  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (80:20, v/v). Puis, environ 250 mg des extraits bruts secs ont été redilués dans un petit volume de méthanol (environ 1 mL) et déposés au sommet de la colonne. L'élution du contenu des extraits bactériens (figure 29) a été réalisée à l'aide d'un gradient constitué de deux solvants et le débit de l'élution a été maintenu régulier grâce à un flux d'Argon. Le solvant A est un mélange  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (80:20, v/v) et le solvant B est un mélange  $\text{EtOAc}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80:20, v/v). Le gradient appliqué est le suivant :

- 250 mL de A 100 % ;
- 75 mL de A 90 % et B 10 % ;
- 75 mL de A 85 % et B 15 % ;
- 75 mL de A 80 % et B 20 % ;
- 100 mL de A 75 % et B 25 % ;
- 250 mL de A 65 % et B 35 % ;
- 75 mL de A 50 % et B 50 % ;
- 50 mL de A 40 % et B 60 % ;
- 75 mL de A 20 % et B 80 % ;
- 50 mL de B 100 %.

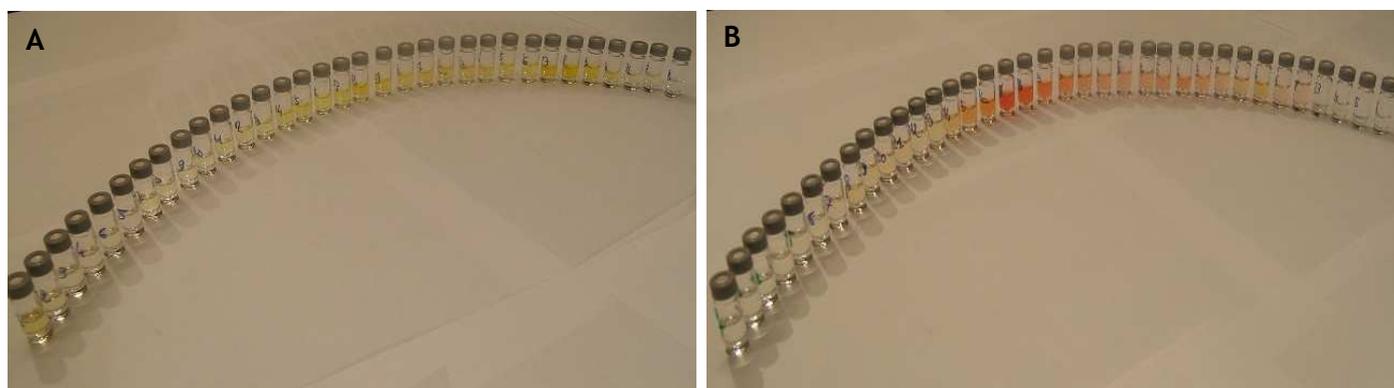
Les fractions d'élution (20 mL) ont été successivement collectées dans des tubes en verre de 25 mL. Les molécules qui ne sont pas des caroténoïdes (autres isoprénoïdes, dont la ménaquinone) étaient attendues en fin d'élution, dans une fraction incolore. À la fin de la purification, le gel de silice en C18 a été régénéré grâce à plusieurs rinçages avec de l'eau Milli-Q puis un mélange  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1, v/v).



**Figure 29** : Progression de l'éluion d'un dépôt d'extrait brut de caroténoïdes bactériens sur une colonne de silice greffée en C18 (exemple de HU36)

### 2.2.2. Analyse des fractions d'éluion par UPLC-MS

Un échantillon (500  $\mu$ L) a été prélevé dans chaque fraction d'éluion collectée précédemment (figure 30), filtré à travers un filtre PTFE de 0,2  $\mu$ m (filtre membrane 13 mm, VWR international, USA) et analysé par UPLC-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectroscopy*, Cf. § 3.6.2) afin de contrôler leur contenu. Ainsi la séparation des caroténoïdes et l'élimination des autres isoprénoïdes par chromatographie liquide ont pu être vérifiées. Les molécules de chaque fraction ont été identifiées par leur spectre UV entre 180 et 800 nm et leur spectre de masse. Seules les fractions contenant exclusivement des caroténoïdes (environ 35 fractions) ont ensuite été regroupées, alors que celles contenant d'autres composés, et notamment la ménaquinone ont été mises de côté.



**Figure 30** : Echantillons collectés pour l'analyse UPLC-MS du contenu des fractions d'éluion des extraits bruts de caroténoïdes obtenus à partir (A) de HU36 et (B) de GB1.

## 2.3. Détermination quantitative de la composition des extraits bactériens

### 2.3.1. Évaluation des coefficients d'extinction molaire moyens des cocktails de caroténoïdes bactériens

Des coefficients d'extinction molaire moyens ont été recherchés pour les mélanges de caroténoïdes produits par HU36 et GB1. En effet, ces caroténoïdes n'ont jamais été étudiés isolément au cours de cette thèse mais en tant que cocktails globaux (car c'est ainsi qu'il sont les plus susceptibles d'être utilisés en formulation à l'avenir). Ces coefficients ont été estimés par analogie avec ceux d'autres caroténoïdes bactériens décrits dans la bibliographie. Cette méthode ne donne qu'une valeur approximative mais reste tout de même plus précise que les méthodes de pesée, car même après purification, des résidus de silices ont été récupérés dans les extraits, ce qui aurait faussé les mesures.

Pour les caroténoïdes de HU36, c'est la staphyloxanthine ( $C_{51}H_{79}O_8$ ), ou  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-O-(4,4'-diaponeurosporen-4-oate)-6-O-(12-méthyl-tétradécanoate), qui a servi de référence. Il s'agit également d'une molécule composée d'une chaîne acide apolycopénoïque, avec un groupement glucose et une chaîne secondaire isoprénoïque à une extrémité (figure 31).

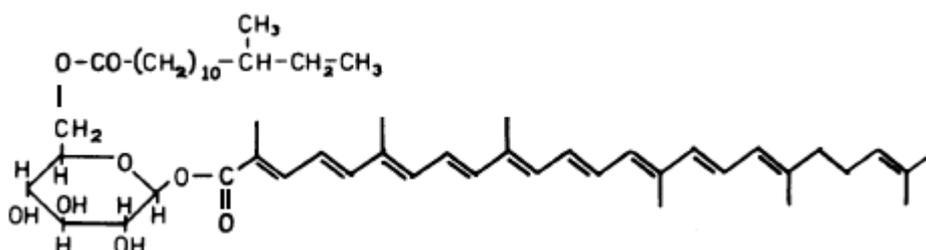


Figure 31 : Structure de la staphyloxanthine synthétisée par *Staphylococcus aureus* (Marshall and Wilmoth 1981).

Dans le cas des caroténoïdes de GB1, la molécule de référence a été la forme glycosyl-diaponeurosporénoate ( $C_{36}H_{51}O_7$ ), également produite par *Staphylococcus aureus* (figure 32).

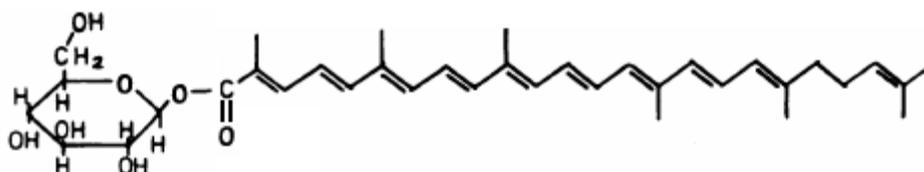


Figure 32 : Structure du glycosyl-diaponeurosporénoate synthétisé par *Staphylococcus aureus* (Marshall and Wilmoth 1981).

Les coefficients  $A^{1\%}$  des deux molécules de référence présentées précédemment sont respectivement de 1 920 et de 2 860 dans l'éther de pétrole à 462 nm (les formes saponifiées absorbent plus la lumière que les formes esters correspondantes). Les coefficients en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  ont été calculés selon la formule suivante :  $\epsilon = A^{1\%} \times (\text{masse molaire} / 10)$ . Les coefficients moyens des cocktails purifiés de HU36 et de GB1 ont ainsi été calculés dans l'éther de pétrole à 462 nm à partir des masses molaires moyennes préalablement calculées (Cf. § 2.1.). Puis, les coefficients d'extinction molaire aux maximums d'absorbance dans d'autres solvants ont été calculés à partir de mesures, par rapports d'absorbances. Le solvant utilisé pour les mesures d'absorbance de ces cocktails est le dichlorométhane.

### 2.3.2. Quantification des caroténoïdes et des autres isoprénoïdes présents dans les extraits bruts de HU36 et de GB1

Les volumes totaux des fractions qui ont été regroupées, contenant exclusivement des caroténoïdes d'une part, et de la ménaquinone d'autre part, ont été mesurés. Puis, chaque mélange a été évaporé sous vide et repris dans un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v).

Pour les caroténoïdes, un échantillon a été dilué dans du dichlorométhane et son absorbance a été mesurée à 25 °C au maximum d'absorbance ( $\lambda_{MAX}$ ), sur spectrophotomètre UV-visible (Specord S600, à barrettes de diode, chemin optique 1 cm, équipé d'un bain à thermostat et d'un passeur 8 échantillons à agitateur magnétique, Analytic Jena AG, Allemagne). Puis, la concentration de caroténoïdes totaux a été calculée en utilisant les coefficients d'extinction molaire déterminés précédemment (Cf. § 2.3.1). Le taux de dilution étant connu, la quantité totale de caroténoïdes a ensuite pu être calculée.

Dans le cas de la ménaquinone, un échantillon dilué a été analysé par UPLC-MS. La concentration de cette vitamine a ensuite été calculée grâce à une courbe étalon établie à partir d'une référence commerciale (ménaquinone-4, Cf. § 1.4), en utilisant un coefficient d'extinction molaire égal à  $\epsilon = 2\ 884\ L.mol^{-1}.cm^{-1}$  à 330 nm dans le méthanol ([Das, Huhgenholtz et al. 1989](#); [Fernandes, Pereira et al. 2002](#)). Puis, la quantité totale de ménaquinone isolée à partir des extraits bruts a été calculée à partir du taux de dilution.

Les caroténoïdes ont finalement été aliquotés et évaporés pour être conservés en atmosphère inerte dans des ampoules teintées scellées jusqu'à utilisation ultérieure.

### 3. MODES OPERATOIRES ET EQUIPEMENTS POUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

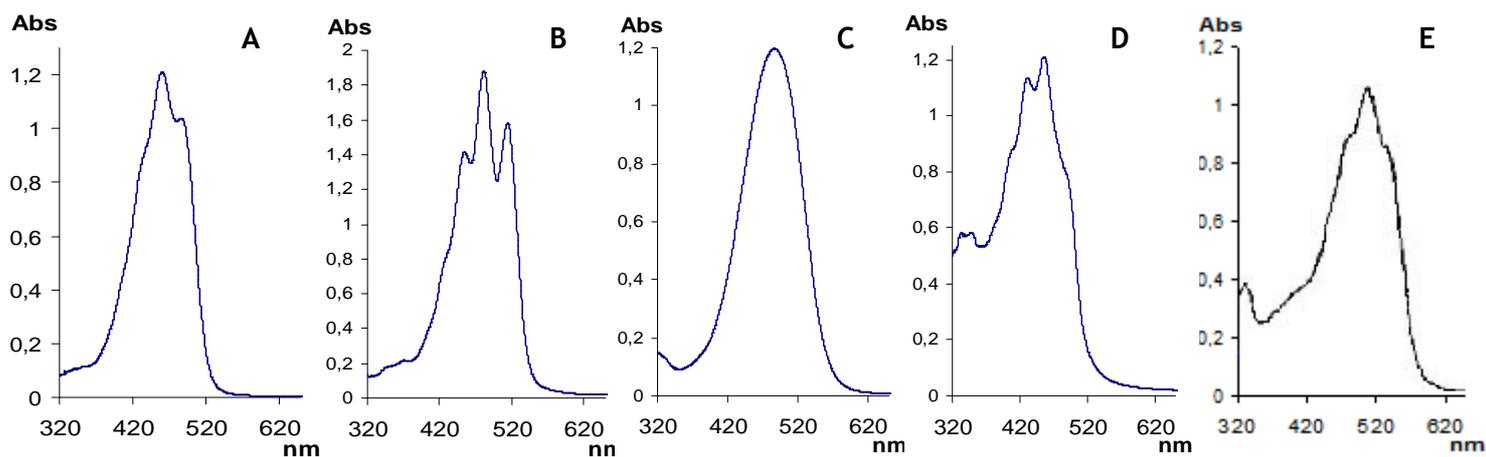
#### 3.1. Préparation des solutions stocks de caroténoïdes

Les cocktails de caroténoïdes bactériens purifiés ont été dissous dans un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v).

Trois caroténoïdes très communs dans le régime alimentaire humain ont été choisis comme molécules de référence afin d'évaluer les propriétés physico-chimiques et nutritionnelles des caroténoïdes bactériens : le lycopène, le  $\beta$ -carotène et l'astaxanthine (Cf. § 1.1).

Les solutions stocks de caroténoïdes (à environ 500  $\mu\text{mol/L}$ ) ont été préparées par dissolution des échantillons cristallisés (2,68 mg pour le  $\beta$ -carotène et le lycopène, 2,98 mg pour l'astaxanthine, 3,75 mg pour les caroténoïdes de HU36 et 3,90 mg pour les caroténoïdes de GB1) dans 10 mL de dichlorométhane. La concentration exacte de chaque solution a ensuite été calculée par mesure d'absorbance à 25°C dans des cellules en quartz (Suprasil® 104-QS, 10 mm, Hellma® Optics, Paris, France), sur spectrophotomètre UV-visible (Specord S600, Analytic Jena AG, Allemagne). La figure 33 montre l'allure des spectres UV obtenus pour chaque caroténoïde dans le dichlorométhane. Les coefficients d'extinction molaire dans le dichlorométhane, utilisés pour les calculs de concentrations sont : 128 500 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 460 nm pour le  $\beta$ -carotène, 178 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 482 nm pour le lycopène, 125 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 486 nm pour l'astaxanthine ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 1994](#)), 165 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 454 nm pour les caroténoïdes de HU36 et 225 300 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 502 nm pour les caroténoïdes de GB1.

Toutes les manipulations de solutions de caroténoïdes ont été effectuées sous hôte aspirante, à température ambiante, à l'abri de la lumière et en utilisant des seringues de précision en verre, de 25  $\mu\text{L}$  à 2 mL (Agilent, Australie).



**Figure 33** : Spectres d'absorption des caroténoïdes de référence (A)  $\beta$ -carotène, (B) lycopène, (C) astaxanthine, et des cocktails de caroténoïdes bactériens (D) de HU36 et (E) de GB1 dans le dichlorométhane.

### 3.2. Préparation des solutions de fer

Les solutions de fer ont été préparées avant chaque expérimentation, car ces solutions ne sont pas stables sur de longues périodes (réactions d'oxydo-réduction).

Les solutions stocks de fer à 500 mmol/L ont été préparées par dissolution de 404,0 mg de nitrate de fer nonahydraté dans 2 mL de solution d'acide nitrique à 0,1 mol/L pour le fer III et par dissolution de 279,4 mg de sulfate de fer heptahydraté dans 2 mL de solution d'acide sulfurique à 0,1 mol/L. Les solutions stocks de MbFe<sup>III</sup> à environ 1 mmol/L ont été préparées en dissolvant 18 mg de myoglobine dans 1 mL d'eau milliQ à pH neutre. La myoglobine est difficilement soluble dans l'eau. Les solutions stocks ont donc systématiquement été filtrées à 0,45  $\mu$ m sur filtres de cellulose (membrane RC 15 mm, Phenex, Phenomenex, Le Pecq, France) et leur concentration exacte a été contrôlée par mesure d'absorbance sur spectrophotomètre UV-visible (Specord S600, Analytic Jena AG, Allemagne) après une dilution au 1/10<sup>ème</sup>, en utilisant le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon = 97\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  à 505 nm ([Mikkelsen 1995](#)).

Des solutions de plus faibles concentrations ont ensuite été préparées par dilutions successives des solutions stocks précédentes. On a ainsi obtenu :

- huit solutions de Fe<sup>III</sup> à 50 mmol/L, 25 mmol/L, 12,5 mmol/L, 5 mmol/L, 2,5 mmol/L, 500  $\mu$ mol/L, 250  $\mu$ mol/L, 50  $\mu$ mol/L dans l'acide nitrique à 0,1 mol/L,

- huit solutions de Fe<sup>II</sup> à 50 mmol/L, 25 mmol/L, 12,5 mmol/L, 5 mol/L, 2,5 mmol/L, 500 µmol/L, 250 µmol/L et 50 µmol/L dans l'acide sulfurique,
- huit solutions de MbFe à 1 mmol/L, 500 µmol/L, 250 µmol/L, 50 µmol/L, 25 µmol/L, 5 µmol/L, 2,5 µmol/L et 0,5 µmol/L dans l'eau milliQ (pour les expériences en milieu micellaire) ou dans du tampon acétate à pH 4 (pour les expériences en émulsion huile/eau).

### 3.3. Elaboration des systèmes chimiques modèles du compartiment gastrique

#### 3.3.1. Elaboration du modèle micellaire

##### 3.3.1.1. Préparation de la solution

Le modèle micellaire du compartiment gastrique a été élaboré en mélangeant, dans un ballon en verre, 2 ou 3 mL (selon les essais) d'une solution de tensioactif à 40 mmol/L dans le dichlorométhane et un volume de solution stock de caroténoïde calculé de façon à avoir une concentration finale entre 0 et 15 µmol/L selon les essais. Lors des essais en présence d'acides gras, 511 µL d'une solution d'acide linoléique à 28 mmol/L (39,25 mg / 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) a été mélangée aux deux précédentes ([Vulcain, Goupy et al. 2005](#); [Goupy, Vulcain et al. 2007](#)).

Puis, les micelles ont été formées selon le protocole suivant :

- évaporation des solvants sur évaporateur rotatif sous vide, à T<sub>AMB</sub>,
- reprise du résidu sec par ajout à 37°C, de 20 mL de solution tampon acétate 0,2 mol/L à pH 4 ou de solution tampon phosphate 0,2 mol/L à pH 5,8 (la concentration finale de tensioactif est de 4 ou 6 mmol/L et celle d'acide linoléique est de 0,7 mmol/L lors des essais en présence d'acides gras),
- homogénéisation pendant 5 min à 1 000 tr/min sur agitateur magnétique chauffant à 37°C pour obtenir un mélange limpide.

Tout au long de la préparation, le ballon contenant les caroténoïdes secs ou en solution a été protégé de la lumière par des caches en papier noir.

### 3.3.1.2. Etude de l'effet de divers tensioactifs sur les caractéristiques de l'émulsion

Des solutions micellaires de  $\beta$ -carotène à 15  $\mu\text{mol/L}$  ont été préparées comme décrit précédemment, avec quatre tensioactifs non-ioniques différents à 6  $\text{mmol/L}$  : du Tween<sup>®</sup>20, du Brij<sup>®</sup>, du Brij<sup>®</sup>35, et de l'albumine de sérum bovin (BSA). Dans le cas de la BSA, la solution stock n'a pas été préparée dans du dichlorométhane mais directement dans les solutions tampons ajoutées sur les résidus secs de caroténoïdes (la protéine précipite en présence de solvant organique).

Puis, plusieurs tests ont été effectués sur ces différents modèles afin de trouver le tensioactif le plus approprié aux études de stabilité en présence de fer et de pouvoir antioxydant des caroténoïdes :

- vérification de la limpidité du tensioactif en solution tampon (indispensable pour suivre la stabilité des caroténoïdes directement dans les cuves de spectrophotométrie),
- vérification de la bonne dispersion des caroténoïdes par mesure d'absorbance sur spectrophotomètre et comparaison de la concentration calculée avec la concentration théorique incorporée dans le modèle (si le milieu n'est pas limpide ou que la concentration est sous-estimée, les caroténoïdes ne sont pas dispersés de façon homogène dans les micelles ou sont cristallisés),
- test d'extraction des caroténoïdes par du dichlorométhane (avec certains tensioactifs, les liaisons formées avec les caroténoïdes sont très difficiles à rompre, limitant l'extraction des caroténoïdes),
- mesure de la concentration initiale en hydroperoxydes (certains tensioactifs en contiennent de grandes quantités, gênantes pour évaluer l'effet du fer seul sur la stabilité des caroténoïdes).

### 3.3.2. Elaboration du modèle émulsionné huile/eau

#### 3.3.2.1. Purification de l'huile

L'huile de tournesol étant riche en  $\alpha$ -tocophérol, il était nécessaire de la traiter afin d'éliminer ce puissant antioxydant qui aurait empêché l'évaluation correcte de la stabilité et du pouvoir antioxydant des caroténoïdes dans le modèle d'émulsion.

Pour cela, 30 g d'huile de tournesol ont été mélangés à 15 g d'alumine neutre activée dans des tubes à centrifuger (CentriStar™ en polypropylène, Corning inc., New York, USA). Puis, le mélange a été agité sur roue à 4°C pendant 24 h, et centrifugé deux fois 20 min à 3 000 tr/min et 20°C afin de récupérer l'huile purifiée.

### 3.3.2.2. Préparation de l'émulsion

Le modèle émulsion huile dans eau du compartiment gastrique a été élaboré en mélangeant, dans un ballon en verre de 25 mL, 638,1 mg de phospholipides de soja (à 40 % de phosphatidylcholine), 1,8 g d'huile de tournesol purifiée et un volume de solution stock de caroténoïde calculé de façon à avoir une concentration finale de 0,25 ou 100 µmol/L selon les essais.

Puis, les émulsions ont été formées selon le protocole suivant :

- évaporation des solvants sur évaporateur rotatif sous vide, à  $T_{AMB}$ , pendant 10 min. Cette étape a d'abord permis d'éliminer les solvants, mais aussi de mieux solubiliser les caroténoïdes dans l'huile de tournesol, ce qui a favorisé une dispersion homogène de l'huile et du caroténoïde dans la phase aqueuse à pH 4 et a évité une précipitation ou un déphasage de l'émulsion au cours du temps,
- reprise du résidu sec par ajout à 37°C, de 16,4 mL de solution tampon acétate 0,02 mol/L à pH 4 (les concentrations finales sont de 10 % (m/m) d'huile et de 13,3 g/L (17,4 mmol/L) d' $\alpha$ -phosphatidylcholine),
- homogénéisation pendant 5 min à 1 000 tr/min sur agitateur magnétique à  $T_{AMB}$  pour former une pré-émulsion,
- sonication à 25 W sous 20 000 Hz sur bac de glace (sonicateur Vibra Cell™ 75022, équipé d'une sonde à ultrasons de diamètre 6 mm) selon six cycles de 45 secondes, espacés de 30 secondes afin d'éviter toute élévation de la température dans le milieu.

Tout au long de la préparation, le ballon contenant les caroténoïdes secs ou en solution a été protégé de la lumière par des caches en papier noir.

Lors des essais d'inhibition de la peroxydation par des polyphénols ( $\alpha$ -tocophérol, rutine et acide chlorogénique), les solutions mères ont été préparées par dissolution dans du méthanol et les volumes adéquats ont été ajoutés dans le modèle après obtention de l'émulsion finale.

### 3.3.2.3. Caractérisation du modèle : microscopie optique et granulométrie laser

Les émulsions préparées ont, dans un premier temps, été observées au microscope optique à immersion sur un microscope Olympus BX50, au grossissement x 2 000, équipé d'un micromètre oculaire d'un appareil photo numérique. Une goutte d'émulsion est déposée sur une lame recouverte d'une lamelle, puis la lame est observée après le dépôt d'une goutte d'huile à immersion sur la lamelle. Cette technique donne un aperçu visuel de l'émulsion, de la structure des gouttelettes d'huile et une estimation de leur taille.

La granulométrie laser permet de mesurer la taille des particules et plus exactement leur diamètre. Elle est basée sur la diffraction de la lumière frappant une particule et s'appuie sur les théories de Fraunhofer et de Mie. Le diamètre moyen et la distribution en taille des particules sont donnés par traitement mathématique :

- le  $d[4,3]$ , ou diamètre de Herdan ou de Drouckere (diamètre de volume), est le diamètre moyen d'une sphère qui aurait le même volume que les particules.
- le  $d[3,2]$ , ou diamètre de Sauter (diamètre de surface), est le diamètre moyen d'une sphère qui aurait la même surface projetée que les particules.

La distribution de taille des gouttelettes a été mesurée sur différentes émulsions, avec ou sans initiateur de la peroxydation lipidique ( $MbFe^{III}$ ) et/ou antioxydants. Des prélèvements réguliers ont été faits sur ces émulsions (t0, 2 h, 4 h) afin d'évaluer la stabilité de la taille des gouttelettes au cours du temps sur granulomètre (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Orsay, France), en mode "liquide", selon le protocole suivant :

- dispersion de deux gouttes d'émulsion dans l'échantillonneur contenant de l'eau distillée,
- lancement de trois mesures par l'appareil, avec des indices de réfraction pour l'huile de tournesol de 1,475 (partie réelle) et 0,01 (partie imaginaire) et pour l'eau (dispersant) de 1,330.
- analyse de la taille des particules selon la théorie de Mie, la distribution de taille des gouttelettes est caractérisée par les diamètres de volume ( $d[4,3]$ ) et de surface ( $d[3,2]$ ).

### 3.4. Initiation de l'oxydation

#### 3.4.1. En milieu micellaire, en l'absence de sources d'acides gras

La réaction d'oxydation des caroténoïdes par le fer en l'absence d'acides gras a été menée de deux façons différentes selon que l'objectif était de mesurer uniquement la cinétique de dégradation des caroténoïdes au cours du temps, ou de suivre simultanément les concentrations de caroténoïdes, d'oxygène dissout, de fer II, de fer III et l'éventuelle formation de peroxydes dans le milieu. Pour chaque condition expérimentale, les tests ont été répétés trois fois.

Dans le premier cas, 1,96 mL de solution micellaire à 10  $\mu\text{mol/L}$  de caroténoïdes et 4 mmol/L de Brij<sup>®</sup>35 ont été transférés (avec un mini barreau magnétique) dans huit Macrocuves jetables de spectrophotométrie en PMMA (polyméthacrylate de méthyle, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) placées dans le passeur d'échantillons du spectrophotomètre thermostaté à 37 °C (Specord S600, Analytic Jena AG, Allemagne), sous agitation et à l'abri de la lumière (figure 34). Puis, à  $t_0$ , 40  $\mu\text{L}$  des solutions de fer préalablement préparées et diluées ont été injectées dans chaque cuve afin d'initier la dégradation des caroténoïdes (concentrations à  $t_0 = 0, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500$  ou  $1\ 000 \mu\text{mol/L}$  pour le fer libre ; ou  $0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10$  ou  $20 \mu\text{mol/L}$  pour le fer hémique (metmyoglobine). Cette méthode est automatique et permet de préparer huit concentrations de fer à la fois. Elle a été utilisée pour comparer la stabilité de tous les caroténoïdes en présence de concentrations croissantes de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  puis de  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  et de faire une étude cinétique.

mesure directe  
de la dégradation  
des caroténoïdes



**Figure 34** : Spectrophotomètre utilisé pour le suivi de la dégradation des caroténoïdes en système micellaire aqueux, directement en macrocuves ; et pour les dosages après prélèvements dans le milieu réactionnel.

Dans le deuxième cas, 19,4 mL de solution micellaire à 15  $\mu\text{mol/L}$  de caroténoïdes et 6 mmol/L de Brij<sup>®</sup>35 ont été transférés dans un ballon tricol (figure 35), couvert par un cache en papier noir (protection contre la lumière) et placé sur un système d'agitation thermostaté à 37 °C (plaque chauffante à agitateur magnétique Radley, RR 98072, équipée d'une sonde de température et de portoirs pour ballons, Interchim, Montluçon, France). Les trois cols du ballon ont permis de plonger dans le milieu la sonde de température, une sonde à oxygène et une seringue afin d'effectuer des prélèvements au cours du temps. Puis, à  $t_0$ , 600  $\mu\text{L}$  des solutions de fer préalablement préparées et diluées ont été injectées dans le milieu afin d'initier la dégradation des caroténoïdes (concentrations à  $t_0 = 0, 1,5, 7,5, 15, 75, 150, 375$  ou  $750 \mu\text{mol/L}$  pour le fer libre ; ou  $0, 0,015, 0,075, 0,15, 0,75, 1,5, 7,5$  ou  $15 \mu\text{mol/L}$  pour le fer hémique (metmyoglobine)). Cette méthode nécessitant davantage de mise au point et de manipulations ne permet d'étudier qu'une condition à la fois. Elle a été utilisée afin de suivre en même temps les cinq marqueurs choisis de la réaction entre le fer et les caroténoïdes, dans le but de mieux comprendre cette réaction et d'en proposer un mécanisme. Toutes les concentrations de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et de  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  ont été testées sur le  $\beta$ -carotène ; des essais complémentaires ont été effectués avec les autres caroténoïdes, afin de déterminer s'il était possible de généraliser les observations et le mécanisme proposé aux autres molécules.

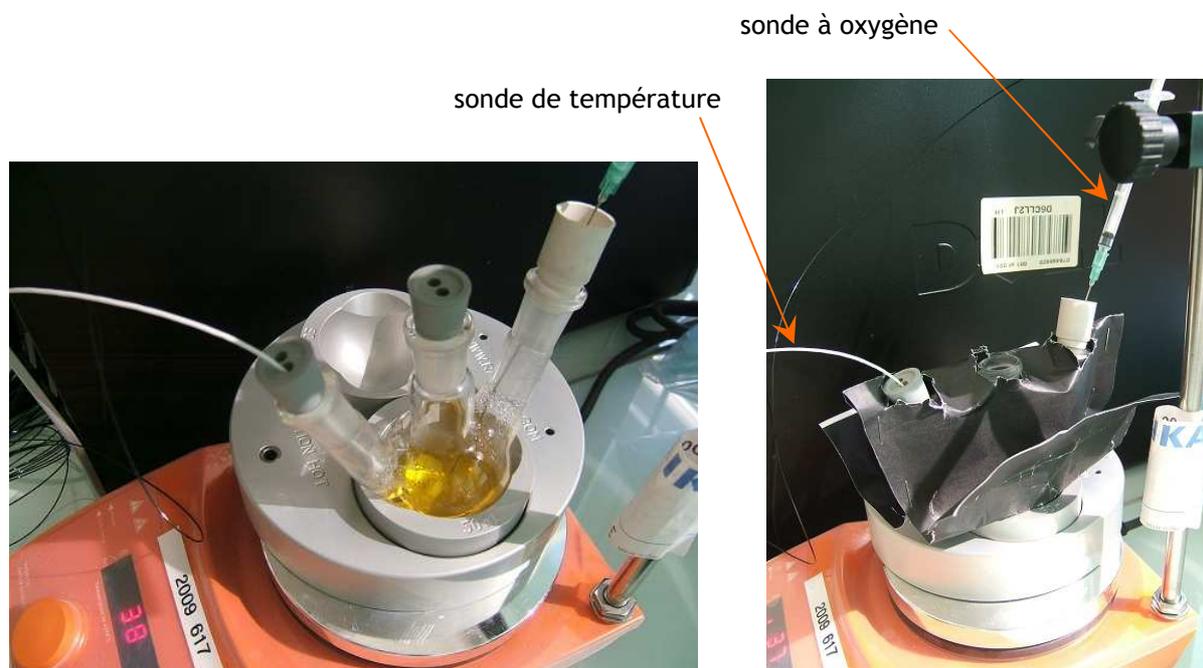


Figure 35 : Montage expérimental pour l'étude des caroténoïdes en système micellaire aqueux.

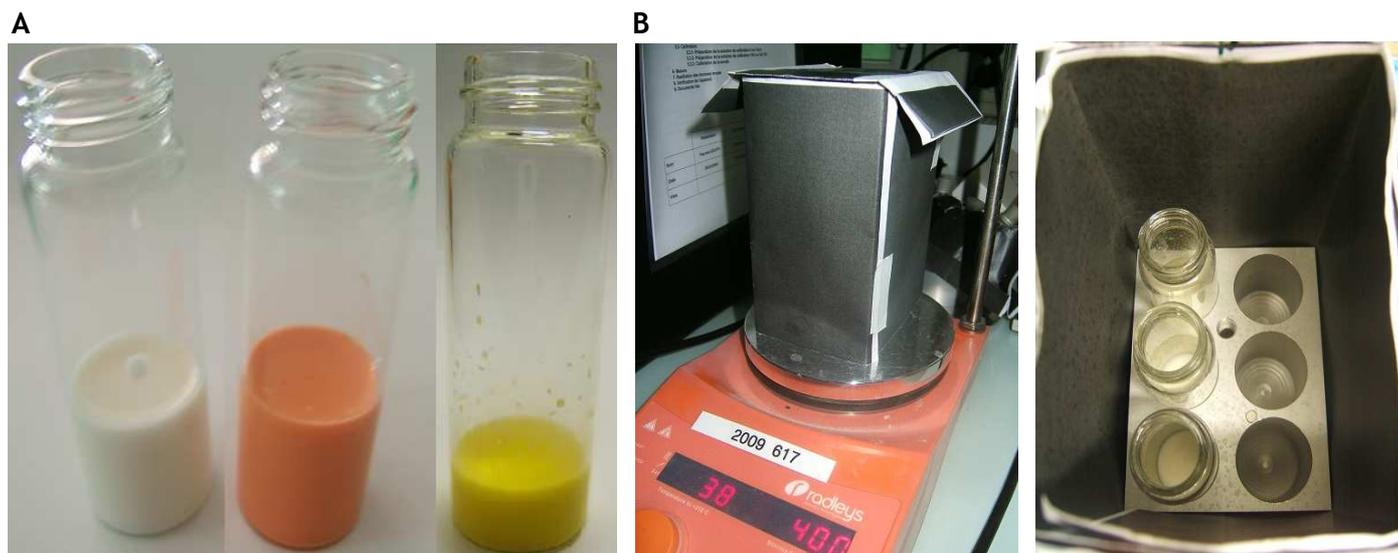
### 3.4.2. En milieu micellaire, en présence d'acide linoléique

La réaction a été initiée et suivie directement dans les cuves du spectrophotomètre, en transférant 1,96 mL de solution micellaire contenant 4 mmol/L de Brij<sup>®</sup>35, 0,7 mmol/L d'acide linoléique et entre 0 et 8 µmol/L de caroténoïdes, dans huit Macrocuves jetables en PMMA (polyméthacrylate de méthyle, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) avec un mini barreau magnétique. Elles ont été placées dans le passeur d'échantillons du spectrophotomètre thermostaté à 37°C (Specord S600, analytic jena AG, Allemagne), sous agitation et à l'abri de la lumière. Puis, à t<sub>0</sub>, 40 µL des solutions de fer préalablement préparées et diluées ont été injectées dans chaque cuve afin d'initier la peroxydation lipidique : concentrations à t<sub>0</sub> = 20 µmol/L pour le fer libre Fe<sup>II</sup>, ou 0,5 µmol/L pour le fer hémique MbFe<sup>III</sup>. Ces concentrations initiales de fer ont été choisies selon des critères techniques, de façon à pouvoir observer l'accumulation des peroxydes lipidiques par mesures d'absorbance sur des périodes variant entre 15 min et 1h selon la concentration en caroténoïdes.

Cette méthode est automatique et permet de faire plusieurs répétitions à la fois avec les deux formes de fer à pH 4 et pH 5,8 sur une concentration de caroténoïdes. Chaque condition a été testée trois fois.

### 3.4.3. En émulsion huile/eau, en présence des acides gras de l'huile de tournesol

La réaction a été effectuée dans des flacons droits en verre de 20 mL, avec 5 mL d'émulsion contenant 17,4 mol/L d' $\alpha$ -phosphatidylcholine, 10 % d'huile d'olive (m/m) et 25 ou 100 µmol/L de caroténoïdes (une émulsion contrôle a été préparée sans caroténoïdes) et maintenus sous agitation magnétique dans un socle en acier thermostaté à 37°C (figure 36). Un cache noir les protégeait de la lumière tout en préservant les échanges gazeux (entrée d'oxygène). Puis, à t<sub>0</sub>, 200 µL de solution de MbFe<sup>III</sup> préalablement préparée à 1 mmol/L ont été injectés dans chaque flacon afin d'initier la peroxydation lipidique (le volume injecté est chaque fois légèrement ajusté en fonction de la concentration de la solution stock de MbFe après contrôle au spectrophotomètre) : concentration de MbFe<sup>III</sup> à t<sub>0</sub> = 40 µmol/L.



**Figure 36 :** (A) Exemple d'émulsions (contrôle et avec caroténoïdes jaunes ou rouges) et (B) montage expérimental pour l'étude des caroténoïdes en émulsion huile dans eau.

L'efficacité de l'inhibition de la peroxydation lipidique a été évaluée selon cette méthode pour chaque caroténoïde ainsi que pour les autres antioxydants ( $\alpha$ -tocophérol, rutine et acide chlorogénique, seuls ou en mélange avec les caroténoïdes bactériens). Chaque condition a été répétée trois fois.

### 3.5. Suivi de la composition des milieux chimiques modèles en présence de fer

Tous les résultats de mesures de concentrations ont été donnés comme des moyennes sur trois répétitions et les écarts-types ont été précisés.

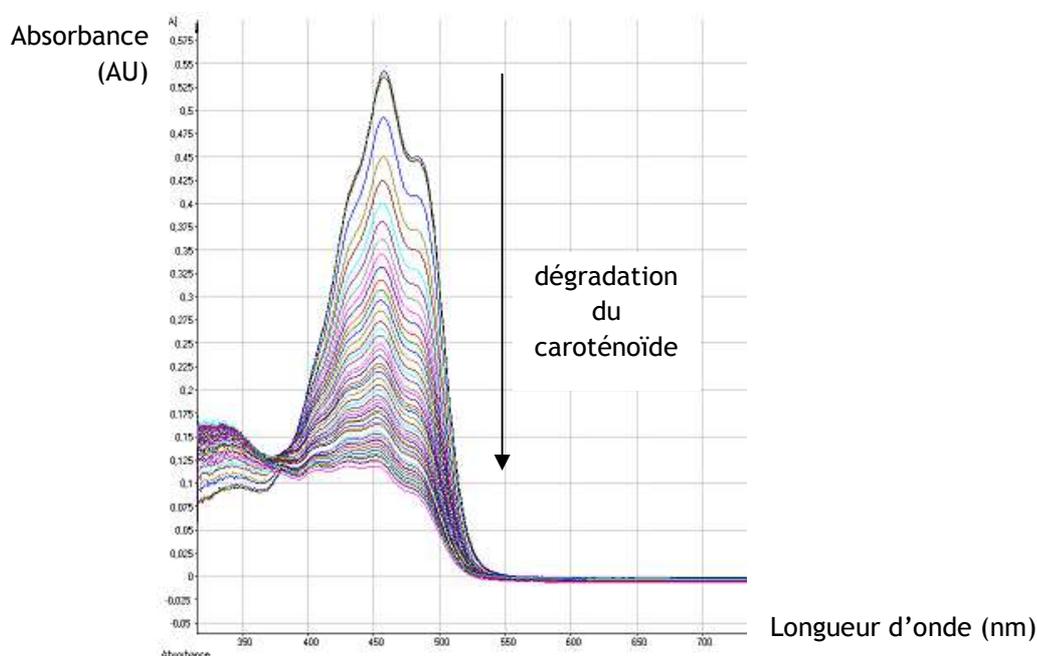
#### 3.5.1. Mesure de la stabilité des caroténoïdes par spectrophotométrie

Toutes les mesures ont été effectuées sur spectrophotomètre (Specord S600, Analytic Jena AG, Allemagne) dans des cuves jetables en PMMA (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). L'impact des flashes du spectrophotomètre sur la cinétique des réactions a préalablement été évalué. Pour les cinétiques en cuves, il est indispensable de limiter la fréquence des flashes pour ne pas accélérer la dégradation des caroténoïdes et l'oxydation lipidique. Les études de stabilité ne nécessitant que des mesures en lumière visible, la lampe tungstène (UV) a été désactivée pour ces essais.

Dans le cas où les réactions d'oxydation en milieu micellaire (avec ou sans acide linoléique) ont été menées dans les cuves du spectrophotomètre, la dégradation des caroténoïdes (figure 37) a été suivie en mesurant directement l'absorbance des caroténoïdes résiduels à 37°C (ligne de base établie sur le tampon acétate pH 4 ou le tampon phosphate pH 5,8, à 0,2 mol/L), selon les conditions et fréquences suivantes :

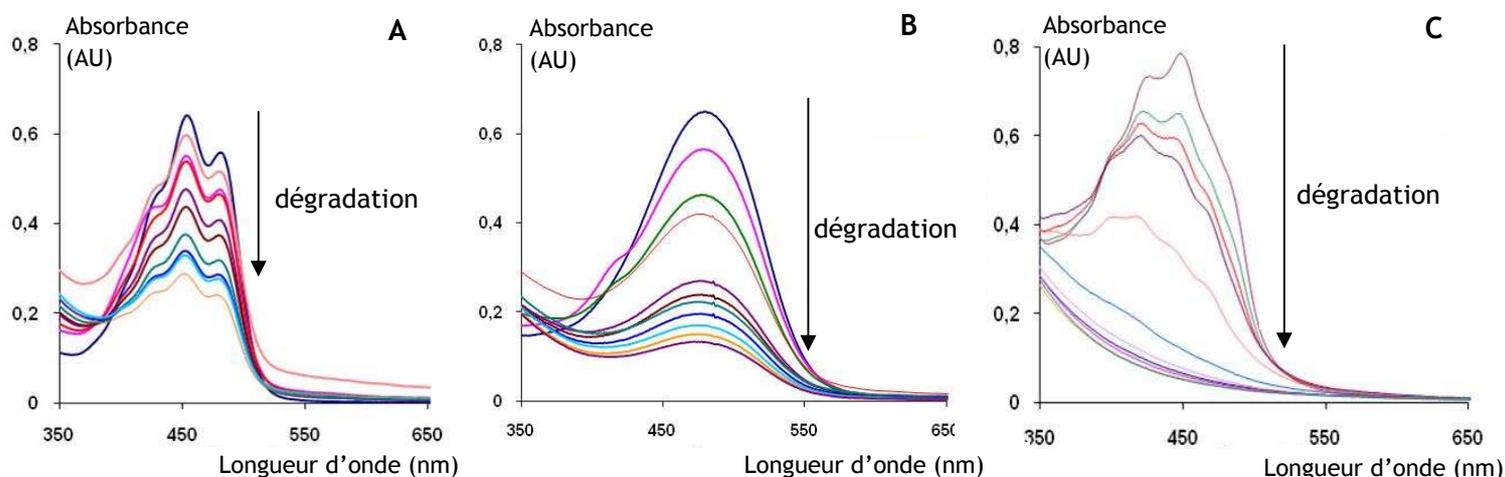
- en l'absence d'acides gras : entre 300 et 1 000 nm (lampe UV éteinte), pendant 4 heures, toutes les 35 s de 0 à 10 min ; toutes les 2 min de 10 à 30 min ; toutes les 15 min de 30 à 60 min ; toutes les 30 min de 60 à 240 min,
- en présence d'acide linoléique : entre 190 et 1 000 nm (lampe UV allumée), jusqu'à atteindre un état stable, toutes les 40 s de 0 à 5 min ; toutes les 60 s de 5 à 15 min ; toutes les 5 min de 15 à 45 min ; toutes les 15 min à partir de 45 min jusqu'à l'arrêt de la réaction.

Dans le cas où les réactions d'oxydation ont été menées en milieu micellaire en ballon de verre sur système chauffant, des échantillons de 1 mL ont été prélevés régulièrement pendant deux heures (à t<sub>0</sub>, puis 2, 6, 12, 20, 30, 45, 60 et 120 minutes), puis immédiatement transférés dans des cuves jetables et leurs spectres d'absorption ont été mesurés sur spectrophotomètre à 25°C (ligne de base établie sur le tampon acétate pH 4 ou le tampon phosphate pH 5,8, à 0,2 mol/L).



**Figure 37** : Spectres d'absorption obtenus au cours de la dégradation des caroténoïdes en milieu micellaire en présence de fer (exemple du  $\beta$ -carotène).

Dans le cas où les réactions d'oxydation ont été menées en émulsion huile/eau dans des flacons en verre sur système chauffant, des échantillons de 100  $\mu\text{L}$  ont été prélevés régulièrement pendant six heures (à  $t_0$ , puis 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 et 360 min), puis dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans 1,9 mL d'isopropanol. Après 2 minutes de centrifugation à 1 000 tr/min (microcentrifugeuse Galaxy digital type 7D, avec rotor 12 x 1,5/2,0 mL, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), le suivi de la dégradation des caroténoïdes a été effectué par mesure de leurs spectres d'absorption (figure 38) sur spectrophotomètre à 25 °C (ligne de base établie sur l'isopropanol).



**Figure 38** : Spectres d'absorption obtenus au cours de la dégradation des caroténoïdes en émulsion huile/eau en présence de fer. Exemples pour (A) le  $\beta$ -carotène, (B) l'astaxanthine, (C) les caroténoïdes de HU36.

Pour chaque expérience, les courbes cinétiques ont ensuite été tracées au maximum d'absorbance des divers caroténoïdes (ou cocktail de caroténoïdes bactériens) testés. Les résultats du suivi de la dégradation des caroténoïdes ont été représentés soit en concentration de caroténoïdes résiduels (en  $\mu\text{mol/L}$ ) calculée selon la loi de Beer-Lambert avec les coefficients d'extinction molaire donnés dans le tableau 9, soit en taux de caroténoïdes résiduels en fonction de leur concentration initiale (taux résiduel en % =  $100 \times C/C_{t_0}$  au maximum d'absorbance).

**Tableau IX** : Longueurs d'ondes maximales d'absorption et coefficients d'absorption molaire appliqués pour les mesures de concentration des caroténoïdes de l'étude, par spectrophotométrie dans les différents solvants utilisés.

	dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		en milieu micellaire pH 4-5.8		dans l'isopropanol	
	$\lambda_{\text{MAX}}$ (nm)	$\epsilon^*$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\text{MAX}}$ (nm)	$\epsilon^{**}$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\text{MAX}}$ (nm)	$\epsilon^{***}$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
lycopène	480	178 000	482	168 000	472	153 200
$\beta$ -carotène	460	128 500	460	122 000	460	120 000
astaxanthine	487	125 500	486	118 600	479	154 500
caroténoïdes de HU36	454	165 000	458	124 000	448	173 800
caroténoïdes de GB1	502	225 300	500	180 200	495	223 700

\* Les coefficients d'absorption des caroténoïdes de référence sont issus de la littérature (Cf. § 3.1). Les coefficients d'absorption des caroténoïdes bactériens ont été déterminés à partir de la bibliographie et de calculs de ratio d'absorbance entre solvants (Cf. § 2.3.1).

\*\* Coefficients obtenus par calculs de ratio d'absorbance entre le milieu aqueux et le dichlorométhane.

\*\*\* Coefficients obtenus par calculs de ratio d'absorbance entre le milieu aqueux et le dichlorométhane.

### 3.5.2. Dosages du fer et du peroxyde d'hydrogène

Pour les réactions d'oxydation menées en milieu micellaire en ballon de verre sur système chauffant, les échantillons de 1 mL prélevés régulièrement pendant deux heures (à t<sub>0</sub>, puis 2, 6, 12, 20, 30, 45, 60 et 120 minutes) ont été mélangés à 1 mL de dichlorométhane afin d'extraire les caroténoïdes résiduels et leurs produits de dégradation (cette séparation permet aussi de stopper la réaction avec le fer).

Après 2 minutes de centrifugation à 10 000 tr/min (microcentrifugeuse Galaxy digital type 7D, avec rotor 12 x 1,5/2,0 mL, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), les concentrations de fer et l'éventuelle présence de peroxydes en phase aqueuse ont été dosées selon les protocoles suivants :

- dans un tube Eppendorf, mélange de 250  $\mu$ L de phase aqueuse avec 750  $\mu$ L de réactif spécifique de Fe<sup>II</sup>, préalablement préparé en dissolvant 10,2 mg de ferrozine dans 20 mL d'eau milliQ (solution à 10<sup>-3</sup> mol/L) ([El Hajji, Nkhili et al. 2006](#); [Boon, McClements et al. 2009](#)),

- dans un tube Eppendorf, mélange de 250  $\mu\text{L}$  de phase aqueuse avec 750  $\mu\text{L}$  de réactif spécifique de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , préalablement préparé en homogénéisant 10 mL d'une solution d'acide sulfurique à 0,25 mol/L (700  $\mu\text{L}$  dans 50,4 mL d'eau milliQ), 7,60 mg de xylénol orange et 88 mg de BHT dans 90 mL de méthanol (solution à  $10^{-4}$  mol/L de xylénol orange),
- dans un tube Eppendorf, mélange de 250  $\mu\text{L}$  de phase aqueuse avec 750  $\mu\text{L}$  de réactif spécifique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (FOX2), préalablement préparé en homogénéisant 10 mL d'une solution d'acide sulfurique à 0,25 mol/L (700  $\mu\text{L}$  dans 50,4 mL d'eau milliQ), 7,60 mg de xylénol orange, 88 mg de BHT et 13,80 mg de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -ammonium dans 90 mL de méthanol (solution à  $10^{-4}$  mol/L de xylénol orange et  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/L de  $\text{FeSO}_4$ ) ([Södergren, Nourooz-Zadeh et al. 1998](#); [El Hajji, Nkhili et al. 2006](#)),
- incubation de chaque mélange à température ambiante pendant 15 minutes (obtention de colorations stables),
- transfert des mélanges dans des cuves jetables en PMMA et lecture d'absorbance à 564 nm pour le fer II et 559 nm pour le fer III et les hydroperoxydes, sur spectrophotomètre à 25°C (lignes de base établies sur les différents réactifs).

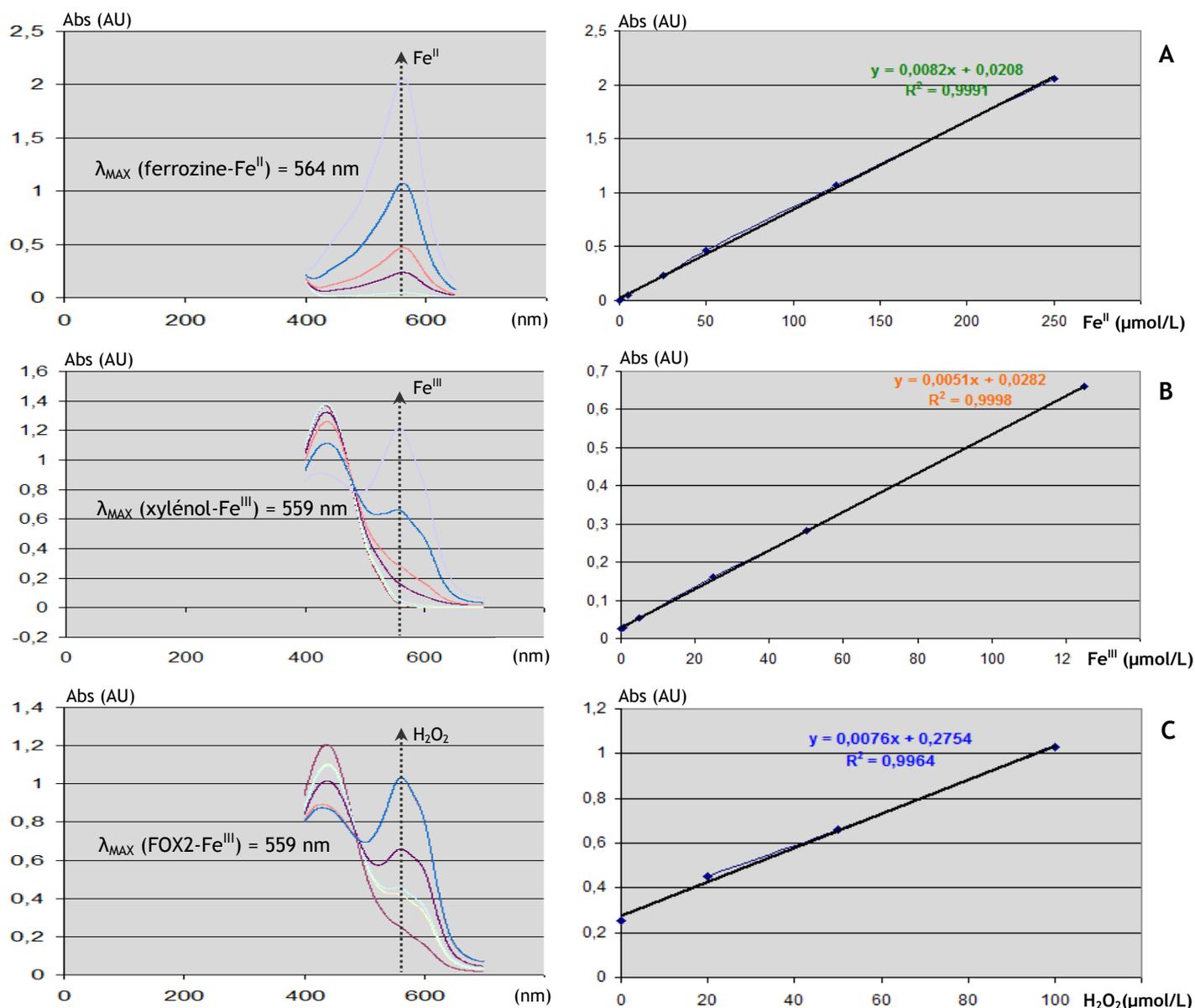
Tous les réactifs ont été conservés à l'abri de la lumière et à 4°C pour une utilisation sur quelques jours. Pour les calculs de concentrations, des courbes étalons (*i*, *ii* et *iii*, et figure 39) ont été établies à l'aide de solutions de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluées en tampon acétate :

$$(i) \text{ Abs}(\text{Fe}^{\text{II}}\text{-ferrozine à } 564 \text{ nm}) = a \times C(\text{Fe}^{\text{II}}) + b,$$

$$(ii) \text{ Abs}(\text{Fe}^{\text{III}}\text{-xylénol seul à } 559 \text{ nm}) = c \times C(\text{Fe}^{\text{III}}) + d,$$

$$(iii) \text{ Abs}(\text{Fe}^{\text{III}}\text{-xylénol dans le FOX2 à } 559 \text{ nm}) = e \times C(\text{H}_2\text{O}_2) + f.$$

Les dosages sont linéaires pour des concentrations entre 0,5 et 250  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , 0,5 et 125  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , et 0,2 et 100  $\mu\text{mol/L}$  d'hydroperoxydes (exprimés en équivalents de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).



**Figure 39 :** Spectres d'absorption et courbes étalon obtenus avec (A) le fer II et de la ferrozine, (B) le fer III et du xylénol orange, (C) le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le FOX2.

En raison de la présence de Fe<sup>III</sup> dans le milieu, le dosage des eq. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par le FOX2 a nécessité un calcul correctionnel afin de discerner la quantité de Fe<sup>III</sup> provenant strictement de la conversion du Fe(II)-ammonium par les eq. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il a été fait après construction d'une courbe étalon entre les ions Fe<sup>III</sup> et le FoX2 (iv, figure 40) :

$$(iv) \text{ Abs(Fe}^{III}\text{-xylénol dans le FOX2 à 559 nm)} = g \times C(\text{Fe}^{III}) + f,$$

avec f, l'absorbance de base du réactif FOX2, coefficient commun aux équations (iii) et (iv).

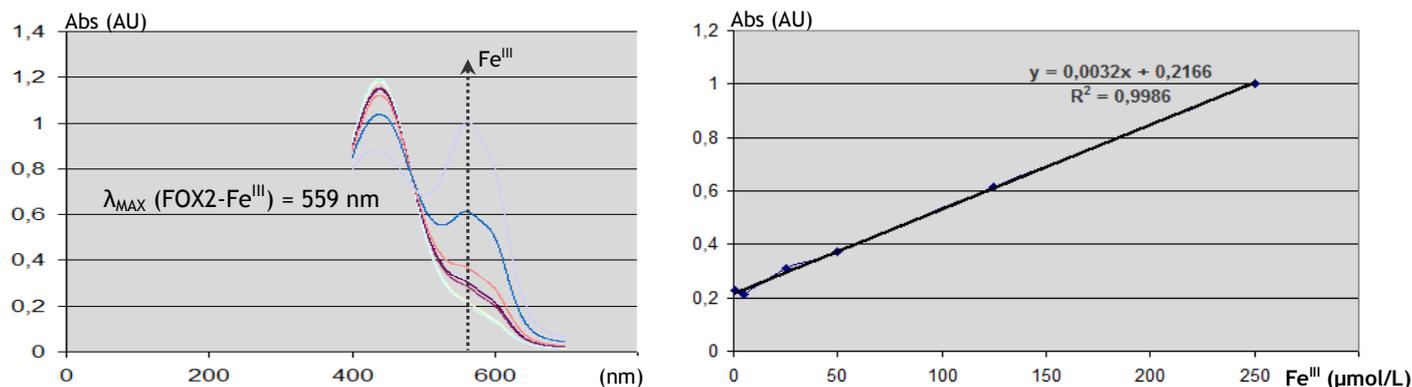


Figure 40 : Spectres d'absorption et courbes étalon obtenus avec le fer III et le FOX2.

Le dosage par le FOX2 a donné une absorbance correspondant à la fois aux ions Fe<sup>III</sup> du milieu et à ceux formés par réaction avec les eq. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :

$$\text{Abs}(\text{Fe}^{\text{III}}\text{-xylénol dans le FOX2 at 559 nm}) = (e \times C(\text{H}_2\text{O}_2)) + (g \times C(\text{Fe}^{\text{III}})) + f$$

À partir du dosage du Fe<sup>III</sup> du milieu précédemment établi avec du xylénol orange seul, on a pu établir :

$$C(\text{H}_2\text{O}_2) = [ \text{Abs} (559 \text{ nm sur le milieu, obtenue avec le FOX 2}) - (C(\text{Fe}^{\text{III}}) \times g + f) ] / e$$

### 3.5.3. Mesure de l'oxygène dissous

L'évolution de la concentration d'oxygène dissous dans le milieu micellaire a été enregistrée pendant l'étude de stabilité des caroténoïdes grâce à un oxygenmètre (Microx TX3, Presens GmbH, Allemagne), équipé d'une microsonde à oxygène (fibre optique maintenue dans une aiguille protectrice, type NTH PST1-L5 NS 120 x 0.8- TS-YOP) (figure 41). Cette méthode de mesure non invasive est basée sur une détection de la luminescence envoyée par la sonde et renvoyée par les atomes d'oxygène dissous. Elle permet de mesurer des teneurs en oxygène comprises entre 0 et 22,6 mg/L (soit, 0 à 700 µmol/L de O<sub>2</sub>, seuil de détection : 20 µmol/L) avec un temps de réponse de 1 s.

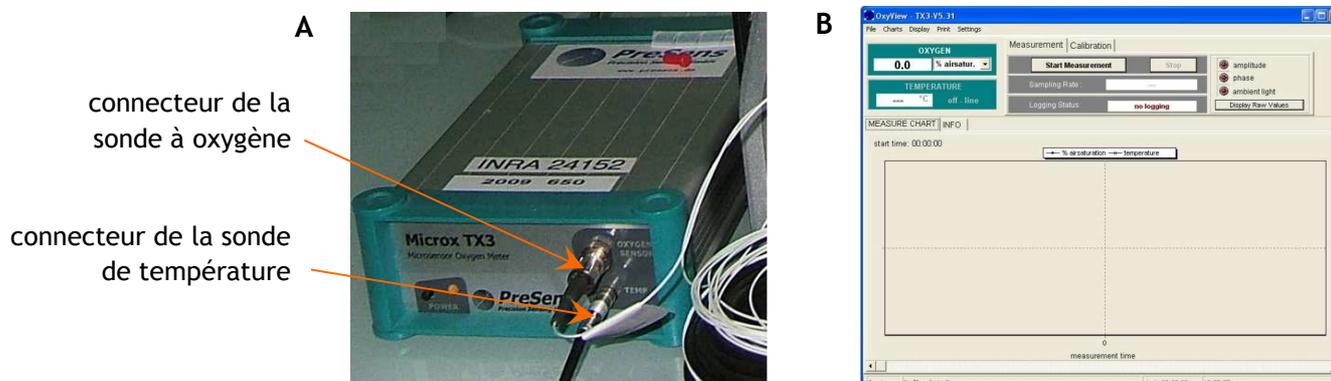
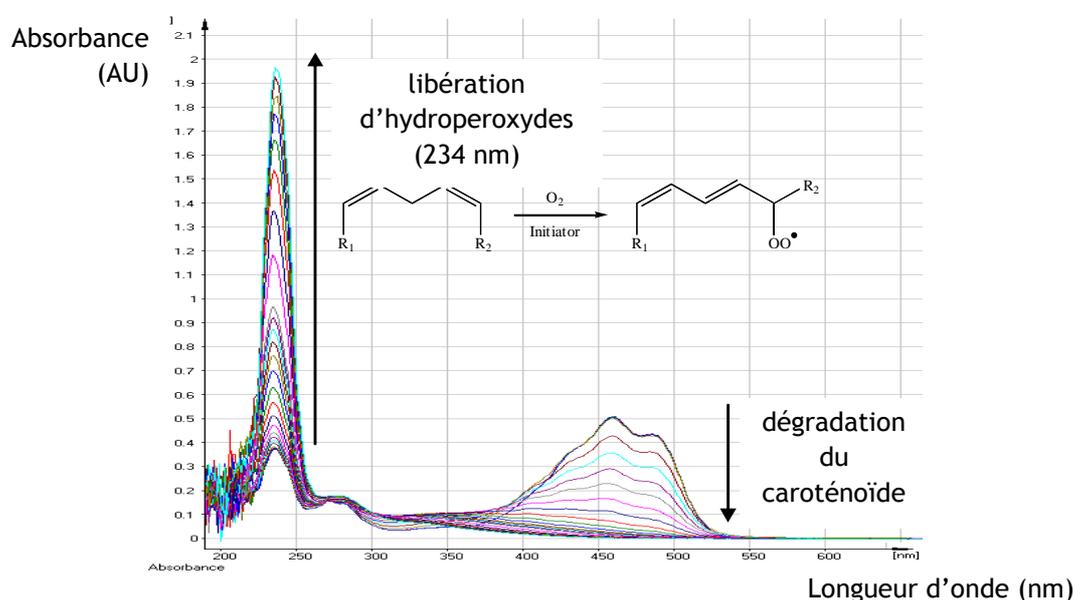


Figure 41 : (A) Appareillage et (B) logiciel de suivi, utilisés pour la mesure du dioxygène dissous dans le système micellaire aqueux.

### 3.5.4. Mesure des produits primaires de l'oxydation lipidique

#### 3.5.4.1. Enregistrement des spectres d'absorption des hydroperoxydes en milieu micellaire

Lorsque l'acide linoléique est oxydé, les produits primaires de l'oxydation lipidique sont des peroxydes, détectables par spectrométrie UV à 234 nm en milieu aqueux ([Dufour and Loonis 2005](#); [Vulcain, Goupy et al. 2005](#); [Goupy, Vulcain et al. 2007](#)). La peroxydation étant effectuée directement dans les cuves du spectrophotomètre (Specord S600, Analytic Jena AG, Allemagne) avec un enregistrement des spectres d'absorption entre 190 et 1 000 nm (figure 42), les mesures à 234 nm ont été récupérées.



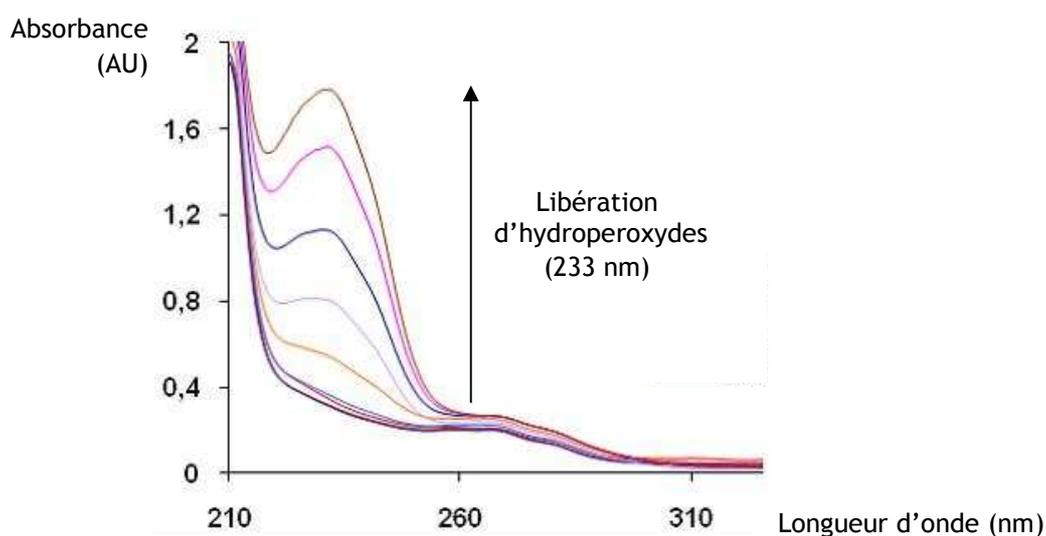
**Figure 42 :** Enregistrements spectrophotométriques de la dégradation des caroténoïdes et de la formation de peroxydes lipidiques en milieu micellaire aqueux lors de l'oxydation de l'acide linoléique initiée par le fer.

Les courbes cinétiques ont ensuite été tracées en retranchant l'absorbance initiale à 234 nm (peroxydes déjà présents dans l'acide linoléique), afin d'harmoniser les résultats.

#### 3.5.4.2. Enregistrement des spectres d'absorption des diènes conjugués en émulsion huile/eau

Lorsque les acides gras de l'huile d'olive sont oxydés, les produits primaires de l'oxydation lipidique sont des diènes conjugués, détectables à 233 nm dans l'isopropanol. Les échantillons de 100  $\mu$ L prélevés régulièrement dans le milieu (à t0, puis 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 et 360 min) et dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans l'isopropanol ont été dilués une

deuxième fois au 1/10<sup>ème</sup> (200 µL de surnageant dans 1,8 mL d'isopropanol) et centrifugés pendant 2 min à 1 000 tr/min. Puis, le surnageant a été transféré dans des cuves en quartz (Suprasil® 104-QS, 10 mm, Hellma® Optics, Paris, France) afin de mesurer son absorbance sur spectrophotomètre (Specord S600, Analytic Jena AG, Allemagne) à 233 nm à 25°C (contre blanc isopropanol, figure 43) (Lorrain, Dangles et al. 2010).



**Figure 43 :** Enregistrements spectrophotométriques de la formation de peroxydes lipidiques, extraits dans l'isopropanol, en milieu micellaire aqueux lors de l'oxydation des acides gras de l'huile de tournesol, initiée par le fer, dans l'émulsion huile/eau à pH4.

Pour tracer les courbes cinétiques, la concentration en diènes conjugués a ensuite été calculée selon la loi de Beer-Lambert, avec un coefficient d'extinction molaire des hydroperoxydes de l'acide linoléique égal à  $\epsilon = 27\ 000\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  à 233 nm dans l'isopropanol (la dilution totale est de 1/200<sup>ème</sup>) (Lorrain 2008).

### 3.5.5. Mesure des produits secondaires de l'oxydation lipidique par GC-MS

La formation de produits secondaires d'oxydation, issus de la décomposition des hydroperoxydes et de la dégradation des caroténoïdes, constitue un second marqueur d'oxydation. Ils ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection de masse, H-S-SPME-GC-MS (chromatographe gaz QP 20120, Shimadzu, équipé d'un liner de diamètre interne 0,75 mm, figure 44).



**Figure 44** : Equipement GC-MS pour l'identification des produits secondaires de la peroxydation lipidique.

Des émulsions à pH 4 ont été préparées avec et sans antioxydants pour le suivi des composés volatils pendant 6 heures : 3 mL d'émulsion à analyser ont été introduits dans un flacon de 20 ml fermé avec un bouchon équipé d'un joint téflon et placé dans un four à 37°C, agité à 250 tr/min pendant 15 minutes.

L'extraction a été faite par SPME (Solid Phase Micro Extraction) à l'aide d'une fibre recouverte de carboxen/polydiméthylsiloxane (PDMS) (Supelco Analytical, longueur 10 mm, épaisseur du film 0,75 µm, Sigma, Fontenay-sous-Bois, France) introduite directement dans l'espace de tête du flacon contenant le milieu réactionnel à 37°C, selon le protocole suivant :

- enrichissement du milieu pendant 15 minutes,
- absorption des composés volatils sur la fibre pendant 25 min,
- désorption de la fibre et passage dans l'injecteur split/splitless du CG-SM, maintenu à 250°C,
- injection en mode splitless, avec ouverture de la vanne de purge au bout de 30 secondes (gaz vecteur hélium, avec une vitesse de 38 cm.s<sup>-1</sup>),
- séparation des composés volatils en 32 minutes, sur une colonne capillaire en silice CP-Sil 8 CB (Varian, 5 % phénylméthyl polysiloxane, longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur du film 0,5 µm, Agilent Technologies, Massy, France), avec le programme de température suivant : 35°C de t<sub>0</sub> à 2 min, puis augmentation jusqu'à 150°C selon un gradient de 5°C.min<sup>-1</sup>, puis

augmentation jusqu'à 250°C selon un gradient de 20°C.min<sup>-1</sup>, puis maintien 2 min à 250°C,

- enregistrement des spectres en mode scan de m/z = 29 à 300, à une vitesse de 4 scan.s<sup>-1</sup>, avec un impact électronique à 70 eV.

L'identification des produits volatils a été effectuée en comparant les spectres de masse des composés avec la bibliothèque spectrale NIST (National Institute of Standard and Technology, Finnigan Corp, San Jose, CA, USA). Les aires des pics des composés détectés ont été mesurées. Cependant, par manque d'étalons internes pour faire une calibration et une quantification, la libération des produits obtenus a été estimée en pourcentage par rapport à l'aire du pic à la fin de la réaction d'oxydation.

### 3.6. Caractérisation des produits de dégradation des caroténoïdes par UPLC-MS

#### 3.6.1. Préparation des échantillons

Au cours des cinétiques de dégradation des caroténoïdes en milieu micellaire, des échantillons des milieux réactionnels ont été prélevés puis les caroténoïdes et leurs produits dérivés ont été extraits selon le protocole suivant :

- mélange de 2 mL de milieu réactionnel avec 2 mL de dichlorométhane, 1 mL de solution tampon acétate pH 4 et 1 mL d'eau milliQ saturée en NaCl (améliore la séparation des phases pour des échantillons riches en tensioactif),
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- centrifugation pendant 3 min à 10 000 tr/min (microcentrifugeuse Galaxy digital type 7D, avec rotor 12 x 1,5/2,0 mL, VWR, Fontenay-sous-Bois, France),
- récupération de la phase organique (phase inférieure, environ 2 mL),
- ajout de sulfate de sodium anhydre (élimination des résidus d'eau),
- centrifugation pendant 1 min à 10 000 tr/min,
- purification par extraction sur phase solide (SPE) sur cartouches de silice (strata<sup>TM</sup> Si-1, Phenomenex, France) préalablement activées avec 2 mL d'eau milliQ puis 2 mL de méthanol. Le tensioactif polymère se fixe sur la silice et les caroténoïdes et leurs produits ont été élués par 4 mL d'un mélange hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v) puis 4 mL d'un mélange hexane/isopropanol (4/1, v/v),

- filtration sur filtres 0,2  $\mu\text{m}$  (membrane 13 mm en PTFE, Phenomenex, Le Pecq, France),
- transfert dans des flacons d'UPLC à fond conique (Waters UPLC<sup>®</sup>, Guyancourt, France),
- évaporation à sec sous flux d'argon,
- reprise dans 100  $\mu\text{L}$  d'un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/1, v/v) juste avant injection en UPLC pour analyse.

### 3.6.2. Méthode d'analyse

Le contenu des échantillons en caroténoïdes a ensuite été caractérisé par chromatographie liquide ultra-haute performance (UPLC<sup>®</sup> Acquity Waters, Guyancourt, France) à barrette de diode UV-visible, couplée à un spectromètre de masse à trappe d'ions 3D (HCT<sup>™</sup> Ultra MS<sup>®</sup>, Brüker Daltonics, Billerica, USA).



**Figure 45** : Equipement UPLC-MS utilisé pour l'analyse des caroténoïdes et l'identification de leurs produits de dégradation.

Le système Acquity<sup>™</sup> UPLC<sup>®</sup> de Waters (figure 45) est composé d'une pompe 0-2 mL/min, d'un injecteur 1-10  $\mu\text{L}$ , d'un dégazeur 4 voies en ligne, d'un four à colonne de 20 à 60°C, et d'un détecteur UV/visible entre 100 et 800 nm. Les caroténoïdes ont été séparés à 35°C, à l'aide d'une colonne C18 (2,1 x 150 mm, type HSS T3, porosité 1,8  $\mu\text{m}$ , Waters Acquity<sup>™</sup>, Guyancourt, France), à base de silice 200 Å avec greffage de phase alkyle trifonctionnelle avec une densité favorisant la rétention des composés organiques (1,6  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , charge de carbone 11 %). Deux solvants ont été utilisés pour le gradient

d'élution : (A) mélange acétonitrile:MeOH:H<sub>2</sub>O (60:20:20, v/v/v) contenant 5 µmol/L de HCOOH et 10 mmol/L de HCOONH<sub>4</sub>, et (B) mélange EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20, v/v) contenant 5 µmol/L de HCOOH. Le flux d'élution a été fixé à 0,5 mL/min (pression entre 600 et 800 bars selon la proportion des solvants). Le gradient appliqué est le suivant pour les produits du β-carotène, du lycopène et des caroténoïdes de HU36 et de GB1 :

- entre 0 et 2min, 100 % de A, 0 % de B,
- entre 2 et 14,5 min, gradient linéaire jusqu'à 45 % de A et 55 % de B,
- entre 14,5 et 15 min, maintien de 45 % de A et 55 % de B,
- entre 15 et 22 min, gradient linéaire jusqu'à 40 % de A et 60 % de B,
- entre 22 et 25 min, gradient linéaire jusqu'à 30 % de A et 70 % de B,
- entre 25 et 26 min, maintien de 30 % de A et 70 % de B,
- à 26,01 min, retour à 100 % de A, 0 % de B,
- entre 26,01 et 28 min, maintien à 100 % de A, 0 % de B ;

et pour l'astaxanthine :

- entre 0 et 2min, 100 % de A, 0 % de B,
- entre 2 et 7 min, gradient linéaire jusqu'à 90 % de A et 10 % de B,
- entre 7 et 15 min, gradient linéaire jusqu'à 55 % de A et 45 % de B
- entre 15 et 16 min, gradient linéaire jusqu'à 40 % de A et 60 % de B,
- à 16,01 min, retour à 100 % de A, 0 % de B,
- entre 16,01 et 18 min, maintien à 100 % de A, 0 % de B.

Le détecteur UV a été réglé sur une acquisition entre 250 et 800 nm (mesures tous les 2 nm, par intervalles de 0,1 min), avec une vitesse de 20 points/sec (optimisation de la résolution).

Puis, le système Ultra MS<sup>®</sup> de Bruker a permis une acquisition des spectres de masse par ionisation chimique sous pression atmosphérique (APCI) et dissociation par trappe à ions (mesures par intervalles de 40 ms). Les paramètres de la source étaient réglés comme suit : corona = + 1000 nA, pression dans le nébuliseur = 40 psi, flux gazeux = 3 L/min, température du gaz = 300°C, température de vaporisation = 300°C, temps d'accumulation dans la trappe à ions = 50 ms, cible = 150 000, sensibilité de détection en mode ultra scan = 50-300 m/z, vitesse = 26 m/z.s<sup>-1</sup>, seuil d'enregistrement = 1000, stabilité des composés pour la détection = 100 %, niveau de la trappe = 90 %. Des masses cibles spécifiques aux différents caroténoïdes ont été précisées sur chaque plage de détection :

- pour les produits du β-carotène, 300 m/z entre 0 et 12,5 min et 500 m/z entre 12,5 et 26 min,

- pour les produits du lycopène, 300 m/z entre 0 et 6 min et 500 m/z entre 6 et 26 min,
- pour les produits de l'astaxanthine, 300 m/z entre 0 et 7 min et 500 m/z entre 7 et 16 min,
- pour les caroténoïdes de HU36 et de GB1, 350 m/z entre 0 et 7 min, 600 m/z entre 7 et 11,5 min et 750 m/z entre 11,5 et 26 min.

Les molécules ont été identifiées grâce à leurs temps de rétention, leurs spectres d'absorption entre 250 et 800 nm, et leurs spectres de masse. Le traitement des données a été effectué avec le logiciel Compass, version 1.3 (Bruker Daltonics, Billerica, USA).

### 3.6.3. Confirmation de l'identification des produits de dégradation du $\beta$ -carotène

L'identification des époxydes et des produits de coupure formés par oxydation du  $\beta$ -carotène a été confirmée en synthétisant spécifiquement ces produits à l'aide de réactifs ciblant des sites précis sur la molécule.

Des époxydes ont été formés par réaction avec l'acide méta-chloroperoxybenzoïque (MCPBA) ([Rodriguez and Rodriguez-Amaya 2007](#)). Une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) a été ajoutée à une solution de  $\beta$ -carotène à 50  $\mu\text{mol/L}$  dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$  (10 mL, 1/1, v/v). Ce mélange biphasique a été maintenu sous agitation forte sur agitateur magnétique (750 tr/min) à température ambiante. Le MCPBA a été solubilisé à 75  $\mu\text{mol/L}$  dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$  (10 mL, 1/1, v/v), et additionné goutte à goutte pendant 3 heures au mélange contenant le  $\beta$ -carotène. Puis, le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 1 heure supplémentaire. Un échantillon de la phase organique a ensuite été récupéré et lavé à volume équivalent avec une solution aqueuse de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  à 20 %, une solution aqueuse saturée en  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  et de l'eau milliQ. Puis, les résidus d'eau ont été éliminés par ajout de sulfate de sodium anhydre. Enfin, l'extrait sec a été évaporé sous un flux d'argon et repris dans 1 mL d'un mélange  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2/1, v/v) juste avant injection en UPLC pour analyse comme décrit précédemment (Cf. § 3.6.2).

Des produits de coupure oxydative (apocaroténals et apocaroténols) ont été formés par réaction avec le permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) ([Caris-Veyrat, Schmid et al. 2003](#)). Une solution aqueuse de  $\text{KMnO}_4$  à 0,59 mg/mL (10 mL) a été ajoutée à une solution à 50  $\mu\text{mol/L}$  de  $\beta$ -carotène (1,34 mg) et 6,75 mg/L de bromure de cetyltriméthylammonium (0,27 mg) préparée dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{toluène}$  (40 mL, 1/1, v/v). Ce mélange biphasique a été maintenu sous agitation forte (750 tr/min) sur agitateur

magnétique pendant 2 heures à température ambiante. Un échantillon de la phase organique a ensuite été récupéré et filtré sur un filtre à 0,45 µm (Acrodisc®, 32 mm à membrane en PVDF, Sigma-Aldrich, Fontenay-sous-Bois, France). Puis, les résidus d'eau ont été éliminés par ajout de sulfate de sodium anhydre. Enfin, l'extrait sec a été évaporé sous un flux d'argon et repris dans 1 mL d'un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/1, v/v) juste avant injection en UPLC pour analyse comme décrit précédemment (Cf. § 3.6.2).

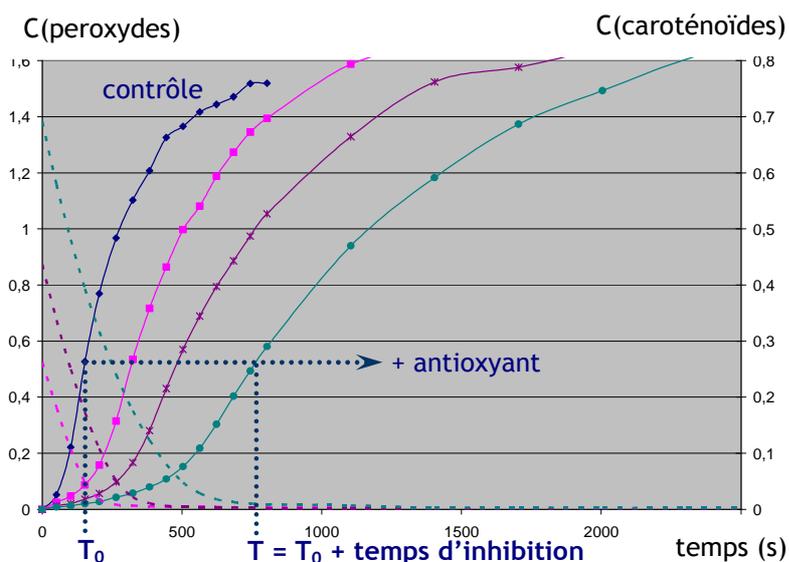
Les produits de dégradation des caroténoïdes élués ont ensuite été retrouvés grâce à leurs temps de rétention, leurs spectres d'absorption, et leurs spectres de masse.

### **3.7. Modélisation mathématique des cinétiques de réaction entre les caroténoïdes et le fer**

Toutes les courbes moyennes de la dégradation des différents caroténoïdes en présence de concentrations croissantes de fer II, fer III et de MbFe ont été traitées par modélisation mathématique. Les courbes de régression et les coefficients cinétiques (avec leurs écarts-types) ont été obtenus à l'aide du logiciel Scientist (Micromath, Salt Lake city, USA). Les concentrations initiales de caroténoïdes et de fer ont été données comme paramètres de départ.

### **3.8. Calcul du pouvoir antioxydant par inhibition de la peroxydation lipidique**

Pour chaque test de pouvoir antioxydant en milieu micellaire, les ratios  $RT = T/T_0$  correspondant aux temps nécessaires pour atteindre une certaine production de diènes conjugués (augmentation de l'absorbance à 234 nm par rapport à  $t_0$ ) en présence de concentrations croissantes de molécule antioxydante (figure 46), divisé par le temps nécessaire pour atteindre le même niveau d'oxydation sans antioxydants (essai contrôle), ont été calculés. RT varie avec la concentration d'antioxydant utilisé et correspond à l'effet antioxydant de cette concentration.



**Figure 46** : Courbes cinétiques de l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique initiée par le fer en milieu micellaire aqueux, en présence de concentrations croissantes de caroténoïdes. **Courbes continues** : formation des peroxydes lipidiques ; **courbes en pointillés** : dégradation des caroténoïdes.

Puis, les courbes  $RT = f$  (concentration de la molécule antioxydante) ont été tracées et une courbe de tendance passant par l'origine et son équation ont été ajoutées. Cette modélisation représente l'effet inhibiteur des différentes molécules étudiées sur la peroxydation lipidique. Les coefficients des courbes de tendance ont été utilisés pour caractériser l'effet antioxydant. La modélisation a été répétée trois fois pour chaque antioxydant afin de pouvoir calculer des écarts-types.

Pour les tests en émulsion huile/eau, c'est l'aire sous la courbe d'accumulation des diènes conjugués pendant les six heures de la cinétique qui a été choisie comme facteur descriptif du pouvoir antioxydant. Le calcul de l'aire sous la courbe  $C(\text{diènes conjugués}) = f(\text{temps en h})$  a été effectué de façon géométrique : l'aire a été divisée en trapèzes définis sur des intervalles de temps  $\Delta t = \text{temps entre deux mesures de la concentration en diènes conjugués}$  ; puis chaque trapèze étant constitué d'un rectangle et d'un triangle, son aire sur l'intervalle de temps  $\Delta t$  est égale à  $(\Delta t \times C_t) + [\Delta t \times (C_{t+1} - C_t)] / 2$ , avec  $C_t$  la concentration de diènes mesurée au temps  $t$ . Avec  $\Delta t = 1$  heure, on obtient : aire (en  $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}$ ) =  $C_t + (C_{t+1} - C_t)/2$ . Pour une mesure pendant 6 heures, l'aire totale sous la courbe est donc définie par la relation :

$$\sum_{t=0}^{t=5} (C_t + (C_{t+1} - C_t)/2)$$

Cette aire, obtenue avec une concentration donnée de chaque molécule étudiée, a été comparée à celle obtenue dans un milieu contrôle en l'absence d'antioxydants afin de caractériser l'effet antioxydant. Chaque aire a été mesurée au cours de trois répétitions afin de calculer leurs moyennes et écart-types.

Dans les deux modèles, le  $\beta$ -carotène, le lycopène, l'astaxanthine, les caroténoïdes issus de HU36 et de GB1 ont tout d'abord été testés individuellement et leur pouvoir antioxydant a été calculé (en  $\mu\text{mol}^{-1}$  et en  $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}$ , en milieu micellaire et en émulsion, respectivement).

Puis, des tests complémentaires ont été effectués (essentiellement en solution micellaire) en combinant les caroténoïdes, comme le  $\beta$ -carotène et le lycopène.

Par ailleurs, d'autres molécules antioxydantes ont également été évaluées par la même méthode : la ménaquinone-7 (qui a été identifiée dans les extraits bruts de caroténoïdes bactériens), l' $\alpha$ -tocophérol et deux polyphénols (acide chlorogénique et rutine).

Puis, le pouvoir antioxydant de mélanges caroténoïde / antioxydant phénolique a été déterminé en combinant les caroténoïdes les plus efficaces de l'étude avec l' $\alpha$ -tocophérol ou les polyphénols. Les mécanismes d'interaction (additivité, synergie ou antagonisme) ont été évalués en comparant l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par les différents antioxydants individuellement et en combinaison.

## 4. MODES OPERATOIRES ET EQUIPEMENTS POUR L'ETUDE NUTRITIONNELLE

### 4.1. Préparation des solutions mères de caroténoïdes

Les cocktails de caroténoïdes bactériens purifiés ont été dissous dans un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v).

Quatre caroténoïdes très communs dans le régime alimentaire humain ont été choisis comme molécules de référence afin d'évaluer les propriétés physico-chimiques et nutritionnelles des caroténoïdes bactériens : le  $\beta$ -carotène, le lycopène, l'astaxanthine et la lutéine.

Les solutions stocks de caroténoïdes ont été préparées par dissolution des échantillons cristallisés : le  $\beta$ -carotène et le lycopène ont été dissous dans l'hexane, la lutéine a été dissoute dans l'éthanol, l'astaxanthine a été dissoute dans l'hexane à 10 % de dichlorométhane, et les caroténoïdes de HU36 et de GB1 ont été dissous dans le dichlorométhane. La concentration exacte de chaque solution a ensuite été calculée par mesure d'absorbance au spectrophotomètre (UV-1800 à double faisceau, Shimadzu, Kyoto, Japon), équipé d'un passeur 6 échantillons (CPS-240 A, Shimadzu, Kyoto, Japon) et d'un thermostat (CPS-controller, Shimadzu, Kyoto, Japon), avec des cuves en quartz (Suprasil<sup>®</sup> 104-QS, 10 mm, Hellma<sup>®</sup> Optics, Paris, France). Les coefficients d'extinction molaire utilisés pour ces calculs étaient de 138 931 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 452 nm pour le  $\beta$ -carotène ([NIST 29/5/2000](#)), 184 920 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 472 nm pour le lycopène ([NIST 29/5/2000](#)), 144 840 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 445 nm pour la lutéine ([NIST 29/5/2000](#)), 125 160 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 470 nm pour l'astaxanthine ([Britton, Liaaen-Jensen et al. 1994](#)), 165 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 454 nm pour les caroténoïdes de HU36 et 225 300 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 502 nm pour les caroténoïdes de GB1, dans leurs solvants respectifs.

Toutes les manipulations de solutions de caroténoïdes ont été effectuées sous hôte aspirante, à température ambiante, à l'abri de la lumière et en utilisant des seringues de précision en verre, de 25  $\mu$ L à 2 mL (Agilent, Australie).

## 4.2. Digestions *in vitro*

### 4.2.1. Préparation des repas tests

Les expériences de digestion *in vitro* ont été effectuées deux fois pour chaque caroténoïde, d'abord avec des molécules pures, puis avec des aliments riches en ces caroténoïdes. Tous les essais ont été répétés trois fois.

Pour les essais avec les caroténoïdes purs, les solutions stocks ont été dispersées dans de l'huile d'arachide puis les solvants ont été évaporés de façon à obtenir des concentrations de caroténoïdes dans l'huile d'environ 750  $\mu\text{mol/L}$ . Chaque essai contenait  $100 \pm 2$  mg d'huile d'arachide enrichie, soit 40  $\mu\text{g}$  de caroténoïdes.

Pour les essais avec des sources alimentaires de caroténoïdes, les aliments riches en caroténoïdes ( $4,0 \pm 0,02$  g) ont été codigérés avec un repas de base composé de viande de bœuf à 5 % de matière grasse ( $1,2 \pm 0,02$  g), de purée de pommes de terre ( $6,7 \pm 0,02$  g) et d'huile d'olive ( $100 \pm 2$  mg). Les proportions de ces aliments ont permis de mimer les apports journaliers en macronutriments recommandés dans l'alimentation humaine : 64,2 % de l'énergie de ce repas de base était apportée par les glucides, 14,2 % par les lipides et 20,8 % par les protéines. Par ailleurs, le volume d'huile incorporé dans le modèle a été optimisé après plusieurs tests, de façon à obtenir un taux de dégradation d'environ 90 % en fin de digestion. La micellisation des caroténoïdes était ainsi favorisée par l'apport d'acides gras, tout en limitant la rétention des caroténoïdes dans l'huile non digérée, ce qui pourrait être un facteur de variabilité entre les divers caroténoïdes. Les pommes de terre ont été cuites dans l'eau bouillante avec la peau, puis épluchées et écrasées à la fourchette. La viande a été cuite à point à la poêle sans ajout de matière grasse. Les sources alimentaires des caroténoïdes de référence ont été choisies pour leur richesse en chaque caroténoïde étudié : les carottes vapeurs en conserve pour le  $\beta$ -carotène (environ 11  $\mu\text{g/g}$ ), les tomates pelées en conserve pour le lycopène (environ 7,5  $\mu\text{g/g}$ ), les épinards hachés en conserve pour la lutéine (environ 54  $\mu\text{g/g}$ ) et le saumon fumé sous vide pour l'astaxanthine (environ 9  $\mu\text{g/g}$ ). Ces aliments étaient tous peu transformés, cuits et conservés sans additifs et ont été sectionnés en morceaux de tailles similaires de façon à limiter la variabilité de bioaccessibilité due à la préparation des aliments. Les caroténoïdes bactériens ont été utilisés sous forme de cellules lyophilisées, qui ont été homogénéisées dans du yaourt ferme nature à une teneur de 1 g par yaourt de 125 g (soit 32 mg de cellules lyophilisées dans les 4 g de yaourt ajoutés au repas de base).

#### 4.2.2. Préparation des homogénats

Une première série d'échantillons n'a pas été soumise à la digestion *in vitro* ; elle a permis de déterminer le contenu initial en caroténoïdes.

Pour cela, les composants des repas tests (*i.e.* huile d'arachide enrichie en caroténoïdes purs ; ou les aliments riches en caroténoïdes avec viande de bœuf, purée de pommes de terre et huile d'olive) ont été mélangés avec 32 mL d'eau bidistillée contenant 0,9 % de NaCl et le tout a été broyé par ultraturax (Ultraturax® T18 basic, IKA®-Works, Taquara, Brésil) à 22 000 tr/min jusqu'à homogénéisation totale.

Les homogénats ont été aliquotés dans des cryotubes de 2 mL en polypropylène (Corning inc., New York, USA) et conservés à -80°C jusqu'à analyse du contenu en caroténoïdes.

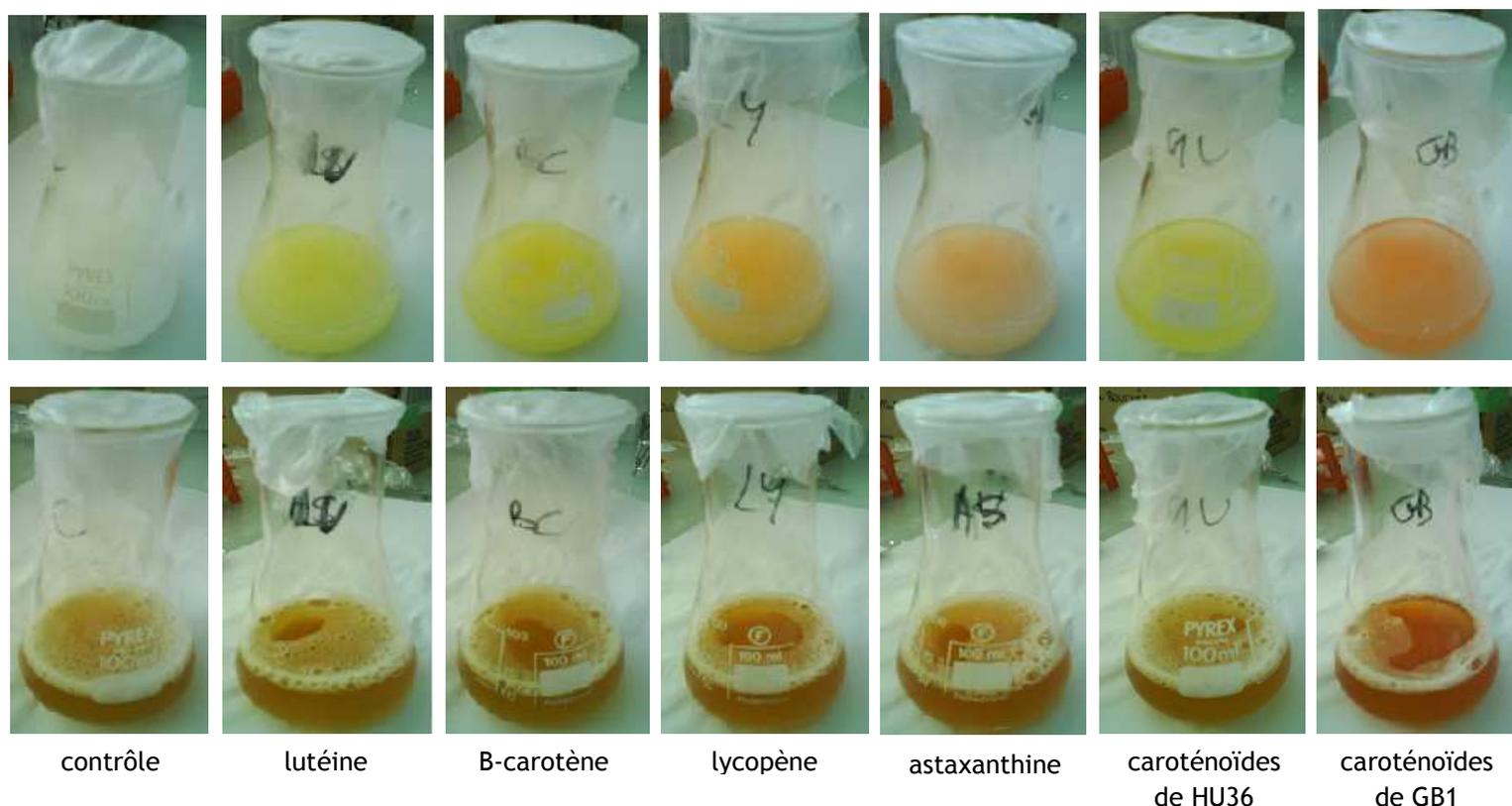
#### 4.2.3. Digestion simulée des repas tests

Les composants des repas tests ont été mélangés avec 32 mL d'eau bidistillée contenant 0,9 % de NaCl et le tout a été homogénéisé pendant 10 min dans un bain (Polytest 20, Bioblock Scientific) thermostaté à 37°C, sous agitation (160 va-et-vient/min) (figure 47).

Puis, 2,5 mL de salive artificielle (solution d'eau bidistillée contenant 62 mmol/L de NaHCO<sub>3</sub>, 15,1 mmol/L de NaCl, 6,4 mmol/L de KCl, 3 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 6 mmol/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,16 g/L de mucin et 13 g/L d' $\alpha$ -amylase) ont été ajoutés. Le milieu de digestion a ensuite été légèrement broyé par ultraturax (Ultraturax® T18 basic, IKA®-Works, Taquara, Brésil) pendant 30 sec à 5 000 tr/min afin de mimer la mastication, et à nouveau incubé pendant 10 min à 37°C sous agitation (160 v-v/min).

Afin de mimer la digestion gastrique, le pH du milieu a ensuite été abaissé à  $4,0 \pm 0,02$  (mesure à T<sub>AMB</sub>, HI-210 microprocessor pHmeter, HANNA instruments) par ajout d'une solution de HCl à 1 mol/L (environ 600  $\mu$ L, mais volume variable selon la composition des aliments digérés). Puis 2 mL de solution de pepsine (contenant 40 mg/mL de pepsine porcine et 0,1 mol/L de HCl dans de l'eau bidistillée) ont été ajoutés avant d'incuber le milieu pendant 1 heure à 37°C sous agitation (160 v-v/min).

Ensuite, pour mimer la digestion duodénale le pH a été remonté à  $6,0 \pm 0,02$  (mesure à  $T_{AMB}$ , HI-210 microprocessor pHmeter, HANNA instruments) par ajout d'une solution de bicarbonate de sodium à 0,9 mol/L (environ 800  $\mu$ L, mais volume variable selon les aliments digérés). Puis un mélange d'extrait de bile et de pancréatine a été ajouté (9 mL d'une solution d'eau bidistillée à pH 6,0 contenant 2 mg/mL de pancréatine, 12 mg/mL d'extrait de bile et 100 mmol/L de citrate de sodium, et 4 mL d'une solution d'eau bidistillée à pH 6,0 contenant 0,1 g/mL d'extrait de bile et 100 mmol/L de citrate de sodium) et le milieu a été placé une dernière fois à 37°C sous agitation (160 v-v/min) pendant 2 heures.



**Figure 47** : Aspect des échantillons des différents caroténoïdes soumis au processus de digestion *in vitro*. **Rangée supérieure** : en début de digestion ; les caroténoïdes sont dispersés sous l'effet de l'agitation en présence de salive artificielle. **Rangée inférieure** : en fin de digestion ; les caroténoïdes sont partiellement incorporés dans les micelles mixtes en présence de pepsine, de sels biliaires et de pancréatine.

#### 4.2.4. Extraction de la fraction micellaire des digestats

À l'issue de la digestion *in vitro*, les digestats ont été centrifugés dans des tubes en verre de 50 mL, pendant 1 heure à 3 600 tr/min (Jouan GR412-W rotor, Saint-Herblain, France). Trois phases ont été obtenues : une fine couche de lipides contenant essentiellement de l'huile non hydrolysée, un volume d'environ 45 mL correspondant à la phase micellaire aqueuse et un culot solide (environ 15 mL) contenant notamment les aliments non digérés, des sels et des particules des extraits biliaries. La phase aqueuse a été prélevée à l'aide d'une seringue (Terumo® stérile, Liège, Belgique) et filtrée successivement à travers des filtres stériles de 0,8 µm (filtre à vis pour clarification de solutions aqueuses, Millex®-AA à membrane d'esters de cellulose, Millipore MF, Cork, Irlande) et de 0,2 µm (filtre à vis pour stérilisation de solutions aqueuses, Millex®-GS à membrane d'esters de cellulose, Millipore MF, Cork, Irlande), puis aliquotée dans des cryotubes de 2 mL (Corning inc., New York, USA) et conservée à -80°C jusqu'à analyse du contenu en caroténoïdes et utilisation pour les tests d'absorption intestinale.

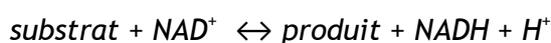
#### 4.2.5. Mesures granulométriques sur les fractions micellaires

La taille et le potentiel zeta des micelles mixtes formées pendant la digestion *in vitro* ont été mesurés à l'aide d'un granulomètre (High Performance Zetasizer Nano, Malvern instruments, Orsay, France). Ces deux paramètres ont été mesurés trois fois sur chaque échantillon.

#### 4.2.6. Dosage de la composition des micelles mixtes

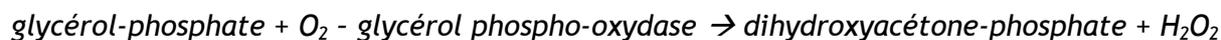
Pour certaines expérimentations de digestion *in vitro* (Cf. Problématique C, § 4.1), quatre composants importants des micelles mixtes ont été dosés selon des méthodes colorimétriques par lecture d'absorbances (trois répétitions) sur microplaques, (lecteur de microplaques iEMS Reader MF, Labsystems, Israel, piloté par logiciel Ascent, version 2.6, Malte).

Pour le dosage des sels biliaries, 6,6 µL d'échantillon ont été mélangés à 200 µL de réactif. La réaction était catalysée par la déshydrogénase α-hydroxystéroïde.



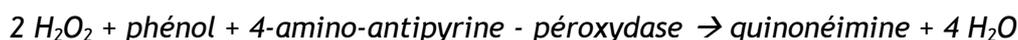
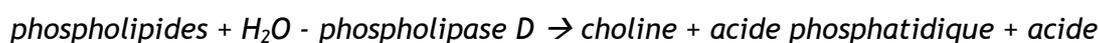
Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance a été enregistrée à 340 nm. La gamme étalon a été réalisée avec un standard de sels biliaries entre 0 et 15 mmol/L.

Pour le dosage des monoglycérides, 20 µL d'échantillon ont été mélangés à 200 µL de réactif. La réaction était catalysée par trois enzymes (méthode de Fossati et Principe, couplée à une réaction de Trinder) :



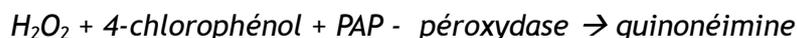
Après 15 min d'incubation à 37°C, l'absorbance a été enregistrée à 492 nm. La gamme étalon a été réalisée avec un standard de glycérol et triglycérides entre 0 et 5,6 mmol/L.

Pour le dosage des phospholipides et lyso-phospholipides, 20 µL d'échantillon ont été mélangés à 200 µL de réactif. La réaction était catalysée par trois enzymes :



Après 15 min d'incubation à 37°C, l'absorbance a été enregistrée à 492 nm. La gamme étalon a été réalisée avec un standard de phospholipides entre 0 et 5,74 mmol/L.

Pour le dosage du cholestérol total, 20 µL d'échantillon ont été mélangés à 200 µL de réactif. La réaction était catalysée par trois enzymes (méthode de Allain et al.) :



Après 15 min d'incubation à 37°C, l'absorbance a été enregistrée à 492 nm. La gamme étalon a été réalisée avec un standard de cholestérol entre 0 et 5,17 mmol/L.

### 4.3. Etude microbiologique sur le matériel bactérien au cours des digestions *in vitro*

Le suivi de la quantité de cellules végétatives et de spores au cours de la digestion *in vitro* de repas types enrichis en matériel bactérien a été effectué grâce à un travail en partenariat avec l'équipe du laboratoire de "Microbiologie" (Stéphanie Chamot, sous la responsabilité de Frédéric Carlin), au sein de l'unité SQPOV de l'INRA d'Avignon.

#### 4.3.1. Dénombrement du contenu bactérien total et des spores aux différentes étapes de la digestion

Les spores de bactéries HU36 ou GB1 utilisées sous forme lyophilisée sont viables (probiotiques) et peuvent donc évoluer (germination, multiplication, maintien au stade de spores ou encore dénaturation) au cours des étapes de formulation des aliments dans lesquels elles sont incorporées, ainsi qu'au cours de la digestion. Leur statut a donc été suivi au cours des digestions *in vitro* menées avec du yaourt nature enrichi en spores lyophilisées.

Des échantillons du milieu digestif (450  $\mu$ L), contenant le matériel bactérien, ont été prélevés à intervalles réguliers :

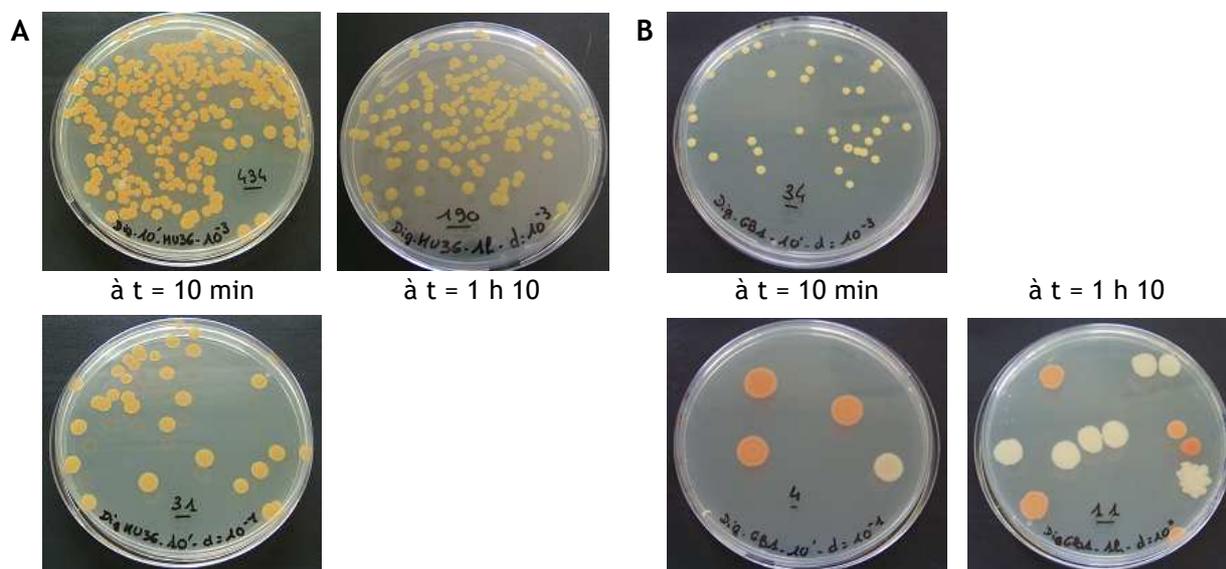
- t<sub>0</sub>, après mise en suspension des spores dans le repas test,
- t = 10 min, après ajout de la salive artificielle (pH = 5,6),
- t = 1 h 10, à la fin de la digestion gastrique à pH 4,
- t = 2 h 10, au milieu de la digestion duodénale à pH 6,
- t = 3 h 10, à la fin de la digestion duodénale à pH 6.

Ces échantillons ont été dilués plusieurs fois successives dans du tampon phosphate pH 7,0 à 0,2 mol/L. Cette concentration de la solution tampon neutralise le pH légèrement acide du milieu gastrique et duodénal au cours de la digestion. Puis, des volumes de 100  $\mu$ L prélevés dans les dilutions  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  ont été étalés manuellement (en double) sur des plaques de gélose contenant du milieu de culture nutritif LB (contenant des peptides, des tryptones de caséine, des vitamines, des oligo-éléments et des minéraux).

En parallèle, les prélèvements non dilués ont été incubés à 75°C pendant 10 minutes, afin de détruire les cellules végétatives (seules les formes spores résistent). Puis, ces échantillons ont été à nouveau dilués dans du tampon phosphate et 100  $\mu$ L des

dilutions  $10^0$  à  $10^{-4}$  ont été étalés en double sur milieu de culture LB (milieu nutritif non-sélectif, ou "bouillon lysogène").

Les concentrations de la population bactérienne totale (cellules végétatives et spores) ont été calculées après 24 heures d'incubation en étuve à  $37^\circ\text{C}$ . Les colonies formées à partir des échantillons non chauffés ont alors été dénombrées sur les plaques de milieu LB (figure 48). Les concentrations de spores bactériennes aux mêmes étapes ont été calculées après 48 et 72 heures d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ . Les colonies formées à partir des échantillons chauffés ont été dénombrées sur les plaques de milieu LB. Les concentrations ont ensuite été exprimées en cfu/mL (nombre de colonies par mL, cfu : "colony-forming unit"). La limite de détection est considérée à 1 colonie par plaque, c'est-à-dire 10 cfu/mL.

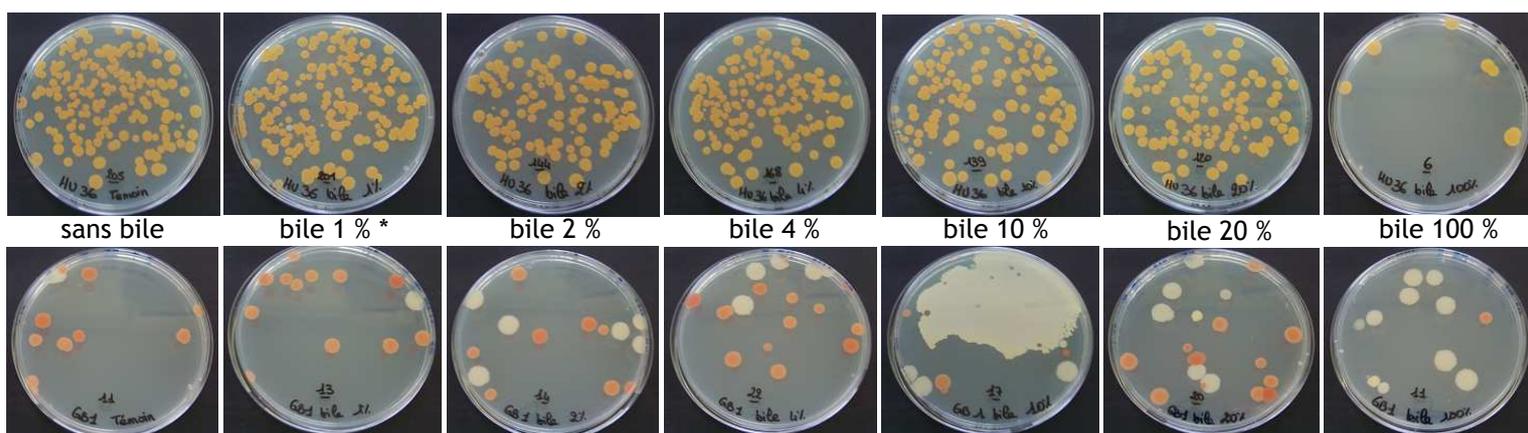


**Figure 48** : Exemples de dénombrements des bactéries totales (rangée supérieure) et des spores (rangée inférieure) présents dans le milieu de digestion *in vitro* lors de tests avec le matériel bactérien lyophilisé (A) de HU36 et (B) de GB1.

#### 4.3.2. Détermination de la sensibilité des spores de HU36 et GB1 à la concentration de sels biliaires du milieu de digestion

Il est connu que la germination des spores est inhibée par de fortes concentrations de sels biliaires ([Clavel, Carlin et al. 2007](#)). Le milieu de digestion (et donc les prélèvements pour les comptages) étant riche en extraits de bile et de pancréatine pendant la digestion duodénale, un test complémentaire a été mis en place afin de déterminer le niveau de dilution nécessaire en tampon phosphate pour annuler cet effet inhibiteur pendant l'incubation des plaques de milieu LB.

Pour cela, des solutions diluées dans le tampon phosphate, contenant 0 %, 1 %, 4 %, 10 %, 20 %, et 100 % de bile et pancréatine par rapport au milieu de digestion *in vitro* ont été préparées. Puis, 0,515 mg de matériel lyophilisé de HU36 ou de GB1 ont été homogénéisés dans 1 mL de chacune de ces solutions diluées. Puis, ces échantillons ont été chauffés 10 min à 75°C (dénaturation des cellules végétatives), dilués plusieurs fois successives dans du tampon phosphate, et 100 µL ont été étalés sur plaques de milieu LB afin de dénombrier les spores qui pouvaient entrer en germination (figure 49). Après 48 et 72 heures d'incubation à 37°C, les colonies ont été dénombrées sur chaque plaque (trois dilutions pour chaque concentration de bile/pancréatine) afin de déterminer la dilution minimale du milieu de digestion *in vitro* nécessaire pour ne pas inhiber (et donc sous-estimer) la croissance des colonies à partir de spores au cours des dénombrements.



**Figure 49 :** Dénombrement des spores résistantes à des concentrations croissantes de bile, pour HU36 (rangée supérieure) et GB1 (rangée inférieure).

\* Pourcentage par rapport à la concentration de bile utilisée dans le milieu de digestion artificielle *in vitro*.

## 4.4. Etudes sur micelles mixtes artificielles

### 4.4.1. Préparation des micelles mixtes artificielles

La composition des micelles mixtes artificielles cherche à mimer, de façon simplifiée, celles qui sont formées dans le duodénum humain au cours de la digestion. Elles contiennent des phospholipides, des lysophospholipides, du cholestérol, un acide gras et un monoglycéride d'acide gras.

Des solutions stocks de 2-oléoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine phosphatidylcholine à 16 mmol/L, 1-palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine à 64 mmol/L, cholestérol libre à 40 mmol/L, mono-oléine à 120 mmol/L et d'acide oléique à 200 mmol/L ont été préparées dans un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2/1, v/v). Une solution de taurocholate de sodium à 5 mmol/L a été préparée dans de l'eau bidistillée à 0,9 % (m/v) de NaCl.

Puis, un volume égal de chaque solution stock a été transféré dans un ballon en verre et les solvants ont été évaporés sous un flux d'azote (Sample Concentrator, avec Dri-block DB-3, Techne, Morancé en Beaujolais, France) avant de reprendre les lipides dans la solution de taurocholate de sodium afin d'obtenir des concentrations finales de 0,04 mmol/L de phosphatidylcholine, 0,16 mmol/L de lysophosphatidylcholine, 0,3 mmol/L de mono-oléine, 0,1 mmol/L de cholestérol et 0,5 mmol/L d'acide oléique. Les micelles artificielles enrichies en caroténoïdes ont été préparées de la même façon, en ajoutant un volume de solution stock de caroténoïdes avant d'évaporer les solvants. Ce volume a été calculé pour obtenir des concentrations finales de 5 µmol/L.

Les micelles ont été formées par homogénéisation forte pendant 5 min sur agitateur magnétique puis 5 min d'ultrasons à 25 W sur glace (sonificateur Branson 250 W, Danbury, CT, USA). Enfin, les mélanges obtenus ont été laissés au repos pendant 30 min puis filtrés sur filtres stériles de 0,22 µm (filtre à vis pour stérilisation de solutions aqueuses, Millex®-GS à membrane d'esters de cellulose, Millipore MF, Cork, Irlande). Les solutions micellaires étaient limpides et pouvaient être stockées dans des cryotubes (Corning inc., New York, USA) à -80°C pour une utilisation ultérieure.

#### 4.4.2. Etude cinétique du transfert des cristaux de caroténoïdes vers des micelles mixtes préformées

Pour chaque caroténoïde, un volume de solution stock a été transféré dans 8 tubes à hémolyse et évaporé sous azote (Sample Concentrator, avec Dri-block DB-3, Techne, Morancé en Beaujolais, France), jusqu'à obtention d'un résidu sec. Puis 2 mL de solution de micelles mixtes ont été ajoutés dans chaque tube, qui ont ensuite été fermés hermétiquement.

Chaque tube contenait 5  $\mu\text{mol/L}$  de caroténoïdes. Les tubes ont été brièvement agités afin de décoller le film sec de caroténoïdes, puis placés dans une étuve (Minitron, Infors-AG, Bottmingen, Suisse) à 37°C à l'abri de la lumière et sous agitation constante à 250 tr/min. La cinétique d'incorporation des caroténoïdes au sein des micelles mixtes a été suivie pendant 6 heures selon le protocole suivant :

- prélèvement des tubes à intervalles de temps réguliers ( $t_0$ , 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h et 6 h),
- filtration de leur contenu sur filtres stériles de 0,22  $\mu\text{m}$  (filtre à vis pour stérilisation de solutions aqueuses, Millex®-GS à membrane d'esters de cellulose, Millipore MF, Cork, Irlande) afin d'éliminer les formes cristallisées des caroténoïdes,
- extraction en deux temps sur 1 mL de micelles (ajout de 2 mL d'hexane et 0,5 mL d'éthanol, agitation puis centrifugation pendant 3 min à 2 000 tr/min, prélèvement de la phase supérieure, rajout de 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sur la phase aqueuse, agitation puis centrifugation pendant 3 min à 2 000 tr/min, prélèvement de la phase inférieure, mise à évaporer avec le prélèvement précédent sous azote),
- reprise des caroténoïdes dans 1 mL du solvant adéquat (Cf. § 4.1),
- lecture de l'absorbance sur spectrophotomètre (UV-1800 à double faisceau, Shimadzu, Kyoto, Japon) puis calcul de la concentration au cours du temps.

Cette cinétique a été suivie trois fois pour chaque caroténoïde.

#### 4.4.3. Mesure de l'incorporation des caroténoïdes dans des micelles artificielles

Des extractions ont été effectuées sur les micelles enrichies en caroténoïdes formées par pré-mélange des caroténoïdes avec les phospholipides et les acides gras avant évaporation, reprise dans le taurocholate de sodium à 5 mmol/L et filtration. Puis, la

quantité de caroténoïdes incorporés dans les micelles mixtes a été mesurée par analyse HPLC et comparée à la concentration théoriquement disponible dans le milieu (5  $\mu\text{mol/L}$ ).

Le protocole d'extraction et la méthode d'analyse appliqués sont décrits ci-après (Cf. § 4.7).

#### **4.5. Expérimentations d'absorption intestinale *in vitro***

Des cultures en monocouches de cellules Caco-2, clone TC-7 ont été utilisées comme modèle de l'épithélium intestinal humain afin de tester l'absorption des caroténoïdes micellisés dans des micelles mixtes.

Toutes les manipulations ont été effectuées avec du matériel stérile et sous une hôte à flux laminaire.

##### **4.5.1. Culture cellulaire**

La lignée cellulaire utilisée à l'INRA de Marseille a été fournie par un laboratoire de l'INSERM (U178, Villejuif, France).

Les cellules ont été entretenues par culture dans des flasques stériles de 25  $\text{cm}^2$  à col coudé et munies de bouchons à filtres 2  $\mu\text{m}$  laissant passer l'oxygène de l'air (Corning Inc., New York, USA) et repiquages réguliers jusqu'au passage 80. Le milieu de culture complet utilisé sur les cellules non différenciées était du DMEM (milieu à base de glutamine), avec 20 % de sérum fœtal bovin (dans lequel les protéines du complément ont préalablement été inactivées par traitement thermique : 30 min d'incubation à 56 °C), 1 % d'acides aminés non-essentiels et 1 % d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules ont été conservées dans une étuve à 37 °C dans une atmosphère humide avec 10 % de  $\text{CO}_2$  dans l'air.

Le milieu de culture a été changé toutes les 48 heures et les repiquages étaient effectués dès que les cellules atteignaient environ 80 % de confluence (tous les 3 à 4 jours), selon le protocole suivant :

- aspiration du milieu de culture dans les flasques de surface 25  $\text{cm}^2$ ,
- ajout de 1 mL d'une solution de trypsine/EDTA à 25 %,
- incubation à 37 °C pendant 5 min,

- ajout de 19 mL du milieu de culture complet,
- homogénéisation par aller-retour à l'aide d'une pipette,
- prélèvement de 1 mL de cellules et transfert dans une nouvelle flasque de 25 cm<sup>2</sup>,
- ajout de 4 mL de milieu complet,
- homogénéisation et mise en culture dans l'étuve à 37°C (les cellules sédimentent puis se divisent).

#### 4.5.2. Mesure de l'absorption des caroténoïdes par le modèle cellulaire Caco-2

Pour les tests d'absorption *in vitro*, les cellules ont été repiquées comme décrit précédemment. Un volume de 1 mL de cellules en suspension dans du milieu complet a été déposé sur des filtres disposés sur des plaques 6-puits stériles (plaque TC à puits de diamètre 24 mm avec couvercle, Millipore, Billerica, Allemagne), avec inserts à pores de 1 µm (Millicell® en PET transparent, Millipore, Allemagne) (figure 50). La densité cellulaire obtenue était de  $25 \cdot 10^4$  cellules/puits. Puis, 2 mL de milieu complet ont été déposés en basolatéral avant d'incuber les plaques en étuve à 37°C et 10 % de CO<sub>2</sub> pour que les cellules se fixent sur les filtres. Les cellules ont été entretenues pendant trois semaines préalablement aux essais avec les micelles mixtes. Pendant les six premiers jours, le milieu de culture a été remplacé quotidiennement en ajoutant 1 mL de milieu complet en apical et 2 mL de milieu complet en basolatéral. Au bout de quelques jours, les cellules sont arrivées à confluence et ont commencé à se différencier. Entre les jours 7 et 21, le milieu complet a toujours été utilisé en basolatéral, alors que du milieu sans sérum fœtal a été ajouté en apical. Après 21 jours, les cellules étaient différenciées et fonctionnelles.

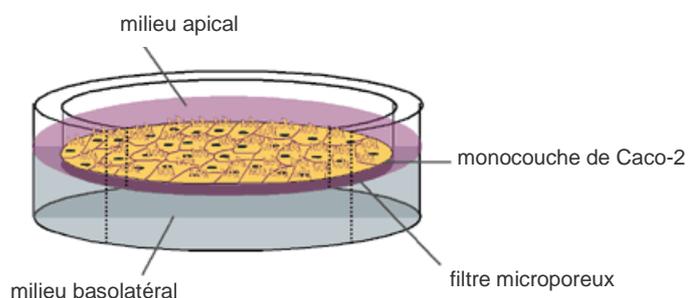


Figure 50 : Culture de monocouches de cellules Caco-2 sur filtres dans des plaques à puits.

Les diverses micelles mixtes riches en caroténoïdes préalablement obtenues (issues de digestion *in vitro* à partir d'aliments complets, ou micelles artificielles formées sous ultrasons) ont été testées sur monocouches de Caco-2 selon le protocole suivant :

- ajout de milieu sans sérum en apical et en basolatéral environ 12 heures avant les dépôts (permet d'éliminer toute trace de caroténoïdes contenus dans le sérum fœtal bovin),
- dilution des micelles mixtes dans du DMEM pur (au 1/2 pour les micelles artificielles et au 1/5<sup>ème</sup> pour les micelles issues de digestion *in vitro*, afin de limiter la teneur en sels biliaires, qui ont un effet détergent sur les cellules),
- deux lavages avec une solution de tampon phosphate (PBS) en apical et en basolatéral,
- dépôt de 1 mL de micelles diluées en apical et de 2 mL de milieu sans sérum en basolatéral,
- incubation pendant 3 heures en étuve à 37°C et 10 % de CO<sub>2</sub>.

À la fin de la période d'incubation les cellules et les milieux apicaux et basolatéraux de chaque puits ont été prélevés :

- aspiration du milieu apical,
- aspiration des milieux basolatéraux,
- deux lavages des puits avec du PBS afin d'éliminer les traces de milieu de culture contenant des caroténoïdes non absorbés,
- ajout de 500 µL de PBS sur les filtres et récupération des couches de cellules par grattage et aspiration.

Tous les échantillons ont été transférés dans des tubes Eppendorf et conservés à -80°C jusqu'au dosage des caroténoïdes contenus dans chaque milieu et absorbés par les cellules.

## 4.6. Expérimentations *in vivo* chez le rat

### 4.6.1. Gavages à base d'huile d'arachide enrichie en caroténoïdes

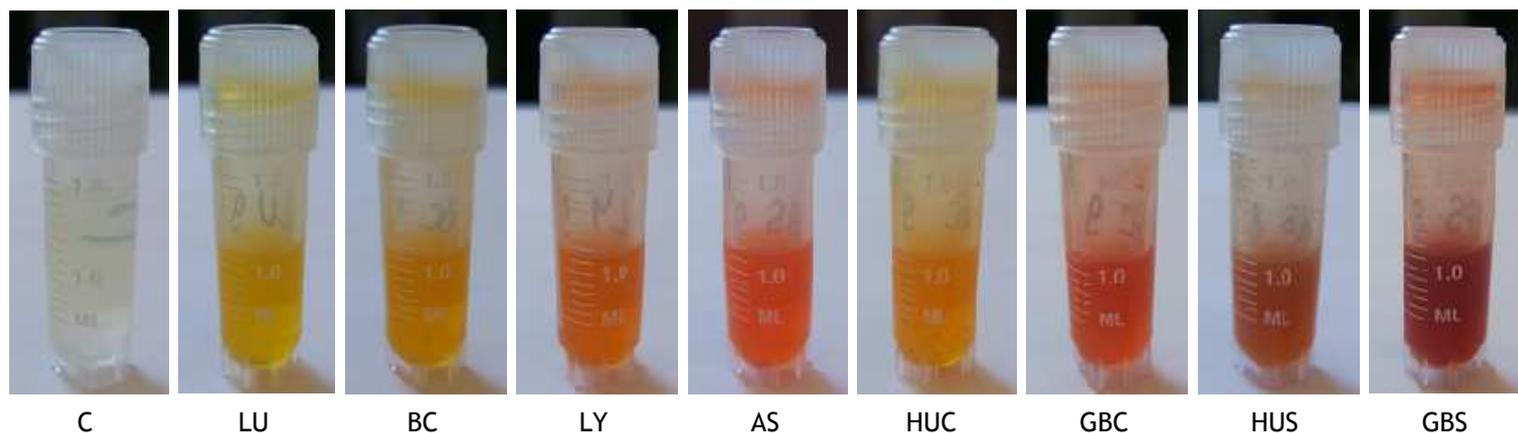
Les animaux utilisés pour ces expérimentations étaient des rats albinos de race Wistar, âgés de six semaines et de poids normal (environ 200 grammes). Les expériences ont été conduites conformément aux recommandations du Comité Ethique français sur l'expérimentation animale, après avoir déposé un dossier d'autorisation. La complémentation par gavage a été préférée à un régime sur plusieurs semaines car elle nécessite moins de caroténoïdes, or les caroténoïdes bactériens de HU36 et de GB1 ont été

fournis en quantités limitées par les partenaires du projet. Il est également beaucoup plus facile dans ce type d'expérimentation de contrôler précisément les volumes consommés par les animaux et de limiter la dégradation des caroténoïdes par oxydation à l'air ambiant.

Les gavages ont été effectués avec de l'huile d'arachide (choisie pour sa teneur nulle en caroténoïdes et très faible en  $\alpha$ -tocophérol) enrichie en caroténoïdes. Les divers caroténoïdes ont été mis en suspension dans l'huile d'arachide par solubilisation des solutions stocks dans l'huile puis évaporation des solvants sous azote (Sample Concentrator, avec Dri-block DB-3, Techne, Morancé en Beaujolais, France), de façon à obtenir des concentrations en caroténoïdes de 55  $\mu\text{mol/L}$ . Pour les essais avec les cellules de HU36 ou de GB1 contenant les caroténoïdes bactériens, le matériel lyophilisé a tout d'abord été tamisé afin d'obtenir un produit homogène de faible granulométrie plus facile à utiliser lors des gavages. Puis, la masse de cellules à suspendre dans l'huile a été calculée pour que le contenu molaire en caroténoïdes dans l'huile soit le même (environ 55  $\text{nmol/L}$ ), que l'on utilise des caroténoïdes purifiés ou des cellules bactériennes lyophilisées : 43,41  $\text{mg/L}$  pour HU36 et 35,92  $\text{mg/L}$  pour GB1.

Dix groupes composés de huit rats ont été constitués, et chacun a été complété trois fois avec un produit spécifique (figure 51) :

- groupe contrôle (C), gavé avec de l'huile d'arachide pure,
- groupe BC, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en  $\beta$ -carotène (exactement 169,4  $\text{nmol}$ , soit 454,0  $\mu\text{g/kg}$  rat en tout),
- groupe LY, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en lycopène (exactement 168,8  $\text{nmol}$ , soit 452,5  $\mu\text{g/kg}$  rat au total),
- groupe LU, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en lutéine (exactement 168,0  $\text{nmol}$ , soit 477,1  $\mu\text{g/kg}$  rat au total),
- groupe AS, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en astaxanthine (exactement 167,5  $\text{nmol}$ , soit 499,0  $\mu\text{g/kg}$  rat au total),
- groupe HUC, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en caroténoïdes purifiés de HU36 (exactement 170,3  $\text{nmol}$ , soit 638,6  $\mu\text{g/kg}$  rat au total),
- groupe GBC, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en caroténoïdes purifiés de GB1 (exactement 169,0  $\text{nmol}$ , soit 662,5  $\mu\text{g/kg}$  rat au total),
- groupe HUS, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en cellules et spores lyophilisés de HU36 (exactement 165,0  $\text{nmol}$ , soit 618,8  $\mu\text{g/kg}$  rat au total),
- groupe GBS, gavé avec de l'huile d'arachide enrichie en cellules et spores lyophilisés de GB1 (exactement 164,9  $\text{nmol}$ , soit 646,6  $\mu\text{g/kg}$  au total).



**Figure 51 :** Échantillons d’huile d’arachide, contrôle ou complétementée en caroténoïdes (ou en matériel bactérien lyophilisé), administrées aux différents groupes de rats lors des gavages pour les tests de biodisponibilité *in vivo*.

L’huile d’arachide enrichie en caroténoïdes a été donnée aux rats en complément d’un régime alimentaire de base composé de granulés et d’eau. Après une semaine d’acclimatation en animalerie, les animaux ont été traités pendant trois jours selon la procédure ci-dessous :

- retrait de la nourriture des rats la veille du premier gavage (J0),
- à J1, prise de sang intracardiaque le matin à jeun, sur 8 rats au hasard, puis réintroduction de la nourriture de base,
- à J1 et J2, administration le soir à chaque animal, de 1 mL d’huile d’arachide enrichie en caroténoïdes, à l’aide de canules introduites dans l’œsophage, puis retrait de la nourriture des rats après le deuxième gavage,
- à J3, prise de sang intracardiaque le matin à jeun, sur tous les rats, puis administration du troisième gavage,
- exécution des rats 4 heures après le dernier gavage et prélèvement d’échantillons de sang, de foie et de tissus adipeux épидидymal (bien représentatif des différents tissus adipeux de l’organisme chez le rat) ([Cinti 2005](#)). Les échantillons ont été immédiatement congelés dans l’azote liquide et conservés à -80°C jusqu’au dosage des caroténoïdes.

#### 4.6.2. Dosage des protéines sur les échantillons de tissus prélevés chez le rat

Les protéines des échantillons de foie et de tissus adipeux ont été dosées à l’aide d’un kit à base d’acide bicinchoninique, sur microplaques 96-puits (nunc™, Thermo Fisher, Roskilde, Danemark). Il s’agit d’une méthode colorimétrique, basée sur la liaison spécifique entre l’acide et les ions cuivre sous forme Cu(I) libérés par la réduction

stœchiométrique des ions Cu(II) en présence de protéines. Le complexe formé avec l'acide bicinchoninique est violet et l'absorbance mesurée par spectrophotométrie entre 540 et 590 nm est proportionnelle à la concentration de protéines dans l'échantillon. Le protocole hypersensible de cette méthode permet des dosages de protéines entre 5 et 250 µg/mL.

Le dosage des protéines a été effectué dans les échantillons de tissu selon le protocole suivant :

- broyage des échantillons de tissus (environ 150 mg) avec 300 µL de tampon phosphate (PBS),
- dilution de 50 µL de ces broyats dans du PBS, respectivement au 1/200<sup>ème</sup> et au 1/15<sup>ème</sup> pour le foie et le tissu adipeux,
- répartition en double de 25 µL de chaque échantillon dilué dans les puits d'une microplaque,
- ajout de 200 µL de réactif contenant l'acide bicinchoninique et les ions Cu(II) dans chaque puits,
- incubation de la microplaque pendant 30 min à 60°C avant mesure de l'absorbance sur lecteur de plaques (Labsystems iEMS reader MF, utilisé avec un logiciel Ascent Software, Thermo Labsystems, Issy-les-Moulineaux, France)

Une courbe étalon a été établie à l'aide d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA).

#### 4.6.3. Etude de l'expression génétique dans les cellules du tissu adipeux et du foie

##### 4.6.3.1. Extraction des ARN totaux

Les échantillons de tissu adipeux (environ 150 mg) et de foie (environ 20 mg) ont été décongelés dans la glace, puis transférés dans des tubes Eppendorf non stériles de 2 mL, avec deux billes en acier inoxydable (diamètres 1,5 et 3 mm) et 1 mL de TRIzol®. Ils ont été broyés jusqu'à homogénéisation totale, à l'aide d'un broyeur mécanique (Retsch MM301, Eragny-sur-Oise, France), à une fréquence de 20 vibrations/min, pendant au moins 2 minutes.

Puis, l'ARN a été extrait de chaque échantillon selon le protocole suivant, en réalisant chaque étape sur la glace et en utilisant du matériel strictement stérile ([Gouranton, Thabuis et al. 2011](#)) :

- ajout de 200 µL de CHCl<sub>3</sub> dans les tubes Eppendorf,
- agitation forte pendant 15 sec,

- repos pendant 2 à 3 min à température ambiante,
- centrifugation pendant 15 min, à 12 000 tr/min, à 4 °C (centrifugeuse Heraeus Labofuge 400R, équipée d'un rotor 3325B, Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France),
- récupération de la phase supérieure et transfert dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 mL,
- ajout de 500 µL d'isopropanol,
- agitation forte pendant 15 sec (l'apparition d'un trouble correspond à la précipitation de l'ARN),
- repos pendant 10 min à température ambiante,
- centrifugation pendant 25 min, à 12 000 tr/min, à 4 °C,
- élimination de la phase supérieure,
- ajout de 1 mL d'éthanol à 75 % sur les culots,
- lavage des culots par retournement des tubes,
- centrifugation pendant 25 min, à 12 000 tr/min, à 4 °C,
- élimination de la phase supérieure,
- après décantation, aspiration de l'excès d'alcool, puis séchage à l'air ambiant pendant 10 à 15 min,
- reprise dans environ 60 µL d'eau stérile et conservation à -80 °C jusqu'à utilisation pour formation d'ADNc (ADN complémentaire).

#### 4.6.3.2. Transcription reverse des ADNc

Les échantillons d'ARN extraits ont été décongelés à 4 °C, dénaturés par chauffage à 65 °C pendant 10 min sur bloc 20 positions (Lab-line Instruments 86201, Bioblock Scientific, Illkirch, France), puis immédiatement refroidis en les plaçant dans la glace.

Les concentrations d'ARN ont ensuite été mesurées par lecture d'absorbance à 260 nm, à partir de 1 µL de solution, sur spectrophotomètre UV/visible de précision pour micro-volumes (NanoDrop 1000, piloté par le logiciel ND-1000 version 3.7, labtech, Palaiseau, France). La pureté des échantillons a été vérifiée par mesure des ratios d'absorbance  $Abs_{(260\text{ nm})}/Abs_{(280\text{ nm})}$  et  $Abs_{(260\text{ nm})}/Abs_{(230\text{ nm})}$ , qui doivent être d'environ 2 et supérieur à 1,5 respectivement.

Puis, la transcription reverse des échantillons d'ARN en ADNc a été effectuée selon le protocole suivant en réalisant chaque étape sur la glace et en utilisant du matériel strictement stérile ([Gouranton, Thabuis et al. 2011](#)) :

- dépôt, dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, de 10 µL de réactif (contenant 292 µL de tampon 5X, 146 µL de DTT à 0,1 mol/L, 146 µL de dNTP à 5 mmol/L, 73 µL d'hexamères à 0,3 µg/µL et 73 µL de RTase à 200 U/µL),
- ajout de 1 µg d'ARN (calcul du volume correspondant, entre 1 et 10 µL, pour chaque échantillon, à partir des mesures de concentrations effectuées préalablement sur NanoDrop),
- ajout d'un volume d'eau stérile pour compléter le volume total dans chaque tube à 20 µL,
- centrifugation à 12 000 tr/min pendant 30 sec (centrifugeuse Mini Spin, équipée d'un rotor F45-12-11, Eppendorf, Le Pecq, France), afin de concentrer tous les réactifs dans le fond des tubes,
- incubation au bain-marie à 37°C pendant 1 heure,
- refroidissement immédiatement après dans la glace,
- ajout de 80 µL d'eau stérile et conservation à -80°C jusqu'à utilisation pour PCR.

#### 4.6.3.3. Réaction quantitative de polymérisation en chaîne (Q-PCR)

Les échantillons d'ADNc ont été décongelés à température ambiante. Si les PCR sont effectuées sur plusieurs jours, les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur à 4°C. Puis la PCR quantitative en temps réel a été effectuée sur thermocycleur Mx3005P™ (système qPCR, piloté par le logiciel MxPRO 2007, version 4.01, Stratagène, Massy, France), afin d'amplifier les ADNc et de les quantifier, en vue d'analyser les profils d'expression de chaque gène d'intérêt.

Un intercalant a été utilisé pour mesurer la quantité d'ADN amplifié à chaque cycle de la PCR : le SYBR green fluoresce lorsqu'il se fixe à l'ADN double brin. Ainsi, plus le nombre de cycles de PCR nécessaire à atteindre le seuil de fluorescence est grand, plus la quantité d'ADNc cible est faible.

La PCR a été réalisée en conditions stériles sur des plaques 96 puits (microplaques de détection Thermo-Fast® 96, type AB-1100, Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), selon le protocole suivant ([Landrier, Malezet-Desmoulins et al. 2008](#)) :

- dépôt de 10  $\mu\text{L}$  de mix de polymérisation (contenant 6,25  $\mu\text{L}$  de SYBR green, 3  $\mu\text{L}$  d'eau stérile, 0,375  $\mu\text{L}$  de primer « sens » et 0,375  $\mu\text{L}$  de primer « antisens » du gène d'intérêt à 10 pmol/L),
- ajout de 2,5  $\mu\text{L}$  de solution d'ADNc préalablement préparée par transcription reverse,
- fermeture des puits à l'aide de barrettes de 8 bouchons (Ultra Clear 8-cap Strip, type AB-0866, Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France),
- centrifugation à 2 000 tr/min pendant 1,5 min (centrifugeuse Jouan BR4, équipée d'un rotor pour microplaques Thermo Electro S20, Jouan, Saint-Herblain, France), afin de concentrer tous les réactifs dans le fond des puits,
- insertion de la plaque dans le rail du système Mx3005P™ et lancement du run de PCR, avec 40 cycles thermiques de 2,25 min (2 min à 50°C, puis monté à 95°C en 1 min, puis retour à 50°C en 15 sec). La polymérisation a lieu rapidement, lors du passage à 60°C.

Pour chaque échantillon, la PCR a été réalisée en double. Un double négatif avec de l'eau stérile, nommé NTC (No Template Control) a également été ajouté.

Puis, pour chaque échantillon, l'expression relative d'un gène d'intérêt a été normalisée en effectuant une PCR supplémentaire avec un gène de référence, le 18S, exprimé constitutivement chez les animaux ([Livak and Schmittgen 2001](#)). L'expression de 12 gènes d'intérêt a ainsi été mesurée dans les échantillons de tissu adipeux : 4 gènes de la fonction adipocytaire (PPAR $\gamma$ , adiponectine, leptine et LPL), 4 gènes caractéristiques de l'inflammation (TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$  et MCP1) et 3 gènes de transporteurs membranaires (CD36, SRB1 et AP2). Enfin, l'expression des 3 gènes de transporteurs membranaires CD36, SRB1 et AP2 a également été mesurée dans les échantillons de foie afin de comparer leur expression dans le foie et le tissu adipeux.

#### 4.7. Quantification des caroténoïdes par analyse HPLC

##### 4.7.1. Extraction des caroténoïdes lors des expérimentations *in vitro*

Les caroténoïdes ont été extraits dans les échantillons de repas homogénéisés, de digestats, de micelles mixtes des digestions *in vitro*, de micelles mixtes artificielles, de cellules et de milieux de culture apicaux et basolatéraux, selon le protocole suivant :

- mélange de 500 µL d'échantillon, 500 µL de 8'-apo-β-caroténal (étalon interne) dans l'éthanol et 2 mL d'hexane dans des tubes en verre de 10 mL portant un bouchon en téflon,
- homogénéisation pendant 5 min sur vortex (Vibrax VXR basic et portoir Typ-VX2, IKA®-Werke, Staufen, Allemagne),
- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 4°C (Jouan GR412-W rotor, Saint-Herblain, France),
- récupération de la phase supérieure et transfert dans des tubes à hémolyse pour évaporation sous azote (Sample Concentrator, avec Dri-block DB-3, Techne, Morancé en Beaujolais, France),
- ajout de 2 mL de dichlorométhane sur la phase aqueuse,
- homogénéisation sur vortex pendant 5 min,
- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 4°C,
- récupération de la phase inférieure et transfert dans les tubes à hémolyse avec les prélèvements précédents,
- évaporation sous azote, jusqu'à obtention d'un résidu sec.

#### 4.7.2. Extraction des caroténoïdes lors des expérimentations *in vivo*

La procédure d'extraction des caroténoïdes à partir des tissus animaux a dû être adaptée à chaque type d'échantillons.

##### 4.7.2.1. A partir des échantillons de sang

Immédiatement après chaque prélèvement sanguin (prises de sang à jeun puis ponction cardiaque) les échantillons ont été placés dans des tubes contenant de l'héparine à 1 % , agités et centrifugés afin de séparer et de récupérer le plasma (ensuite conservé à -80°C jusqu'à l'extraction).

La méthode d'extraction des caroténoïdes du plasma est similaire à celle utilisée lors des tests *in vitro* :

- mélange de 300 à 500 µL d'échantillon (en fonction des volumes disponibles), 500 µL de 8'-apo-β-caroténal (étalon interne) dans l'éthanol et 2 mL d'hexane dans des tubes en verre de 10 mL portant un bouchon en téflon,
- homogénéisation pendant 5 min sur vortex (Vibrax VXR basic et portoir Typ-VX2, IKA®-Werke, Staufen, Allemagne),

- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 4 °C (centrifugeuse GR412-W à rotor, Jouan Saint-Herblain, France),
- récupération de la phase supérieure et transfert dans des tubes à hémolyse pour évaporation sous azote (Sample Concentrator, avec Dri-block DB-3, Techne, Morancé en Beaujolais, France),
- ajout de 2 mL de dichlorométhane sur la phase aqueuse,
- homogénéisation sur vortex pendant 5 min,
- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 4 °C,
- récupération de la phase inférieure et transfert dans les tubes à hémolyse avec les prélèvements précédents,
- évaporation sous azote, jusqu'à obtention d'un résidu sec.

#### 4.7.2.2. A partir des échantillons de foie

Pour les extractions à partir des échantillons de foie, il a été nécessaire de broyer préalablement le tissu. Pour cela, une méthode utilisant l'agitation de billes en inox a été choisie. Deux billes en acier inoxydable (de diamètres 1,5 mm et 3 mm) ont été placées avec l'échantillon et 300 µL de tampon phosphate (PBS) dans des tubes Eppendorf. Le broyage a été effectué grâce à un agitateur mécanique (Retsch MM301, Eragny-sur-Oise, France), à une fréquence de 20 vibrations/s, pendant 2 minutes.

Ensuite, 250 µL de l'homogénat obtenu ont été récupérés et extraits de la façon suivante :

- mélange de 250 µL d'échantillon, 150 µL de PBS, 500 µL de dichlorométhane et 1 mL de méthanol dans des tubes en verre de 10 mL portant un bouchon en téflon,
- homogénéisation pendant 5 min sur vortex (Vibrax VXR basic et portoir Typ-VX2, IKA®-Werke, Staufen, Allemagne),
- ajout de 500 µL de dichlorométhane et de 500 µL d'eau bidistillée,
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- centrifugation pendant 10 min à 2 500 tr/min, à 10 °C (centrifugeuse GR412-W à rotor, Jouan Saint-Herblain, France),
- récupération de la phase inférieure et transfert dans des tubes en verre de 7 mL (extraction lipidique totale, selon la méthode de Blight & Dyer),
- évaporation sous azote jusqu'à obtention d'un résidu sec,

- ajout de 500 µL d'eau bidistillée, 500 µL de 8'-apo-β-caroténal (étalon interne) dans l'éthanol et 2 mL d'hexane sur le résidu,
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 4°C,
- récupération de la phase supérieure et transfert dans des tubes à hémolyse pour évaporation sous azote (Sample Concentrator, avec Dri-block DB-3, Techne, Morancé en Beaujolais, France),
- ajout de 2 mL de dichlorométhane sur la phase aqueuse,
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 10°C,
- récupération de la phase inférieure et transfert dans les tubes à hémolyse avec les prélèvements précédents,
- évaporation sous azote, jusqu'à obtention d'un résidu sec.

#### 4.7.2.3. A partir des échantillons de tissu adipeux épидидymal

Les échantillons de tissu épидидymal (150 mg) ont également été broyés avec 300 µL de PBS et deux billes en acier inoxydable (diamètres 1,5 et 3 mm) afin d'obtenir des produits homogènes avant l'extraction. En raison de la très forte teneur en esters d'acides gras dans ces échantillons, il a en outre été nécessaire d'ajouter une étape de saponification au cours de l'extraction ([Gleize, Steib et al. 2011](#)). En effet, ces esters auraient gêné l'identification et la quantification des caroténoïdes lors de la lecture des chromatogrammes obtenus par analyse HPLC.

La méthode d'extraction adaptée à ces tissus est donc la suivante :

- mélange de 250 µL d'échantillon, 150 µL de PBS, 500 µL de dichlorométhane et 1 mL de méthanol dans des tubes en verre de 10 mL portant un bouchon en téflon,
- homogénéisation pendant 5 min sur vortex (Vibrax VXR basic et portoir Typ-VX2, IKA®-Werke, Staufen, Allemagne),
- ajout de 500 µL de dichlorométhane et de 500 µL d'eau bidistillée,
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- centrifugation pendant 10 min à 2 500 tr/min, à 10°C (centrifugeuse GR412-W à rotor, Jouan Saint-Herblain, France),
- récupération de la phase inférieure et transfert dans des tubes en verre de 7 mL (extraction lipidique totale, selon Blight & Dyer),

- évaporation sous azote jusqu'à obtention d'un résidu sec,
- ajout de 1 mL de KOH à 5,5 % (m/v) dans l'éthanol et de 100 µL de pyrogallol (antioxydant limitant l'effet du KOH sur les caroténoïdes) fraîchement préparé (120 mg / 10 mL d'éthanol),
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- incubation pendant 90 min à 37°C, sous agitation à 2 350 tr/min (saponification des esters d'acides gras),
- ajout de 1 mL d'eau bidistillée, 250 µL de 8'-apo-β-caroténal (étalon interne) dans l'éthanol et 3 mL d'hexane,
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 4°C,
- récupération de la phase supérieure et transfert dans de nouveaux tubes,
- ajout de 1 mL d'eau bidistillée et 1 mL d'éthanol dans les nouveaux tubes (rinçage de l'extrait de caroténoïdes pour éliminer le KOH),
- homogénéisation sur vortex pendant 1 min,
- centrifugation pendant 5 min à 2 500 tr/min, à 10°C,
- récupération de la phase supérieure et transfert dans des tubes à hémolyse,
- évaporation sous azote (Sample Concentrator, avec Dri-block DB-3, Techne, Morancé en Beaujolais, France), jusqu'à obtention d'un résidu sec.

#### 4.7.3. Méthode d'analyse

Tous les résidus secs obtenus après extraction des caroténoïdes ont été repris dans 200 µL d'un mélange MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (65:35, v/v) et vortexés (Harmony mixer uzusio VTX-3000L, LMS, Tokyo, Japon). Puis ils ont été placés dans des inserts (Interchrom, en verre clair, longueur 9-10 mm, 250 µL, Interchim, Montluçon, France) à l'intérieur de flacons de chromatographie (Interchrom, en verre clair, 12 x 32 mm, 2 mL, fermés par clips de 11 mm en butyl-PTFE, Interchim, Montluçon, France), en vue de leur analyse.

Les caroténoïdes ont ensuite été quantifiés par analyse HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) en phase inverse, sur un système Dionex (Dionex France, Vinsins-le-Bretonneux, France), équipé d'une pompe Dionex P680, d'un dégazeur Gastorr BG-14 (FLOM Co., Ltd., Tokyo, Japon), d'un injecteur automatique d'échantillons Dionex ASI-100 et d'un détecteur UV/visible Dionex UVD340U.

Les caroténoïdes ont été séparés à 35°C, à l'aide d'une colonne C30 (250 x 4,6 nm, S-5 µm, YMC Separation Technology, Interchim, Montluçon, France), à base de silice 200 Å avec greffage polymérique permettant la séparation des isomères de caroténoïdes. Trois solvants ont été utilisés pour le gradient d'élution : du méthanol (A), du TBE (B) et de l'eau bidistillée (C). Le flux d'élution était de 1 mL/min (pression entre 45 et 65 bars selon les proportions de solvants), et le gradient appliqué était le suivant :

- à t<sub>0</sub>, 96 % de A, 2 % de B et 2 % de C,
- entre 0 et 27 min, gradient linéaire jusqu'à 20 % de A, 80 % de B et 0 % de C,
- entre 27 et 28 min, maintien de 20 % de A, 80 % de B et 0 % de C,
- entre 28 et 29 min, retour à 96 % de A, 2 % de B et 2 % de C,
- entre 29 et 32 min, maintien de 96 % de A, 2 % de B et 2 % de C.

Les caroténoïdes élués ont été identifiés grâce à leur temps de rétention et leur spectre entre 300 et 595 nm, par comparaison avec des standards purs de concentration connue (tableau X). Puis, ils ont été quantifiés grâce à des courbes étalons et à la mesure des aires de l'étalon interne et de leurs pics à  $\lambda_{\text{MAX}}$  (445 nm pour la lutéine, 455 nm pour le  $\beta$ -carotène et les caroténoïdes de HU36, 470 nm pour le lycopène et l'astaxanthine et 495 nm pour les caroténoïdes de GB1). Le chromatographe était relié à l'ordinateur par une interface Dionex UCI-50 et le traitement des données a été effectué avec le logiciel Chromeleon (Dionex Chromatography Management system, version 6.80).

**Tableau X** : Longueurs d'ondes maximales d'absorption et coefficients d'absorption molaire appliqués pour les mesures de concentration par spectrophotométrie, des échantillons de caroténoïdes utilisés pour tracer les courbes étalon en HPLC.

	solvants	$\lambda_{\text{MAX}}$ (nm)	$\epsilon^*$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
lycopène	hexane	472	184 920
$\beta$ -carotène	hexane	460	138 931
lutéine	éthanol	445	144 840
astaxanthine	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :hexane (10:90, v/v)	470	125 160
caroténoïdes de HU36	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	454	165 000
caroténoïdes de GB1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	502	225 300

\* Les coefficients d'absorption des caroténoïdes de référence ont été obtenus dans la bibliographie (Cf. § 4.1). Les coefficients d'absorption des caroténoïdes bactériens ont été déterminés à partir de la bibliographie et de calculs de ratios d'absorbance entre solvants (Cf. § 2.3.1).

#### 4.8. Calculs de bioaccessibilité, de taux de micellarisation, d'efficacité d'absorption intestinale et de biodisponibilité

La bioaccessibilité a été calculée comme le pourcentage de caroténoïdes sous forme native incorporés dans les micelles mixtes à l'issue de la digestion *in vitro*, par rapport à la quantité initiale contenue dans les aliments (ou dans l'huile dans le cas des caroténoïdes purs).

L'incorporation des caroténoïdes dans les micelles artificielles est définie comme le pourcentage de caroténoïdes purs retrouvés dans la fraction micellaire après filtration, par rapport à la quantité totale de caroténoïdes disponibles dans le milieu (ajoutés lors de la préparation des micelles).

L'absorption des caroténoïdes par les cellules Caco-2 en culture correspond au pourcentage de caroténoïdes sous forme native retrouvés dans les cellules de l'épithélium intestinal, par rapport à la quantité totale de caroténoïdes déposés dans le milieu apical des cellules en culture.

La biodisponibilité *in vitro* a ensuite été calculée comme le produit de la bioaccessibilité et de l'absorption cellulaire.

La biodisponibilité *in vivo* chez le rat correspond au pourcentage de caroténoïdes totaux retrouvés dans le plasma, le foie et le tissu adipeux prélevés, par rapport à la quantité de caroténoïdes ingérés par les animaux au cours des trois jours de gavage. Les résultats *in vivo* ont été exprimés sous forme de moyennes (avec leurs écarts-types) sur 6 à 8 répétitions (en fonction du nombre de rats dans chaque groupe).

## 5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

Les teneurs résiduelles de caroténoïdes stables en présence de fer et les résultats de mesure de pouvoir antioxydant dans les deux modèles ont été calculés à partir de la moyenne de trois essais. Les résultats de bioaccessibilité, d'incorporation dans les micelles artificielles, et d'absorption dans les cellules Caco-2 ont été calculés à partir de la moyenne de trois essais. Les résultats de biodisponibilité *in vivo* et de variation de l'expression génétique ont été calculés à partir de six à huit répétitions (selon le nombre de rats dans chaque groupe). Tous les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes, avec leurs écarts-types.

Pour la comparaison des résultats, des tests statistiques de comparaison des moyennes ont été effectués à l'aide du logiciel StatView version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA). Les différences de moyennes ont été considérées significatives lors de valeurs de probabilité (*P*-values) inférieures à 0,05.

Concernant les tests physico-chimiques et les tests nutritionnels *in vitro*, les données étant issues d'une distribution paramétrée (distributions normales, variances égales), un test ANOVA a été utilisé, complété par le test *a posteriori* de Tuckey-Kramer.

En revanche, pour les tests *in vivo*, les données sont issues d'une distribution non-paramétrée ; un test de Kruskal-Wallis a donc été utilisé, suivi d'*U*-tests deux-à-deux de Mann-Whitney dans le cas d'une différence mise en évidence par le test de Kruskal-Wallis.

Enfin, des études de corrélations entre différents résultats *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées à l'aide du logiciel StatView version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA), en utilisant un test de régression simple. Les corrélations ont été considérées significatives lors de valeurs de probabilité (*P*-values) inférieures à 0,05.

---

Problématique A :

**STABILITÉ ET  
MÉCANISMES  
RÉACTIONNELS DES  
CAROTÉNOÏDES**

---



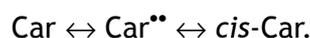
## 1. ÉTAT DE L'ART : DEGRADATION NON ENZYMATIQUE DES CAROTÉNOÏDES, EXEMPLES

La structure polyisoprénoïque caractéristique des caroténoïdes leur confère de nombreuses propriétés mais est aussi responsable de leur grande sensibilité à la dégradation en présence de divers facteurs. Les insaturations de la chaîne linéaire sont autant de lieux de coupure potentiels ([El-Tinay and Chichester 1970](#); [Caris-Veyrat, Amiot et al. 2001](#)). La coupure centrale du  $\beta$ -carotène produit par exemple du rétinol (vitamine A). Selon les caroténoïdes, les groupements terminaux peuvent aussi être dégradés dans certaines conditions, libérant des composés à chaîne plus courte avec des fonctions terminales aldéhyde ou cétone ([Mordi 1993](#); [Caris-Veyrat, Amiot et al. 2001](#)). Les sources d'oxydation des caroténoïdes sont diverses et déterminent les mécanismes mis en jeu et la nature des produits formés ([Handelman, Vankuijk et al. 1991](#)). Toutefois, les agents de dégradation sont souvent multiples et, une fois l'oxydation initiée, les caroténoïdes peuvent également réagir avec les nouveaux produits formés. Dans les milieux naturels les produits dérivés de la dégradation des caroténoïdes peuvent alors être extrêmement nombreux et variés ([El-Tinay and Chichester 1970](#); [Boon, McClements et al. 2010](#)).

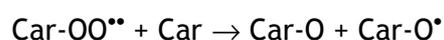
### 1.1. Autoxydation

#### 1.1.1. Mécanismes réactionnels

Les caroténoïdes réagissent très facilement avec l'oxygène de l'air, en particulier lorsqu'il s'agit d'extraits ou lorsqu'ils sont étudiés dans des milieux solvants organiques. L'autoxydation implique la formation de radicaux libres ([Mordi 1993](#); [Finkelshtein and Krasnokutskaya 1996](#); [Martin, Ruck et al. 1999](#)) et pourrait commencer par un mécanisme d'isomérisation (figure 52) avec des produits intermédiaires peroxydes biradicalaires ([Boon, McClements et al. 2010](#)) :



Les intermédiaires biradicalaires étant instables, ils peuvent réagir avec l'oxygène de l'air pour libérer des endoperoxydes et des époxydes, puis des composés secondaires d'oxydation ([Mordi, Walton et al. 1993](#); [Boon, McClements et al. 2010](#)) :



Car-O  $\rightarrow$  composés carbonyles, dioxydes et acides carboxyliques

De plus, la configuration des isomères *cis* favorise les attaques d'atomes d'oxygène de part et d'autre de la double liaison *cis*. Cette réaction libère des radicaux peroxydes du caroténoïde, qui réagissent eux-mêmes et libèrent des formes stables époxydes ou dioxétanes, puis des apocaroténals et des apocaroténones ([Mordi 1993](#)).

Une étude cinétique consistant à suivre les produits d'autoxydation du  $\beta$ -carotène au cours du temps a révélé que la dégradation du caroténoïde suit un ordre bien défini ([Mordi, Walton et al. 1993](#)). Au début de l'oxydation, les principaux produits formés sont le 5,6-époxy- $\beta$ -carotène, le 15,15'-époxy- $\beta$ -carotène (figure 52), des diépoxydes et une série d'apo- $\beta$ -caroténals et apo- $\beta$ -caroténones (produits de coupure, figure 53). Puis, les teneurs en oligomères non-identifiés très hydrophobes et en composés carbonyles augmente. Dans les dernières étapes de l'oxydation, les apo- $\beta$ -caroténals à longue chaîne sont eux-mêmes oxydés (figure 53) pour former des composés carbonyles plus courts (13-apo- $\beta$ -caroténone,  $\beta$ -ionone, 5,6-époxy- $\beta$ -ionone, dihydroactinidiolide et acides carboxyliques). Des observations complémentaires ont montré que l'acide rétinoïque dérivé des caroténoïdes précurseurs de vitamine A peut lui-même réagir directement avec l'oxygène de l'air à température ambiante, formant essentiellement des acides époxy-dihydrorétinoïques, épidioxy-dihydrorétinoïques et hydroxy-dihydrorétinoïques ([Finkelshtein and Krasnokutskaya 1996](#)).

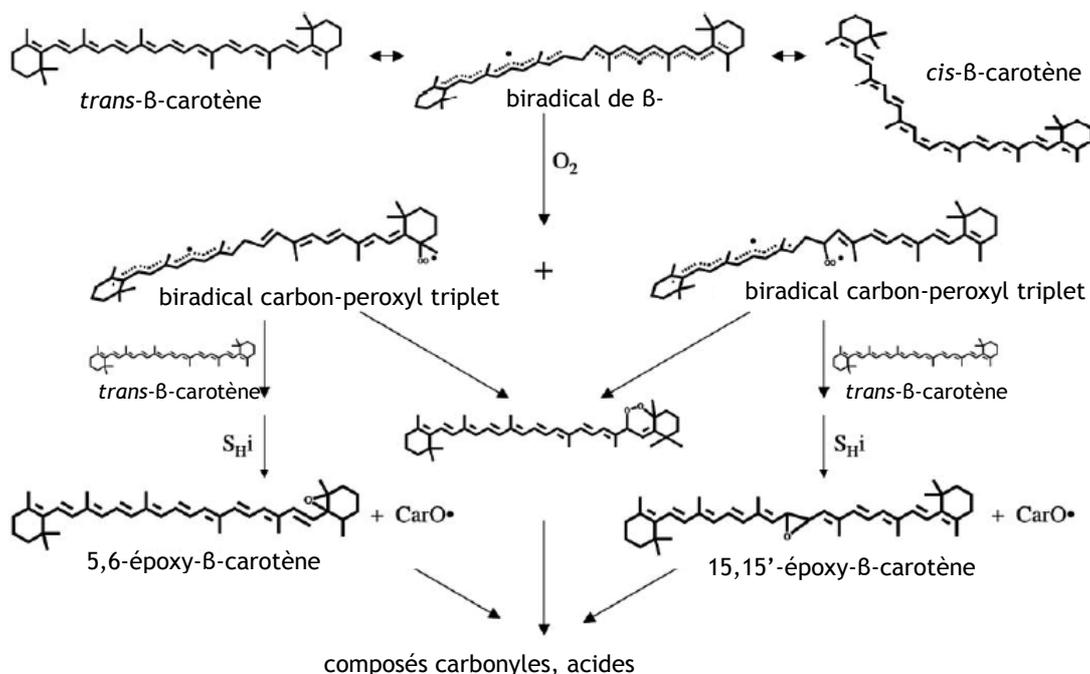
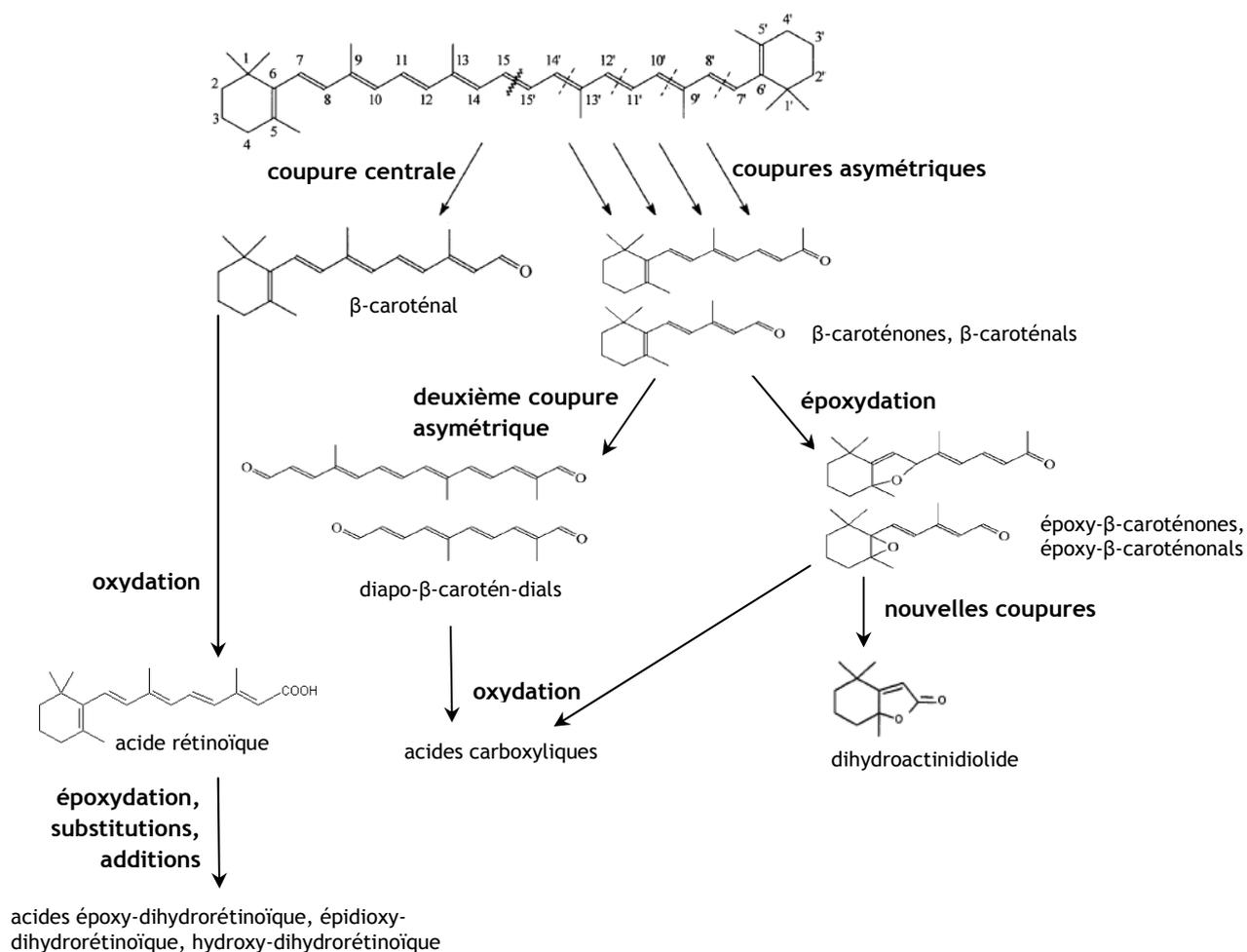
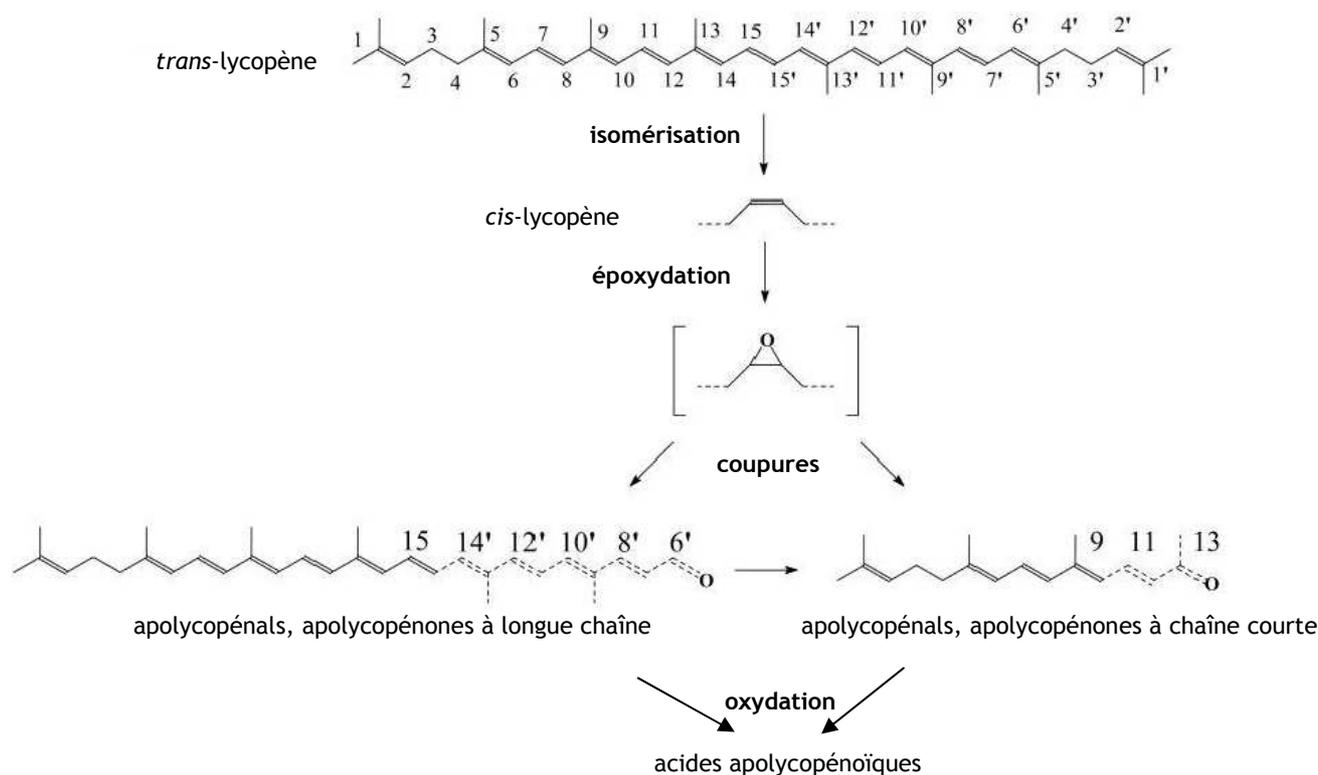


Figure 52 : Initiation de l'autoxydation du  $\beta$ -carotène par une réaction d'isomérisation et formation d'époxydes à partir d'intermédiaires réactionnels biradicalaires ([Benevides, Veloso et al. 2011](#)).



**Figure 53 :** Initiation de l'autoxydation du  $\beta$ -carotène par des réactions de coupure oxydative et exemples d'étapes successives d'oxydation et d'époxydation. D'après (Caris-Veyrat, Amiot et al. 2001).

L'autoxydation du lycopène peut *a priori* se produire au niveau des 11 doubles liaisons conjuguées de la molécule. Les produits formés sont des acyclo-apocaroténals et acyclo-apocaroténones de différentes longueurs, à partir d'intermédiaires époxydes (Caris-Veyrat, Schmid et al. 2003). Comme les produits du  $\beta$ -carotène, ils peuvent ensuite être eux-mêmes oxydés pour former des acides (figure 54). Par exemple, le 10-apolycopénal, la 13-apolycopénone, l'acyclorétinal, le 14'-apolycopénal, le 12'-apolycopénal, le 10'-apolycopénal, le 8'-apolycopénal, le 6'-apolycopénal et l'acide acyclorétinoïque ont été identifiés comme produits de coupure et d'oxydation au cours de la dégradation du lycopène en milieu aqueux stabilisé par un tensioactif chimique (Kim, Nara et al. 2001).



**Figure 54** : Initiation de l'autoxydation du lycopène des réactions d'isomérisation, suivies d'étapes successives d'époxydation, de coupures oxydatives et d'oxydations ([Caris-Veyrat, Schmid et al. 2003](#)).

Un autre exemple : le  $\zeta$ -carotène peut être clivé par autoxydation au niveau de cinq doubles liaisons conjuguées lorsqu'il est dans un système de suspension liposomale. Des composés carbonyles à longue chaîne et à courte chaîne sont libérés. Les principaux produits sont des aldéhydes et de l'acide 4,5-didehydrogéranyl-géranioïque ([Kim 2004](#)).

### 1.1.2. Données cinétiques

Tout d'abord, l'autoxydation des caroténoïdes en présence de  $O_2$  accélère avec l'augmentation de la pression partielle en oxygène ([Mordi, Walton et al. 1993](#); [Takahashi, Shibasaki-Kitakawa et al. 1999](#)).

Par ailleurs, les cinétiques d'autoxydation varient selon la nature du milieu réactionnel. En milieu modèle aqueux, par exemple, l'autoxydation du  $\beta$ -carotène tout-*trans*, du 9-*cis*- $\beta$ -carotène, de la  $\beta$ -cryptoxanthine ou du lycopène suit une cinétique linéaire ([El-Tinay and Chichester 1970](#); [Henry, Puspitasari-Nienaber et al. 2000](#)).

La sensibilité à l'autoxydation et la vitesse des réactions dépendent aussi de la structure des caroténoïdes ([Prokhorova and Revina 2001](#)). L'importance des phénomènes d'autoxydation dépend notamment des groupements fonctionnels de la molécule et de leur faculté à stabiliser ou pas les intermédiaires radicalaires de la réaction (Cf. § 1.5.2). Les molécules les plus sensibles à la dégradation par l'oxygène sont, dans l'ordre, le lycopène (dégradé particulièrement vite), le  $\beta$ -cryptoxanthine, le  $\beta$ -carotène tout-*trans* et enfin le 9-*cis*- $\beta$ -carotène ([Henry, Puspitasari-Nienaber et al. 2000](#)). Par exemple, l'autoxydation du  $\beta$ -carotène maintenu à l'abri de la lumière dans le benzène ou le tétrachlorométhane est induite en moins d'une heure en présence d'oxygène et la dégradation totale est rapide ([Handelman, Vankuijk et al. 1991](#)). Au contraire, les caroténoïdes à groupement céto (ex : canthaxanthine, astaxanthine) et la violaxanthine sont moins sensibles à la dégradation ([Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)). La  $\beta$ -ionone non-substituée (9-*apo*- $\beta$ -caroténone) est une molécule très sensible aux modifications en présence d'oxygène. En revanche, une substitution en position 3 du cycle tend à stabiliser la molécule ([Ramakrishnan 1974](#)).

## 1.2. Sensibilité à la chaleur

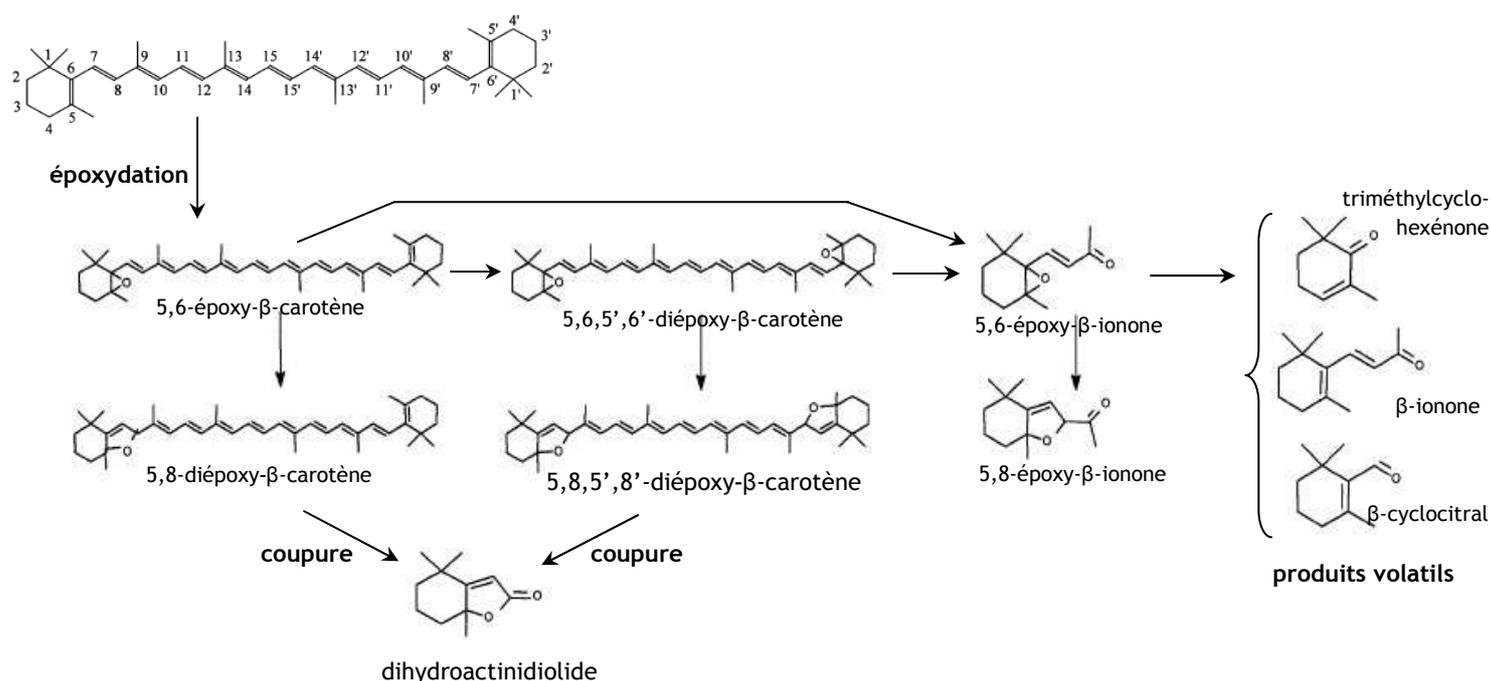
Les caroténoïdes alimentaires sont susceptibles d'être dégradés lors de la transformation des produits et en particulier lors des étapes de chauffage. La dégradation thermique des caroténoïdes en présence d'oxygène induit la formation de composés volatils en plus des époxydes, diépoxydes, apocaroténals apocaroténones, et plusieurs isomères *cis* ([Boon, McClements et al. 2010](#)) :



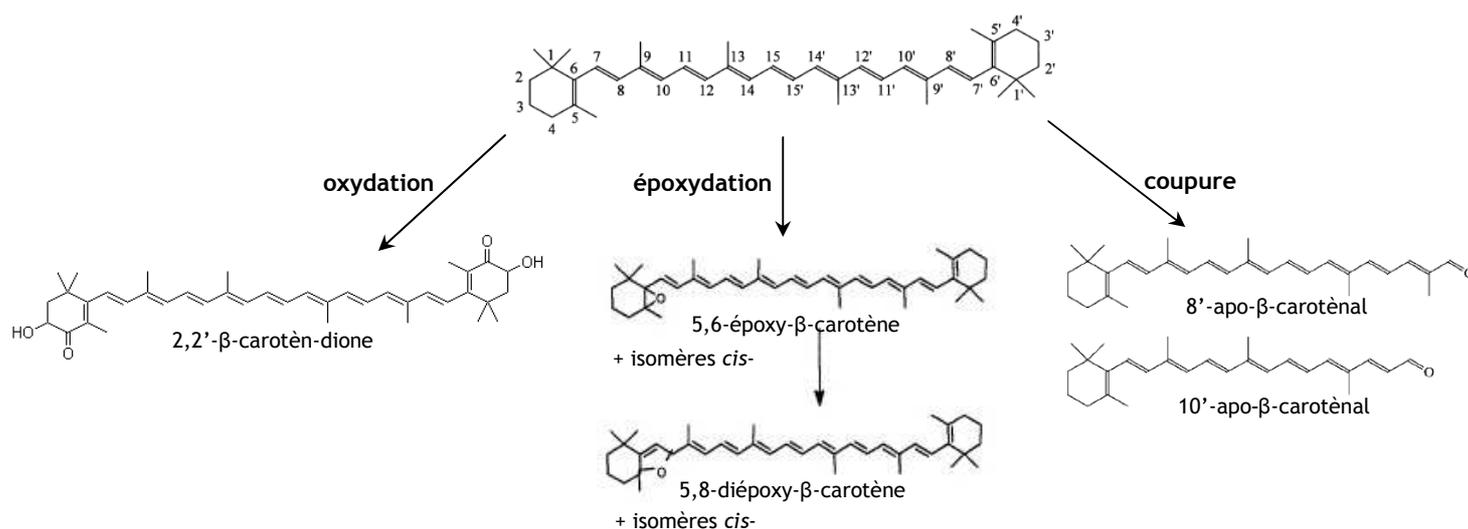
Toutes les doubles liaisons des caroténoïdes peuvent être oxydées à haute température. La coupure de ces doubles liaisons commence préférentiellement au niveau des terminaisons puis progresse vers le centre de la molécule. En outre, la formation des époxydes en présence de chaleur et d'oxygène implique diverses espèces radicalaires qui réagissent avec l'oxygène de l'air et libèrent de nouveaux radicaux peroxydes, qui peuvent oxyder d'autres caroténoïdes.

La dégradation des caroténoïdes dépend de la température et de la durée du chauffage ([Onyewu, Ho et al. 1986](#); [Kanasawud and Crouzet 1990](#)) (ex : à 210°C, le  $\beta$ -carotène est presque totalement dégradé en 15 min ; à 97°C la dégradation est plus progressive, et le caroténoïde reste stable pendant plusieurs heures à 30°C).

Les produits varient aussi avec la composition du milieu. En solution aqueuse, le chauffage du  $\beta$ -carotène à 97°C en présence d'oxygène libère d'abord des époxydes (figure 52). Le 5,6-époxy- $\beta$ -carotène est ensuite converti (figure 55) en mutatochrome (5,8-époxy-), 5,6,5',6'-diépoxy- $\beta$ -carotène ou en lutéochrome (intermédiaire 5,6,5',8'-diépoxy-). Le lutéochrome produit de l'aurochrome (5,8,5',8'-diépoxy-), ensuite clivé en dihydroactinidiolide (produit principal). Le 2,6-époxy- $\beta$ -carotène est aussi clivé en 5,6-époxy- $\beta$ -ionone, qui est le principal précurseur des produits volatils de la dégradation : elle est convertie en  $\beta$ -ionone, en triméthylcyclohexanone (qui donne triméthylcyclohexénone) et en triméthylcyclohexane-carboxaldéhyde (qui donne du  $\beta$ -cyclocitral) (Kanasawud and Crouzet 1990). En milieu lipidique contenant des triacylglycérols, l'oxydation du  $\beta$ -carotène par un chauffage à 110°C produit essentiellement des époxydes (5,8-époxy- $\beta$ -carotène et du 5,6-époxy- $\beta$ -carotène, ainsi que leurs isomères *cis* 15-*cis*-5,6-époxy- $\beta$ -carotène, 13-*cis*-5,6,5',6'-diépoxy- $\beta$ -carotène, 5,6-époxy-8'-apo- $\beta$ -caroténal), et quelques composés carbonylés (8'-apo- $\beta$ -caroténal, 6'-apo- $\beta$ -caroténal, et 2,2'- $\beta$ -carotène-dione) (figure 56) (Zeb and Murkovic 2011).



**Figure 55 :** Formation d'époxydes et de produits volatils issus de la dégradation du  $\beta$ -carotène soumis à un chauffage en milieu aqueux.



**Figure 56 :** Formation de composés carbonyles et d'époxydes issus de la dégradation du β-carotène soumis à un chauffage en milieu lipidique.

### 1.3. Sensibilité à la lumière

#### 1.3.1. Par réaction directe avec l'énergie lumineuse

L'exposition à la lumière induit la dégradation des caroténoïdes, qui se manifeste par un blanchiment plus ou moins rapide selon les sources lumineuses (UV naturels, flash laser...) ([Scita 1992](#)). En premier lieu, la photo-irradiation provoque le passage des caroténoïdes à l'état excité sous l'effet de l'énergie lumineuse. Puis, le caroténoïde sous forme excitée réagit avec le milieu et l'oxydation libre notamment des radicaux cations de caroténoïdes ([Boon, McClements et al. 2010](#)) :



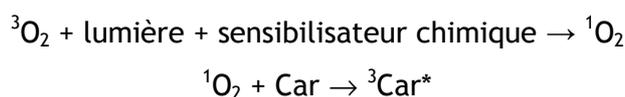
La dégradation se fait selon plusieurs mécanismes réactionnels possibles. L'augmentation de la pression partielle en oxygène, par exemple, accélère la réaction ([Limbo, Torri et al. 2007](#)).

Disous dans des solvants anhydres, les caroténoïdes se dégradent à la lumière selon une cinétique d'ordre zéro, alors que leur dégradation suit une cinétique d'ordre un en milieu aqueux. L'augmentation de l'intensité lumineuse et de la température accélère la dégradation mais sans modifier l'allure des cinétiques. Le calcul des paramètres cinétiques (énergie d'activation et enthalpie d'activation) indique que la décoloration des caroténoïdes est la première étape de leur dégradation, quelle que soit la structure des pigments et les conditions expérimentales. En revanche, l'allure des cinétiques de cette

première étape de dégradation varie fortement en fonction de la nature des pigments et des conditions ([Minguez-Mosquera and Jarengalan 1995](#)). En présence de lumière naturelle, la photo-oxydation dégrade les carotènes et les xanthophylles selon des vitesses différentes. Le lycopène est le plus sensible, puis le  $\beta$ -carotène, alors que la zéaxanthine et la lutéine sont les plus résistantes ([Siems, Sommerburg et al. 1999](#)). Ces deux xanthophylles peu dégradés par l'énergie lumineuse sont aussi les pigments majoritaires dans la rétine de la plupart des espèces animales.

### 1.3.2. En présence de réactifs photosensibilisateurs

En présence de divers sensibilisateurs, l'oxygène singulet est facilement formé par voie photochimique. Il provoque ou accélère alors les mécanismes d'oxydation et la dégradation des caroténoïdes, qui passent sous un état excité, puis peuvent soit revenir à leur état initial soit poursuivre l'oxydation ([Boon, McClements et al. 2010](#)) :



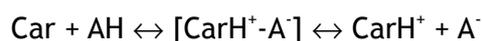
Les caroténoïdes en C40 sont très efficaces pour piéger l'oxygène singulet par transfert d'énergie. Le  $\beta$ -carotène est très sensible à la dégradation initiée par l'oxygène singulet, suivi de l' $\alpha$ -tocophérol, de la riboflavine, puis de la vitamine D et de la vitamine C ([Choe and Min 2006](#)).

Une étude comparant les vitesses de dégradation de plusieurs caroténoïdes en présence de lumière UV et du photosensibilisant Rose Bengal (4,5,6,7-tétrachloro-2',4',5',7'-tétra-iodofluorescéine) a montré que le  $\beta$ -carotène subit l'oxydation la plus rapide (c'est aussi le meilleur piègeur de l'oxygène singulet), suivi du lycopène, alors que la zéaxanthine et la lutéine sont moins sensibles ([Siems, Sommerburg et al. 1999](#)). Une autre étude sur la dégradation du  $\beta$ -carotène en présence de Rose Bengal a mis en évidence que les produits de dégradation dans ces conditions sont la  $\beta$ -ionone, le 14'-apo- $\beta$ -caroténal, le 10'-apo- $\beta$ -caroténal, le 8'-apo- $\beta$ -caroténal et le 5,8-époxyde- $\beta$ -carotène ([Stratton, Schaefer et al. 1993](#)).

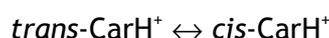
## 1.4. Dégradation chimique

### 1.4.1. Réaction avec les acides

La réaction entre des caroténoïdes et des acides (ex : l'acide sulfurique et le  $\beta$ -carotène, le 8'-apo-caroténal ou la canthaxanthine) produit des complexes ioniques, qui peuvent ensuite se dissocier pour donner des carbocations ([Boon, McClements et al. 2010](#)) :

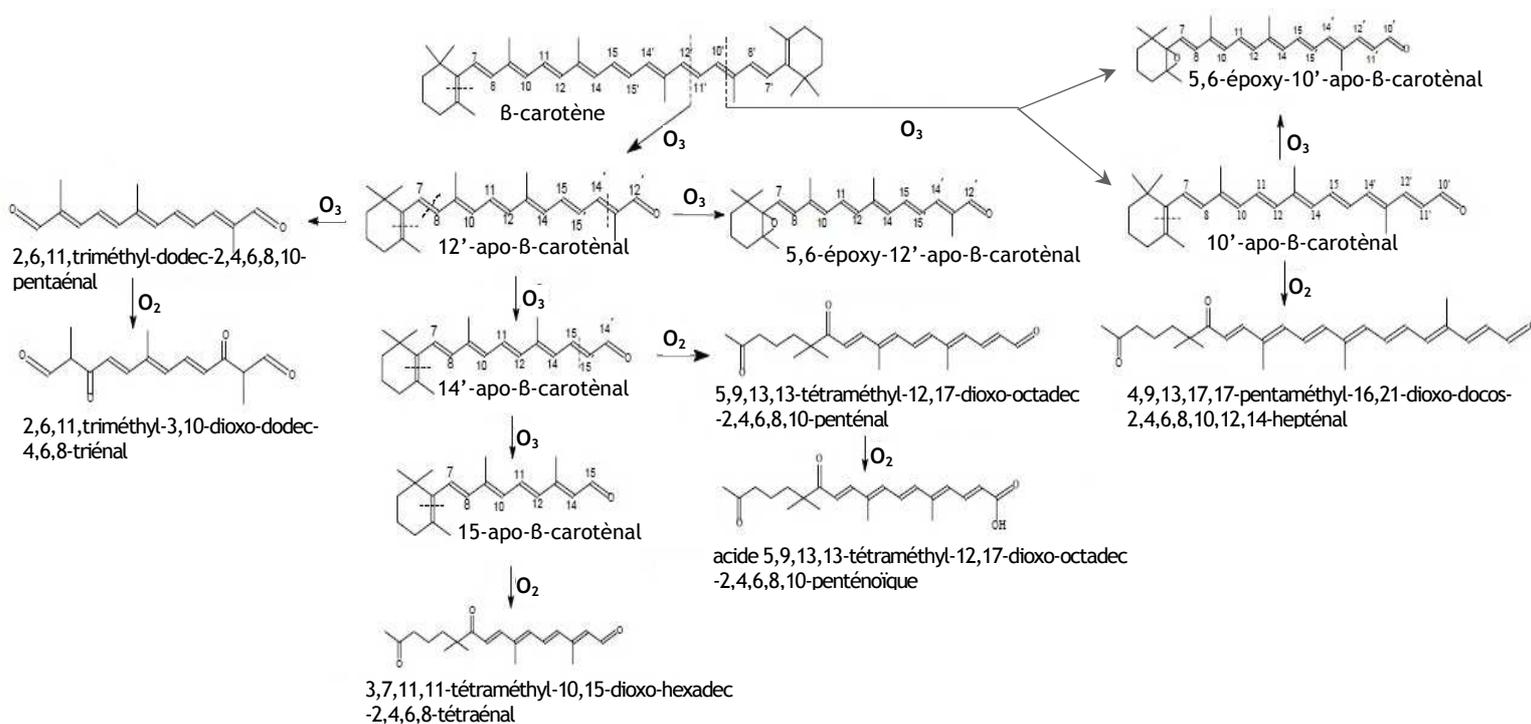


Cette réaction entre les caroténoïdes et les acides participe aussi à la formation d'isomères. Le carbocation  $\text{CarH}^+$  est alors un intermédiaire de l'isomérisation :



### 1.4.2. Réactions en présence d'oxydants

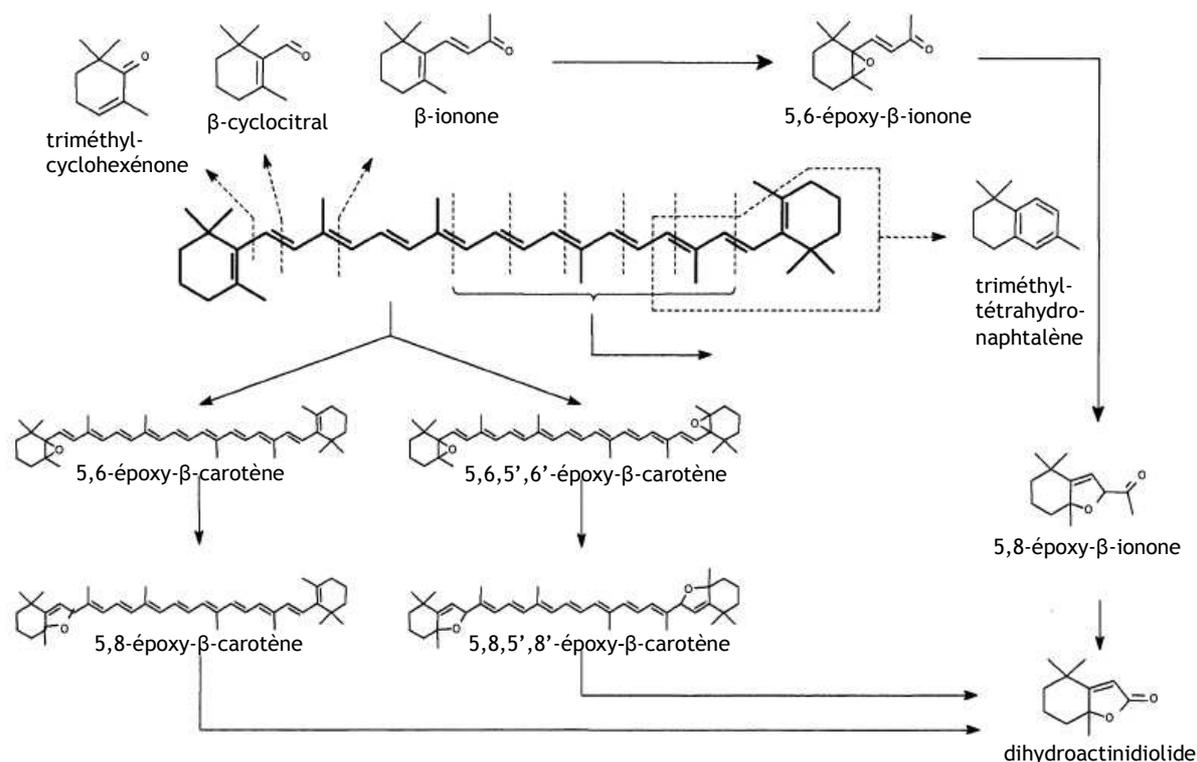
L'ozone est un antimicrobien efficace, utilisé dans l'industrie alimentaire. Or, en présence de cet oxydant, le  $\beta$ -carotène est dégradé, ce qui libère essentiellement des produits de coupure et des époxydes (figure 57) : 5,6-époxy-10'-apo- $\beta$ -caroténal, 5,6-époxy-12'-apo- $\beta$ -caroténal, 12'-apo- $\beta$ -caroténal, 14'-apo- $\beta$ -caroténal, 15'-apo- $\beta$ -caroténal. Ceux-ci sont ensuite eux-mêmes oxydés (figure 57), libérant des acides et des composés contenant plusieurs fonctions carboxyles : acide tétraméthyl-dioxo-octadec-penténoïque, tétraméthyl-dioxo-hexadec-tétraénaal, pentaméthyl-dioxo-docos-heptaénaal et diméthyl-undecèn-trione. Plusieurs composés volatils sont aussi produits : 2-méthyl-butèn-2-dial, glyoxal, méthylglyoxal,  $\beta$ -cyclocitral et acide pyruvique ([Benevides, Veloso et al. 2011](#)). Par ailleurs, la dégradation des caroténoïdes en présence de différentes pressions partielles d'ozone est linéaire ([Benevides, Veloso et al. 2011](#)).



**Figure 57 :** Formation de produits de coupure, d'époxydes puis d'acides carboxyliques issus de la dégradation du  $\beta$ -carotène soumis à un traitement par l'ozone. D'après ([Benevides, Veloso et al. 2011](#)).

Les nitrites ( $NO_2$ ), présents dans la salive par exemple, jouent un rôle dans l'oxydation du  $\beta$ -carotène en milieu aqueux acide ([Volk, Gorelik et al. 2009](#)). La dégradation du caroténoïde dans ces conditions est très rapide (plus de 30 % de dégradation en quelques minutes, puis oxydation totale).

L'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) fait partie des oxydants libérés par les leucocytes dans la défense immunitaire (effet antibactérien). Or, cet oxydant induit une forte dégradation des caroténoïdes. La réaction avec le  $\beta$ -carotène (figure 58), par exemple, libère des produits de coupure, en particulier des apo- $\beta$ -caroténals, et plusieurs produits d'oxydation plus courts, dont des composés volatils (ex : 5,6-époxy- $\beta$ -ionone, ionène,  $\beta$ -cyclocitral,  $\beta$ -ionone, dihydroactinidiolide et 4-oxo- $\beta$ -ionone) ([Sommerburg, Langhans et al. 2003](#)). Une autre étude comparant le blanchiment des caroténoïdes en présence d'hypochlorite de sodium ( $NaOCl$ ), a mis en évidence la dégradation rapide du lycopène puis du  $\beta$ -carotène et, plus lentement, de la zéaxanthine et de la lutéine ([Siems, Sommerburg et al. 1999](#)).



**Figure 58** : Formation d'époxydes et de produits volatils issus de la dégradation du β-carotène en présence d'acide hypochloreux (Sommerburg, Langhans et al. 2003).

La réaction entre les carotènes et le permanganate de potassium libère des produits de coupure contenant des fonctions aldéhydes et cétones. La dégradation du β-carotène donne du 8'-apo-β-caroténal, 10'-apo-β-caroténal, 12'-apo-β-caroténal, 14'-apo-β-caroténal, 15'-apo-β-caroténal, de la semi-β-caroténone et du 5,8-époxy-β-carotène (Rodriguez and Rodriguez-Amaya 2007). La dégradation du lycopène dans les mêmes conditions donne des apolycopénals et apolycopénones, mais aussi des molécules apolycopèn-dial possédant une chaîne polyénique et deux fonctions aldéhyde. (Caris-Veyrat, Schmid et al. 2003).

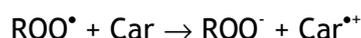
L'acide *meta*-chloroperbenzoïque (MCPBA) induit spécifiquement l'époxydation des doubles liaisons. La réaction commence par l'accrochage d'un groupement ozonide ( $O_3$ ) sur la chaîne polyéthylène (Zurcher and Pfander 1999). En présence de ce réactif, le β-carotène génère des monoépoxydes et des diépoxydes sur les positions 5,6-, 5',6'-, 5,8- et 5',8'-, ainsi que les isomères *cis* correspondants (Rodriguez and Rodriguez-Amaya 2007).

## 1.5. Réactions avec les radicaux libres : transferts d'électrons, déprotonation et adduits

### 1.5.1. Mécanismes réactionnels

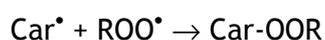
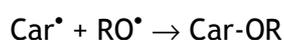
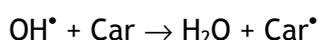
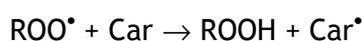
Des radicaux libres (issus de l'oxydation lipidique, par exemple) peuvent être présents dans les milieux alimentaires ou dans l'organisme. Les caroténoïdes réagissent avec ces radicaux selon des mécanismes distincts en fonction de la concentration de caroténoïdes, de la présence d'oxygène ou de la polarité du milieu réactionnel ([El-Agamey and McGarvey 2008](#)). Il peut s'agir de transferts d'électrons, de perte d'atomes d'hydrogène ou d'addition de radicaux (formation d'adduits radicalaires de caroténoïdes) ([Krinsky and Yeum 2003](#)). Les premiers produits de dégradation peuvent à leur tour réagir avec les radicaux et entre eux, libérant de nombreux produits secondaires ([Boon, McClements et al. 2010](#)).

Les transferts d'électrons ont lieu entre les caroténoïdes et des radicaux très oxydants comme  $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{RSO}_2^\bullet$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{CCl}_3^\bullet$ ,  $\text{Br}_2^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$  ou les arylperoxydes ( $\text{R-C}_6\text{H}_x\text{C}_y\text{H}_z^\bullet$ ) et libèrent des radicaux cations de caroténoïdes ([Martin, Ruck et al. 1999](#); [Mortensen, Skibsted et al. 2001](#)) :

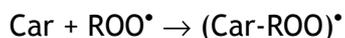
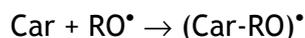
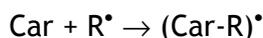


Des dimérisations peuvent aussi se produire ([Mortensen, Skibsted et al. 2001](#)). La mesure du potentiel réducteur des radicaux cations de caroténoïdes permet d'estimer leur propension à propager ensuite l'oxydation ([Burke, Edge et al. 2001](#)). L'importance des réactions de transferts d'électrons dépend essentiellement du type de caroténoïdes ([Woodall, Wai-Ming et al. 1997](#)) et des radicaux présents, c'est-à-dire des potentiels redox et des énergies de liaison X-H en jeu ([Martin, Ruck et al. 1999](#)). Le  $\beta$ -carotène, par exemple, réagit peu avec les radicaux peroxydes mais est davantage sensible aux formations d'adduits ou aux pertes d'hydrogène.

L'arrachage d'un atome d'hydrogène sur un caroténoïde par un radical induit la formation d'un radical neutre de caroténoïde. C'est par exemple le cas lors des réactions avec les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}^\bullet$ ), alkyles ( $\text{R}^\bullet$ ), alkoxydes ( $\text{RO}^\bullet$ ) ou alkylperoxydes ( $\text{R}'\text{-ROO}^\bullet$ ) ([Mortensen, Skibsted et al. 2001](#); [Jomová, Kysel et al. 2009](#)). La réaction peut s'arrêter rapidement si les radicaux de caroténoïdes formés réagissent avec d'autres radicaux libres pour former des produits non-radicalaires stables :



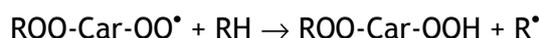
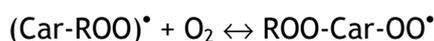
La formation d'adduits peut se produire par réaction entre les caroténoïdes et les radicaux alkyles, alkoxytes, peroxytes ([Liebler and McClure 1996](#)) ou les radicaux sulfurés ([Mortensen, Skibsted et al. 2001](#)) :



La réaction s'arrête si les adduits formés réagissent avec d'autres radicaux libres pour former des produits d'addition stables :



En revanche, en présence d'oxygène, les adduits peuvent former des radicaux peroxytes à chaîne secondaire, selon une réaction réversible. Cette réaction est favorisée par une forte concentration d'oxygène (forte pression partielle) :



Les radicaux formés peuvent favoriser la formation de nouveaux radicaux. Enfin, les adduits de caroténoïdes peuvent se dégrader spontanément pour libérer des époxydes et de nouveaux radicaux libres, induisant de nouvelles réactions d'oxydation :



La dégradation du  $\beta$ -carotène par les radicaux libres dérivés de l'oxygène ou de l'azote libère une grande variété de produits : des époxydes (en position 5,6 ou 5',6' ou 5,8 ou 5',8' ou 15,15'), des diépoxydes (en position 5,6 et 5',6', ou 5,8 et 5',8'), des apocaroténoïdes (8'-apocaroténone, 10'-apocaroténal, rétinol, 9-apocaroténone, 7-apocaroténal), des époxy-apocaroténoïdes (5,6-époxy-9-apocaroténone), des composés 4-oxo (9-apocaroténone, 10-apocaroténal, 11-apocaroténal, 13-apocaroténal), des produits secondaires d'oxydation (en quantités minoritaires) et des alcools ([Martin, Ruck et al. 1999](#)).

### 1.5.2. Données cinétiques

La dégradation des caroténoïdes peut varier selon que les radicaux libres proviennent de la réaction avec l'azote ou avec l'oxygène. En effet, l'oxydation du  $\beta$ -carotène, du 9-*cis*- $\beta$ -carotène et du lycopène est plus rapide en présence des espèces réactives de l'azote qu'en présence de celles de l'oxygène, alors que c'est le contraire pour la  $\beta$ -cryptoxanthine.

Les vitesses de réaction diffèrent aussi selon les radicaux en jeu (alkyles, alkoxyes ou peroxyes). Le  $\beta$ -carotène, par exemple, réagit plus lentement avec les radicaux peroxyes qu'avec les autres.

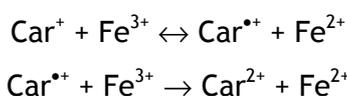
Pour un radical oxydant donné, une relation a été observée entre la structure des caroténoïdes et leur vitesse de dégradation. En effet, la longueur de la chaîne, la présence de groupements fonctionnels (hydroxy, époxy ou céto) et la nature des cycles en position terminale ( $\beta$  ou  $\kappa$ , par exemple) peuvent modifier la vitesse de réaction des caroténoïdes en présence de radicaux libres ([Mortensen, Skibsted et al. 2001](#); [Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)). Tout d'abord, l'efficacité des transferts d'électrons augmente avec le nombre de doubles liaisons conjuguées coplanaires sur le caroténoïde ([Miller, Sampson et al. 1996](#); [Mortensen and Skibsted 1996](#)). Par ailleurs, en milieu homogène (ex : solvant), il a été montré que les caroténoïdes à groupements hydroxy ou céto réagissent moins avec les radicaux ([Mortensen and Skibsted 1997 a](#); [Mortensen and Skibsted 1997 b](#)). Il semblerait que les groupements carbonyles augmentent l'énergie d'activation des intermédiaires radicalaires de ces caroténoïdes (états de transition plus hauts), ce qui pourrait en particulier limiter les réactions entre les céto-caroténoïdes et les radicaux ([Mortensen and Skibsted 1997 b](#)). Par exemple, les vitesses de réaction entre les radicaux phénoxyes et le lycopène semblent plus importantes qu'avec le  $\beta$ -carotène, puis la zéaxanthine, la lutéine et enfin l'échinénone. La cantaxanthine et le 8'-apo- $\beta$ -caroténal ne réagissent presque pas avec les radicaux et l'astaxanthine pas du tout (xanthophylles avec des groupements céto ou un groupement aldéhyde). Des résultats similaires concernant la réactivité des différentes classes de caroténoïdes ont été observés en solutions micellaires (carotènes > hydroxy-caroténoïdes > céto-caroténoïdes) ([Miller, Sampson et al. 1996](#)). Une étude sur la stabilité des caroténoïdes dans des liposomes a également montré que la dégradation du lycopène et du  $\beta$ -carotène (carotènes) par les radicaux libres est nettement plus importante que celles de la lutéine, de la zéaxanthine et de la  $\beta$ -cryptoxanthine (xanthophylles) ([Chen and Djuric 2001](#)). Toutefois, ce mécanisme n'est pas

vérifié pour les xanthophylles dont la charge électronique est concentrée à la fin de la chaîne, près du groupement fonctionnel (ex : pour la capsanthine) et qui sont plus réactifs ([Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)). La localisation de certaines substitutions sur les cycles des caroténoïdes peut aussi faire baisser leur réactivité en positions terminales (*i.e.* molécules moins sensibles aux déprotonations ou additions). Par exemple, la stabilité plus forte de la violaxanthine pourrait être attribuée aux groupements époxy en positions 5,6 et 5',6', qui empêchent l'arrachage d'atomes d'hydrogène (ils ne sont plus disponibles) sur le cycle terminal et les carbones adjacents ([Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)). Autres exemples : en présence de radicaux peroxy ou de radicaux hydroxyles, l'isozéaxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine dont les positions C4 et C4' sont occupées par des groupements fonctionnels réagissent moins vite que la zéaxanthine, la lutéine, le  $\beta$ -carotène ou le lycopène où ces positions sont libres ([Woodall, Wai-Ming et al. 1997](#)).

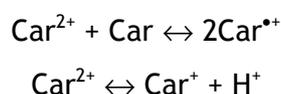
## 1.6. Réactions avec les métaux de transition, transferts d'électrons

### 1.6.1. Mécanismes réactionnels

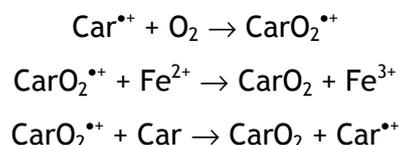
Les métaux de transition (titane, chrome, manganèse, fer, nickel, cuivre, zinc, ruthénium, argent, cadmium, or, mercure, bohrium...), sont susceptibles d'interagir directement avec les caroténoïdes. Les réactions avec le chlorure de fer dans des solvants organiques sont celles qui ont été étudiées le plus souvent. La réaction résulte en la formation de radicaux cations de caroténoïdes par délocalisation d'un électron. Ces premiers produits peuvent réagir à nouveau avec le fer et libérer des caroténoïdes dications :



La production de caroténoïdes dications dépendrait de la concentration de fer disponible dans le milieu réactionnel : formation de cations radicalaires avec environ 0,5 équiv. de fer, mais de caroténoïdes dications au-delà de 2 équiv. Ces divers produits peuvent être différenciés par leurs spectres optiques, car les longueurs d'ondes de leurs maximums d'absorption diffèrent :  $\lambda_{\text{MAX}}$  caroténoïde neutre (Car) <  $\lambda_{\text{MAX}}$  dication (Car<sup>2+</sup>) <  $\lambda_{\text{MAX}}$  radical cation (Car<sup>•+</sup>). De plus, les caroténoïdes dications produits réagissent soit avec des caroténoïdes neutres soit par déprotonation :

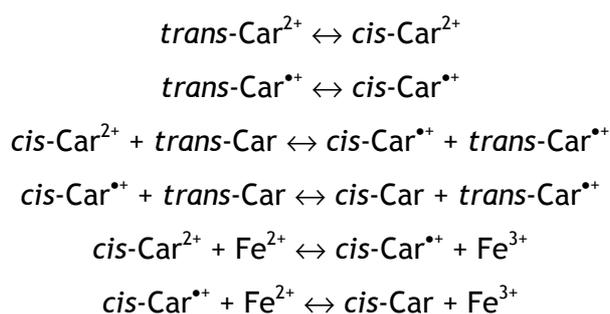


La libération de radicaux cations en présence de métaux induit de nombreuses réactions supplémentaires, notamment catalysées par l'oxygène de l'air (production de radicaux cations peroxydes de caroténoïdes) :



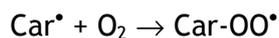
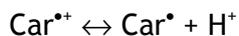
Au cours de la réaction entre le chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) et le  $\beta$ -carotène, plusieurs équilibres se mettent en place entre les ions  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  et les formes neutre, cation radicalaire et dication du caroténoïde ([Gao and Kispert 2003](#)). Les cations arrachent un électron aux ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Le complexe dioxo-tétramésitylporphyrine-ruthénium  $\text{Ru}(\text{O}_2)(\text{TMP})$  est aussi une métalloprotéine qui induit le clivage du  $\beta$ -carotène par catalyse du transfert d'atome d'oxygène à partir du  $\text{O}_2$  de l'air. La dégradation génère une série d'apocaroténals et apocaroténones formés par coupure au niveau de toutes les doubles liaisons conjuguées, ainsi que les époxydes 5,6 ou 5,8 correspondants ([Caris-Veyrat, Amiot et al. 2001](#)).

De plus, les réactions de transferts d'électrons à partir des caroténoïdes neutres jouent un rôle dans l'isomérisation des caroténoïdes ([Gao and Kispert 2003](#)). La formation des isomères est due à la rotation des molécules autour de certaines doubles liaisons lorsqu'elles sont sous forme radicalaire ou dication. Les isomères neutres sont ensuite générés par échange électronique entre les cations radicalaires *cis* et des caroténoïdes neutres tout-*trans* du milieu ([Wei, Gao et al. 1997](#)) :



Les isomères représentent environ 40 à 60 % des produits formés avec le fer. De plus, la localisation des rotations varie selon la nature des caroténoïdes. La réaction entre  $\text{FeCl}_3$  et un caroténoïde symétrique comme la canthaxanthine ( $\beta,\beta$ -4,4'-carotène-dione) par exemple forme d'abord des isomères 9-*cis* et 13-*cis*, puis des isomères 15-*cis* et 9,13-di-*cis*. Avec des caroténoïdes asymétriques comme les caroténals, des isomères supplémentaires peuvent être détectés ([Wei, Gao et al. 1997](#)).

Enfin, les radicaux cations de caroténoïdes peuvent aussi subir une déprotonation, en particulier dans des milieux aqueux, libérant des radicaux déprotonés qui peuvent réagir soit entre eux (formation de didéhydrodimères) ([Gao, Deng et al. 1997](#)), soit avec l'oxygène de l'air (formation d'autres radicaux) :



L'iode (un halogène) est aussi un agent d'oxydation pouvant induire la libération de cations radicalaires, mais qui reste moins réactif que les métaux de transition. Le mécanisme réactionnel en jeu est le transfert d'un électron du caroténoïde vers l'iode <sup>3</sup>I.

### 1.6.2. Effets d'autres facteurs d'oxydation

L'oxydation des caroténoïdes par les métaux de transition peut avoir lieu en présence comme en absence de lumière, mais l'irradiation par des UV a tendance à augmenter les vitesses de réaction ([Boon, McClements et al. 2010](#)). C'est par exemple le cas pour la réaction entre le cuivre et le  $\beta$ -carotène ([El-Tinay and Chichester 1970](#)).

En émulsions à pH faible (pH < 4), la présence de fer est le principal facteur de dégradation du lycopène. La réaction est rapide et la présence ou pas de lumière a peu d'impact. À pH plus fort (pH 7), la dégradation par le fer diminue. Elle dépend davantage de l'attaque du caroténoïde par les radicaux libres ([Boon, McClements et al. 2009](#)). Dans les solvants ne contenant ni hydroperoxydes ni oxygène pouvant provoquer l'oxydation du fer II, il n'y a pas de réaction directe entre le lycopène et le fer II. Le lycopène n'est dégradé que lors de l'ajout de fer III, qui est alors converti en fer II.



## 2. PUBLICATION I - IRON-INDUCED AUTOXIDATION OF (ALL-E)- $\beta$ -CAROTENE IN MODEL GASTRIC CONDITIONS: KINETICS, PRODUCTS AND MECHANISM

*Free Radical Biology and Medicine, en préparation pour soumission*

CHARLOTTE SY<sup>1,2</sup>, PATRICK BOREL<sup>3-5</sup>, OLIVIER DANGLES<sup>2,1</sup>, & CATHERINE CARIS-VEYRAT<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR408, Safety and Quality of Plant Products, Site Agroparc, 84000, Avignon, France

<sup>2</sup> University of Avignon, UMR408, UMR408, 84000, Avignon, France

<sup>3</sup> INRA, UMR1260 "Lipid Nutrients and Prevention of Metabolic Diseases", F-13385 Marseille, France

<sup>4</sup> INSERM, ERL U1025 "Bioavailability of Micronutrients", F-13385 Marseille, France

<sup>5</sup> Aix-Marseille Univ, faculté de Médecine, F-13385, France

\* Corresponding author. E-mail address: catherine.caris@avignon.inra.fr

### ABSTRACT

---

The stability of (all-*E*)- $\beta$ -carotene towards dietary iron was studied in a mildly acidic (pH 4) micelle solution as a simple model of the postprandial gastric conditions. The oxidation was initiated by free iron (Fe<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup>) or by heme iron (metmyoglobin) on increasing concentrations. Fe<sup>II</sup> and metmyoglobin (MbFe<sup>III</sup>) were found much more efficient than Fe<sup>III</sup> at initiating  $\beta$ -carotene autoxidation. Whatever the initiator, hydrogen peroxide was not accumulated. Moreover,  $\beta$ -carotene markedly inhibited the conversion of Fe<sup>II</sup> into Fe<sup>III</sup>.  $\beta$ -carotene autoxidation induced by Fe<sup>II</sup> or MbFe<sup>III</sup> was maximal with 5-10 equiv. Fe<sup>II</sup> or 0.05-0.1 equiv. MbFe<sup>III</sup> and it was inhibited at higher iron concentrations, especially with Fe<sup>II</sup>. UPLC-MS and GC-MS analyses revealed a complex distribution of  $\beta$ -carotene derivatives including (*Z*)-isomers, epoxides and cleavage products of different chain lengths. Finally, the mechanism and potential nutritional consequences of iron-induced  $\beta$ -carotene autoxidation are discussed.

---

**KEYWORDS:**  *$\beta$ -carotene, carotenoid, iron, stability, oxidation, kinetics, mechanism.*

## INTRODUCTION

Carotenoids are one of the most important groups of natural pigments. They are mainly synthesised in plants but have also been isolated from yeasts, fungi, marine algae, micro-algae and some bacteria. Since, like other animals, humans do not synthesize carotenoids, all carotenoids that are found in human blood and tissues originate from food or supplements [1-3]. So far, over 600 carotenoids have been described in nature and 40 are present in the human diet. Epidemiological studies have shown correlations between carotenoid consumption and a lower risk of several diseases, thus suggesting that carotenoid-rich foods play important beneficial roles in human health. In particular, carotenoids participate in reducing skin photooxidative damage, age-related macular degeneration, the incidence of certain cancers and diseases associated with the metabolic syndrome [4-8]. Carotenoids are at highest concentration in the gastro-intestinal tract and after intestinal absorption they accumulate in lipophilic compartments like membranes and plasma lipoproteins [8-10]. Carotenoids are widely recognized as important components of the antioxidant network (quenching of singlet dioxygen and other reactive oxygen species like peroxy radicals, protection of LDL against cell-mediated oxidation...) [7, 8, 11, 12]. They are also associated with the induction and stimulation of intercellular communication via gap junctions [8] and there is increasing evidence that some carotenoids regulate signalling pathways and gene expression [7, 13]. Besides its pigmentation and antioxidant properties,  $\beta$ -carotene is the main precursor of vitamin A [4, 14] and has been widely studied for its bioactivity [4, 15-20].

Increasing awareness of the potential health benefits of carotenoids has prompted the development of functional food products enriched in carotenoids, in particular  $\beta$ -carotene. However, the long chain of conjugated carbon-carbon double bonds makes  $\beta$ -carotene highly susceptible to oxidation. Its instability during processing (extraction, thermal treatments), storage and digestion is an important issue. The oxidation of (all-*E*)- $\beta$ -carotene and the characterisation of its derivatives have been a subject of intense research (table 1). Apocarotenals are the main oxidation products of  $\beta$ -carotene. A cleavage mechanism starting at either end of the conjugated system and progressing to the 15,15' double bond has been proposed [21]. Isomerisation of (all-*E*)- $\beta$ -carotene to (*Z*)-isomers (preferably 13' and 15,15') is thought to be the first step in the formation of cleavage products. Indeed, dioxygen attack on either side of the (*Z*) C-C double bond would be faster, giving peroxy radicals that form epoxide or dioxetane intermediates and then carbonyl cleavage products (apocarotenals and apocarotenones) [21, 22]. However,

given the complex distribution of oxidation products obtained, this set of reactions can only be regarded as a simplified mechanism [23]. Table 1 shows the structure of known  $\beta$ -carotene derivatives and likely reaction pathways for their formation [22-41].

During gastric digestion  $\beta$ -carotene is submitted to potentially damaging conditions: presence of dioxygen in non-limiting concentrations, mild temperature (37°C), a pH typically varying from 6 (postprandial) to 2 (empty stomach), a constant mechanical mixing favouring high postprandial hydroperoxide concentrations [42]. Moreover,  $\beta$ -carotene oxidation can be initiated by diverse food components [43]. In particular, iron ions are present in food (especially in red meat), both as heme and non-heme (loosely bound) forms [44, 45]. Dietary iron may be regarded as one of the major sources of oxidative stress in the gastro-intestinal (GI) tract [46].

The objective of this study is to investigate the reactivity of (all-*E*)- $\beta$ -carotene (kinetics, mechanisms, product distribution) in the presence of heme and non-heme iron in a simple chemical model mimicking the gastric conditions. The model should help appreciate the potential for  $\beta$ -carotene oxidation before intestinal absorption.

Table 1.  $\beta$ -carotene derivatives and possible reaction pathways for their formation.

Mechanism	Reactivity of $\beta$ -carotene	Products
<i>autoxidation</i>	autoxidation of beta-carotene depends on oxygen partial pressure [24]	first products: 5,6-epoxy-beta-carotene, 15,15'-epoxy-beta-carotene, diepoxides, beta-apocarotenals and apocarotenones. further oxidation: oligomeric compounds, carbonyl compounds (epoxides are degraded).
	autoxidation includes a stage of isomerisation of polyenyl peroxy radicals. [25]	late oxidation: long-chain beta-apocarotenals give shorter carbonyl compounds (beta-apo-13-carotenone, beta-ionone, 5,6-epoxy-beta-ionone, dihydroactinidiolide and probably carboxylic acids and alcohols). [24]
	kinetics of beta-carotene autoxidation in an oxygenated aqueous medium is linear [26]	isomerisation products: 13-cis, 9-cis and a di-cis isomer. Cleavage products: beta-apo-13-carotenone, beta-apo-14'-carotenol. epoxydation: beta-carotene 5,8-epoxide-beta-carotene, 5,8-endoepoxide-beta-carotene. [26]
	oxidation of beta-carotene, under different ozone concentrations, follows a zero order kinetic model relative to beta-carotene in the main region of the curves [23]	non volatile products: 5,6-epoxy-10'-apo-beta-carotenol, 12'-apo-beta-carotenol, 5,6-epoxy-12'-apo-beta-carotenol, 14'-apo-beta-carotenol, 5,9,13,13-tetramethyl-12,17-dioxo-octadec-2,4,6,8,10-pentenoic acid, 15'-apo-beta-carotenol, 3,7,11,11-tetramethyl-10,15-dioxo-hexadec-2,4,6,8-tetra-enal, 4,9,13,17,17-pentamethyl-16,21-dioxo-docos-2,4,6,8,10,12,14-heptaenal, 6,6-dimethyl-undec-3-en-2,5,10-triene. volatile products: 2-methyl-buten-2-dial, glyoxal, methylglyoxal, beta-cyclocitral, pyruvic acid. [23]
<i>thermal degradation</i>	degradation in a food matrix depends on temperature and heating duration. [27]	non volatile products: apolar and oxidative derivatives of beta-carotene [27] volatile products: dihydroactinidiolide, then beta-ionone, 2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone and 2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexane-1-carboxaldehyde. [28] intermediates: mutatochrome, 5,6-epoxy-beta-ionone. [27]
<i>photodegradation</i>	light intensity and oxygen partial pressure determine beta-carotene degradation kinetics. Fluorescent light [29] and blue UV light [30] cause main degradation, visible light has only little effects [30]	
<i>chemical degradation</i>	M-chloroperbenzoic acid (MCPBA) induces epoxydation of beta-carotene [31]	beta-carotene-5,6-epoxide, beta-carotene-5,8-epoxide, beta-carotène-5,6,5',6'-diepoxide, beta-carotene-5,6,5',8'-diepoxide, beta-carotene-5,8,5',8'-diepoxide and some Z-isomers. [31]
	Magnesium permanganate (KMnO <sub>4</sub> ) induce oxidative cleavage. [31]	beta-apo-8'-carotenol, beta-apo-10'-carotenol, beta-apo-12'-carotenol, beta-apo-14'-carotenol, beta-apo-15'-carotenol, semi-beta-carotenone, monohydroxy-beta-carotene-5,8-epoxide and some Z-isomers. [31]
	Hypochlorous acid activates oxidation of beta-carotene in aqueous solutions. [32]	apo-beta-carotenals, 5,6-epoxy-beta-ionone, ionone, beta-cyclocitral, beta-ionone, dihydroactinidiolide, 4-oxo-beta-ionone. [32]
<i>electron transfer (radical)</i>	free radicals induce an autocatalytic cascade reaction. A second initiation phase includes hydroperoxides' degradation. Termination and propagation processes involve beta-carotene-derived C-centered radicals. temperature and dissolved oxygen concentration determines the kinetics. [33]	neutral beta-carotene radicals [34, 35]
	The initial concentration of another antioxidant (tocopherol) induces autoxidation, cooxidation and radical exchange mechanisms modifying degradation kinetics. [34]	carbonyl oxidation products: beta-apo-13-carotenone, retinal, beta-apo-14'-carotenol, beta-apo-12'-carotenol, beta-apo-10'-carotenol and several very hydrophobic compounds [36]
	beta-carotene reacts with moderately strong oxidising radicals like tert-butyl peroxide (alkylperoxy radical) via hydrogen atom transfer but also via electron transfer. [35]	
	reaction of beta-carotene with a photosensitizer (Rose Bengal) induces oxidation via the action of singlet oxygen and not via an autoxidation mechanism [37]	beta-ionone, beta-apo-14'-carotenol, beta-apo-10'-carotenol, beta-apo-8'-carotenol, beta-carotene-5,8-endoepoxide [37]
<i>electron transfer (metal)</i>	a ruthenium porphyrin catalyses mild-oxidative cleavage of beta-carotene by dioxigen: the active Ru(O) <sub>2</sub> (TMP) species effects alkene epoxydation and is regenerated by subsequent reaction with atmospheric oxygen. [22]	8', 10', 12', 14', 15-, 13-, 11-, 9-, 7-beta apocarotenals and beta-apocarotenones 5,6-epoxy-8', 5,8-epoxy-8', 5,6-epoxy-14', 5,8-epoxy-14'--beta-apocarotenals, 5,6-epoxy-13-, 5,8-epoxy-13-, 5,6-epoxy-11-, 5,8-epoxy-11-, 5,8-epoxy-8-beta-apocarotenones 9,8'- and 13,8'-diapo-beta-carotene-dials. [22]
	cupric ions catalysis beta-carotene autoxidation. While autoxidation mechanism is linear in time, the kinetics is modified in the presence of copper. [38]	beta-carotene 5,6-monoepoxide and its isomers, beta-carotene 5,6,5',6'-diepoxide, beta-carotene 5,8-monoepoxide and its isomers and beta-carotene 5,8,5',8'-diepoxide. [38]
	all trans beta-carotene is oxidised in the presence of iron chloride, via a mechanism inducing several equilibrium between Fe <sup>II</sup> , Fe <sup>III</sup> and Cl <sup>-</sup> and well as with the neutral carotenoid and with its cation and dication radicals. [39]	beta-carotene radicals, isomers (products even in the absence of oxygen), the main oxidation product is 5,8-peroxide. [39]
	In organic solvents, beta-carotene is degraded by the addition of Fe II combined to UV enlightenment. Fe <sup>II</sup> is first converted into Fe <sup>III</sup> by light. Then Fe <sup>III</sup> oxidises the carotenoid. [40]	
	In lipidic membranes, beta-carotene is degraded by free radicals induced by iron ions [41]	

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals.** Synthetic type II (all-*E*)- $\beta$ -carotene ( $C_{40}H_{56}$ ,  $M=536$  g/mol, >95%), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween<sup>®</sup>20), polyoxyethylene glycol 23 lauryl ether (Brij<sup>®</sup>35),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (> 99.5%),  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  (98%), myoglobin from equine heart (> 90%, essentially salt-free), xylol orange tetrasodium salt and butylhydroxytoluene (BHT) were purchased from Sigma-Aldrich. Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4'-4''-disulfonic acid monosodium, 97%) was from Fluka. The buffer used in the experiments is a 0.2 mol/L acetate buffer (pH 4.0). Water was purified through a Millipore Q-Plus. Formic acid (> 98%) was from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate (99,995%), anhydrous sodium sulphate (> 99%), cetyltrimethylammonium bromide ( $CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3Br$ , > 99%) 3-chloroperoxybenzoic acid (mCPBA, ~77%),  $\beta$ -cyclocitral ( $C_{10}H_{16}O$ , > 90%) and  $\beta$ -ionone ( $C_{13}H_{20}O$ , > 96%) were purchased from Sigma-Aldrich.

MeOH (LC-MS grade) was from Merck. Tetrahydrofuran (THF, UPLC grade) from Prolabo Normapur was previously poured through basic alumina. All other solvents were from Fisher-Scientific: MeCN (LC-MS grade),  $CH_2Cl_2$  and n-hexane (UPLC grade), ethyl acetate, i-PrOH and toluene (analytical grade).

**Preparation of the micellar system mimicking the gastric conditions.** Experiments were carried out in an aqueous medium at pH 4 corresponding to the mid phase of gastric digestion in humans [47]. The 0.2 mol/L acetate buffer was purified from metal traces by elution on a chelating resin (Chelex 100<sup>®</sup>, Bio-Rad). Each surfactant (Tween<sup>®</sup>20, Brij<sup>®</sup>35) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  to prepare 40 mmol/L stock solutions. A stock  $\beta$ -carotene (BC) solution was prepared by dissolving 5 mg of commercially available  $\beta$ -carotene in 10 mL  $CH_2Cl_2$ . The actual concentration (ca. 933  $\mu$ mol/L) was calculated by using a molar absorption coefficient of 128,000  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$  at 460 nm [48]. An aliquot (320  $\mu$ L) was mixed with 3 mL of the stock surfactant solution. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved under magnetic stirring until homogenization in 20 mL of acetate buffer. The final BC and surfactant concentrations were 15  $\mu$ mol/L and 6 mmol/L respectively.

**Preparation of iron solutions.** Stock  $Fe^{III}$  and  $Fe^{II}$  solutions (500 mmol/L) were prepared in 0.1 mol/L  $HNO_3$  and 0.1 mol/L  $H_2SO_4$ , respectively. The stock metmyoglobin (Mb $Fe^{III}$ ) solution was prepared in milliQ water. Because of the poor solubility of Mb $Fe^{III}$ , the stock solution was filtered and its actual concentration was calculated by using

$\epsilon = 97,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  at 505 nm. Dilute iron solutions were then prepared from the stock solutions in the same solvents. Their concentrations were in the range 25 mmol/L - 50  $\mu\text{mol/L}$  for  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and in the range 500  $\mu\text{mol/L}$  - 0.5  $\mu\text{mol/L}$  for  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ .

**Oxidation experiments.** The micellar solution of  $\beta$ -carotene (20 mL) was transferred to a 3-neck round-bottom flask with a black cover (protection from light) and placed on a stirring hot plate to maintain contact with the air present in the head-space and a constant temperature of 37°C. Temperature and  $\text{O}_2$  sensors were plunged into the reaction medium.

A volume of dilute iron solution (600  $\mu\text{L}$ ) was injected into the medium at time zero of the kinetic experiments. The concentrations were in the range 1.5  $\mu\text{mol/L}$  - 1500  $\mu\text{mol/L}$  for  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and in the range 0.015  $\mu\text{mol/L}$  - 15  $\mu\text{mol/L}$  for  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ . A control experiment was performed without added iron.

After 2 h of oxidation, 2 mL of the reaction medium were mixed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL), acetate buffer (1 mL) and saturated NaCl (1 mL). The mixture was vortexed and centrifuged with at  $10^4$  rpm for 3 min to separate the organic and aqueous phases. The organic phase containing the native carotenoid and its derivatives was collected and dried on anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and centrifuged at 104 rpm for 1 min. The extract was purified by solid phase extraction on silica tubes Strata<sup>TM</sup> Si-1 (Phenomenex). The tensioactive agent was retained on silica and the carotenoid and its derivatives were eluted by 4 mL hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1, v/v), then 4 mL hexane/*i*PrOH (4/1, v/v). The eluent was evaporated under reduced pressure, redissolved in 2 mL MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1, v/v) and filtrated through 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE syringe filters (Phenomenex) before being transferred to Waters UPLC<sup>®</sup> vials. Complete evaporation was achieved under Ar and the residue was redissolved in 100  $\mu\text{L}$  MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2/1, v/v) just before injection.

**UV-visible spectroscopy.** All spectra were recorded at 25°C on a Specord S-600 diode-array UV-vis spectrophotometer (optical pathlength = 1 cm) equipped with an 8-cell rail, a magnetic stirring device and a thermostatic bath (Analytic Jena).

**Titration of  $\beta$ -carotene.** Aliquots (1 mL) of the medium were taken-up at  $t = 0$  (before addition of iron), 2, 6, 12, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min. Residual  $\beta$ -carotene was quantified by UV-vis spectroscopy (base-line recorded on acetate buffer). From the previous aliquots,  $\beta$ -carotene and its products were extracted in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1, v/v). After a 2 min centrifugation at  $10^4$  rpm, measurements of residual carotenoids by UV-vis

spectroscopy were repeated (base-line recorded on CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Kinetic curves were plotted at 460 nm (wavelength of absorption maximum).

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup> titrations.** After extraction of β-carotene and its products, 250 μL of the aqueous phase from the previous aliquots were mixed with 750 μL reagent solutions. Hydroperoxides (expressed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equiv.) were titrated with the FOX2 reagent (10<sup>-4</sup> mol/L xylenol orange (XO), 2.5x10<sup>-5</sup> mol/L FeSO<sub>4</sub> solution in 90% MeOH + 10% 0.25 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) [49]. Fe<sup>II</sup> was titrated with a 10<sup>-3</sup> mol/L ferrozine solution in milliQ water [50]. Titration of Fe<sup>III</sup> was adapted from the FOX2 method for hydroperoxides by using a 10<sup>-4</sup> mol/L XO solution in 90% MeOH + 10% 0.25 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After a 15 min incubation at room temperature, a stable coloration of the reagents was obtained. The samples were then transferred to the spectrophotometer cell for recording the absorbance at 564 nm for Fe<sup>II</sup> titration and at 559 nm for Fe<sup>III</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> titrations. Linear calibration curves were previously constructed with solutions of Fe<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the acetate buffer. For hydroperoxide titration with FOX2, a correction for Fe<sup>III</sup> already present in the aliquot was applied.

**Measurement of dissolved dioxygen.** O<sub>2</sub> consumption was recorded by a luminescence method (optic fiber microsensor, response time <1 s) on a temperature-compensated Microx TX3 oxygen meter (Presens, Germany).

**Kinetic analyses.** Each experiment was run in triplicate. Data were expressed as means ± SD. Curve-fittings were carried out with the Scientist software (MicroMath) through least square regression and yielded optimized values for the parameters. Standard deviations are reported.

**Ultra-fast HPLC-MS.** The organic phase extracted from the previous aliquots (containing residual β-carotene and its products) was dried by addition of anhydrous sodium sulfate and centrifugation with a 10<sup>4</sup> rpm speed for 1 min. The extract was purified by solid phase extraction on silica tubes Strata<sup>TM</sup> Si-1 (Phenomenex, France). The tensioactive agent was adsorbed on silica and the carotenoid and its derivatives were eluted by 4 mL hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v) and then 4 mL hexane/isopropanol (4/1, v/v). The eluent was evaporated under reduced pressure, redissolved in 2 mL MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v) and filtrated through 0.2 μm PTFE syringe filters (Phenomenex, France) before being transferred to Waters UPLC<sup>®</sup> vials. After complete evaporation under argon, the residue was redissolved in 100 μL MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v) just before the injection. Analyses were performed on a Waters

Acquity™ Ultra Performance LC® system equipped with a diode array detector (250 - 800 nm) and coupled with a Brüker-daltonics 3-D high capacity ion trap mass spectrophotometer (esquire HCT™ ultra MS®). A Waters Acquity™ reversed-phase C18 column type HSS T3 (2.1 x 150 mm, 1.8 µm particle size) was used. Separation was carried out by gradient elution at 35°C, using a two-solvent mobile phase at a flow rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup> (eluent A: 5 µmol/L HCOOH + 10 mmol/L HCOONH<sub>4</sub> in MeCN:MeOH:H<sub>2</sub>O (60:20:20, v/v/v), eluent B: 5 µmol/L HCOOH in EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20, v/v)). The elution started with 100% A for 2 min followed by a linear gradient: t = 14.5-15 min, 45% A; t = 22 min, 40% A; t = 25-26 min, 30% A; t = 26-28 min, 100% A. The effluent from the HPLC column was directed towards the ion source of the MS operating in the APCI mode (corona intensity = 1 µA, cone pressure = 40 psi, flow rate = 4 L.min<sup>-1</sup>, T = 300°C). Spectra were acquired every 40 ms with a mass range of 50 to 1000 m/z. Target masses were 200 for t = 0-4.5 min, 350 for t = 4.5-8 min, 450 for t = 8-12 min, 500 for t = 12-15 min and 530 for t = 15-26 min. The software of the MS used for data analysis was Compass, version 1.3 (Brüker Daltonics)

**GC-MS.** Analyses were performed on a Shimadzu GC QP 20120 apparatus equipped with a liner (inner diameter = 0.75 mm) and coupled with a mass spectrometer. β-Carotene oxidation in the presence of iron was repeated with small volumes of the micellar system (3 mL) in 20 mL glass flasks closed with a Teflon cap and placed at 37°C for 4 h under stirring (250 rpm). Solid phase microextraction of the volatile compounds was performed directly in the head-space with a Supelco carboxen/polydimethylsiloxane (PDMS) fibre (length = 1 cm, film width = 0.75 µm) for 25 min after a 15-min period of enrichment. Direct splitless injection was carried out in GC with He (velocity = 38 cm.s<sup>-1</sup>) and volatile organic compounds were separated for 32 min on a Varian capillary CP-Sil 8 CB column (5% phenylmethyl polysiloxane, length = 30 m, internal diameter = 0.25 mm, film width = 0.5 µm) using the following conditions: 50°C for 2 min, heating to 150°C (gradient = 5°C.min<sup>-1</sup>), then to 250°C (gradient = 20°C.min<sup>-1</sup>), then 2 min at 250°C. Mass spectra were recorded in the m/z range 29 - 300, at a speed of 4 scans.s<sup>-1</sup> and with an electronic impact of 70 eV. Products identification was achieved by comparison with references (National Institute of Standards and Technology, Finnigan Corp.).

**Epoxidation of β-carotene by m-chloroperoxybenzoic acid** (adapted from [31]). Saturated NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) was added to a 50 µmol/L solution of β-carotene in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF (1/1, v/v). To the resulting two-phase mixture, a 75 µmol/L solution of mCPBA in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF (1/1, v/v) was added dropwise over 3 h under vigorous stirring. The reaction mixture was stirred for another 1 h after complete addition of mCPBA. The

organic phase was separated and successively washed with 20% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, saturated NaHCO<sub>3</sub> and water, then dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. An aliquot of the dried extract was evaporated under reduced pressure, taken up in 1 mL MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/1, v/v) and subjected to UPLC-MS analysis under the conditions previously described.

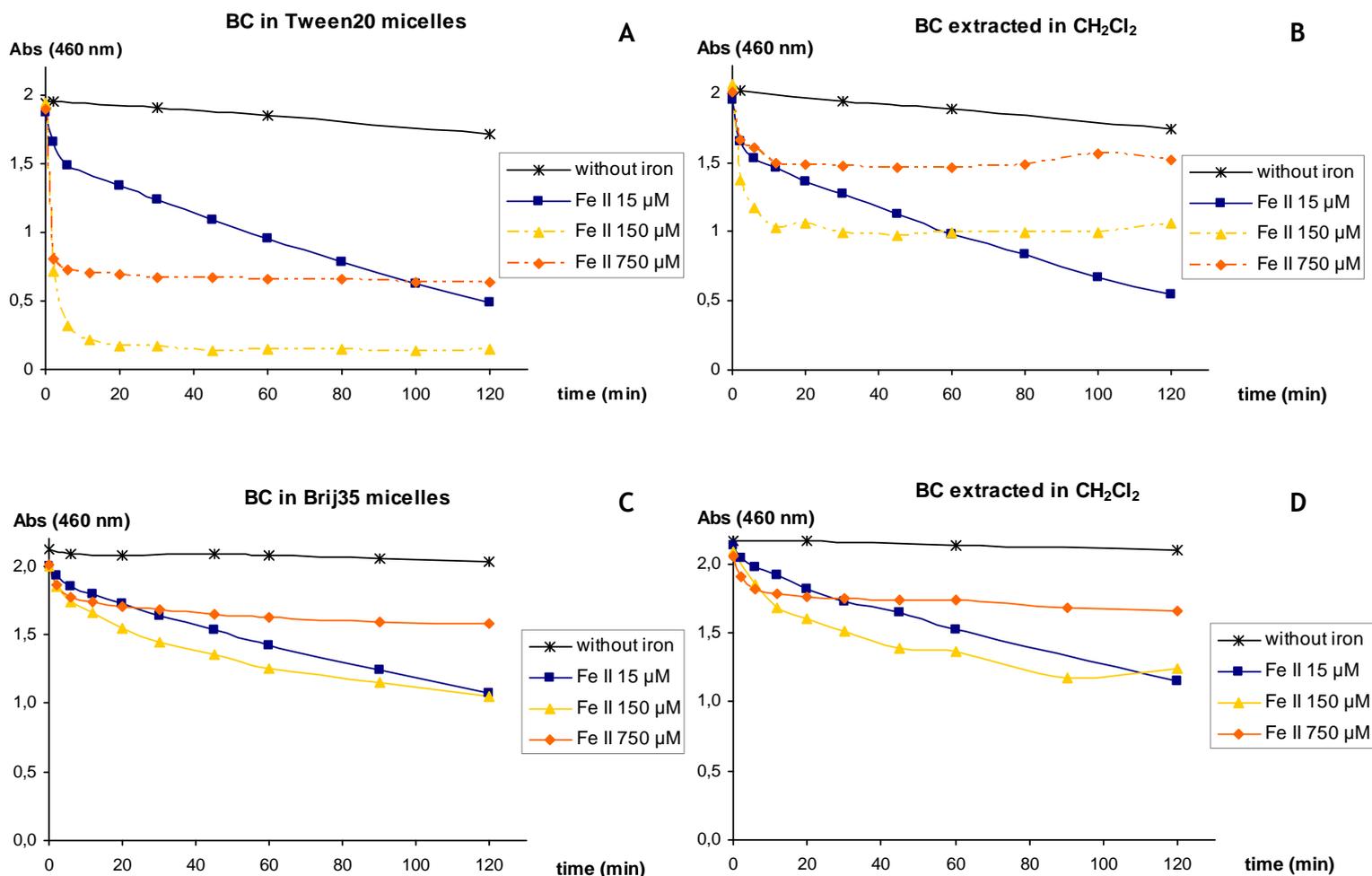
**Oxidative cleavage of β-carotene by potassium permanganate** (adapted from [31, 51]). β-Carotene (1.34 mg, final concentration = 50 μmol/L) and cetyltrimethylammonium bromide (0.27 mg) were dissolved in 40 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/toluene (1/1, v/v). Ten mL of an aqueous solution of KMnO<sub>4</sub> (5.9 mg, final KMnO<sub>4</sub> concentration = 750 μmol/L) was added to the organic solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and filtered through an Acrodisc PVDF filter (0.45 μm, 32 mm). The organic phase was washed with 40 mL water, filtered through a PVDF filter and dried on anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. An aliquot of the dried extract was evaporated under reduced pressure, taken up in 1 mL MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/1, v/v) and subjected to UPLC-MS analysis under the conditions previously described.

## RESULTS

**Choice of the surfactant.** During digestion, carotenoids are incorporated into micelles and emulsions involving dietary surfactants such as phospholipids, proteins, triacylglycerols and their digestion products (fatty acids, mono- and diacylglycerols) [52]. Our aim was to find a surfactant with little or no influence on the spectroscopic properties of  $\beta$ -carotene (BC) in aqueous solution so as to directly monitor  $\beta$ -carotene consumption in the aqueous medium, thus avoiding time-consuming extraction. To that purpose, the common surfactants Tween<sup>®</sup>20 and Brij<sup>®</sup>35 were evaluated and compared. In a first approach, non-ionic tensioactive agents were selected so as to minimize their interactions with iron ions [53].

First,  $\beta$ -carotene consumption was directly monitored in the micelle solutions and after extraction in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . With Tween<sup>®</sup>20 as the surfactant, little difference was observed between the visible spectra as long as  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration was low (figure 1, A & B). However, when  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration was increased to 150  $\mu\text{mol/L}$ , the micelle solution became almost colourless, whereas after extraction, a large concentration of  $\beta$ -carotene could still be evidenced. Unexpectedly, with 750  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{\text{II}}$ , the bleaching in both solutions was less important. Thus, in the presence of an excess iron, the direct monitoring of  $\beta$ -carotene consumption in Tween<sup>®</sup>20 micelles does not reflect the actual concentration of residual  $\beta$ -carotene. This could be due to interactions between Tween<sup>®</sup>20, iron ions and  $\beta$ -carotene, which so far have not been characterized. When Brij<sup>®</sup>35 was used as the surfactant, such discrepancies were not observed (figure 1, C & D).

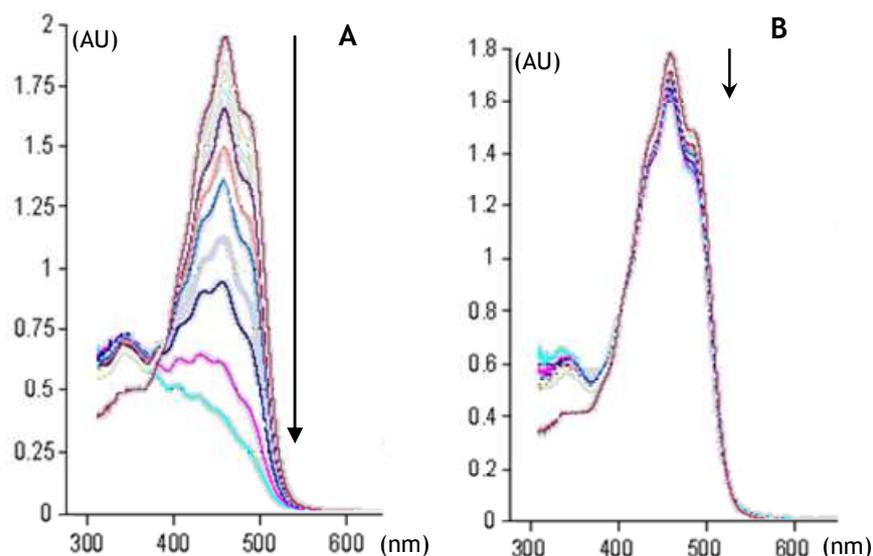
Moreover, unlike Brij<sup>®</sup>35, Tween<sup>®</sup>20 was found to be strongly contaminated by hydroperoxides (12  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  equiv. in 6 mmol/L Tween<sup>®</sup>20 vs. less than 0.2  $\mu\text{mol/L}$  in 6 mmol/L Brij<sup>®</sup>35) in agreement with previous studies [54]. These Tween<sup>®</sup>20-derived hydroperoxides could be a source of artefacts by taking part in the iron-induced oxidation of  $\beta$ -carotene. Overall, Brij<sup>®</sup>35 was finally selected as the surfactant and used throughout our work.



**Figure 1.** Fe<sup>II</sup>-induced oxidation of β-carotene (initial BC concentration = 15 μmol/L). (A) Tween<sup>®</sup>20 micelles, direct monitoring in the micelle solution, (B) Tween<sup>®</sup>20 micelles, after extraction in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (C) Brij<sup>®</sup>35 micelles, direct monitoring in the micelle solution, (D) Brij<sup>®</sup>35 micelles, after extraction in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**Influence of dioxygen on kinetics of iron-induced β-carotene oxidation.** When a micellar solution containing β-carotene and Fe<sup>II</sup> (10 equiv.) was placed under continuous argon bubbling, little change in the visible spectrum was observed over 2h, in sharp contrast with the same experiment conducted under air during which most β-carotene was consumed (figure 2).

When O<sub>2</sub> was directly monitored in the micellar solution containing β-carotene and Fe<sup>II</sup>, a decrease of its concentration was observed especially in the first minutes following the addition of iron (data not shown). Both experiments show that O<sub>2</sub> is primarily involved in the reaction between Fe<sup>II</sup> and β-carotene. It is thus clear that β-carotene is consumed by autoxidation.

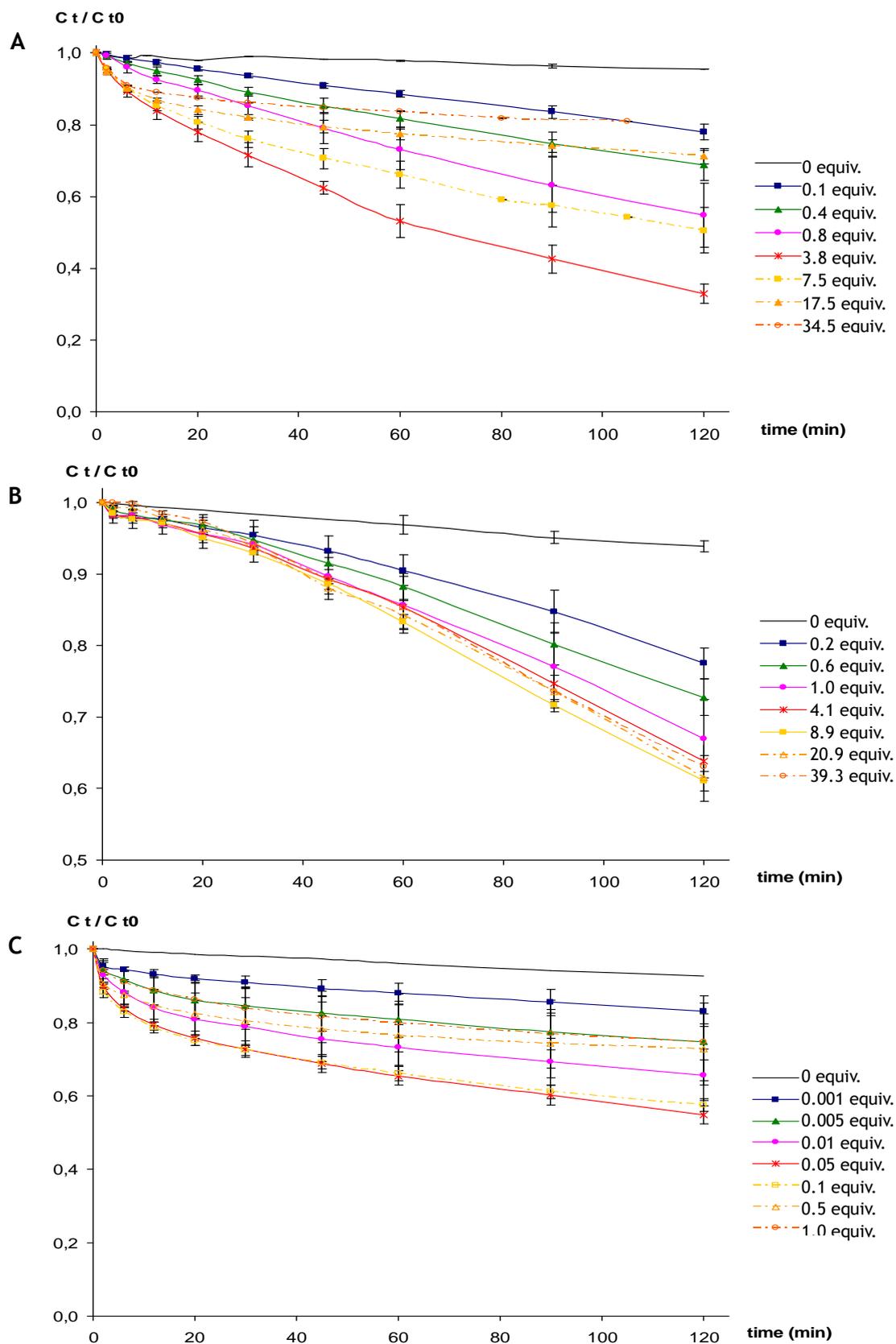


**Figure 2.** Fe<sup>II</sup>-induced oxidation of  $\beta$ -carotene (initial BC concentration = 15  $\mu$ mol/L, 10 equiv. Fe<sup>II</sup>), (A) with and (B) without dioxygen available in the reaction medium.

**Influence of iron concentration on kinetics of iron-induced  $\beta$ -carotene oxidation.** At pH 4 in the absence of added iron, a slight consumption of  $\beta$ -carotene was noted over 4h (figure 3). This result was attributed to ‘spontaneous’ autoxidation of  $\beta$ -carotene induced by unidentified metal traces. In the presence of Fe<sup>II</sup>,  $\beta$ -carotene oxidation became faster when the Fe<sup>II</sup> concentration was increased from 0.1 to 4 equiv. (figure 3, A). At higher Fe<sup>II</sup> concentrations (7.5 - 35 equiv.), an unexpected slowing down of BC consumption was observed.

When Fe<sup>II</sup> was replaced by Fe<sup>III</sup>, the kinetics of  $\beta$ -carotene consumption appeared biphasic (figure 3, B): an induction period of about 30 min was observed followed by a period of much faster consumption. The rate of  $\beta$ -carotene consumption increased with Fe<sup>III</sup> concentration from 0 to 9 equiv., then levelled off (9 - 40 equiv. Fe<sup>III</sup>).

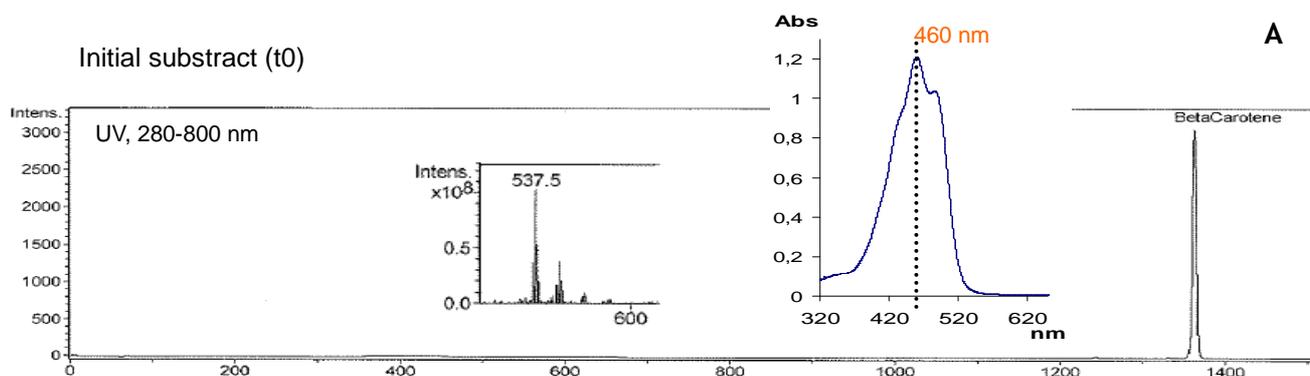
In the presence of metmyoglobin,  $\beta$ -carotene consumption was relatively fast during the first 10 min, then became much slower (figure 3, C). As with Fe<sup>II</sup>,  $\beta$ -carotene consumption passed through a maximum when the iron concentration increased. This maximum was observed with 0.05 equiv. MbFe<sup>III</sup>, *i.e.* at an iron concentration that is 80 times as low as with Fe<sup>II</sup>.

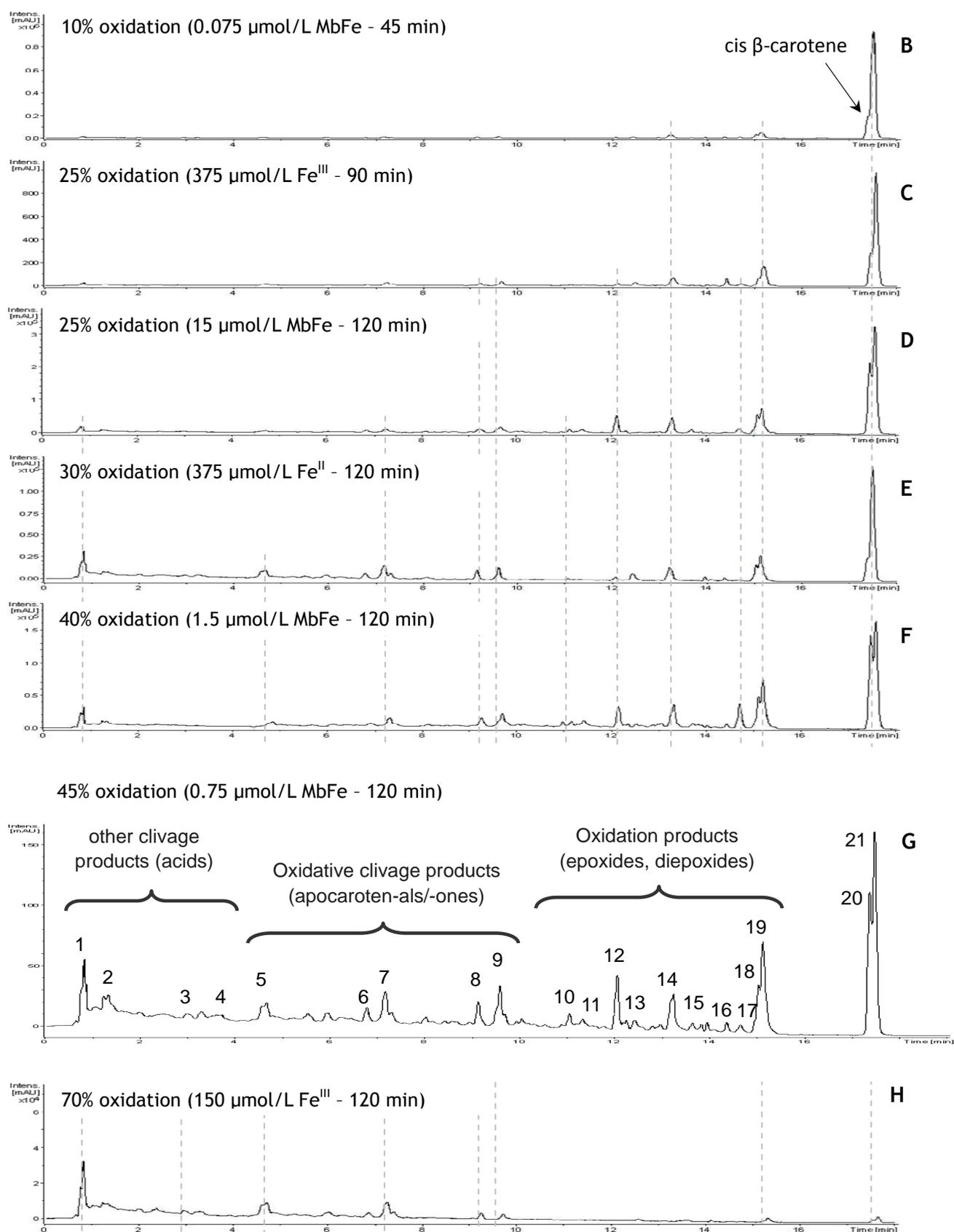


**Figure 3.** Fraction of residual  $\beta$ -carotene (initial concentration 14-17  $\mu\text{mol/L}$ ) during iron-induced autoxidation (pH 4, 37°C). (A) with  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , (B) with  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , (C) with  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  (in molar equivalents of BC).

**Non-volatile products of  $\beta$ -carotene oxidation.**  $\beta$ -Carotene oxidation products were analysed by UPLC/UV-DAD/MS over 2 h of reaction. Similar chromatograms were obtained with all three iron forms used (figure 4). Several classes of carotenoid derivatives were identified (table 2). (Z)-Isomers of  $\beta$ -carotene were the first to appear (figure 4, B), followed by  $\beta$ -carotene epoxides (25%  $\beta$ -carotene consumption, figure 4, C & D), among which (Z)- and (E)-5,8-epoxide, 5,6-epoxide, 5,6,5',6'-diepoxide, 5,6,5',8'-diepoxide and 5,8,5',8'-diepoxide were tentatively identified. After 30%  $\beta$ -carotene consumption, oxidative cleavage products were detected (figure 4, E - G), including  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-14'-carotenal and  $\beta$ -apo-13-carotenone. Other shorter cleavage products (smaller  $m/z$  values) were also detected but could not be identified.

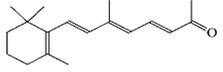
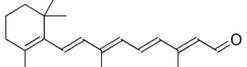
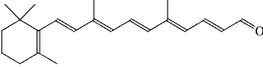
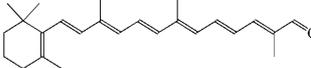
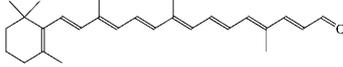
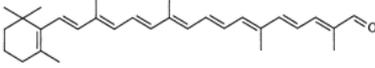
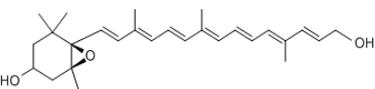
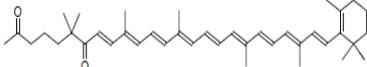
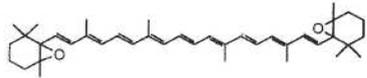
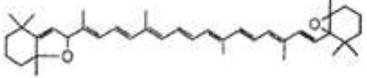
The identification of  $\beta$ -carotene derivatives was confirmed by analysing reference mixtures in the same conditions. The first reference mixture for  $\beta$ -carotene epoxides was prepared with *m*-chloroperbenzoic acid, an O-donor known to produce carotenoid epoxides with high stereoselectivity, purity and yield [31]. The second reference was prepared with the stronger oxidant potassium permanganate, which in acidic conditions yields not only epoxides but also cleavage products [31, 51].





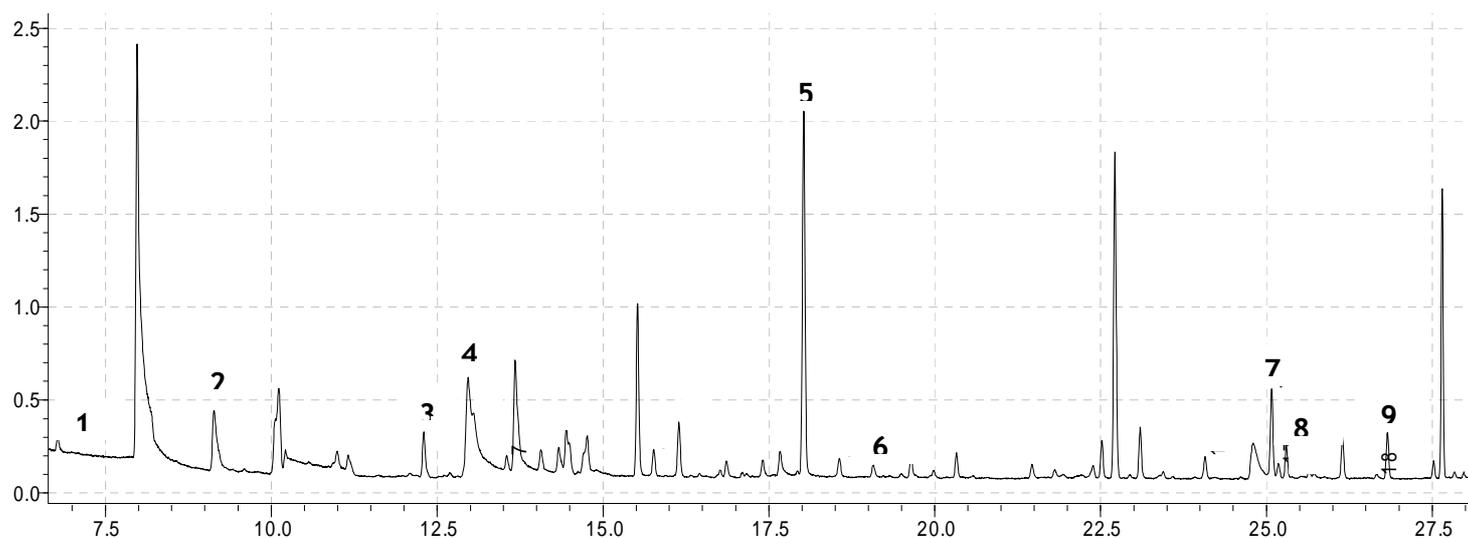
**Figure 4.** UPLC-DAD-MS analysis of  $\beta$ -carotene oxidation products. **A:** before addition of iron (BC = 15  $\mu\text{mol/L}$ ), (all-*E*)- $\beta$ -carotene, **B - H:** at different stages of iron-induced  $\beta$ -carotene oxidation. The peaks numbered on **G** pertain to the oxidation products identified (see table 2)

Table 2. Characteristics of non-volatile  $\beta$ -carotene derivatives formed upon iron-induced autoxidation.

Peak	$t_R$ (min)	Compounds	Chemical structure	UV-vis spectral data $\lambda_{max}$ (nm)	Mass spectral data (m/z)
1	0.8	unidentified		330	
2	2.0	unidentified		295	
3	2.9	unidentified		365	
4	3.7	unidentified		350, 384	
5	4.6 4.7	(Z)- $\beta$ -apo-13-carotenone (all-E)- $\beta$ -apo-13-carotenone		350	259
6	5.9	(all-E)- $\beta$ -apo-15-carotenal (retinal)		380	284
7	7.2	(all-E)- $\beta$ -apo-14'-carotenal		408	311
8	9.1	(all-E)- $\beta$ -apo-12'-caroten-al		425	351
9	9.6	(all-E)- $\beta$ -apo-10'-carotenal		450	377
10	11.1	(all-E)- $\beta$ -apo-8'-carotenal		470	417
11	11.3	( $\beta$ -apo-10'-carotene-3,10'-diol-5,6-epoxide)		403, 427, 452	411
12	12.0 12.1	(Z)- $\beta$ -seco-5,6-carotene-dione (all-E)- $\beta$ -seco-5,6-carotene-dione		(350), 469, 498 469, 498	569 569
13	12.3	(all-E)- $\beta$ -carotene-5,8,5',8'-diepoxide		365, 400, 425	569
14	13.1 13.2	(Z)- $\beta$ -carotene-5,6,5',6'-diepoxide (all-E)- $\beta$ -carotene-5,6,5',6'-diepoxide		(330), 408, 444, 473 426, 451, 479	569 569
15	13.9	(Z)- $\beta$ -carotene-5,6,5',8'-diepoxide		(383), 404, 430, 454	569
16	14.3 14.4	(Z)- $\beta$ -carotene-5,6-epoxide (all-E)- $\beta$ -carotene-5,6-epoxide		(336), 423, 449, 478 428, 454, 480	553 553
17	14.6	(all-E)- $\beta$ -carotene-5,6,5',8'-diepoxide		405, 430, 455	569
18	15.1	(Z)- $\beta$ -carotene-5,8-epoxide		(310), 405, 428, 453	553
19	15.2	(all-E)- $\beta$ -carotene-5,8-epoxide		407, 430, 455	553
20	17.3	(Z)- $\beta$ -carotene		(345), 429, 456, 484	537
21	17.5	(all-E)- $\beta$ -carotene		429, 456, 484	537

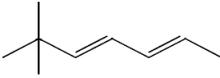
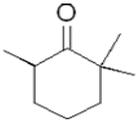
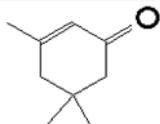
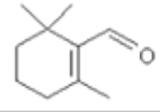
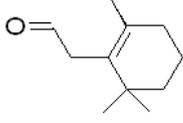
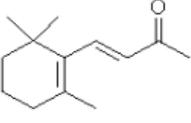
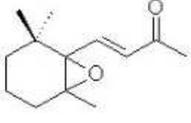
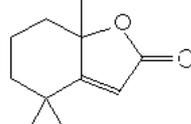
**Volatile products of  $\beta$ -carotene oxidation.** Additional oxidation products could be identified by GC-MS analysis every 40 min after addition of 10 equiv.  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (figure 5).

The fit of every single product compared to the reference data was higher than 75%. As listed in table 3, these volatile products were: (2*E*,4*E*)-6,6-dimethyl-2,4-heptadiene, 6-methyl-2-heptanone, 2,2,6-trimethyl-cyclohexanone, 3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one,  $\beta$ -cyclocitral, 2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-acetaldehyde,  $\beta$ -ionone,  $\beta$ -ionone-5,6-epoxide and 5,6,7,7*a*-tetrahydro-4,4,7*a*-trimethyl-2(4*H*)-benzofuranone.  $\beta$ -Cyclocitral and  $\beta$ -ionone were the two main products detected in agreement with the literature [55]. Using commercially available standards for quantification, it was estimated that, after 2 h of reaction between 75  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{\text{II}}$  and 15  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -carotene, 0.5  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -cyclocitral and 1.0  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -ionone were produced, which corresponds to 3.3 and 6.6% of the initial BC concentration respectively. After 4 h of reaction, those values increased to 5.3 and 9.3%.



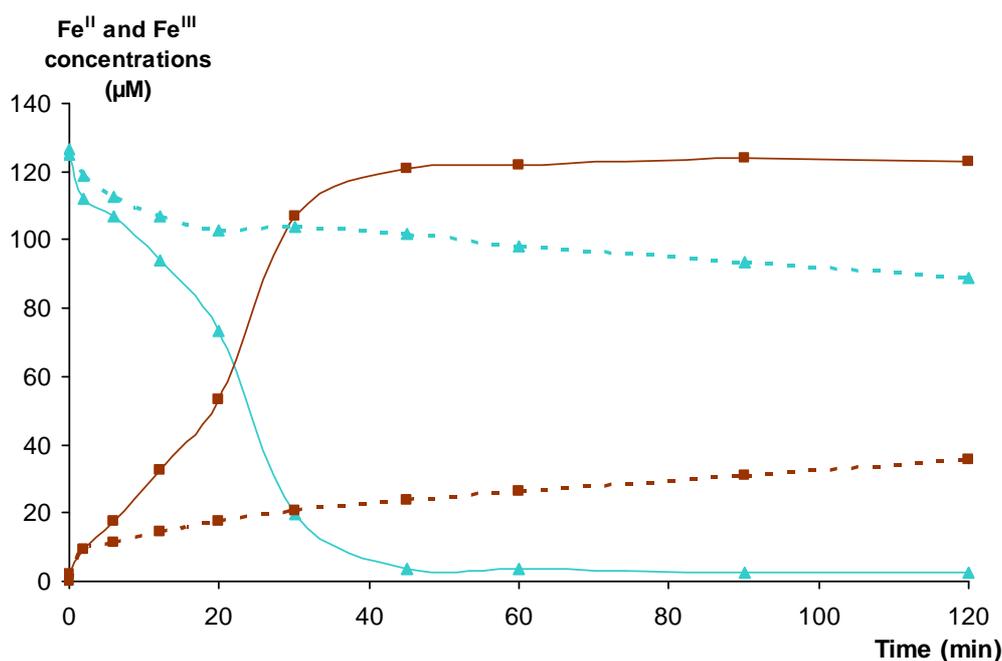
**Figure 5.** GC-MS analysis of  $\beta$ -carotene oxidation products. Total ion chromatogram of a sample in which  $\beta$ -carotene (15  $\mu\text{mol/L}$ ) was reacted with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (75  $\mu\text{mol/L}$ ) for 4 h. The marked peaks represent the oxidation products tentatively identified (see table 3).

**Table 3.** Volatile products formed in iron-induced oxidation of  $\beta$ -carotene (identification from MS database of the National Institute of Standards and Technology, quantification ions are underlined).

Peak	$t_R$ (min)	Compounds	Chemical structure	Mass spectral data
1	6.9	(2E,4E)-6,6-dimethyl-2,4-heptadiene		124 (M), <u>109</u> (M-15)
2	9.7	6-methyl-2-heptanone		<u>58</u> , 43
3	12.4	2,2,6-trimethyl-cyclohexanone		140 (M), <u>82</u>
4	13.2	3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one ( $\alpha$ -isophorone)		138 (M), <u>82</u>
5	18.1	$\beta$ -cyclocitral		152 (M), <u>137</u> (M-15)
6	19.2	2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-acetaldehyde		166 (M), <u>151</u> (M-15)
7	25.2	$\beta$ -ionone		192 (M), <u>177</u> (M-15)
8	25.3	$\beta$ -ionone-5,6-epoxide		135, <u>123</u>
9	26.7	2(4H)-benzofuranone-5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl (dihydroactinidiolide)		180 (M), <u>111</u> (M-15)

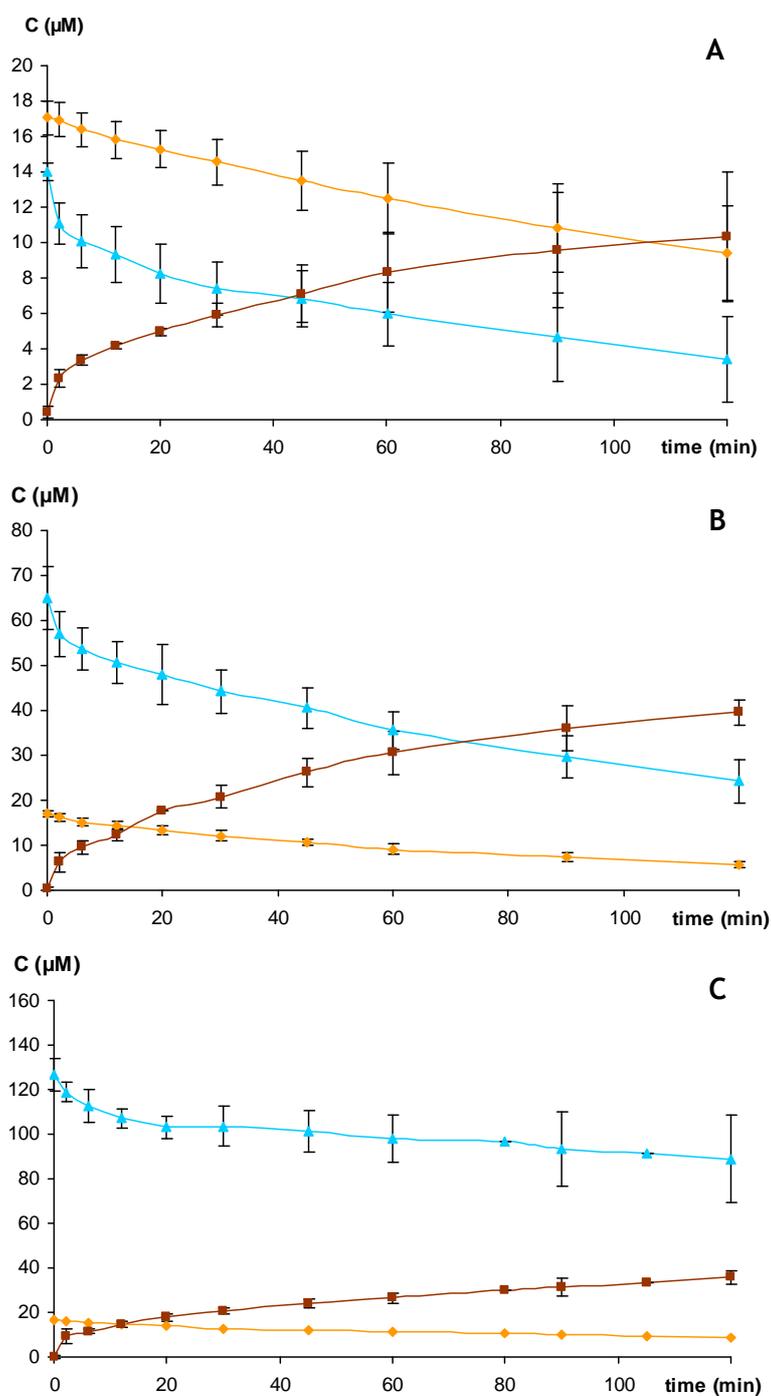
**Hydroperoxide formation during  $\beta$ -carotene oxidation.** In all experiments, titrations revealed that hydroperoxides do not accumulate during iron-induced  $\beta$ -carotene oxidation (data not shown). It is also noteworthy that  $\text{Fe}^{\text{II}}$  autoxidation by itself produces little  $\text{H}_2\text{O}_2$  (no more than  $6 \mu\text{mol/L}$  after 2 h with a total iron concentration of  $125 \mu\text{mol/L}$ ) and that most added  $\text{H}_2\text{O}_2$  (initial concentration =  $60 \mu\text{mol/L}$ ) is decomposed by  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (2 equiv.) in a few minutes (data not shown). It can thus be concluded that any  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced during the first steps of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  autoxidation is decomposed by the Fenton reaction in our conditions.

**Changes in the iron redox state during  $\beta$ -carotene oxidation.** To get insight into the mechanisms of iron-induced  $\beta$ -carotene oxidation independent titrations of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (ferrozine method [50]) and  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (xylenol orange method) were set up. Except in strongly acidic solutions,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  is known to be highly sensitive to autoxidation into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  [56]. This was confirmed in our experimental conditions. Indeed, without  $\beta$ -carotene,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  was almost totally converted into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  after 40 min (figure 6). Moreover, the total iron concentration remained constant, confirming that the methods used for  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{Fe}^{\text{III}}$  titration are reliable. From both curves, consistent values for the apparent first-order rate constant of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  autoxidation (in the absence of  $\beta$ -carotene) can be deduced:  $k_{\text{obs}} = 36 (\pm 8) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . However, it is obvious from the time dependence of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{Fe}^{\text{III}}$  concentrations that the mechanism of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  autoxidation is multistep. In particular, a fast step during which 10-30% of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  was converted to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  was always observed during the first 10 min in the absence or presence of  $\beta$ -carotene. However, in the presence of  $\beta$ -carotene, the overall conversion of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  was strongly inhibited (figure 6).



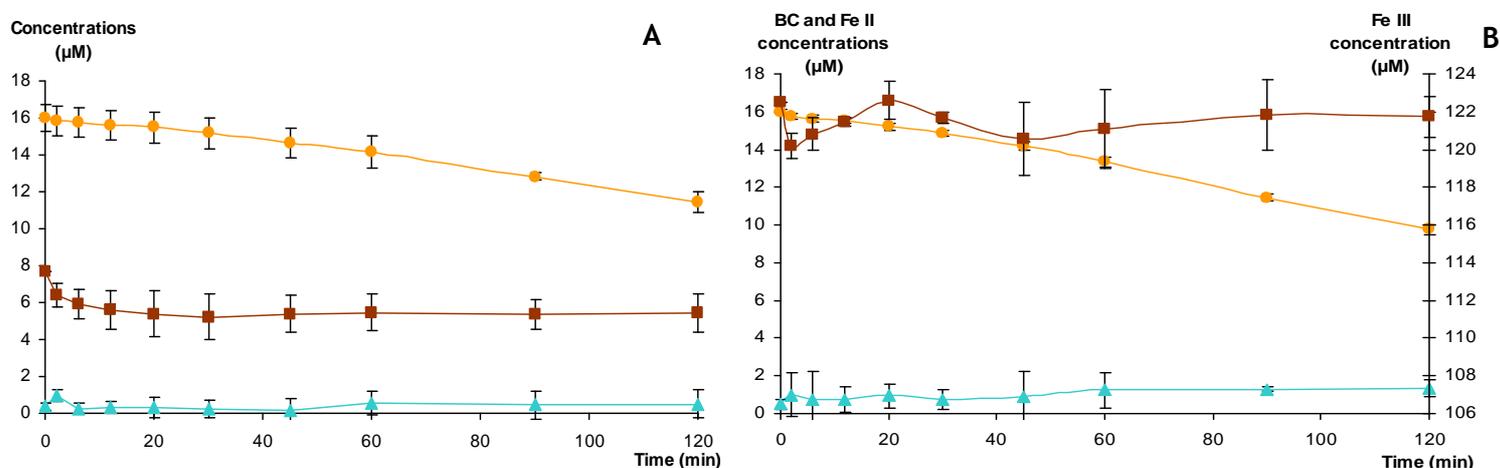
**Figure 6.** Conversion of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $\blacktriangle$ ) into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $\blacksquare$ ) in pH 4 acetate buffer + Brij<sup>®</sup>35, 37°C, measured from independent titrations. **Plain curves:**  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (125  $\mu\text{mol/L}$ ), **dashed curves:**  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (125  $\mu\text{mol/L}$ ) +  $\beta$ -carotene (17  $\mu\text{mol/L}$ ).

As long as the initial  $\text{Fe}^{\text{II}}$  / BC molar ratio was lower than 10, a continuous consumption of  $\beta$ -carotene was observed in parallel with a continuous conversion of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (figures 3 & 7), although much more slowly than in the absence of  $\beta$ -carotene. By contrast, when  $\text{Fe}^{\text{II}}$  was in large excess ( $\geq 25$  equiv.), trends towards constant concentrations of residual  $\beta$ -carotene and  $\text{Fe}^{\text{II}}$  were observed (table 4). Consistently,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  titration only showed a limited accumulation of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .



**Figure 7.** Changes in  $\beta$ -carotene ( $\bullet$ ),  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $\blacktriangle$ ) and  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $\blacksquare$ ) concentrations during iron-induced  $\beta$ -carotene autoxidation (initial concentration = 17  $\mu\text{mol/L}$ ) in pH 4 acetate buffer + Brij<sup>®</sup>35, 37 °C. Initial  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration = (A) 14  $\mu\text{mol/L}$ , (B) 65  $\mu\text{mol/L}$ , or (C) 127  $\mu\text{mol/L}$ .

After addition of Fe<sup>III</sup> to the reaction medium, titrations highlighted that for any Fe<sup>III</sup> concentration used, Fe<sup>III</sup> was only partially consumed during the first minutes (figure 8). Then, its concentration remained constant while Fe<sup>II</sup> did not accumulate (table 4).



**Figure 8:** Changes in  $\beta$ -carotene ( $\bullet$ ), Fe<sup>II</sup> ( $\blacktriangle$ ) and Fe<sup>III</sup> ( $\blacksquare$ ) concentrations during iron-induced  $\beta$ -carotene autoxidation (initial concentration = 17  $\mu\text{mol/L}$ ) in pH 4 acetate buffer + Brij<sup>®</sup>35, 37 °C. Initial Fe<sup>III</sup> concentration = (A) 7.5  $\mu\text{mol/L}$ , or (B) 122  $\mu\text{mol/L}$ .

**Table 4.** Kinetic analysis of iron-induced  $\beta$ -carotene autoxidation (BC concentration = 14-17  $\mu\text{mol/L}$ , pH 4 acetate buffer + Brij 35, 37 °C).

Fe ( $\mu\text{mol/L}$ )	BC ( $\mu\text{mol/L}$ )	$10^2 R_0$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) *	% BC consumed (after 2 h)	% iron converted ** (after 2 h)
Fe <sup>II</sup>	6.8	6.7	21.9	68.1
	14.0	9.3	31.3	75.9
	65.0	53.4	44.8	62.7
	126.7	39.9	67.1	29.8
	305.0	52.9	49.0	13.6
	610.0	50.4	19.0	9.4 ***
Fe <sup>III</sup>	2.1	0.14	21.5	13.1
	7.7	0.17	28.6	6.8
	13.5	0.20	33.0	4.4
	58.0	0.20	36.1	1.6
	122.5	0.23	38.9	1.1
	288.0	0.20	38.6	0.7
	586.0	0.17	36.9	0.5
MbFe <sup>III</sup>	0.075	46.1	25.3	-
	0.15	57.2	34.6	-
	0.75	96.3	45.1	-
	1.5	123.2	42.6	-
	7.5	140.0	27.5	-
	15.0	67.8	25.2	-

\* Initial rate of BC consumption, deduced from the biexponential curve-fitting of the concentration vs. time curves:  $R_0 = k_1\Delta C_1 + k_2\Delta C_2$ , the  $k$  and  $\Delta C$  parameters being the first-order rate constants and amplitudes respectively.

\*\* First series of numbers : Fe<sup>II</sup> converted into Fe<sup>III</sup> ; second series : Fe<sup>III</sup> converted into Fe<sup>II</sup>.

\*\*\* Time = 1h45.

**Kinetic analysis.** The apparent kinetics of Fe<sup>II</sup>-induced  $\beta$ -carotene consumption is mono- or bi-exponential depending on the initial Fe<sup>II</sup> concentration. The apparent kinetics of Fe<sup>II</sup> consumption and Fe<sup>III</sup> accumulation could only be described according to a bi-exponential model. The corresponding amplitudes and apparent rate constants are reported in table 5 for a selection of Fe<sup>II</sup> concentrations.

When  $\beta$ -carotene oxidation was induced by Fe<sup>III</sup>, time dependence of  $\beta$ -carotene concentration could be described by a polynomial model:  $Ct = C_0 - R_1t - a_2t^2$ . Thus, the reaction rate is:  $-dC/dt = R_1 + 2a_2t$ . Two phases can be distinguished: the induction period with apparent rate  $R_1$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) and a period of faster  $\beta$ -carotene oxidation whose acceleration is expressed by  $a_2$  ( $\mu\text{mol}^2\cdot\text{L}^{-2}\cdot\text{min}^{-2}$ ). The rate of  $\beta$ -carotene oxidation during the induction period is essentially independent of the initial Fe<sup>III</sup> concentration. During the second phase,  $\beta$ -carotene oxidation is accelerated proportionally to the initial Fe<sup>III</sup> concentration.

With metmyoglobin as initiator,  $\beta$ -carotene consumption could be described with a bi-exponential model.

From the analysis of  $\beta$ -carotene consumption according to a bi-exponential (Fe<sup>II</sup>, MbFe<sup>III</sup>) or polynomial (Fe<sup>III</sup>) model, the initial rate of  $\beta$ -carotene consumption could be estimated (table 5).

**Table 5.** Kinetic analysis of Fe<sup>II</sup>-induced  $\beta$ -carotene autoxidation (BC concentration = 17  $\mu\text{mol/L}$ , pH 4 acetate buffer + Brij 35, 37°C). Standard deviations are reported.

Initial Fe <sup>II</sup> concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	Fe <sup>II</sup> half-life (min) *	species monitored	$10^2k_{\text{obs}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\Delta C$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	R
14	42	BC	$0.7 \pm 0.1$	$13.5 \pm 0.8$	0.9995
		Fe <sup>II</sup>	$68 \pm 16$ $1.2 \pm 0.3$	$3.6 \pm 0.3$ $9.2 \pm 1.0$	0.998
		Fe <sup>III</sup>	$78 \pm 14$ $1.6 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$ $9.3 \pm 0.2$	0.9997
65	73	BC	$1.6 \pm 0.2$	$13.1 \pm 0.8$	0.998
		Fe <sup>II</sup>	$120 \pm 100$ $1.5 \pm 0.1$	$7.5 \pm 0.9$ $37.1^{**}$	0.997
		Fe <sup>III</sup>	$88 \pm 32$ $1.7 \pm 0.1$	$5.6 \pm 0.5$ $39 \pm 1$	0.9996
126.7	> 120	BC	$2.3 \pm 0.3$	$8.2 \pm 0.4$	0.992
		Fe <sup>II</sup>	$27 \pm 7$ $1.1 \pm 0.1$	$16.4 \pm 1.6$ $26.2^{\text{b}}$	0.994
		Fe <sup>III</sup>	$87 \pm 22$ $1.2 \pm 0.2$	$10.1 \pm 0.6$ $32.5 \pm 2.1$	0.999

\* Time of equal Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup> concentrations (22 min in the absence of BC)

\*\* Set constant from the total Fe<sup>III</sup> concentration accumulated

## DISCUSSION: Proposed mechanism for iron-induced $\beta$ -carotene autoxidation

The main objective of this study was to assess the mechanisms of  $\beta$ -carotene autoxidation in the presence of different forms of dietary iron (free or hemic). We set up a model consisting in : *i*) a simple micellar system stabilised by Brij<sup>®</sup> 35 to mimic the gastric compartment, *ii*) a reliable method to titrate free ferric iron independently from free ferrous iron and to perform a FOX2 titration of hydroperoxides in a system containing iron ions, *iii*) mathematical modelling and kinetic analysis of  $\beta$ -carotene oxidation in the presence of the different forms of iron, and *iv*) UPLC-MS and GC-MS analysis of carotenoid-derived products.

The most important observations can be summarized as follows.

$\beta$ -Carotene autoxidation is much faster when induced by  $\text{Fe}^{\text{II}}$  than by  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . For instance, the initial rate of  $\beta$ -carotene consumption is typically in the range  $0.1 - 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , while it does not exceed  $2 \times 10^{-3} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  during the induction period of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -initiated oxidation (table 4). It is thus clear that  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in the presence of  $\text{O}_2$  rapidly forms oxidizing species distinct from  $\text{Fe}^{\text{III}}$  [56] that quickly react with  $\beta$ -carotene. Metmyoglobin efficiently catalyzes  $\beta$ -carotene autoxidation (initial rate in the range  $0.5 - 1.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  with  $0.005 - 0.5$  equiv  $\text{MbFe}^{\text{II}}$ ).  $\beta$ -Carotene inhibits the autoxidation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  as a likely consequence of its ability to trap oxidizing intermediates formed by reaction between  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{O}_2$ . However, even in the presence of  $\beta$ -carotene, a fast partial conversion of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is observed followed by a much slower step of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  autoxidation.

In the presence of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in large excess, less  $\beta$ -carotene is consumed. Concomitantly, more  $\text{Fe}^{\text{II}}$  is spared. In fact, both  $\beta$ -carotene consumption and iron conversion of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  reach a maximum with an initial  $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{BC}$  molar ratio of about 4. At higher  $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{BC}$  molar ratios, no more  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is accumulated. Thus, when  $\text{Fe}^{\text{II}}$  is in large excess, its quenching of oxidizing intermediates involved in  $\beta$ -carotene oxidation becomes significant [57]. Saturation in  $\beta$ -carotene consumption is also observed with  $\text{MbFe}^{\text{II}}$  as the initiator.

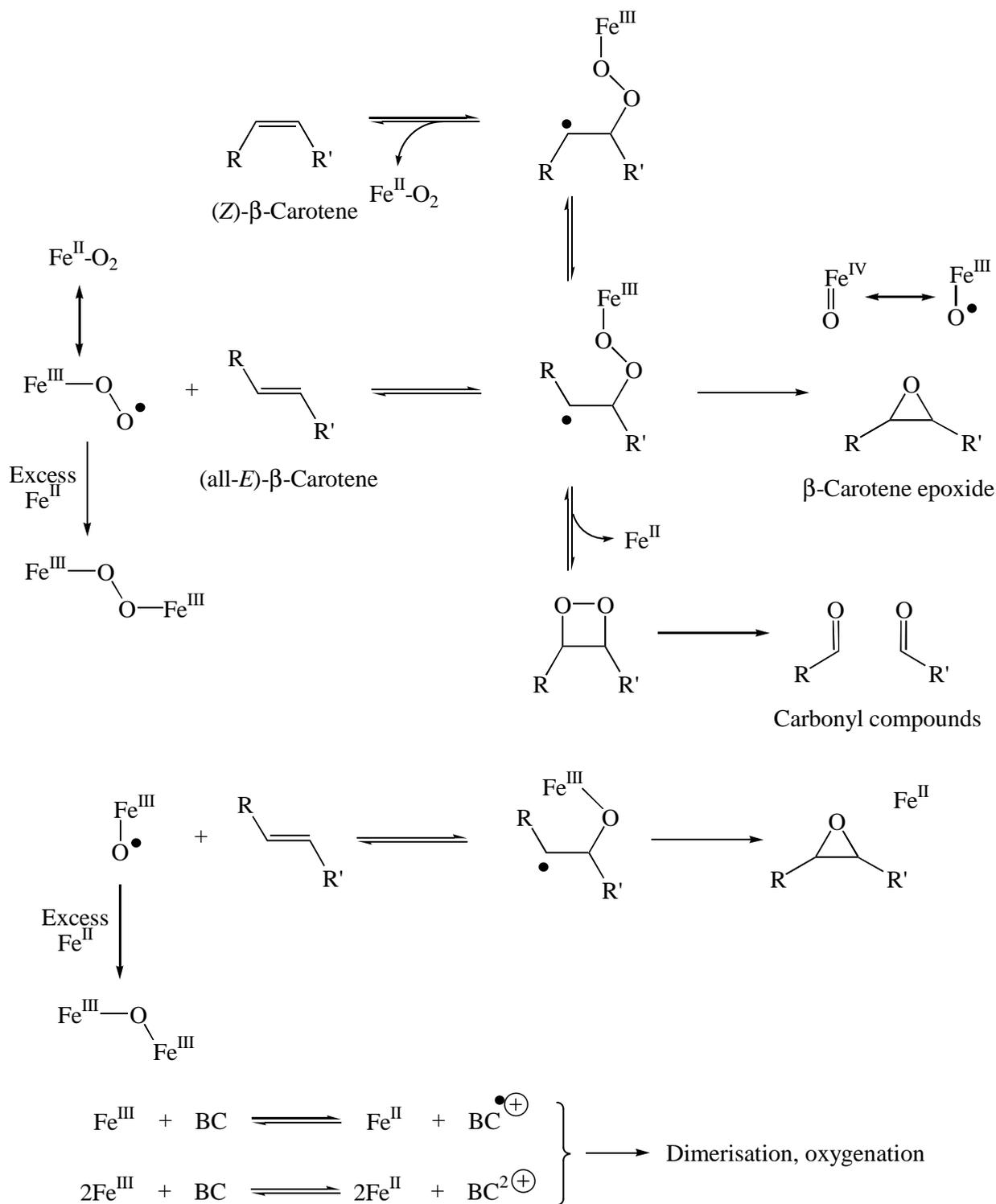
The induction period observed in  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -induced  $\beta$ -carotene autoxidation is consistent with a slow reduction of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  to  $\text{Fe}^{\text{II}}$  as a required preliminary step to trigger significant  $\beta$ -carotene oxidation [58].

When  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is used as initiator,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  does not accumulate in the medium. As seen above,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  released in low concentration via electron transfer from  $\beta$ -carotene to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is very sensitive to autoxidation and quickly converted back to  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Product analysis shows that the fate of  $\text{O}_2$  is not reduction into  $\text{H}_2\text{O}_2$  (no hydroperoxides detected) but transfer of O-atoms to  $\beta$ -carotene. O-Atom transfers can preserve the hydrocarbon chain (epoxide formation) or result in cleavage (formation of aldehydes and methylketones). The observation of (Z)- $\beta$ -carotene isomers is consistent with non-concerted O-atom transfers involving relatively long-lived radical intermediates.

Taken altogether, our results are consistent with the following mechanism of non-heme iron-induced  $\beta$ -carotene autoxidation (figure 9):

- in the  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -induced mechanism,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  quickly reacts with  $\text{O}_2$  to form a highly electrophilic perferryl species [59] that either collapses to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and superoxide (autoxidation) or adds to the conjugated chain of  $\beta$ -carotene;
- the radical thus formed either is converted to (Z)- $\beta$ -carotene isomers (with regeneration of the perferryl species) or evolves to oxygenated products with or without cleavage of the hydrocarbon chain (carbonyl compounds, epoxides);
- upon epoxidation, a ferryl species is released that can trigger a second round of addition-epoxidation;
- in the presence of an excess  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , the perferryl and ferryl species can react with a second equivalent of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , thereby forming inert di-iron species with an oxo or peroxy bridge ;
- the  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -induced mechanism is hindered by the rate-determining reduction of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  by  $\beta$ -carotene. Indeed, the redox potential of the  $\text{BC}^{\text{•+}}/\text{BC}$  couple is as high as *ca.* 1 V in aqueous micellar solutions [57], whereas the redox potential of the  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  couple decreases from *ca.* 0.8 to 0.1 V when the pH increases from 0 to 7. It is thus clear that in mildly acidic solution  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is by far not oxidizing enough to rapidly abstract an electron from the conjugated chain of  $\beta$ -carotene.

Figure 9. Proposed mechanism for non-heme iron-induced autoxidation of  $\beta$ -carotene

Regarding the metmyoglobin-induced mechanism, it must be noted that the heme cofactor ( $\text{HmFe}^{\text{III}}$ ) is rapidly released from  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 4 [60]. Initiation may thus proceed by electron transfer from  $\beta$ -carotene to heme. As the redox potential of heme- $\text{Fe}^{\text{III}}$  is highly dependent on the environment and exposure to water [61], it is possible that the higher efficiency of  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  vs.  $\text{Fe}^{\text{III}}$  at initiating  $\beta$ -carotene autoxidation is due to its enhanced oxidation potential and facilitated access to  $\beta$ -carotene owing to its favorable location at the interface. The one-electron reduction of  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  by  $\beta$ -carotene yields  $\text{HmFe}^{\text{II}}$ , which is expected to rapidly undergo autoxidation back to  $\text{HmFe}^{\text{III}}$ . The superoxide thus formed must rapidly disproportionate into  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  at pH 4. The fact that  $\text{H}_2\text{O}_2$  does not accumulate during  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ -induced  $\beta$ -carotene autoxidation is consistent with its fast reaction with  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  to yield hypervalent iron ( $\text{Fe}^{\text{IV}}$ ) and porphyrin radicals [46, 62] that may also take part in  $\beta$ -carotene oxidation.

The saturation observed in the oxidation rate and percentage of  $\beta$ -carotene consumed when the  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  concentration is increased may reflect the oxidative degradation of the porphyrin ligand with release of non-heme  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , as already observed during heme-induced lipid peroxidation in acidic conditions [60].

## CONCLUSION

Dietary  $\beta$ -carotene is the main source of vitamin A in humans. However, the amount of  $\beta$ -carotene that is actually absorbed by intestinal cells (bioavailability) and thus cleaved in retinal and retinol is limited. Factors limiting bioavailability of  $\beta$ -carotene are diverse and their relative importance is not elucidated. Based on the dietary abundance of heme iron and its efficiency in initiating  $\beta$ -carotene autoxidation in mildly acidic conditions, it may be suggested that a meal rich in iron may significantly decrease the bioavailability of  $\beta$ -carotene due to substantial oxidative degradation in the gastric compartment. Nutritional studies on the stability of  $\beta$ -carotene, in gastric fluids *in vitro* ([Yeum, Lee-Kim et al. 1995](#)) or after intervention trials on humans ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)), reported lower degradation of  $\beta$ -carotene, releasing only isomers when  $\beta$ -carotene was digested inside food matrix, and some excentric cleavage products when it was digested as a pure molecule. However, in such works, test meals containing  $\beta$ -carotene are usually iron-free, while we found that this could noticeably modify the carotenoid stability (almost no autoxidation was found without iron). New trials on humans given a diet rich in both  $\beta$ -carotene and sources of hemic iron (the main form of dietary iron) would be necessary to assess the extent of  $\beta$ -carotene oxidation *in vivo*, compared to the one in our chemical micellar model of the gastric compartment.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Michel Carail and Christian Ginies for their technical assistance for the UPLC/UV-Vis-DAD/MS and GC-MS analysis respectively.

## REFERENCES

1. Britton, G.; Khachik, F. Carotenoids in food. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., eds. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009: 45-66.
2. Khachik, F. Analysis of carotenoids in nutritional studies. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
3. Mortensen, A. Supplements. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
4. Krinsky, N. I.; Johnson, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 26:459-516; 2005.
5. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Carotenoids. Volume 5: Nutrition and health. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
6. Rock, C. L. Carotenoids and cancer. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
7. Stahl, W.; Sies, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740:101-107; 2005.
8. Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 58:100-110; 2004.
9. Canene-Adams, K.; Erdman, J. W., Jr. Absorption, transport, distribution in tissues and bioavailability. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
10. McNulty, H.; Jacob, R. F.; Mason, R. P. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *The American Journal of Cardiology* 101:S20-S29; 2008.
11. Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24:345-351; 2003.
12. Yeum, K. J.; Aldini, G.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I. Antioxidant/pro-oxidant actions of carotenoids. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
13. Palozza, P.; Serini, S.; Ameruso, M.; Verdecchia, S. Modulation of intracellular signalling pathways by carotenoids. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
14. Tang, G. W.; Russell, R. M. Carotenoids as provitamin A. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
15. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Special molecules, special properties. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., eds. Carotenoids. Volume 4: Natural functions. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2008: 1-6.
16. Wang, X. D. Biological activities of carotenoid metabolites. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 2009.
17. Peto, R.; Doll, R.; Buckley, J. D.; Sporn, M. B. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates. *Nature* 290:201-208; 1981.
18. Johnson, E. J. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care* 5:56-65; 2002.
19. Dugas, T. R.; Morel, D. W.; Harrison, E. H. Dietary supplementation with beta-carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 26:1238-1244; 1999.
20. Matos, H. R.; Marques, S. A.; Gomes, O. F.; Silva, A. A.; Heimann, J. C.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G. Lycopene and beta-carotene protect in vivo iron-induced oxidative stress damage in rat prostate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39:203-210; 2006.
21. Mordt, R. C. Mechanism of beta-carotene degradation. *Biochemical Journal* 292:310-312; 1993.

22. Caris-Veyrat, C.; Amiot, M. J.; Ramasseul, R.; Marchon, J. C. Mild oxidative cleavage of beta,beta-carotene by dioxygen induced by a ruthenium porphyrin catalyst: characterization of products and of some possible intermediates. *New J. Chem.* 25:203-206; 2001.
23. Benevides, C. M. d. J.; Veloso, M. C. d. C.; de Paula Pereira, P. A.; Andrade, J. B. d. A chemical study of [beta]-carotene oxidation by ozone in an organic model system and the identification of the resulting products. *Food Chemistry* 126:927-934; 2011.
24. Mordi, R. C.; Walton, J. C.; Burton, G. W.; Hughes, L.; Ingold, K. U.; Lindsay, D. A.; Moffatt, D. J. Oxidative-degradation of beta-carotene and beta-apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* 49:911-928; 1993.
25. Finkelshtein, E. I.; Krasnokutskaya, I. S. Reactivity of retinoids and carotenoids in autoxidation. *Journal of Physical Organic Chemistry* 9:411-418; 1996.
26. Henry, L. K.; Puspitasari-Nienaber, N. L.; Jaren-Galan, M.; van Breemen, R. B.; Catignani, G. L.; Schwartz, S. J. Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:5008-5013; 2000.
27. Onyewu, P. N.; Ho, C. T.; Daun, H. Characterization of beta-carotene thermal degradation products in a model food system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*: 63 (11) 1437-1441 63:1437-1441; 1986.
28. Kanasawud, P.; Crouzet, J. C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. I. beta-carotene degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 38 (1) 237-243 38:237-243; 1990.
29. Scita, G. The stability of beta-carotene under different laboratory conditions. *Journal of Nutritional Biochemistry* 3:124-128; 1992.
30. Limbo, S.; Torri, L.; Piergiovanni, L. Light-induced changes in an aqueous beta-carotene system stored under halogen and fluorescent lamps, affected by two oxygen partial pressures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:5238-5245; 2007.
31. Rodriguez, E. B.; Rodriguez-Amaya, D. B. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from beta-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. *Food Chemistry* 101:563-572; 2007.
32. Sommerburg, O.; Langhans, C.-D.; Arnhold, J.; Leichsenring, M.; Salerno, C.; Crifò, C.; Hoffmann, G. F.; Debatin, K.-M.; Siems, W. G. [Beta]-carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid--a model for neutrophil-derived degradation. *Free Radical Biology and Medicine* 35:1480-1490; 2003.
33. Takahashi, A.; Shibasaki-Kitakawa, N.; Yonemoto, T. Kinetic model for autoxidation of beta-carotene in organic solutions. *Journal of the American Oil Chemists Society* 76:897-903; 1999.
34. Takahashi, A.; Shibasaki-Kitakawa, N.; Yonemoto, T. A rigorous kinetic model for beta-carotene oxidation in the presence of an antioxidant, alpha-tocopherol. *Journal of the American Oil Chemists Society* 80:1241-1247; 2003.
35. Jomová, K.; Kysel, O.; Madden, J. C.; Morris, H.; Enoch, S. J.; Budzak, S.; Young, A. J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Valko, M. Electron transfer from all-trans [beta]-carotene to the t-butyl peroxy radical at low oxygen pressure (an EPR spectroscopy and computational study). *Chemical Physics Letters* 478:266-270; 2009.
36. Handelman, G. J.; Vankuijk, F.; Chatterjee, A.; Krinsky, N. I. Characterization of products formed during the autoxidation of beta-carotene. *Free Radical Biology and Medicine* 10:427-437; 1991.
37. Stratton, S. P.; Schaefer, W. H.; Liebler, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation-products of beta-carotene. *Chemical Research in Toxicology* 6:542-547; 1993.
38. El-Tinay, A. H.; Chichester, C. O. Oxidation of beta-carotene, Site of initial attack. *J Org Chem* 35:2290-2293; 1970.
39. Gao, Y. L.; Kispert, L. D. Reaction of carotenoids and ferric chloride: equilibria, isomerization, and products. *J. Phys. Chem. B* 107:5333-5338; 2003.

40. Gao, G. Q.; Deng, Y.; Kispert, L. D. Photoactivated ferric chloride oxidation of carotenoids by near-UV to visible light. *J. Phys. Chem. B* 101:7844-7849; 1997.
41. Chen, G.; Djuric, Z. Carotenoids are degraded by free radicals but do not affect lipid peroxidation in unilamellar liposomes under different oxygen tensions. *FEBS Lett* 505:151-154; 2001.
42. Kanner, J.; Lapidot, T. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 31:1388-1395; 2001.
43. Boon, C. S.; McClements, D. J.; Weiss, J.; Decker, E. A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50:515-532; 2010.
44. Igene, J. O.; King, J. A.; Pearson, A. M.; Gray, J. I. Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27:838-842; 1979.
45. Garcia, M. N.; Martinez-Torres, C.; Leets, I.; Tropper, E.; Ramirez, J.; Layrisse, M. Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: Iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7:49-54; 1996.
46. Baron, C. P.; Andersen, H. J. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3887-3897; 2002.
47. Tyssandier, V.; Reboul, E.; Dumas, J. F.; Bougteloup-Demange, C.; Armand, M.; Marcand, J.; Sallas, M.; Borel, P. Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 284:G913-G923; 2003.
48. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy. Basel Switzerland: Birkhauser Verlag AG; 1995.
49. Södergren, E.; Nourooz-Zadeh, J.; Berglund, L.; Vessby, B. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 37:137-146; 1998.
50. El Hajji, H.; Nkhili, E.; Tomao, V.; Dangles, O. Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research* 40:303-320; 2006.
51. Caris-Veyrat, C.; Schmid, A.; Carail, M.; Böhm, V. cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanisms of formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7318-7325; 2003.
52. Armand, M.; Borel, P.; Dubois, C.; Senft, M.; Peyrot, J.; Salducci, J.; Lafont, H.; Lairon, D. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am. J. Physiol.* 266:G372-G381; 1994.
53. Mei, L.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:5072-5077; 1998.
54. Mancuso, J. R.; McClements, D. J.; Decker, E. A. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4112-4116; 1999.
55. Lewinsohn, E.; Sitrit, Y.; Bar, E.; Azulay, Y.; Meir, A.; Zamir, D.; Tadmor, Y. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3142-3148; 2005.
56. Welch, K. D.; Davis, T. Z.; Aust, S. D. Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffer, ligands and chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397:360-369; 2002.
57. Boon, C. S.; McClements, D. J.; Weiss, J.; Decker, E. A. Role of Iron and hydroperoxides in the degradation of lycopene in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2009.

58. Burke, M.; Edge, R.; Land, E. J.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. One-electron reduction potentials of dietary carotenoid radical cations in aqueous micellar environments. *FEBS Letters* 500:132-136; 2001.
59. Qian, S. Y.; Buettner, G. R. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1447-1456; 1999.
60. Goupy, P.; Vulcain, E.; Carls-Veyrat, C.; Dangles, O. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. *Free Radical Biology and Medicine* 43:933-946; 2007.
61. Edholm, O.; Nordlander, P.; Chen, W.; Ohlsson, P. I.; Smith, M. L.; Paul, J. The Effect of Water on the Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> Reduction Potential of Heme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268:683-687; 2000.
62. Carlsen, C. U.; Møller, J. K. S.; Skibsted, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews* 249:485-498; 2005.



### 3. PUBLICATION II - STABILITY OF NOVEL BACTERIAL CAROTENOIDS IN THE PRESENCE OF IRON IN A MICELLAR MODEL OF THE GASTRIC COMPARTMENT: COMPARISON WITH COMMON CAROTENOIDS

*Journal of Agricultural and Food chemistry, en préparation pour soumission*

CHARLOTTE SY<sup>1,2</sup>, PATRICK BOREL<sup>3-5</sup>, OLIVIER DANGLES<sup>2,1</sup>, & CATHERINE CARIS-VEYRAT<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR408, Safety and Quality of Plant Products, Site Agroparc, 84000, Avignon, France

<sup>2</sup> University of Avignon, UMR408, UMR408, 84000, Avignon, France

<sup>3</sup> INRA, UMR1260 "Lipid Nutrients and Prevention of Metabolic Diseases", F-13385 Marseille, France

<sup>4</sup> INSERM, ERL U1025 "Bioavailability of Micronutrients", F-13385 Marseille, France

<sup>5</sup> Aix-Marseille Univ, faculté de Médecine, F-13385, France

\* Corresponding author. E-mail address: catherine.caris@avignon.inra.fr

#### ABSTRACT

---

Recently isolated spore-forming pigmented marine bacteria, *Bacillus indicus* HU36 and *Bacillus firmus* GB1 are sources of cocktails of carotenoids (about fifteen distinct yellow and orange O-alkylglycosides and about thirteen distinct pink O-acylglycosides, respectively). These carotenoids are expected to be more heat- and gastric-stable than common carotenoids. In this study, the oxidation of the carotenoids was initiated by free iron (Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup>) or by heme iron (metmyoglobin) in a mildly acidic aqueous solution mimicking the gastro-intestinal medium. All bacterial carotenoids were more stable in the presence of heme iron than with free iron. Carotenoid autoxidation initiated by Fe<sup>II</sup> is relatively fast and likely involves reactive oxygen species (ROS) derived from Fe<sup>II</sup> and O<sub>2</sub>. By contrast, the corresponding reaction with Fe<sup>III</sup> is kinetically blocked by the slow preliminary reduction of Fe<sup>III</sup> into Fe<sup>II</sup> by the carotenoids. The sensitivity of carotenoids toward autoxidation varies as follows: β-carotene > lycopene > astaxanthin > HU36 and GB1. Moreover, bacterial carotenoids reacted more quickly than common carotenoids with Fe<sup>III</sup> but much slower than common carotenoids with Fe<sup>II</sup>. This correlated with the structure of carotenoids, that can have opposite effects in a micellar system: bacterial carotenoids with electro-attracting terminal groups are less reducing than common carotenoids and less accessible to ROS, but their polary favours a location at the edge of the micelles and increases contacts with oxidant species. Finally, analysis by ultra fast HPLC-MS permitted to demonstrate that some carotenoids of the bacterial cocktails can protect the other components from oxidation.

---

**KEYWORDS:** β-carotene, lycopene, astaxanthin, bacterial carotenoids, iron, chemical model, stability, oxidation.

## INTRODUCTION

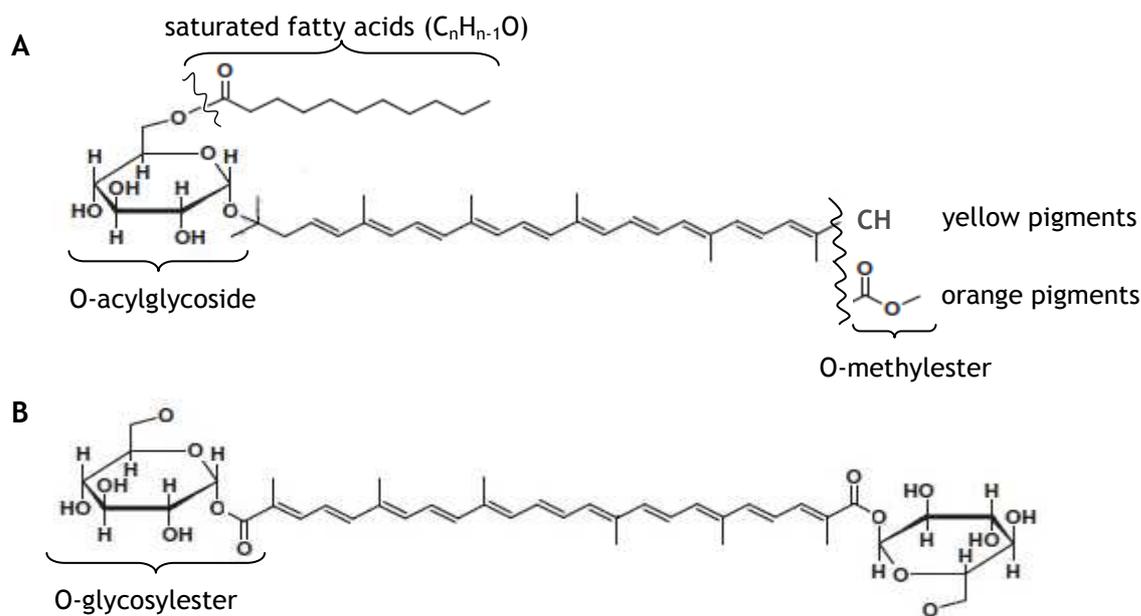
Carotenoids participate in both technological and nutritional properties of processed food. As additives they provide red, orange or yellow coloration and prevent food from oxidative alteration [1]. When consumed with food or used as complements, they are also expected to prevent degenerative diseases [2-8]. Aside from their antioxidant activity [9-15], a wide range of protective actions have been reported including retinoid-dependent signalling, cell communication, regulation of gene expression or filtering of blue light [12, 16, 17].

However, when ingested, carotenoids are also submitted to the reactive conditions of the stomach (dioxygen, temperature of 37°C, a pH varying between 6 and 2 and constant mixing [9, 18]) and are thus susceptible to oxidative degradation [19]. The first mechanism of carotenoid degradation is autoxidation [20-26]. Dietary iron for instance is highly present in food (especially in red meat), both in the heme and free forms [27, 28] and is one of the major sources of oxidative stress in the gastro-intestinal tract [29-32].

Bacterial carotenoid sources have gained interest in the past years due to their ability to provide a sustainable biosource of carotenoids for the food and feed industry [34]. A wide range of coloured spore-forming *Bacillus* species have been isolated in the past years [33]. They synthesise various red, pink or yellow-orange carotenoids with original structures, which might provide specific properties (e.g. solubility, stability) compared to common carotenoids usually found in fruits and vegetables. In higher plants, algae and fungi, the carotenoids produced contain a C40 scaffold, while bacteria can produce a diverse range of carotenoids with both C40 and C30 backbones [35]. Bacterial pigments are generally diapo/apo-carotenoids [35]: 4,4'-diapo-carotenoids have typically been found in a limited number of Gram+ bacteria such as *Pseudomonas rhodos*, *Streptococcus faecium*, *Heliobacteria*, *Staphylococcus aureus*, and 8'-apo-carotenoids were identified in *Planococcus* and *Halobacillus*.

In this work, novel prototypes of carotenoids extracted from two marine bacterial strains were investigated for their sensitivity to oxidative stress in the gastric compartment. Initially, the *Bacillus indicus* HU36 and mutant *Bacillus firmus* GB1 strains were selected for their high production of carotenoids, the resistance of their spores to UV radiations [33] and their probiotic properties [36]. The HU36 strain was isolated in human faeces and synthesises orange-yellow pigments (figure 1A) in variable proportions depending on whether they are in the vegetative cell or spore forms [33]. The corresponding carotenoid-rich extract absorbs visible light at 429, 454 (major maximum)

and 485 nm. The most abundant pigments in the extract are 1-glycosyl-3-4-dehydro-8'-apolycopene and methyl-1-glycosyl-3-4-dehydro-8'-apolycopenoate esters with fatty acid secondary chains from C7 to C15 [35]. The GB1 strain was isolated from human ileum and produces deep-pink pigments (the main one being 4,4'-diglycosyl-4,4'-diapolycopenoic diester, figure 1B), which absorb visible light at 463, 492 (major maximum) and 524 nm [33].



**Figure 1.** Chemical structures of the main carotenoids synthesised by (A) HU36 and (B) GB1 spore-forming strains.

In this study, different forms of dietary iron were compared for their propensity to induce carotenoid autoxidation in the gastro-intestinal tract [37-41]. They encompass free ions and the main form of dietary iron (most abundant in red meat), metmyoglobin [29, 42]. Incorporation of dietary carotenoids into micelles as a prerequisite for intestinal absorption is naturally ensured by phospholipids, proteins and triglyceride digestion products (fatty acids, monoglycerides) [43, 44]. In this study, we simply used polyoxyethylene glycol 23 lauryl ether (Brij<sup>®</sup>35), a non-ionic tensioactive agent with a low affinity for iron ions [45-47]. For comparison, three common carotenoids were selected:  $\beta$ -carotene, lycopene (two carotenes found in fruit and vegetables) and astaxanthin (a xanthophyll from yeasts, present in fishes and crustaceans). They are among the main carotenoids commercially developed in synthetic or natural forms in today's market [2].

In a first step, the kinetics of iron-induced carotenoid autoxidation was investigated with bacterial and vegetal carotenoids. Then, insight in the product distribution was obtained from UPLC-MS analyses.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals for kinetic experiments.** Natural (all-*E*)-lycopene from tomato oleoresin (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, M = 536 g/mol, > 90%) was obtained from Conesa. Novel carotenoid extracts from *Bacillus* strains (HU36 and GB1) were displayed by members of the COLORSPORE project's consortium (Small Collaborative Project No. 207948, funded by FP7 and coordinated by the Royal Holloway University of London) [34]. Synthetic type II (all-*E*)- $\beta$ -carotene (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, M = 536 g/mol, > 95%), synthetic (all-*E*)-astaxanthin (C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>, M = 596 g.mol, > 98%), polyoxyethylene glycol 23 lauryl ether (Brij<sup>®</sup>35), FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (> 99.5%), Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H<sub>2</sub>O (98%) and myoglobin from equine heart (> 90%, essentially salt-free) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). The buffer used in the experiments is a 0.2 mol/L acetate buffer pH 4.0. Water was purified through a Millipore Q-Plus.

**Chemicals for analysis.** Formic acid (> 98%) was from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate (99,995%), anhydrous sodium sulphate (> 99%), sodium chloride (> 99.5%),  $\beta$ -cyclocitral (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O, > 90%),  $\beta$ -ionone (C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O, > 96%) and 6-methyl-5-hepten-2-one ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>, > 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France).

Methanol was from Merck (Darmstadt, Germany) and of LC-MS grade. All other solvents were from Fisher-Scientific (Loughborough, UK). Acetonitrile was of LC-MS grade, methylene chloride and n-hexane were of UPLC grade and ethyl acetate and isopropanol were of analytical grade.

**UV-visible spectroscopy.** All spectra were recorded at 25 °C on a Specord S-600 diode-array UV-Vis spectrophotometer (optical pathlength = 1 cm) equipped with an 8-cell rail, a magnetic stirring device and a thermostatic bath (Analytic Jena).

**Carotenoid stock solutions.** The crude bacterial extracts from HU36 and GB1 were dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1/1, v/v). Cocktails of purified bacterial carotenoids (~ 90%) were obtained by eluting the crude extracts by liquid chromatography on a C18 column. The pure eluent was evaporated and redissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1/1, v/v). Three pure carotenoids were chosen as standards to evaluate the stability of bacterial carotenoids: synthetic (all-*E*)- $\beta$ -carotene (purity > 95%), natural (all-*E*)-lycopene from tomato oleoresin (purity > 90%) and synthetic (all-*E*)-astaxanthin (purity > 98%). Stock standard carotenoid solutions (ca. 500  $\mu$ mol/L) were prepared by dissolving the dry samples (2.68 mg for  $\beta$ -

carotene and lycopene, 2.98 mg for astaxanthin, 3.75 mg HU36 carotenoids and 3.90 mg for GB1 carotenoids) in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The concentrations of stock carotenoid solutions were calculated precisely by absorbance measurements. The molar absorption coefficients used were 128,500 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 460 nm for β-carotene [48], 178,000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 482 nm for lycopene, 125,000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 486 nm for astaxanthin, 165,000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 454 nm for HU36 carotenoids and 225,300 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 502 nm for GB1 carotenoids in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The average molecular weights of the carotenoid cocktails from HU36 and GB1 were 750 g/mol and 784 g/mol respectively and their molar absorption coefficients were estimated from the literature [49].

**Carotenoid micelle solutions.** Experiments were carried out in an aqueous solution at pH 4 to approach postprandial digestion conditions in the stomach [44]. A 0.2 mol/L acetate buffer solution was chosen (no significant iron-chelating capacity). Purification of the buffer solution from metal contamination was achieved by elution on a chelating resin (Chelex 100<sup>®</sup>, Bio-Rad).

A synthetic non-ionic surfactant, Brij<sup>®</sup>35 (polyoxyethylene glycol dodecyl ether) was selected for the solubilisation of carotenoids in the aqueous medium. It was chosen for its good stability and very low content in hydroperoxides [50]. Brij<sup>®</sup>35 (2.42 mg) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) to obtain a 40 mmol/L stock solution.

Aliquots of stock carotenoid solutions (about 400 µL) were mixed with 2 mL stock surfactant solution and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved under magnetic stirring in 20 mL acetate buffer in order to obtain a concentration of 10 µmol/L carotenoid and 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35.

**Iron solutions.** A stock 500 mmol/L Fe<sup>III</sup> solution was prepared by dissolving 404.0 mg ferric nitrate nonahydrate in 2 mL 0.1 mol/L nitric acid. A stock 500 mmol/L Fe<sup>II</sup> solution was prepared by dissolving 279.4 mg ferrous sulphate heptahydrate in 2 mL 0.1 mol/L sulphuric acid. A stock 500 µmol/L MbFe solution was prepared by dissolving 8.9 mg myoglobin from equine heart in 1 mL milliQ water. Because of the poor solubility of myoglobin, the stock solution was filtered and its concentration was estimated by using  $\epsilon = 97,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  at 505 nm. Diluted iron solutions were then prepared by dilution of the previous stock solutions. Seven Fe<sup>III</sup> solutions were obtained in 0.1 mol/L nitric acid: 25 mmol/L, 12.5 mmol/L, 5 mmol/L, 2.5 mmol/L, 500 µmol/L, 250 µmol/L and 50 µmol/L. Seven Fe<sup>II</sup> solutions were obtained in 0.1 mol/L sulfuric acid: 25 mmol/L, 12.5 mmol/L, 5 mmol/L, 2.5 mmol/L, 500 µmol/L, 250 µmol/L and 50 µmol/L. Seven MbFe solutions

were obtained in milliQ water: 500  $\mu\text{mol/L}$ , 250  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 25  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$ , 2.5  $\mu\text{mol/L}$  and 0.5  $\mu\text{mol/L}$ .

**Oxidation experiments in the micellar system.** For kinetics measurements, the micellar system was split into a series of macro quartz spectrophotometer cells (1.96 mL). A volume of diluted iron solutions (40  $\mu\text{L}$ ) was injected in the medium at  $t_0$ , in order to have initial concentrations of 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500 and 1,000  $\mu\text{mol/L}$  for free iron, or 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10  $\mu\text{mol/L}$  for heme iron (metmyoglobin). A control experiment was performed without added iron. Cells were protected from light, covered with Teflon stoppers and kept under magnetic stirring at a constant temperature of 37°C. Each treatment was run in triplicate.

**Measurement of the total concentration of carotenoids.** Concentrations of residual carotenoids in the micellar medium can be directly measured by UV-visible spectroscopy (base-line recorded on acetate buffer). Spectra were recorded over 4 h, from 300 to 1,000 nm and kinetic curves were plotted at the wavelength of maximal absorption.

**Kinetic analyses of the data.** All the mean kinetic curves ( $n = 3$ ) were analyzed by mathematical modelling. Curve-fitting of the percentage of residual carotenoid vs. time plots were carried out using the Scientist software (MicroMath, Salt Lake city, UT). Sets of differential kinetic equations with initial conditions on percentage were input in the model. Curve-fittings were achieved through least square regression and yielded optimized values for the parameters (carotenoid degradation constants and kinetic rate constants). Standard deviations are reported.

**Samples for the structural analysis of oxidation products.** After autoxidation for 4 h, 2 mL of the reaction medium were mixed with 2 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1 mL acetate buffer and 1 mL saturated NaCl solution. The mixture was vortexed and centrifuged with a 10<sup>4</sup> rpm speed for 3 min to separate the organic and aqueous phases. The organic phase (lower fraction, about 2 mL) containing the native carotenoid and its derivatives was collected and dried by addition of anhydrous sodium sulfate and centrifugation with a 10<sup>4</sup> rpm speed for 1 min. The extract was purified by solid phase extraction on silica tubes Strata<sup>TM</sup> Si-1 (Phenomenex, France). The tensioactive agent was adsorbed on silica and the carotenoid and its derivatives were eluted by 4 mL hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1, v/v) and then 4 mL hexane/isopropanol (4/1, v/v). The eluent was evaporated under reduced pressure, redissolved in 2 mL MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1, v/v) and filtrated through 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE syringe

filters (Phenomenex, France) before being transferred to Waters UPLC<sup>®</sup> vials. After complete evaporation under argon, the residue was redissolved in 100  $\mu$ L MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v) just before the injection.

**Analyses of carotenoid derivatives by Ultra-fast HPLC-MS.** Reversed-phase ultra fast liquid chromatography analyses were performed on a Waters Acquity<sup>™</sup> Ultra Performance LC<sup>®</sup> system equipped with a diode array detector and coupled to a Brüker-daltonics 3-D high capacity ion trap mass spectrophotometer (esquire HCT<sup>™</sup> ultra MS<sup>®</sup>). A Waters Acquity<sup>™</sup> reversed-phase C<sub>18</sub> column type HSS T3 (2.1 x 150 mm, 1.8  $\mu$ m particule size) was used. For the separation, gradient elution was realised at 35 °C, using a mobile phase of two solvents at a flow rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. Eluent A contained 5  $\mu$ mol/L HCOOH and 10 mmol/L HCOONH<sub>4</sub> in MeCN:MeOH:H<sub>2</sub>O (60:20:20, v/v/v). Eluent B contained 5  $\mu$ mol/L HCOOH in EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20, v/v). The linear gradient of A and B solvents was:

- for  $\beta$ -carotene, lycopene, HU36 and GB1 carotenoids, 0-2 min, 100%A-0%B ; 14.5-15 min, 45%A-55%B ; 22 min, 40%A-60%B ; 25-26 min, 30%A-70%B ; 26.01-28 min, 100%A-0%B ;
- for astaxanthin, 0-2 min, 100%A-0%B ; 7 min, 90%A-10%B ; 15 min, 55%A-45%B, 16 min, 40%A-60%B ; 16.01-18 min, 100%A-0%B.

Absorbance was measured every 2 nm from 250 to 800 nm with a time interval of 0.1 min. The effluent of the column went towards the ion source of the MS. For mass spectra recording, the ionisation mode was alternating APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation), the corona intensity was 1  $\mu$ A, the cone pressure was 40 psi and the flow rate of dry gaz was 4 L.min<sup>-1</sup> at a temperature of 300 °C. Spectra were acquired every 40 ms with a mass range of 50 to 1000 m/z. Mass detection was optimised for each carotenoid sample: target masses were 300 for t = 0-12.5 min and 500 for t = 12.5-26 min with  $\beta$ -carotene ; 300 for t = 0-6 min and 500 for t = 6-26 min with lycopene ; 300 for t = 0-7 min and 500 for t = 7-16 min with astaxanthin ; 350 for t = 0-7 min, 600 for t = 7-11.5 min and 750 for t = 11.5-26 min with bacterial carotenoids. The software of the MS used for data analysis was Compass, version 1.3 (Brüker Daltonics).

**Determination of volatile compounds by GC-MS.** GC analysis was performed on a Shimadzu GC QP 20120 apparatus equipped with a liner (inner diameter 0.75 mm) and coupled to a mass spectrometer. Iron-induced carotenoid autoxidation was carried out with small volumes of solution (3 mL) in 20 mL glass flasks closed with a Teflon cap and placed at 37 °C for 4 h under stirring (250 rpm). Solid phase microextraction of the volatile compounds was performed directly in the head-space with a Supelco

carboxen/polydimethylsiloxane (PDMS) fibre (length 10 mm, film width 0.75  $\mu\text{m}$ ) for 25 min after 15 min of enrichment. Direct splitless injection was carried out in GC with helium (velocity = 38  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and volatile organic compounds were separated for 32 min on a Varian capillary CP-Sil 8 CB column (5% phenylmethyl polysiloxane, 30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.5  $\mu\text{m}$  film with) using the following conditions: 50°C for 2 min, increase to 150°C (5°C $\cdot\text{min}^{-1}$ ), increase to 250°C (20°C $\cdot\text{min}^{-1}$ ), then 2 min at 250°C. Mass spectra were recorded with a scan mode  $m/z = 29$  to 300, at a speed of 4 scans $\cdot\text{s}^{-1}$  and with an electronic impact energy of 70 eV. Product identification was based on the NIST databank (National Institute of Standards and Technology, Finnigan Corp., San Jose, USA).

## RESULTS

**Influence of iron on carotenoid autoxidation in Brij<sup>®</sup>35 micelles.** The concentration of residual carotenoids was followed by UV-visible spectroscopy at  $\lambda_{MAX}$  = 460 nm for  $\beta$ -carotene, 482 nm for lycopene, 486 nm for astaxanthin, 456.5 nm for HU36 and 500.5 nm for GB1. Results were expressed as:

$$\% \text{ residual carotenoids} = [ A(\lambda_{MAX})_t / A(\lambda_{MAX})_{t_0} ] \times 100,$$

with  $A(t_0)$  = initial absorbance (just before addition of iron).

At pH 4 in the absence of iron, carotenoid concentrations remained almost constant. The slight consumption observed was associated to 'spontaneous' autoxidation due to contaminating unidentified metal traces.

In the presence of  $Fe^{II}$ , carotenoid consumption began immediately. It was massive for  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin (figures 2A, 3A & 4A). In the case of HU36 and GB1 carotenoids, two steps were observed: a step of fast consumption, followed by a slower one that resulted in more residual carotenoids at the end of the kinetic runs (figures 5A & 6A). At low iron concentrations, the higher the iron concentration, the faster the carotenoid consumption. However, a slowing down was observed at high  $Fe^{II}$  concentrations (> 50  $\mu\text{mol/L}$ ).

In the presence of  $Fe^{III}$ , the consumption of  $\beta$ -carotene, lycopene, and even more evidently astaxanthin, began slowly with an induction period lasting about 5, 20 and 45 min respectively. Then, autoxidation became faster and the carotenoid concentration decreased sharply (figures 2B, 3B & 4B). This phenomenon was not observed with bacterial pigments from HU36 and GB1 (figures 5B & 6B). For  $Fe^{III}$  concentration higher than 100  $\mu\text{mol/L}$ , the rate of carotenoid consumption did not increase any more.

The kinetic profiles of carotenoid consumption were very different when  $MbFe^{III}$  was the initiator: after a fast initial consumption, the concentrations of  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin decayed almost linearly (figures 2C, 3C & 4C). A saturation in the autoxidation rate was also observed when the  $MbFe^{III}$  concentration was higher than 0.5  $\mu\text{mol/L}$  for  $\beta$ -carotene and lycopene and higher than 0.1  $\mu\text{mol/L}$  for astaxanthin. It is noteworthy that heme iron accelerates the autoxidation of common carotenoids at much lower concentrations than free iron. Interestingly, bacterial carotenoid cocktails were almost insensitive to heme iron (figures 5C & 6C).

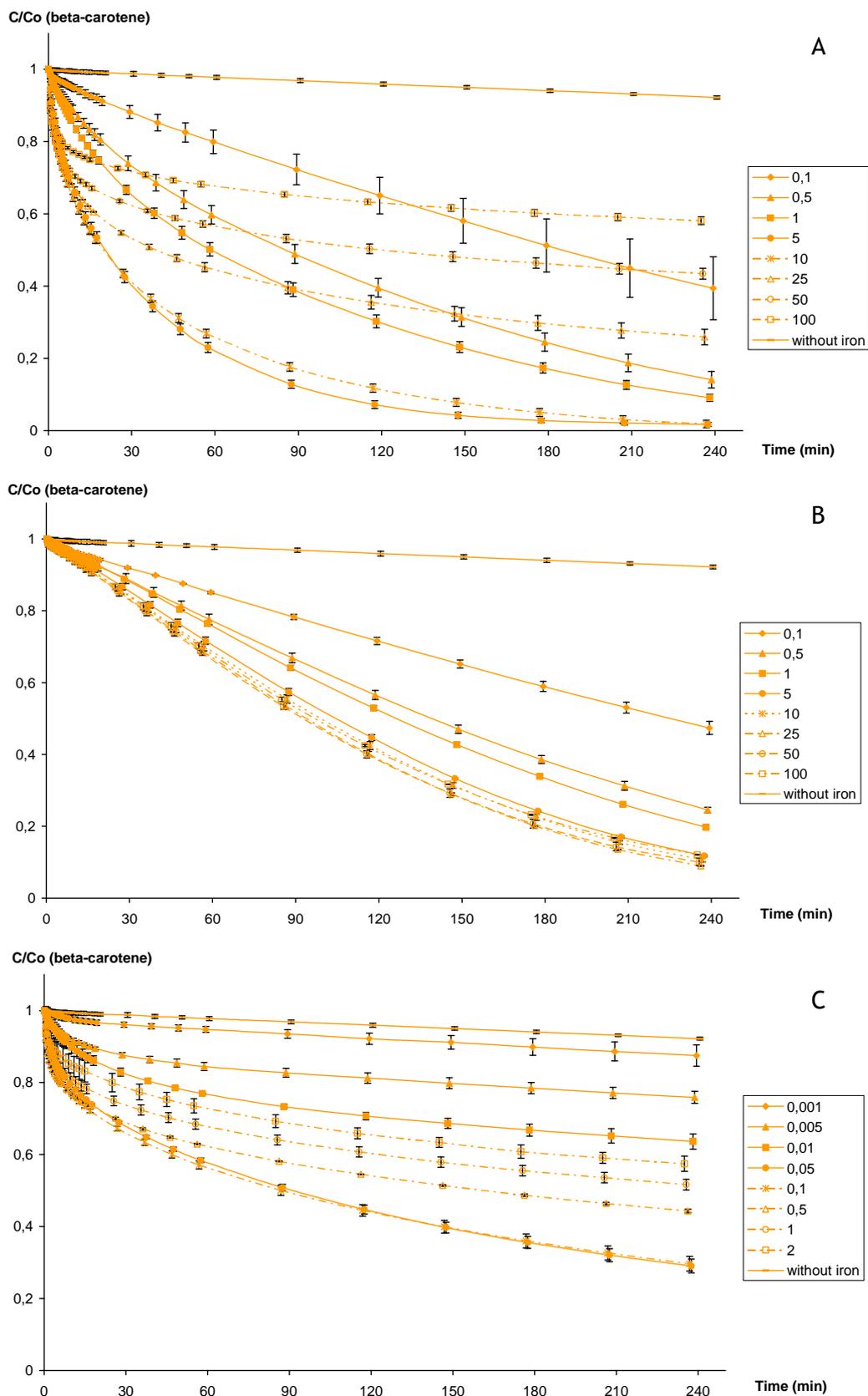
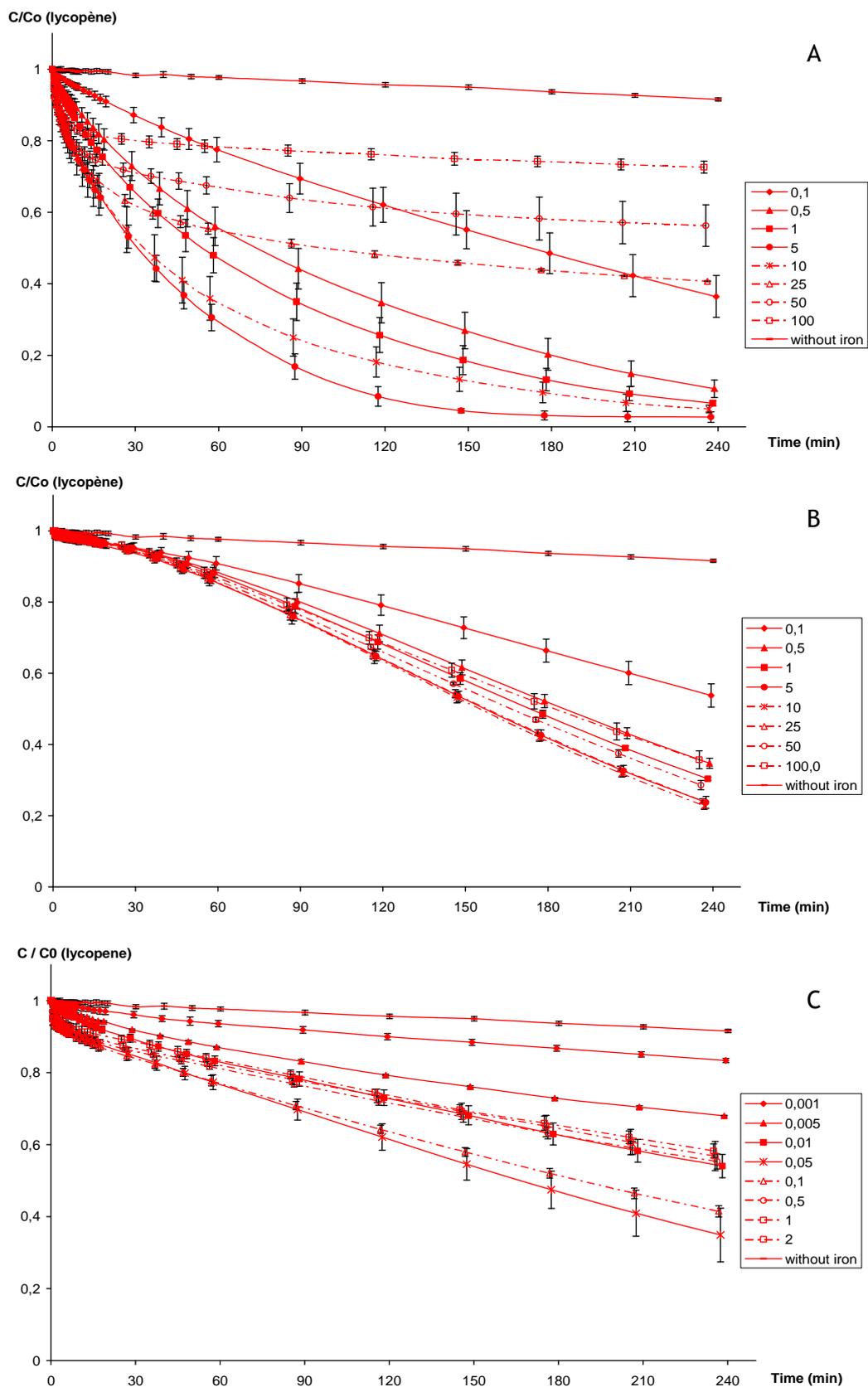
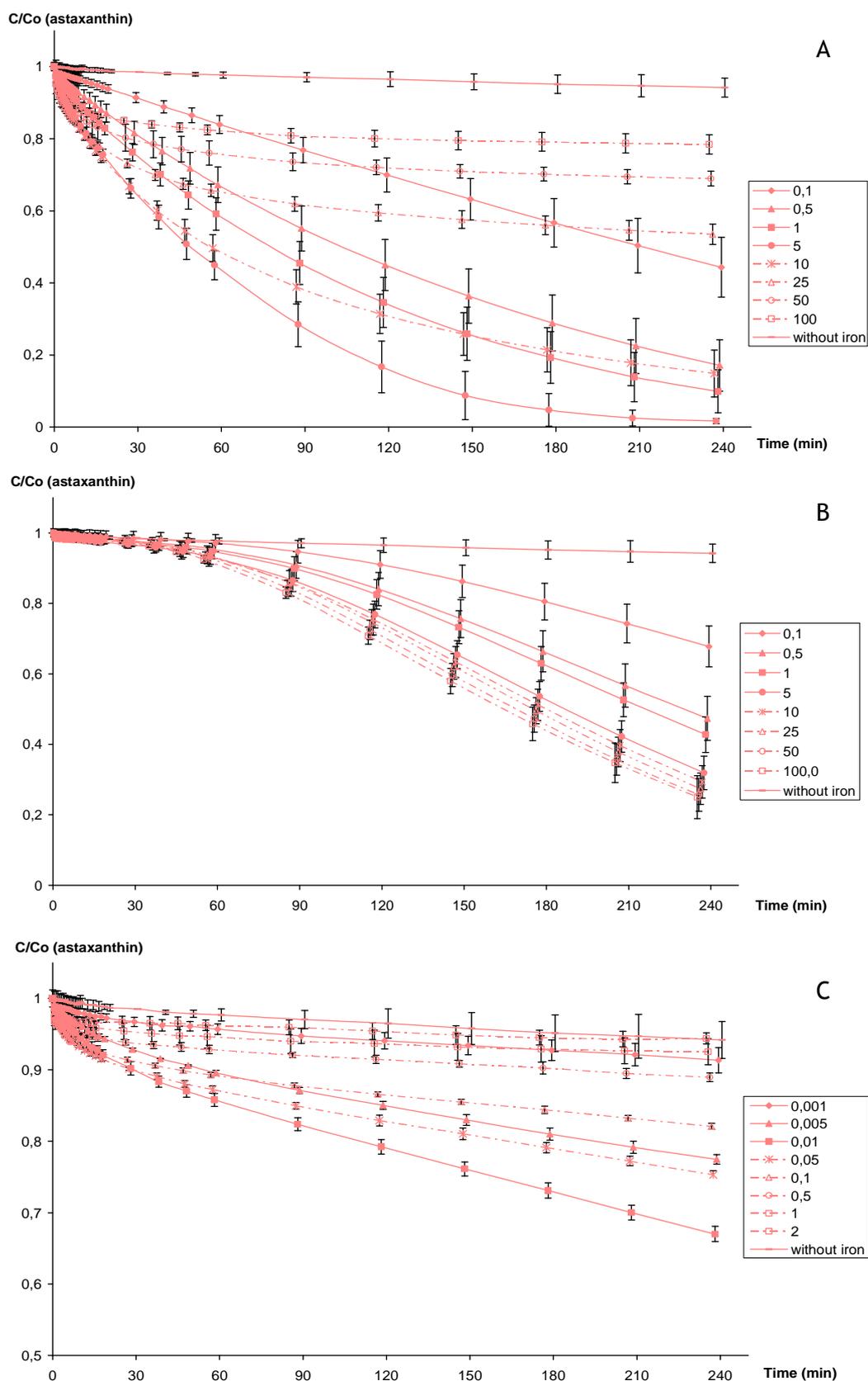


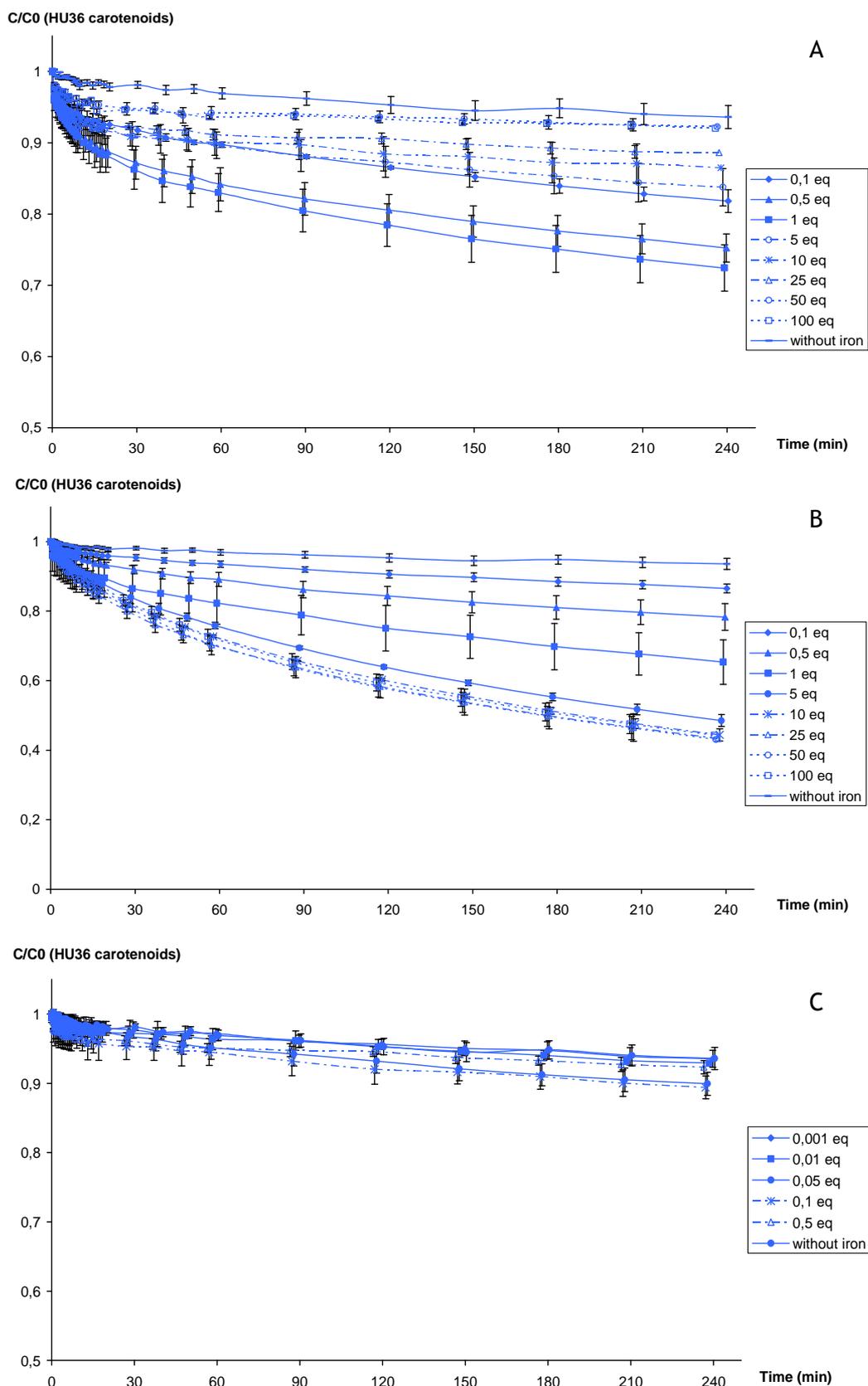
Figure 2. Kinetics of  $\beta$ -carotene autoxidation (initial concentration:  $10 \mu\text{mol/L}$ ), after addition of (A)  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , (B)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and (C)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  in increasing concentrations (data expressed in molar fraction of residual carotenoid).



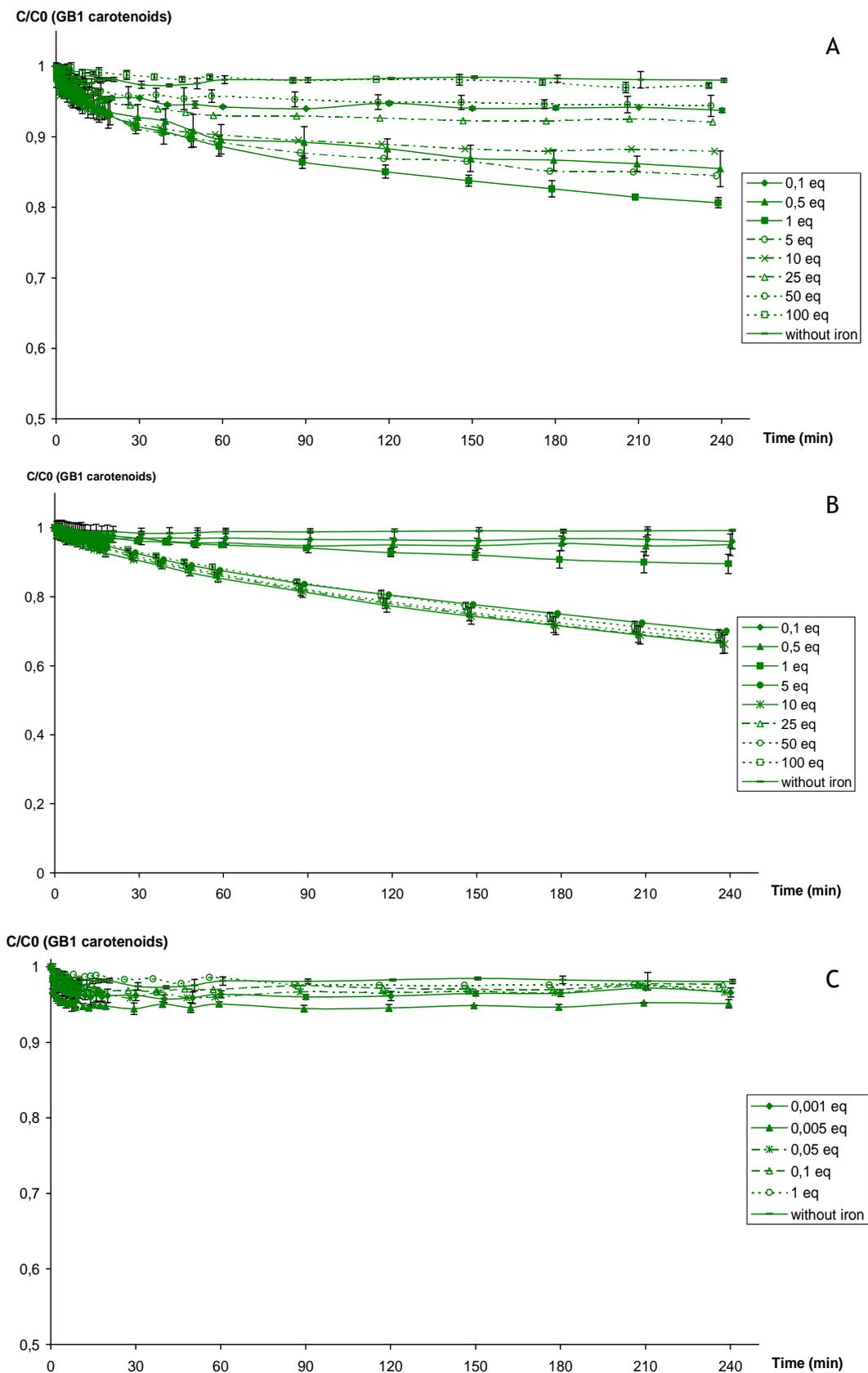
**Figure 3.** Kinetics of lycopene autoxidation (initial concentration: 10  $\mu\text{mol/L}$ ), after addition of (A)  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , (B)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and (C)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  in increasing concentrations (data expressed in molar fraction of residual carotenoid).



**Figure 4.** Kinetics of astaxanthin autoxidation (initial concentration: 10  $\mu\text{mol/L}$ ), after addition of (A)  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , (B)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and (C)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  in increasing concentrations (data expressed in molar fraction of residual carotenoid).

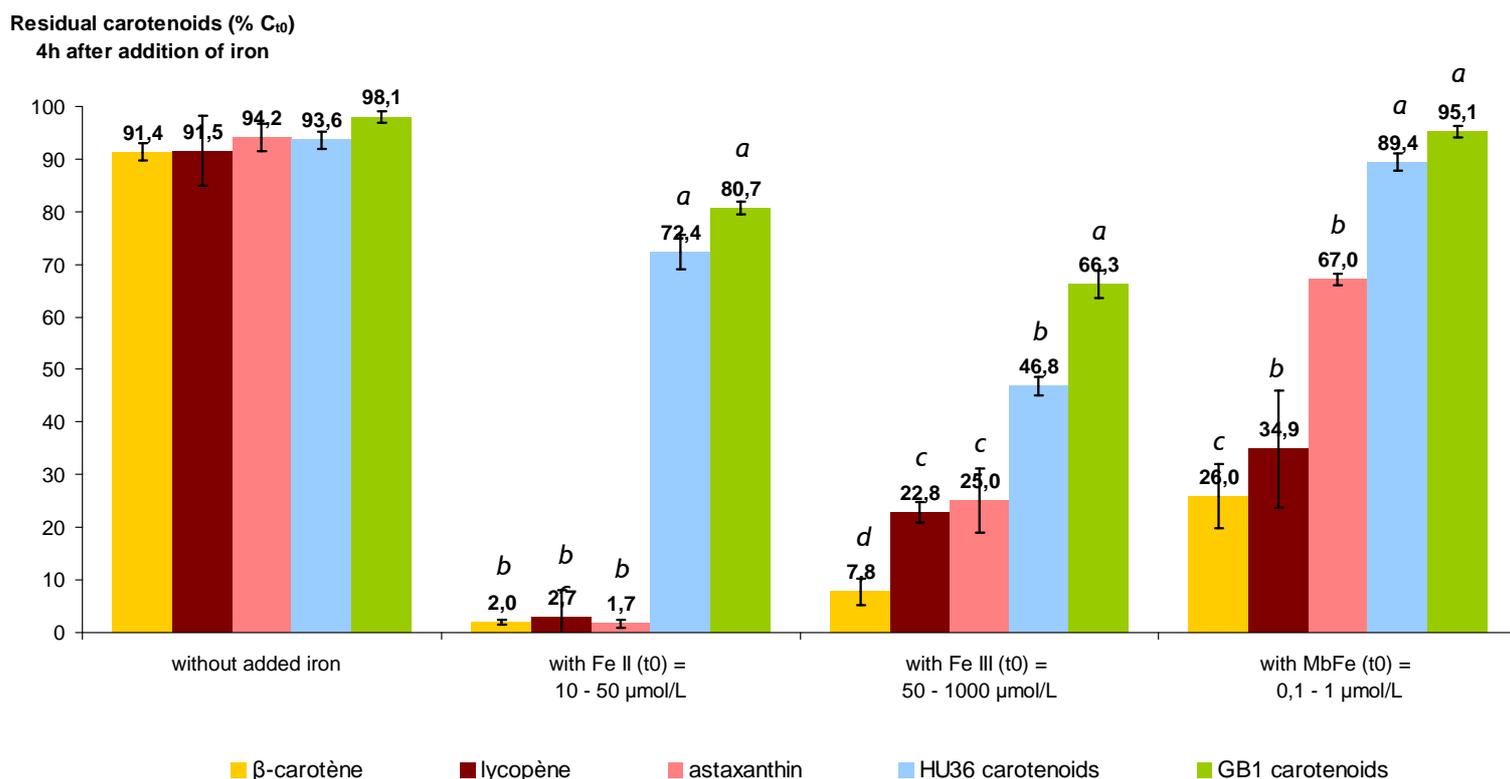


**Figure 5.** Kinetics of HU36 carotenoids autoxidation (initial concentration: 10  $\mu\text{mol/L}$ ), after addition of (A)  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , (B)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and (C)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  in increasing concentrations (data expressed in molar fraction of residual carotenoid).



**Figure 6.** Kinetics of GB1 carotenoids autoxidation (initial concentration: 10  $\mu\text{mol/L}$ ), after addition of (A)  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , (B)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and (C)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  in increasing concentrations (data expressed in molar fraction of residual carotenoid).

After 4 h of reaction, consumption was maximal with a carotenoid/iron molar ratio of *ca.* 5 equiv. for ferrous iron ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ), 10 equiv. for ferric iron ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ), and 0.05 equiv. for heme iron ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ), whatever the carotenoid studied (figure 7). In the presence of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , there was a huge difference in stability between the standard carotenoids and the two groups of bacterial carotenoids. The difference was not so pronounced with free  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and heme iron, but bacterial carotenoids still emerged as the most stable pigments.



**Figure 7.** Comparison of the stability of  $\beta$ -carotene, lycopene, astaxanthin, purified bacterial carotenoids from HU36 and GB1 after 4 h of autoxidation at pH 4, without iron and after addition of three different forms of iron. Initial concentration of carotenoids: 10  $\mu\text{mol/L}$ , initial concentrations of iron selected so as to maximize autoxidation: 10-50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{\text{II}}$ , 250-1000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{\text{III}}$  and 0.1-1.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MbFe}^{\text{III}}$ . Means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

**Mathematic modelling of the reaction kinetics.** Given the diversity of kinetic behaviours, only initial rates of carotenoid consumption and percentage of carotenoid consumption at a fixed time were compared.

In the absence of iron, autoxidation of  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin followed a linear mathematic model (apparent zero-order):

$$C_t/C_{t0} = 1 - k_1 \cdot t$$

with  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) the apparent rate constant, initial rate is  $R_0 = k_1 \cdot C_{t0}$  (table 1).

Differently, the autoxidation kinetics of bacterial carotenoids from HU36 and GB1 without iron were bi-exponential:

$$C_t/C_{t0} = 1 - \Delta R_1 (1 - e^{-k_1 \cdot t}) - \Delta R_2 (1 - e^{-k_2 \cdot t})$$

$$\Delta R_1 = \Delta C_1/C_{t0} \text{ and } \Delta R_2 = \Delta C_2/C_{t0}$$

with  $\Delta C_1$  and  $\Delta C_2$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) the concentrations of carotenoids consumed during the fast (apparent rate constant  $k_1$ , in  $\text{min}^{-1}$ ) and slow (apparent rate constant  $k_2$ , in  $\text{min}^{-1}$ ) steps, initial rate is  $R_0 = k_1 \cdot \Delta C_1 + k_2 \cdot \Delta C_2$  (table 1).

**Table 1.** Initial rates calculated for the autoxidation of the diverse carotenoids in the absence of iron. Means of 3 repetitions  $\pm$  SD.

	$R_0 \times 10^3$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )				
	$\beta$ -carotene	Lycopene	astaxanthin	HU36 carotenoids	GB1 carotenoids
without iron	$3.3 \pm 0.6$	$3.6 \pm 0.5$	$2.7 \pm 1.1$	$0.33 \pm 0.12$	$40.2 \pm 9.0$

The kinetic curves for the consumption of  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin in the presence of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  were described with a polynomial equation:

$$C_t/C_{t0} = 1 - k_1 \cdot t - a_2 \cdot t^2$$

with  $k_1$  in  $\text{min}^{-1}$  and  $a_2$  in  $\text{min}^{-2}$ , initial rate is  $R_0 = k_1 \cdot C_{t0}$  (table 2).

With the bacterial carotenoids, mono-exponential decays were observed (apparent first-order):

$$C_t/C_{t0} = 1 - \Delta R (1 - e^{-k \cdot t})$$

$$\Delta R = \Delta C/C_{t0}$$

with  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) the apparent rate constant, initial rate is  $R_0 = k \cdot \Delta C$  (table 2).

**Table 2.** Initial rates calculated for the autoxidation of the diverse carotenoids induced by Fe<sup>III</sup> at increasing concentrations. Means of 3 repetitions  $\pm$  SD.

		$R_0 \times 10^3$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )				
		$\beta$ -carotene	Lycopene	astaxanthin	HU36 carotenoids	GB1 carotenoids
with Fe <sup>III</sup> (initial conc. in equiv. BC)	0.1	26.8 $\pm$ 0.7	16.2 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 0.3	23.76 $\pm$ 3.2	21.9 $\pm$ 1.8
	0.5	41.3 $\pm$ 0.5	19.6 $\pm$ 0.7	5.5 $\pm$ 0.6	36.1 $\pm$ 4.0	40.5 $\pm$ 3.8
	1	44.1 $\pm$ 0.5	21.0 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 0.8	68.1 $\pm$ 9.6	17.6 $\pm$ 1.8
	5	54.9 $\pm$ 0.6	25.7 $\pm$ 1.1	10.8 $\pm$ 1.2	62.5 $\pm$ 5.0	28.3 $\pm$ 2.6
	10	59.1 $\pm$ 0.7	24.7 $\pm$ 1.1	11.1 $\pm$ 1.2	75.3 $\pm$ 6.4	35.7 $\pm$ 4.1
	25	62.4 $\pm$ 0.6	24.8 $\pm$ 1.0	10.6 $\pm$ 1.3	90.6 $\pm$ 8.5	31.0 $\pm$ 2.9
	50	63.4 $\pm$ 0.5	23.4 $\pm$ 0.9	12.6 $\pm$ 1.5	80.3 $\pm$ 5.5	30.0 $\pm$ 2.6
	100	33.4 $\pm$ 0.6	22.1 $\pm$ 0.9	15.3 $\pm$ 1.6	68.3 $\pm$ 3.4	23.4 $\pm$ 1.2

The kinetic curves of carotenoid consumption in the presence of Fe<sup>II</sup> (table 3) or metmyoglobin (table 4) were both described with a bi-exponential model and the initial rate is  $R_0 = k_1.\Delta C_1 + k_2.\Delta C_2$ , with  $\Delta C_1$  and  $\Delta C_2$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) the concentrations of carotenoids consumed during the fast (apparent rate constant  $k_1$ , in  $\text{min}^{-1}$ ) and slow (apparent rate constant  $k_2$ , in  $\text{min}^{-1}$ ) steps.

**Table 3.** Initial rates calculated for the autoxidation of the diverse carotenoids induced by Fe<sup>II</sup> at increasing concentrations. Means of 3 repetitions  $\pm$  SD.

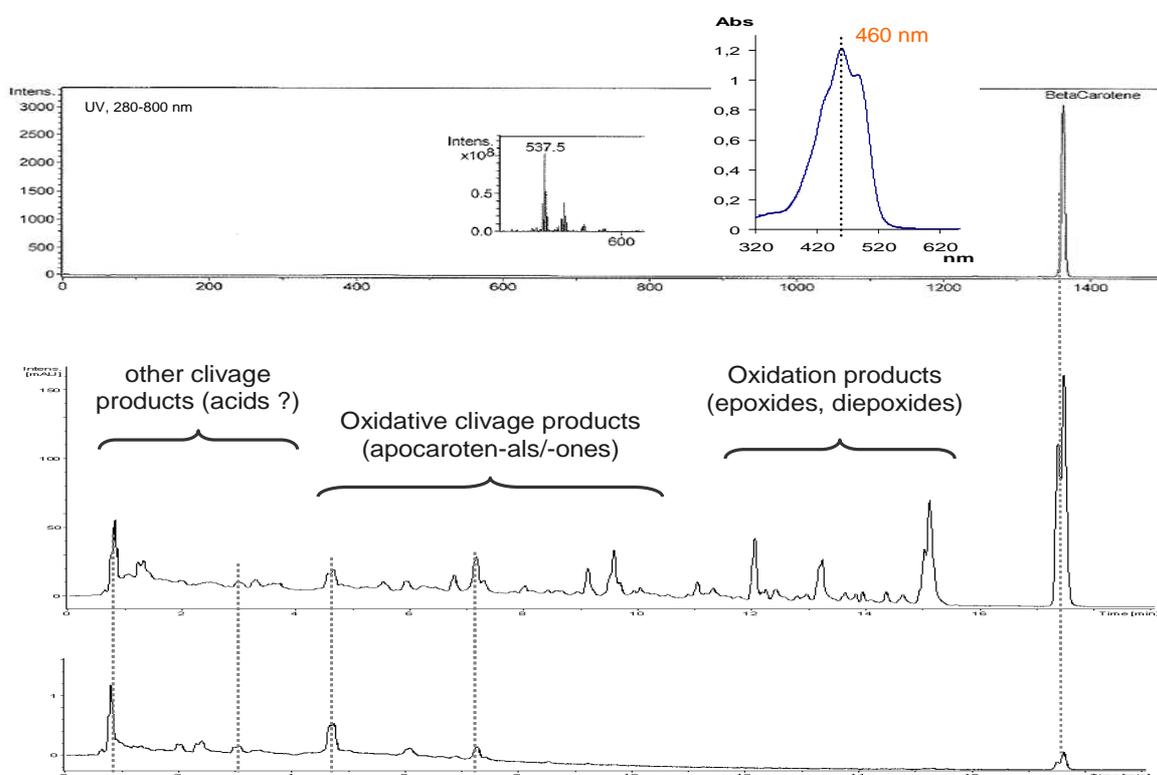
		$R_0$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )				
		$\beta$ -carotene	Lycopene	astaxanthin	HU36 carotenoids	GB1 carotenoids
with Fe <sup>II</sup> (initial conc. in equiv. BC)	0.1	14.3 $\pm$ 1.8	7.7 $\pm$ 0.9	49.6 $\pm$ 9.8	30.9 $\pm$ 2.8	52.7 $\pm$ 35.8
	0.5	17.0 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 0.8	18.9 $\pm$ 1.6	38.7 $\pm$ 3.3	26.0 $\pm$ 5.2
	1	21.2 $\pm$ 0.4	23.7 $\pm$ 1.4	40.4 $\pm$ 4.1	36.9 $\pm$ 5.2	38.4 $\pm$ 12.4
	5	74.0 $\pm$ 2.8	62.5 $\pm$ 4.8	48.0 $\pm$ 9.5	31.3 $\pm$ 3.0	6.5 $\pm$ 0.7
	10	96.0 $\pm$ 5.9	60.4 $\pm$ 5.0	49.6 $\pm$ 5.6	32.7 $\pm$ 4.9	81.6 $\pm$ 24.6
	25	118.9 $\pm$ 9.6	75.2 $\pm$ 9.1	53.6 $\pm$ 7.5	95.1 $\pm$ 23.1	60.4 $\pm$ 21.8
	50	161.2 $\pm$ 14.8	63.2 $\pm$ 3.4	38.7 $\pm$ 2.2	17.7 $\pm$ 3.4	-
	100	157.4 $\pm$ 13.6	73.2 $\pm$ 3.9	68.1 $\pm$ 5.8	73.7 $\pm$ 30.7	-

**Table 4.** Initial rates calculated for the autoxidation of the diverse carotenoids induced by MbFe<sup>III</sup> at increasing concentrations. Means of 3 repetitions  $\pm$  SD.

		$R_0$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )				
		$\beta$ -carotene	Lycopene	astaxanthin	HU36 carotenoids	GB1 carotenoids
with MbFe <sup>III</sup> (initial conc. in equiv. BC)	0.001	14.7 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 0.3	12.4 $\pm$ 3.2	10.1 $\pm$ 2.2	39.1 $\pm$ 15.6
	0.005	16.7 $\pm$ 0.7	5.2 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.6	61.6 $\pm$ 17.5	100.2 $\pm$ 37.2
	0.01	52.0 $\pm$ 2.8	8.4 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 8.1	19.5 $\pm$ 3.0	-
	0.05	73.4 $\pm$ 5.2	22.3 $\pm$ 0.9	17.3 $\pm$ 1.1	-	-
	0.1	118.4 $\pm$ 10.6	35.5 $\pm$ 1.3	22.0 $\pm$ 1.6	-	-
	0.5	100.2 $\pm$ 9.6	77.8 $\pm$ 3.6	46.4 $\pm$ 4.8	-	-
	1	85.8 $\pm$ 9.1	120.8 $\pm$ 10.1	75.8 $\pm$ 9.2	-	-
	2	-	122.1 $\pm$ 9.5	-	-	-

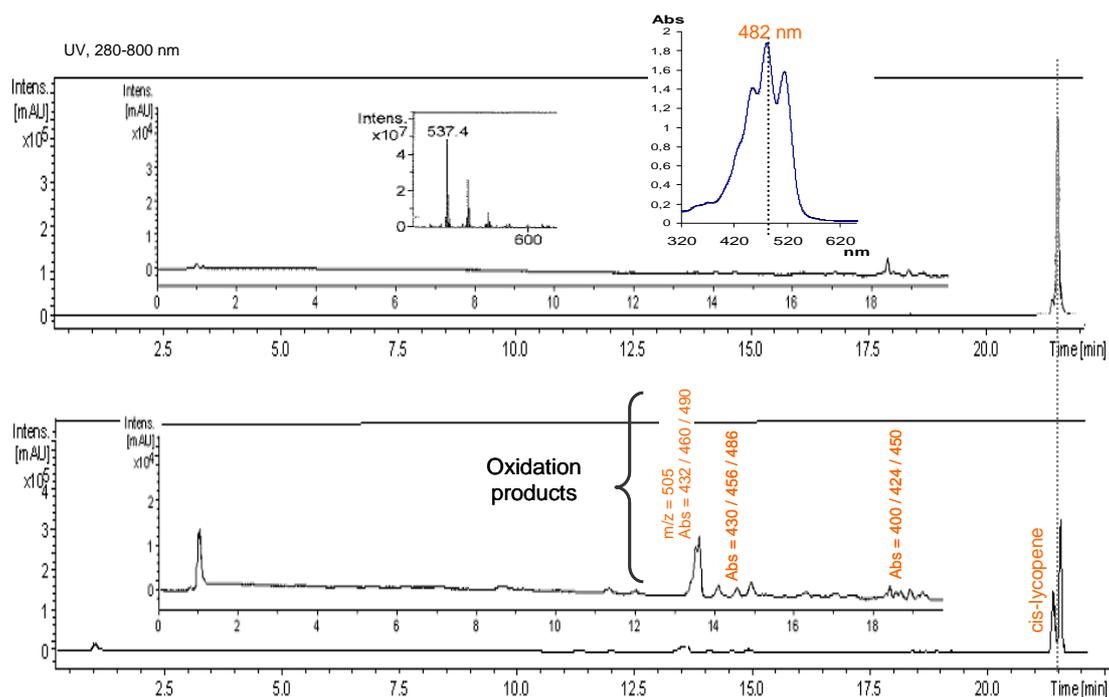
**Identification of soluble carotenoid derivatives formed in the presence of iron.**  
After 4 h of reaction, similar chromatograms were obtained whatever the initiator.

With  $\beta$ -carotene, a kinetic monitoring by UPLC-MS was carried out (figure 8): (Z)-isomers were quickly released into the medium. Then, oxidation products were formed, among which (Z)- and (E)-5,8-epoxides, 5,6-epoxide, 5,6,5',6'-diepoxide and 5,8-diepoxide were clearly identified. Then, epoxides themselves evolved to cleavage products including 10'- $\beta$ -apocarotenal, 12'- $\beta$ -apocarotenal, 14'- $\beta$ -apocarotenal and 13- $\beta$ -apocarotenone. Other smaller cleavage products were also observed but could not be identified. They might be carboxylic acids.



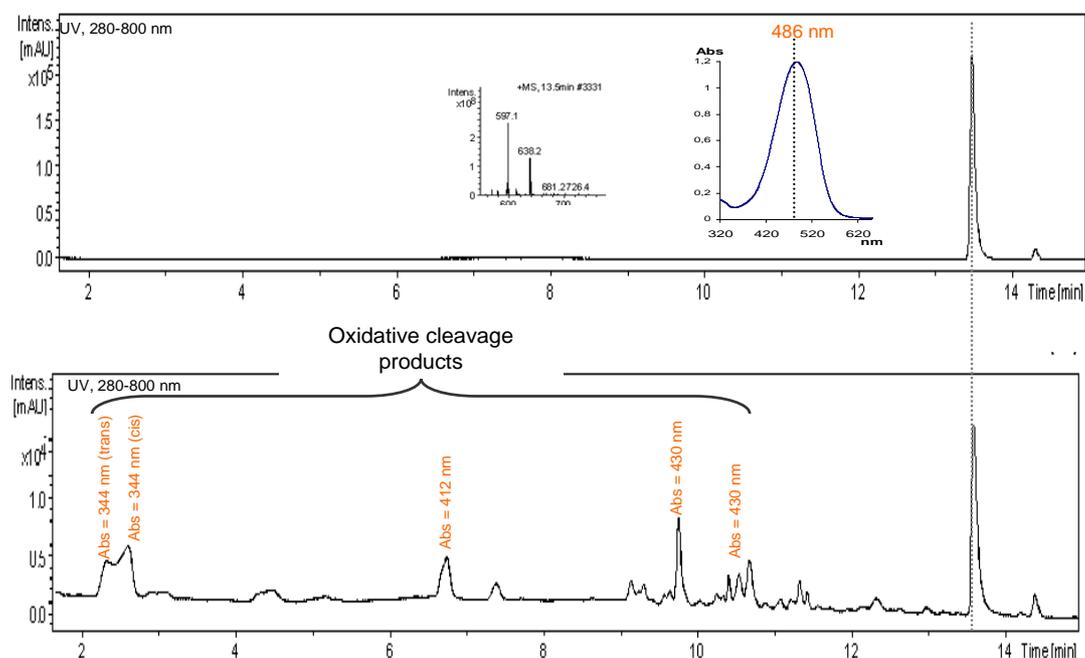
**Figure 8.** UPLC-MS analysis of iron-induced autoxidation of  $\beta$ -carotene, (A) before addition of iron, (B) at an early stage of autoxidation (e.g. with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  or  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , after 1 h) and (C) at a late stage of autoxidation (e.g. with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  or  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , after 4 h).

In the presence of iron, lycopene was isomerized by about 30%. A few oxidation products were also produced (figure 9) but could not be identified.



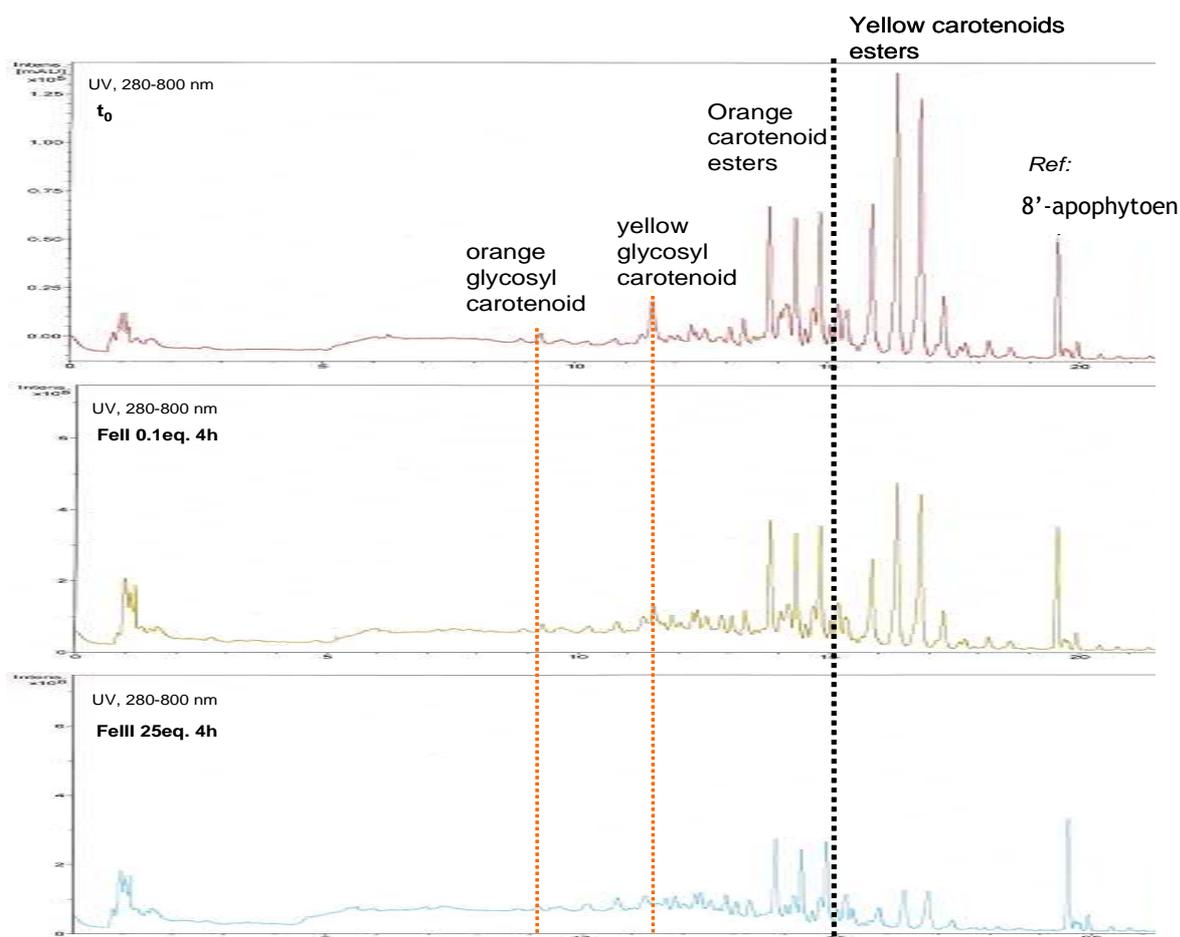
**Figure 9.** UPLC-MS analysis of iron-induced autoxidation of lycopene, (A) before addition of iron, (B) at an early stage of autoxidation (e.g. with Fe<sup>II</sup> or Fe<sup>III</sup>, after 1 h) and (C) at a late stage of autoxidation (e.g. with Fe<sup>II</sup> or Fe<sup>III</sup>, after 4 h).

Several oxidative cleavage products derived from astaxanthin were detected (absorption at 344 nm, 412 nm and 430 nm, figure 10).



**Figure 10.** UPLC-MS analysis of iron-induced autoxidation of astaxanthin, (A) before addition of iron, (B) at an early stage of autoxidation (e.g. with Fe<sup>II</sup> or Fe<sup>III</sup>, after 1 h) and (C) at a late stage of autoxidation (e.g. with Fe<sup>II</sup> or Fe<sup>III</sup>, after 4 h).

The evaluation of the residual HU36 carotenoid content was achieved by reference to the 8'-apophytoen peak used as an internal standard ( $C_{30}H_{48}$ , precursor of carotenoids, not degraded by iron). The yellow carotenoid esters were the first consumed, while the orange carotenoid esters appeared more resistant (figure 11). Moreover, no additional peaks accounting for oxidation products were observed. Additional experiments with other solvents and a normal-phase column did not permit to improve the analysis.

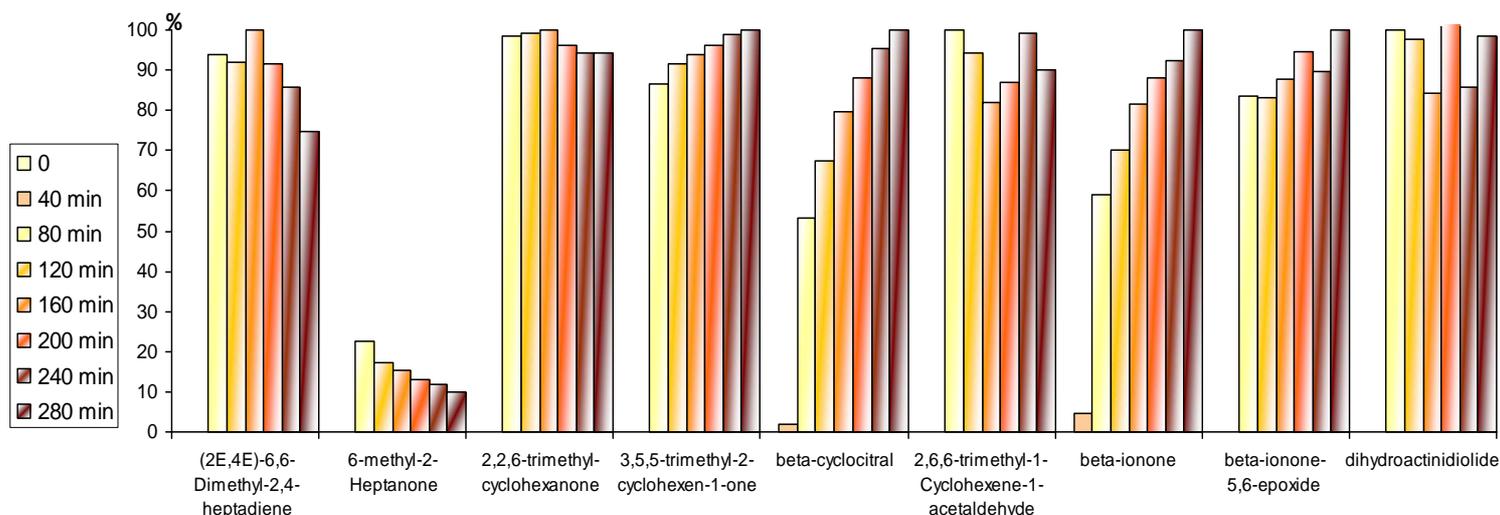


**Figure 11.** UPLC-MS analysis of iron-induced autoxidation of HU36 carotenoids, (A) before addition of iron, (B) at an early stage of autoxidation (e.g. with  $Fe^{II}$  or  $Fe^{III}$ , after 1 h) and (C) at a late stage of autoxidation (e.g. with  $Fe^{II}$  or  $Fe^{III}$ , after 4 h).

**Identification of volatile compounds.** Additional oxidation products could be identified by GC-MS analysis every 40 min during the reaction of the carotenoids with 10 equiv.  $Fe^{II}$ . The fit of every single product compared to the reference data was higher than 75%.

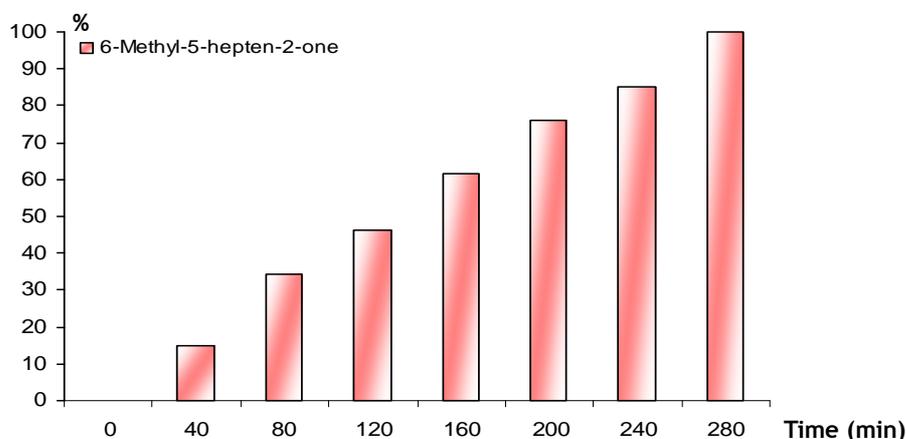
With astaxanthin and bacterial carotenoids, no volatile products were detected.

With  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cyclocitral and  $\beta$ -ionone were the two main products detected. The amounts produced could be evaluated using commercial standards: after 4 h of reaction of 50 nmol  $\beta$ -carotene with 250 nmol  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , about 2.5 nmol  $\beta$ -cyclocitral and 5 nmol  $\beta$ -ionone were released. Other products detected were: (2*E*,4*E*)-6,6-dimethyl-2,4-heptadiene, 6-methyl-2-heptanone, 2,2,6-trimethyl-cyclohexanone, 3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one,  $\beta$ -cyclocitral, 2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-acetaldehyde,  $\beta$ -ionone,  $\beta$ -ionone-5,6-epoxide and 2(4*H*)-benzofuranone-5,6,7,7*a*-tetrahydro-4,4,7*a*-trimethyl. Peaks were integrated and product accumulation was expressed as percentage of the final concentration measured (figure 12).



**Figure 12.** Evolution of the amount of volatile compounds released from  $\beta$ -carotene autoxidation in the presence of iron. Amounts are expressed as percentage of the maximum concentration measured during the 4 hours of reaction.

The reaction between lycopene and iron released one major volatile product, 6-méthyl-5-hepten-2-one (figure 13), with 0.5 nmol produced in 4 h, from 50 nmol lycopene.



**Figure 13.** Progressive release of the volatile product from lycopene autoxidation in the presence of iron. Amounts are expressed as percentage of the final concentration measured.

## DISCUSSION: Carotenoid structure impacts kinetics of autoxidation in several different ways in micellar systems

The main objective of this study was to assess the stability of cocktails of bacterial carotenoids towards dietary iron, in comparison with common carotenoids found in fruit and vegetables. We used a simple micellar system to mimic the gastric compartment (*Cf.* article I) and kinetic analysis of the reaction between each carotenoid and the different forms of iron was performed.

Like the reference carotenoids, bacterial pigments were found stable at pH 4 in the absence of iron. Besides, although MbFe<sup>III</sup> was efficient at initiating carotenoid autoxidation (high  $R_0$ ), all five carotenoids were more stable in the presence of heme iron than with free iron over 4 hours. MbFe<sup>III</sup> might require other sources of hydroperoxides to have a strong pro-oxidant activity [30].

The kinetics of Fe<sup>II</sup>-induced autoxidation of both bacterial and reference carotenoids were two-step (bi-exponential model), but oxidation of HU36 and GB1 carotenoids was much lower. From the kinetic analysis of carotenoid autoxidation the onset of Fe<sup>II</sup>-induced autoxidation ( $R_0$ ) was similar and constant with any concentration of iron for astaxanthin and HU36 and GB1 carotenoids, whereas it increased with the concentration of iron for  $\beta$ -carotene and lycopene. Then, the second phase of autoxidation was faster with the reference carotenoids than with the bacterial carotenoids as a possible consequence of faster electrophilic additions of ROS (formed from Fe<sup>II</sup> and O<sub>2</sub>) on reference carotenoids.

Previous studies reported a relationship between the structure of carotenoids and adduct formation (here, with ferryl or perferryl radicals [32]). On equal conjugated chain lengths, ketocarotenoids are generally more stable than carotenes [15, 26, 51], maybe due to a higher energy of activation of their radical intermediates or to the occupation of the C4 and C4' positions [19]. In this study, the initial speed of adduct formation was found lower for astaxanthin than for the two carotenes only from 5 equiv. Fe<sup>II</sup>. At lower iron concentrations, the higher polarity of astaxanthin, which favours its location at the edge of the micelles might be the dominant factor inducing a higher reactivity of the xanthophyll. Though the higher polarity of HU36 and GB1 carotenoids, both the carbonyl groups and acyl or alkyl groups at the ends of their polyenic chains (figure 1, A & B) tend to limit radical

higher energy of activation and the terminal positions are no accessible). This also correlate the higher stability of orange HU36 carotenoids (with a methyl group at the second end) compared to yellow HU36 carotenoids (where the first carbon is free).

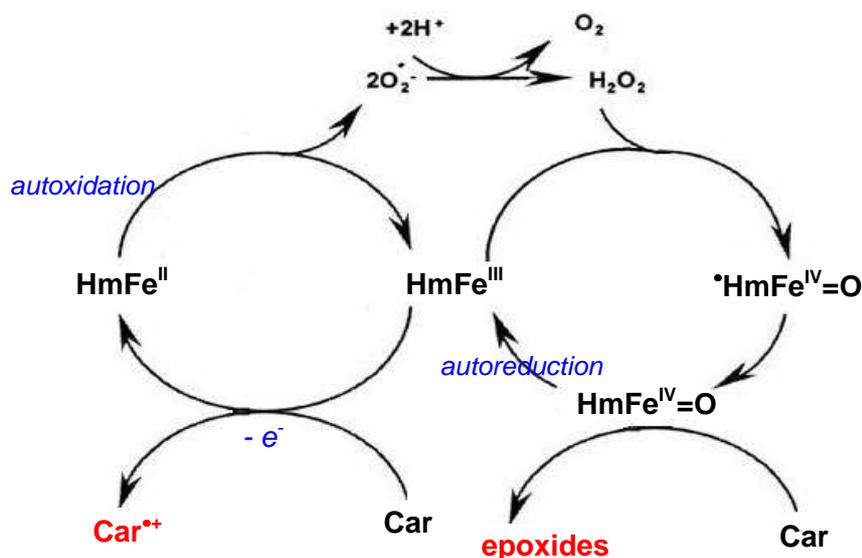
In the presence of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , oxidation of lycopene and astaxanthin displayed an induction phase, which interestingly was not observed with  $\beta$ -carotene, HU36 or GB1 carotenoids. This induction phase was measured by kinetic analysis of the onset of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -induced autoxidation ( $R_0$ ). It is thought to correspond to the one-electron reduction of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  by carotenoids, thus releasing  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , which was quicker with  $\beta$ -carotene, HU36 and GB1 carotenoids than with lycopene and astaxanthin.

The structure of carotenoids modifies their redox potential. For instance, lycopene oxidizes more easily to its radical cation than astaxanthin [52, 53]. Moreover, astaxanthin, HU36 carotenoids and GB1 carotenoids have conjugated polyene chains with electro-attracting groups, thus decreasing their reducing properties. This could explain the longer induction phase observed in the reaction between  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and astaxanthin and the absence of induction phase in the case of  $\beta$ -carotene. But it does not correlate results obtained for HU36 and GB1 carotenoids. Polarity of the carotenoids is another important factor to consider since the model is stabilised by a tensioactive agent [54]. Indeed, xanthophylls and glycosyl carotenoids tend to be more localised at the edge of the micelles, thus being more exposed to oxidant species in the aqueous phase. This is in favour of the rapid initial reaction between HU36 and GB1 carotenoids and  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . However, it is obvious that these two parameters with opposite effects compensate each other and have different relative impacts depending on the carotenoids, since one of them alone can not explain the differences in stability towards  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Besides, although their quick initial oxidation by  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , HU36 and GB1 carotenoids were much more stable than reference carotenoids after the induction phase, and more residual bacterial carotenoids were recovered avec 4 hours of reaction. Indeed, being unstable in aerobic acidic conditions [55],  $\text{Fe}^{\text{II}}$  then reacts with  $\text{O}_2$  to form ROS (ferryl and perferryl radicals, possibly the hydroperoxyl radical  $\text{HOO}^{\bullet}$ ) that add more rapidly onto the conjugated hydrocarbon chains of reference carotenoids, thus compensating the higher initial consumption of HU36 and GB1 carotenoids.

Regarding the metmyoglobin-induced mechanism, it must be noted that the heme cofactor ( $\text{HmFe}^{\text{III}}$ ) is rapidly released from  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 4 [42]. Initiation may thus proceed by one-electron reduction of  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  by carotenoid, which yields  $\text{HmFe}^{\text{II}}$  (then expected to rapidly undergo autoxidation back to  $\text{HmFe}^{\text{III}}$ ). The superoxide thus formed

must rapidly disproportionate into  $O_2$  and  $H_2O_2$  at pH 4.  $H_2O_2$  quickly reacts with  $HmFe^{III}$  to yield hypervalent iron ( $Fe^{IV}$ ) and porphyrin radicals [30, 56], that may also take part in carotenoids oxidation (figure 14).



**Figure 14.** Mechanism of the MbFe<sup>III</sup>-induced autoxidation of carotenoids. The reaction is quicker with carotenoids with reducing properties.

The most efficient reducers of HmFe<sup>III</sup> were  $\beta$ -carotene and Lycopene. Astaxanthin, and even more HU36 and GB1 carotenoids, that have conjugated polyene chains with electro-attracting groups (low reducing capacities), were significantly less efficient reducers than the carotenes. The higher polarity of bacterial carotenoids did not impact their reactivity HmFe<sup>III</sup>, contrarily to what was observed with free Fe<sup>III</sup>, due to an unelucidated mechanism.

In addition, during HU36 iron-induced autoxidation, glycosyl-apolycopenes were consumed first and could thus act as antioxidants protecting 8'-methyl-apolycopenoic acid glycosylesters.

## CONCLUSION

Bacterial carotenoids were found significantly more stable in our mildly acidic micellar system than  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin towards all three forms of dietary iron. The different initial reactivities of the carotenoids with iron were explained by a combination of structural parameters that can have opposite effects.

The lower autoxidation of bacterial carotenoids towards iron is an interesting quality, both technologically (stable colourants) and nutritionally if beneficial health properties were highlighted (long-duration molecules). In particular, the carotenoids may hence act as antioxidants, for instance in lipidic systems prone to free radical chain-reactions. However, the carotenoids are not equally good at quenching oxidation sources ( $^1O_2$ , UV...) or at scavenging free radicals (chain-breaking antioxidants). Consequently, results of antioxidant activity on the same carotenoids will be necessary to draw conclusions about their relative protective actions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the European Community's Seventh Framework Program (Colorspore, Small Collaborative Project Integrated European Project N° 207948). Special thanks are given to Paul Fraser, Laura Perez and Reena khaneja (Royal Holloway University of London, UK) for providing carotenoid-rich bacterial extracts. We thank the company Conesa (Spain) for its gift of (all-*E*)-lycopene. We also thank Michel Carail (INRA) for his excellent technical assistance on UPLC/UV-Vis-DAD/MS analysis and Christian Ginies (INRA) for his help with GC-MS analysis.

## REFERENCES

1. Spence, J. T., Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006, 19, (S4-S6).
2. Mortensen, A., Supplements. In *Carotenoids, Volume 5: nutrition and health*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.; Synnove, Eds. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 2009; pp 67-82.
3. Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D., The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2004, 58, 100-110.
4. Krinsky, N. I.; Johnson, E. J., Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2005, 26, (6), 459-516.
5. Rock, C. L., *Carotenoids and cancer*. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 2009; p 269-286.
6. Stringham, J. M.; Bovier, E. R.; Wong, J. C.; Hammond, J. B. R., The Influence of Dietary Lutein and Zeaxanthin on Visual Performance. *Journal of Food Science* 2010, 75, (1), R24-R29.
7. Bradbury, J., Lutein may help reduce atherosclerosis. *Lancet* 2001, 357, (9273), 2030.
8. Fassett, R. G.; Coombes, J. S., Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease. *Future Cardiology* 2009, 5, (4), 333-342.
9. Boon, C. S.; McClements, D. J.; Weiss, J.; Decker, E. A., Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2010, 50, (6), 515-532.
10. Paiva, S. A.; Russell, R. M., Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American college of Nutrition* 1999, 18, (5), 426-33.
11. Stahl, W.; Sies, H., Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 2003, 24, (6), 345-351.
12. Rodriguez-Amaya, D. B., Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 2010, 23, (7), 726-740.
13. Matos, H. R.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H., Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 2000, 383, (1), 56-9.
14. Matos, H. R.; Marques, S. A.; Gomes, O. F.; Silva, A. A.; Heimann, J. C.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G., Lycopene and beta-carotene protect in vivo iron-induced oxidative stress damage in rat prostate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006, 39, (2), 203-210.
15. Mortensen, A.; Skibsted, L. H., Importance of Carotenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, (8), 2970-2977.
16. Stahl, W.; Sies, H., Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2005, 1740, (2), 101-107.
17. Palozza, P.; Serini, S.; Ameruso, M.; Verdecchia, S., Modulation of intracellular signalling pathways by carotenoids. In *Carotenoids, Volume 5: nutrition and health*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.; Synnove, Eds. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 2009; pp 211-234.
18. Kanner, J.; Lapidot, T., The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 2001, 31, (11), 1388-1395.
19. Woodall, A. A.; Wai-Ming, L. S.; Weesie, J. R.; Jackson, J. M.; Britton, G., Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997, 1336, 33-42.

20. Mordi, R. C.; Walton, J. C.; Burton, G. W.; Hughes, L.; Ingold, K. U.; Lindsay, D. A.; Moffatt, D. J., Oxidative-degradation of beta-carotene and beta-apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* 1993, 49, (4), 911-928.
21. Martin, H. D.; Ruck, C.; Schmidt, M.; Sell, S.; Beutner, S.; Mayer, B.; Walsh, R., Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure and Applied Chemistry* 1999, 71, (12), 2253-2262.
22. Finkelshtein, E. I.; Krasnokutskaya, I. S., Reactivity of retinoids and carotenoids in autoxidation. *Journal of Physical Organic Chemistry* 1996, 9, (6), 411-418.
23. Henry, L. K.; Puspitasari-Nienaber, N. L.; Jaren-Galan, M.; van Breemen, R. B.; Catignani, G. L.; Schwartz, S. J., Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, (10), 5008-5013.
24. Benevides, C. M. d. J.; Veloso, M. C. d. C.; de Paula Pereira, P. A.; Andrade, J. B. d., A chemical study of beta-carotene oxidation by ozone in an organic model system and the identification of the resulting products. *Food Chemistry* 2011, 126, (3), 927-934.
25. Handelman, G. J.; Vankuijk, F.; Chatterjee, A.; Krinsky, N. I., Characterization of products formed during the autoxidation of beta-carotene. *Free Radical Biology and Medicine* 1991, 10, (6), 427-437.
26. Perez-Galvez, A.; Minguez-Mosquera, M. I., Structure-reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, (10), 4864-4869.
27. Igene, J. O.; King, J. A.; Pearson, A. M.; Gray, J. I., Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1979, 27, (4), 838-842.
28. Garcia, M. N.; Martinez-Torres, C.; Leets, I.; Tropper, E.; Ramirez, J.; Layrisse, M., Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: Iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1996, 7, (1), 49-54.
29. Vulcain, E.; Goupy, P.; Caris-Veyrat, C.; Dangles, O., Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radical Research* 2005, 39, (5), 547-563.
30. Baron, C. P.; Andersen, H. J., Myoglobin-Induced Lipid Oxidation. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, (14), 3887-3897.
31. Jomová, K.; Kysel, O.; Madden, J. C.; Morris, H.; Enoch, S. J.; Budzak, S.; Young, A. J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Valko, M., Electron transfer from all-trans beta-carotene to the t-butyl peroxy radical at low oxygen pressure (an EPR spectroscopy and computational study). *Chemical Physics Letters* 2009, In Press, Corrected Proof.
32. Welch, K. D.; Davis, T. Z.; Aust, S. D., Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffer, ligands and chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002, 397, 360-369.
33. Duc, L. H.; Fraser, P. D.; Tam, N. K. M.; Cutting, S. M., Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *Fems Microbiology Letters* 2006, 255, (2), 215-224.
34. Khaneja, R.; Perez-Fons, L.; Fakhry, S.; Baccigalupi, L.; Steiger, S.; To, E.; Sandmann, G.; Dong, T. C.; Ricca, E.; Fraser, P. D.; Cutting, S. M., Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 2010, 108, (6), 1889-1902.
35. Perez-Fons, L.; Steiger, S.; Khaneja, R.; Bramley, P. M.; Cutting, S. M.; Sandmann, G.; Fraser, P. D., Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2010, 1811, (3), 177-185.
36. Hong, H. A.; Huang, J. M.; Khaneja, R.; Hiep, L. V.; Urdaci, M. C.; Cutting, S. M., The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 105, (2), 510-520.

37. Gao, G. Q.; Deng, Y.; Kispert, L. D., Photoactivated ferric chloride oxidation of carotenoids by near-UV to visible light. *Journal of Physical Chemistry B* 1997, 101, (39), 7844-7849.
38. Gao, Y. L.; Kispert, L. D., Reaction of carotenoids and ferric chloride: equilibria, isomerization, and products. *Journal of Physical Chemistry B* 2003, 107, (22), 5333-5338.
39. Wei, C. C.; Gao, G. Q.; Kispert, L. D., Selected cis/trans isomers of carotenoids formed by bulk electrolysis and iron(III) chloride oxidation. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 1997, (4), 783-786.
40. El-Tinay, A. H.; Chichester, C. O., Oxidation of beta-carotene, Site of initial attack. *J Org Chem* 1970, 35, (7), 2290-2293.
41. El Hajji, H.; Nkhili, E.; Tomao, V.; Dangles, O., Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research* 2006, 40, (3), 303-320.
42. Goupy, P.; Vulcain, E.; Carls-Veyrat, C.; Dangles, O., Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. *Free Radical Biology and Medicine* 2007, 43, (6), 933-946.
43. Armand, M.; Borel, P.; Pasquier, B.; Dubois, C.; Senft, M.; Andre, M.; Peyrot, J.; Salducci, J.; Lairon, D., Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 1996, 271, (1), G172-G183.
44. Tyssandier, V.; Reboul, E.; Dumas, J. F.; Bougteloup-Demange, C.; Armand, M.; Marcand, J.; Sallas, M.; Borel, P., Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2003, 284, (6), G913-G923.
45. Mei, L.; Decker, E. A.; McClements, D. J., Evidence of Iron Association with Emulsion Droplets and Its Impact on Lipid Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46, (12), 5072-5077.
46. Roy, J. L. Characterisation of iron-promoted lipid oxidation in emulsions. dissertation, University of Massachusetts Amherst, 1999.
47. Mancuso, J. R.; McClements, D. J.; Decker, E. A., The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (10), 4112-4116.
48. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 1994; Vol. 1B.
49. Marshall, J. R.; Wilmoth, G. J., Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *Journal of Bacteriology* 1981, 147, (3), 900-913.
50. Mancuso, J. R.; McClements, D. J.; Decker, E. A., Ability of iron to promote surfactant peroxide decomposition and oxidize alpha-tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (10), 4146-4149.
51. Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A., Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 1996, 384, 240-242.
52. Mortensen, A.; Skibsted, L. H.; Truscott, T. G., The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, 385, (1), 13-9.
53. Burke, M.; Edge, R.; Land, E. J.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G., One-electron reduction potentials of dietary carotenoid radical cations in aqueous micellar environments. *FEBS Letters* 2001, 500, (3), 132-136.
54. Goupy, P.; Reynaud, E.; Dangles, O.; Carls-Veyrat, C., Antioxidant activity of (all-E)-lycopene and synthetic apo-lycopenoids in a chemical model of oxidative stress in the gastro-intestinal tract. *New Journal of Chemistry* 2011, in press.
55. Jomova, K., Advances in metal-induced oxidative stress and human stress in human disease. *Toxicology* 2011.
56. Carlsen, C. U.; Møller, J. K. S.; Skibsted, L. H., Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews* 2005, 249, (3-4), 485-498.



## 4. AUTRES RESULTATS

## 4.1. Tables complètes des données cinétiques obtenues par modélisation des réactions d'oxydation des caroténoïdes en présence de fer

Tableau A.I : Paramètres cinétiques calculés lors de la dégradation du  $\beta$ -carotène (15  $\mu\text{mol/L}$ ) en présence de concentrations croissantes de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  + Brij 6 mmol/L, 37°C. Moyennes sur trois répétitions ( $\pm$  écarts-types).  $C(\beta\text{-carotène})_t = C(\beta\text{-carotène})_{t_0} - \Delta C_1 (1 - e^{-k_1 \cdot t}) - \Delta C_2 (1 - e^{-k_2 \cdot t})$ .

$\text{Fe}^{\text{II}}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	composés suivis ( $C_{t_0}$ in $\mu\text{mol/L}$ )	$10^2 x k_{\text{obs}1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	DC1	$10^2 x k_{\text{obs}2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	DC2	$R^2$
1.67	$\beta$ -carotène = 17.48			0.57 ( $\pm$ 0.04)	7.03 ( $\pm$ 0.43)	0.9997
	Fe II	31.19 ( $\pm$ 46.61)	0.25 ( $\pm$ 0.16)	0.54 ( $\pm$ 1.84)	1.13 ( $\pm$ 2.58)	0.9434
	Fe III	7.45 ( $\pm$ 2.80)	0.76 ( $\pm$ 0.10)			0.9223
6.83	$\beta$ -carotène = 17.18			0.73 ( $\pm$ 0.06)	9.12 ( $\pm$ 0.57)	0.9994
	Fe II	33.78 ( $\pm$ 9.47)	1.58 ( $\pm$ 0.24)	2.49 ( $\pm$ 0.48)	3.11 ( $\pm$ 0.19)	0.9983
	Fe III	12.63 ( $\pm$ 3.61)	2.80 ( $\pm$ 0.55)	0.18 ( $\pm$ 2.30)	5.28 ( $\pm$ 58.40)	0.9943
14.00	$\beta$ -carotène = 17.06			0.69 ( $\pm$ 0.05)	13.49 ( $\pm$ 0.85)	0.9995
	Fe II	68.22 ( $\pm$ 16.12)	3.58 ( $\pm$ 0.26)	1.15 ( $\pm$ 0.27)	9.18 ( $\pm$ 0.96)	0.9983
	Fe III	77.29 ( $\pm$ 13.33)	2.10 ( $\pm$ 0.11)	1.55 ( $\pm$ 0.10)	9.31 ( $\pm$ 0.21)	0.9997
65.00	$\beta$ -carotène = 16.98	38.3 ( $\pm$ 13.67)	1.00 ( $\pm$ 0.15)	1.04 ( $\pm$ 0.09)	14.52 ( $\pm$ 0.55)	0.9995
	Fe II	96.56 ( $\pm$ 30.01)	8.09 ( $\pm$ 0.59)	1.43 ( $\pm$ 0.10)	37.61 ( $\pm$ 1.43)	0.9994
	Fe III	88.16 ( $\pm$ 32.42)	5.59 ( $\pm$ 0.54)	1.66 ( $\pm$ 0.12)	38.98 ( $\pm$ 0.95)	0.9996
126.67	$\beta$ -carotène = 16.99	16.11 ( $\pm$ 4.14)	2.02 ( $\pm$ 0.34)	0.67 ( $\pm$ 0.24)	10.92 ( $\pm$ 2.10)	0.9992
	Fe II	19.17 ( $\pm$ 2.41)	18.07 ( $\pm$ 1.40)	1.04 ( $\pm$ 0.36)	25.27 ( $\pm$ 3.27)	0.9990
	Fe III	87.64 ( $\pm$ 22.24)	10.07 ( $\pm$ 0.64)	1.21 ( $\pm$ 0.18)	32.53 ( $\pm$ 2.10)	0.9989
305.00	$\beta$ -carotène = 17.43	25.12 ( $\pm$ 2.61)	1.92 ( $\pm$ 0.11)	1.11 ( $\pm$ 0.18)	4.17 ( $\pm$ 0.27)	0.9997
	Fe II	65.74 ( $\pm$ 23.46)	20.01 ( $\pm$ 2.30)	1.40 ( $\pm$ 1.33)	15.70 ( $\pm$ 5.73)	0.9892
	Fe III	59.27 ( $\pm$ 7.70)	16.95 ( $\pm$ 0.80)	1.82 ( $\pm$ 0.32)	19.56 ( $\pm$ 1.03)	0.9989
590.00	$\beta$ -carotène = 17.72	28.29 ( $\pm$ 2.13)	1.67 ( $\pm$ 0.07)	1.47 ( $\pm$ 0.24)	2.16 ( $\pm$ 0.11)	0.9997
	Fe II	30.51 ( $\pm$ 18.49)	24.97 ( $\pm$ 13.49)	4.76 ( $\pm$ 4.31)	16.41 ( $\pm$ 12.82)	0.9928
	Fe III	51.10 ( $\pm$ 15.36)	28.45 ( $\pm$ 3.15)	1.19 ( $\pm$ 2.68)	10.12 ( $\pm$ 9.94)	0.9899

**Tableau A.II** : Paramètres cinétiques calculés lors de la dégradation du  $\beta$ -carotène (15  $\mu\text{mol/L}$ ) en présence de concentrations croissantes de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  + Brij 6 mmol/L, 37°C. Moyennes sur trois répétitions.  $C(\beta\text{-carotène})_t = C(\beta\text{-carotène})_{t_0} - k_1 \cdot t - k_2 \cdot t^2$ .

$\text{Fe}^{\text{III}}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$\beta$ -carotène ( $C_{t_0}$ in $\mu\text{mol/L}$ )	$10^3 \times k_{\text{obs}1}$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$10^5 \times k_{\text{obs}2}$ ( $\mu\text{mol}^2 \cdot \text{L}^{-2} \cdot \text{min}^{-2}$ )	$R^2$
2.06	13.96	1.41	0.37	0.9993
7.67	13.97	1.67	0.51	0.9994
13.5	14.17	2.00	0.62	0.9981
58	14.14	2.00	0.85	0.9992
122.5	13.95	2.28	0.84	0.9992
288	13.82	2.00	1.02	0.9992
586	14.86	1.72	1.18	0.9993

**Tableau A.III** : Paramètres cinétiques calculés lors de la dégradation du  $\beta$ -carotène (15  $\mu\text{mol/L}$ ) en présence de concentrations croissantes de  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  + Brij 6 mmol/L, 37°C. Moyennes sur trois répétitions ( $\pm$  écarts-types).  $C(\beta\text{-carotène})_t = C(\beta\text{-carotène})_{t_0} - \Delta C_1 (1 - e^{-k_1 \cdot t}) - \Delta C_2 (1 - e^{-k_2 \cdot t})$ .

$\text{MbFe}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$\beta$ -carotène ( $C_{t_0}$ in $\mu\text{mol/L}$ )	$10^2 \times k_{\text{obs}1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	DC1	$10^2 \times k_{\text{obs}2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	DC2	$R^2$
0	13.96	12.32 ( $\pm$ 73.32)	0.02 ( $\pm$ 0.07)	0.08 ( $\pm$ 0.03)	11.04 ( $\pm$ 40.39)	0.9993
0.015	13.97	93.18 ( $\pm$ 17.04)	0.70 ( $\pm$ 0.03)	0.74 ( $\pm$ 0.13)	2.79 ( $\pm$ 0.30)	0.9994
0.075	14.17	33.17 ( $\pm$ 7.89)	1.29 ( $\pm$ 0.14)	1.06 ( $\pm$ 0.36)	3.16 ( $\pm$ 0.16)	0.9981
0.15	14.14	28.70 ( $\pm$ 4.46)	1.83 ( $\pm$ 0.14)	1.19 ( $\pm$ 0.26)	3.97 ( $\pm$ 0.32)	0.9992
0.75	13.95	40.35 ( $\pm$ 6.04)	2.24 ( $\pm$ 0.14)	1.06 ( $\pm$ 0.21)	5.55 ( $\pm$ 0.51)	0.9992
1.5	13.82	51.80 ( $\pm$ 7.29)	2.26 ( $\pm$ 0.12)	1.38 ( $\pm$ 0.22)	4.42 ( $\pm$ 0.26)	0.9992
7.5	14.86	83.70 ( $\pm$ 13.43)	1.60 ( $\pm$ 0.08)	2.35 ( $\pm$ 0.24)	2.59 ( $\pm$ 0.08)	0.9993
15	15.17	53.93 ( $\pm$ 9.45)	1.16 ( $\pm$ 0.08)	1.74 ( $\pm$ 0.20)	3.00 ( $\pm$ 0.10)	0.9993

**Tableau A.IV** : Paramètres cinétiques calculés lors de l'autoxydation des caroténoïdes (10 µmol/L) en l'absence de fer, Brij 4 mmol/L, 37°C.  $C_t/C_{t_0} = 1 - k.t$ , ou  $C_t/C_{t_0} = \Delta R_1 (1 - e^{-k_1.t}) - \Delta R_2 (1 - e^{-k_2.t})$ . Moyennes sur trois répétitions ( $\pm$  écarts-types).

sans fer	$k \times 10^4 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$R^2$
$\beta$ -carotène	3.34 ( $\pm$ 0.06)	0.9992
lycopène	3.55 ( $\pm$ 0.05)	0.9976
astaxanthine	2.74 ( $\pm$ 0.11)	0.9851

sans fer	DR1 (%)	$k_1 \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	DR2 (%)	$k_2 \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$R^2$
HU36	0.01 ( $\pm$ 0.003)	0.33 ( $\pm$ 0.12)	0.08 ( $\pm$ 0.02)	0.00007 ( $\pm$ 0.00003)	0.9876
GB1	0.02 ( $\pm$ 0.003)	20.68 ( $\pm$ 4.50)	-0.01 ( $\pm$ 0.003)	1.20 ( $\pm$ 1.77)	0.9220

**Tableau A.V** : Paramètres cinétiques calculés lors de la dégradation des caroténoïdes (10 µmol/L) en présence de concentrations croissantes de  $MbFe^{III}$  + Brij 4 mmol/L, 37°C. Moyennes sur trois répétitions ( $\pm$  écarts-types).  $C_t/C_{t_0} = \Delta R_1 (1 - e^{-k_1.t}) - \Delta R_2 (1 - e^{-k_2.t})$ .

	[MbFe] (eq. caroténoïde)	DR1 (%)	$k_1 \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	DR2 (%)	$k_2 \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$R^2$
$\beta$ -carotène	0.001	8.91 ( $\pm$ 1.39)	15.08 ( $\pm$ 1.39)	18.14 ( $\pm$ 1.12)	0.70 ( $\pm$ 0.12)	0.9984
	0.005	11.97 ( $\pm$ 0.57)	11.97 ( $\pm$ 0.57)	27.66 ( $\pm$ 0.41)	0.87 ( $\pm$ 0.58)	0.9998
	0.01	17.59 ( $\pm$ 0.52)	26.63 ( $\pm$ 1.58)	60.30 ( $\pm$ 0.99)	0.86 ( $\pm$ 0.43)	0.9996
	0.05	19.17 ( $\pm$ 0.60)	35.56 ( $\pm$ 2.58)	55.95 ( $\pm$ 1.14)	0.94 ( $\pm$ 0.06)	0.9993
	0.1	18.65 ( $\pm$ 0.56)	61.13 ( $\pm$ 5.75)	37.90 ( $\pm$ 0.96)	1.17 ( $\pm$ 0.10)	0.9982
	0.5	15.19 ( $\pm$ 0.48)	63.39 ( $\pm$ 6.37)	34.13 ( $\pm$ 0.85)	1.16 ( $\pm$ 0.09)	0.9983
	1	11.33 ( $\pm$ 0.38)	72.56 ( $\pm$ 8.25)	32.72 ( $\pm$ 0.74)	1.11 ( $\pm$ 0.08)	0.9987
	2					
lycopène	0.001	2.36 ( $\pm$ 0.31)	7.80 ( $\pm$ 1.24)	55.31 ( $\pm$ 21.91)	0.12 ( $\pm$ 0.06)	0.9994
	0.005	3.31 ( $\pm$ 0.17)	10.30 ( $\pm$ 0.71)	49.28 ( $\pm$ 1.35)	0.37 ( $\pm$ 0.02)	0.9999
	0.01	5.01 ( $\pm$ 0.29)	12.78 ( $\pm$ 1.14)	136.95 ( $\pm$ 18.00)	0.15 ( $\pm$ 0.02)	0.9998
	0.05	7.27 ( $\pm$ 0.15)	27.10 ( $\pm$ 1.28)	244.71 ( $\pm$ 22.11)	0.11 ( $\pm$ 0.01)	0.9999
	0.1	8.19 ( $\pm$ 0.11)	40.05 ( $\pm$ 1.54)	142.15 ( $\pm$ 7.19)	0.19 ( $\pm$ 0.01)	0.9999
	0.5	8.29 ( $\pm$ 0.08)	91.56 ( $\pm$ 4.32)	107.02 ( $\pm$ 7.72)	0.18 ( $\pm$ 0.02)	0.9998
	1	7.78 ( $\pm$ 0.10)	153.06 ( $\pm$ 12.89)	117.89 ( $\pm$ 14.21)	0.15 ( $\pm$ 0.02)	0.9997
	2	6.39 ( $\pm$ 0.07)	188.20 ( $\pm$ 14.93)	112.51 ( $\pm$ 8.62)	0.16 ( $\pm$ 0.01)	0.9998
astaxanthine	0.001	1.40 ( $\pm$ 0.08)	84.36 ( $\pm$ 22.88)	8.35 ( $\pm$ 0.48)	0.72 ( $\pm$ 0.09)	0.9959
	0.005	4.14 ( $\pm$ 0.33)	11.85 ( $\pm$ 1.35)	31.67 ( $\pm$ 2.96)	0.36 ( $\pm$ 0.06)	0.9994
	0.01	6.16 ( $\pm$ 0.40)	12.88 ( $\pm$ 1.29)	69.90 ( $\pm$ 13.45)	0.20 ( $\pm$ 0.05)	0.9995
	0.05	6.68 ( $\pm$ 0.22)	24.25 ( $\pm$ 1.65)	30.36 ( $\pm$ 2.76)	0.37 ( $\pm$ 0.05)	0.9992
	0.1	6.11 ( $\pm$ 0.18)	34.67 ( $\pm$ 2.56)	15.00 ( $\pm$ 0.95)	0.60 ( $\pm$ 0.08)	0.9985
	0.5	4.46 ( $\pm$ 0.10)	102.80 ( $\pm$ 10.78)	7.51 ( $\pm$ 0.50)	0.75 ( $\pm$ 0.11)	0.9962
	1	3.32 ( $\pm$ 0.05)	226.82 ( $\pm$ 27.82)	4.25 ( $\pm$ 0.14)	1.23 ( $\pm$ 0.11)	0.997
	2					
caroténoïdes de HU36	0.001	1.41 ( $\pm$ 0.07)	69.89 ( $\pm$ 15.47)	8.82 ( $\pm$ 1.70)	0.35 ( $\pm$ 0.10)	0.9939
	0.005	2.42 ( $\pm$ 0.07)	253.42 ( $\pm$ 73.56)	9.04 ( $\pm$ 1.92)	0.35 ( $\pm$ 0.11)	0.9919
	0.01	2.26 ( $\pm$ 0.06)	86.27 ( $\pm$ 13.09)			0.9931
	0.05					0.9978
caroténoïdes de GB1	0.001	2.02 ( $\pm$ 0.43)	175.87 ( $\pm$ 78.41)	1.93 ( $\pm$ 0.41)	18.79 ( $\pm$ 5.22)	0.9734
	0.005	3.33 ( $\pm$ 0.45)	287.87 ( $\pm$ 124.46)	1.86 ( $\pm$ 0.44)	23.44 ( $\pm$ 6.96)	0.9727

Tableau A.VI : Paramètres cinétiques calculés lors de la dégradation des caroténoïdes (10 µmol/L) en présence de concentrations croissantes de Fe<sup>II</sup> + Brij 4 mmol/L, 37°C. Moyennes sur trois répétitions (± écarts-types).  $C_t/C_{t0} = \Delta R_1 (1 - e^{-k_1.t}) - \Delta R_2 (1 - e^{-k_2.t})$ .

	[Fe II] (eq. caroténoïde)	DR1 (%)	k1 x102 (min-1)	DR2 (%)	k2 x102 (min-1)	R2
β-carotène	0.1	2.51 (± 0.14)	44.41 (± 8.44)	138.57 (± 7.03)	0.23 (± 0.01)	0.9998
	0.5	11.37 (± 0.60)	9.91 (± 0.63)	99.75 (± 1.38)	0.58 (± 0.02)	0.9999
	1	19.54 (± 0.49)	7.57 (± 0.18)	85.63 (± 0.35)	0.75 (± 0.02)	0.9999
	5	20.94 (± 0.71)	26.96 (± 1.39)	77.47 (± 0.64)	2.27 (± 0.04)	0.9999
	10	27.66 (± 1.11)	30.03 (± 2.12)	70.00 (± 0.99)	1.85 (± 0.08)	0.9996
	25	27.87 (± 1.08)	40.07 (± 3.44)	45.33 (± 1.07)	1.6 (± 0.13)	0.9984
	50	24.6 (± 7.86)	63.5 (± 5.94)	31.03 (± 0.91)	1.64 (± 0.16)	0.9972
	100	19.53 (± 0.52)	78.88 (± 6.98)	21.84 (± 0.67)	1.54 (± 0.16)	0.9972
lycopène	0.1	2.77 (± 0.38)	15.05 (± 3.41)	118.34 (± 5.93)	0.3 (± 0.02)	0.9998
	0.5	10.4 (± 1.05)	7.84 (± 0.80)	95.91 (± 0.90)	0.72 (± 0.03)	0.9999
	1	8.49 (± 0.60)	16.16 (± 1.61)	91.19 (± 0.47)	1.1 (± 0.02)	0.9999
	5	10.59 (± 0.47)	42.95 (± 4.32)	88.88 (± 0.45)	1.92 (± 0.03)	0.9998
	10	15.55 (± 0.86)	30.52 (± 3.12)	79.67 (± 0.77)	1.63 (± 0.05)	0.9997
	25	20.27 (± 1.46)	33.65 (± 4.52)	37.42 (± 1.32)	1.89 (± 0.20)	0.9974
	50	21.51 (± 0.64)	28.15 (± 1.60)	23.46 (± 0.69)	1.16 (± 0.13)	0.9990
	100	16.41 (± 0.35)	43.92 (± 2.37)	11.56 (± 0.63)	1.02 (± 0.17)	0.9980
astaxanthine	0.1	1.35 (± 0.02)	348.42 (± 72.58)	265.62 (± 7.58)	0.1 (± 0.003)	0.9999
	0.5	1.92 (± 0.06)	66.57 (± 8.33)	109.35 (± 0.52)	0.56 (± 0.004)	0.9999
	1	3.05 (± 0.08)	105.75 (± 13.36)	102.46 (± 0.37)	0.8 (± 0.006)	0.9999
	5	4.93 (± 0.36)	72.15 (± 19.43)	100.51 (± 0.66)	1.24 (± 0.03)	0.9996
	10	9.62 (± 0.56)	41.12 (± 5.79)	77.56 (± 0.69)	1.29 (± 0.04)	0.9997
	25	11.74 (± 9.25)	39.82 (± 6.39)	33.36 (± 0.86)	2.05 (± 0.16)	0.9981
	50	12.36 (± 0.46)	28.6 (± 1.79)	18.37 (± 0.40)	1.80 (± 0.11)	0.9993
	100	9.73 (± 0.32)	67.41 (± 6.01)	11.43 (± 0.32)	2.23 (± 0.19)	0.9978
caroténoïdes de HU36	0.1	5.28 (± 0.13)	56.67 (± 5.31)	16.28 (± 0.92)	0.62 (± 0.07)	0.9978
	0.5	7.14 (± 0.28)	51.47 (± 4.67)	18.08 (± 0.11)	1.08 (± 0.11)	0.9967
	1	7.52 (± 0.39)	46.23 (± 7.03)	20.99 (± 0.79)	1.03 (± 0.12)	0.9961
	5	6.49 (± 0.20)	47.11 (± 4.60)	12 (± 1.04)	0.66 (± 0.12)	0.9958
	10	6.46 (± 0.34)	49.39 (± 7.55)	7.21 (± 0.60)	1.11 (± 0.29)	0.9868
	25	5.32 (± 0.22)	176.88 (± 43.57)	5.53 (± 0.32)	1.91 (± 0.37)	0.9815
	50	3.78 (± 0.29)	45.74 (± 8.98)	3.75 (± 0.35)	1.36 (± 0.45)	0.9810
	100	3.25 (± 0.22)	223.6 (± 96.30)	4.08 (± 0.28)	2.62 (± 0.57)	0.9732
caroténoïdes de GB1	0.1	1.66 (± 0.19)	301.64 (± 224.03)	4.11 (± 0.20)	6.61 (± 0.76)	0.984
	0.5	3.34 (± 0.19)	73.09 (± 15.68)	10.95 (± 0.29)	1.45 (± 0.13)	0.9956
	1	2.94 (± 0.19)	123.76 (± 42.32)	16.64 (± 0.44)	1.19 (± 0.09)	0.9967
	5	4.69 (± 0.58)	11.35 (± 1.61)	10.54 (± 0.38)	1.07 (± 0.16)	0.9986
	10	4.97 (± 0.28)	160.65 (± 49.55)	8.32 (± 0.37)	2.14 (± 0.32)	0.987
	25	3.20 (± 0.23)	184.37 (± 68.75)	4.39 (± 0.26)	3.14 (± 0.58)	0.9799

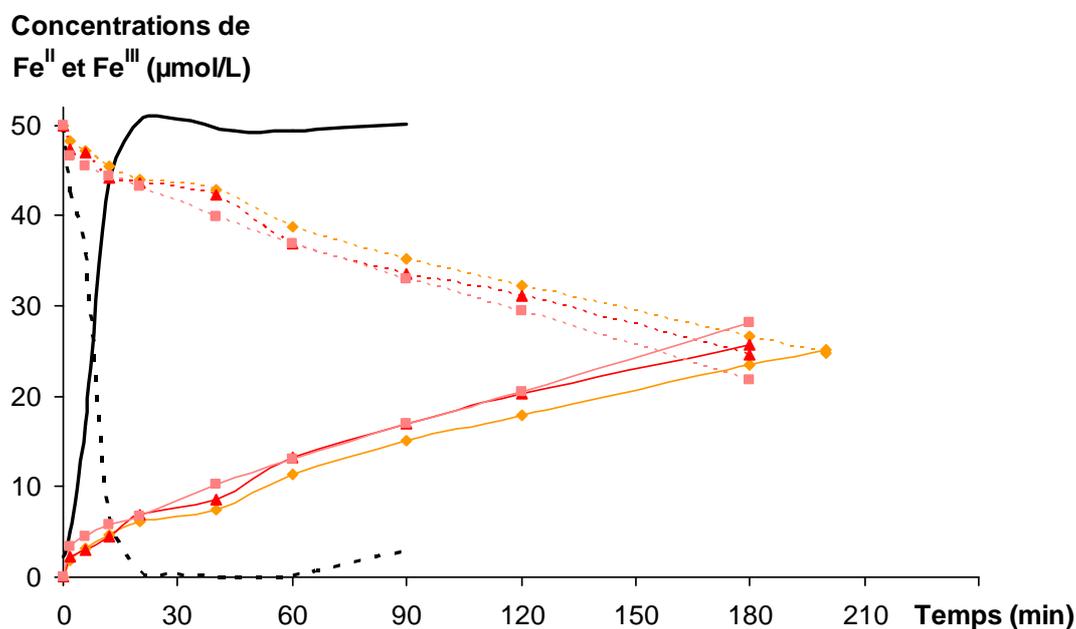
**Tableau A.VII** : Paramètres cinétiques calculés lors de la dégradation des caroténoïdes (10 µmol/L) en présence de concentrations croissantes de Fe<sup>III</sup> + Brij 4 mmol/L, 37°C. Moyennes sur trois répétitions (± écarts-types).  $C_t/C_{t_0} = 1 - k_1.t - k_2.t^2$ , ou  $C_t/C_{t_0} = \Delta R (1 - e^{-k.t})$ .

	[Fe III] (eq. caroténoïde)	k1 x10 <sup>3</sup> (min <sup>-1</sup> )	k2 x10 <sup>6</sup> (min <sup>-2</sup> )	R <sup>2</sup>
β-carotène	0.1	2.68 (± 0.07)	2.12 (± 0.38)	0.9995
	0.5	4.13 (± 0.05)	4.02 (± 0.24)	0.9998
	1	4.41 (± 0.05)	4.18 (± 0.25)	0.9997
	5	5.49 (± 0.06)	7.23 (± 0.32)	0.9997
	10	5.91 (± 0.07)	8.88 (± 0.35)	0.9997
	25	6.24 (± 0.06)	9.93 (± 0.30)	0.9997
	50	6.34 (± 0.05)	10.57 (± 0.27)	0.9998
	100	6.04 (± 0.06)	9.63 (± 0.29)	0.9998
lycopène	0.1	1.62 (± 0.08)	1.30 (± 0.42)	0.9986
	0.5	1.96 (± 0.07)	3.52 (± 0.37)	0.9989
	1	2.10 (± 0.08)	3.85 (± 0.43)	0.9988
	5	2.57 (± 0.11)	3.10 (± 0.57)	0.9984
	10	2.47 (± 0.11)	3.84 (± 0.56)	0.9986
	25	2.48 (± 0.10)	3.52 (± 0.51)	0.9988
	50	2.34 (± 0.09)	3.31 (± 0.48)	0.9990
	100	2.21 (± 0.09)	25.63 (± 0.46)	0.9990
astaxanthine	0.1	0.26 (± 0.03)	4.55 (± 0.16)	0.9994
	0.5	0.55 (± 0.06)	7.13 (± 0.32)	0.9989
	1	0.66 (± 0.08)	7.55 (± 0.42)	0.9986
	5	1.08 (± 0.12)	7.93 (± 0.61)	0.9978
	10	1.11 (± 0.12)	8.45 (± 0.61)	0.9977
	25	1.06 (± 0.13)	9.18 (± 0.69)	0.9974
	50	1.26 (± 0.15)	8.80 (± 0.81)	0.9970
	100	1.53 (± 0.16)	7.79 (± 0.86)	0.9967
	[Fe III] (eq. caroténoïde)	DR (%)	k x10 <sup>2</sup> (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
caroténoïdes de HU36	0.1	0.11 (± 0.01)	2.16 (± 0.32)	0.9631
	0.5	0.19 (± 0.01)	1.90 (± 0.20)	0.9855
	1	0.30 (± 0.02)	2.27 (± 0.32)	0.9711
	5	0.50 (± 0.02)	1.25 (± 0.10)	0.9951
	10	0.53 (± 0.02)	1.42 (± 0.12)	0.9940
	25	0.53 (± 0.02)	1.71 (± 0.16)	0.9917
	50	0.55 (± 0.02)	1.46 (± 0.10)	0.9962
	100	0.56 (± 0.01)	1.22 (± 0.06)	0.9979
caroténoïdes de GB1	0.1	0.03 (± 0.001)	7.29 (± 0.60)	0.9692
	0.5	0.03 (± 0.001)	13.49 (± 1.25)	0.9536
	1	0.07 (± 0.003)	2.51 (± 0.25)	0.9807
	5	0.33 (± 0.01)	0.86 (± 0.08)	0.9971
	10	0.34 (± 0.02)	1.05 (± 0.12)	0.9946
	25	0.36 (± 0.02)	0.86 (± 0.08)	0.9974
	50	0.37 (± 0.02)	0.81 (± 0.07)	0.9980
	100	0.41 (± 0.01)	0.57 (± 0.03)	0.9992

## 4.2. Comparaison de la capacité des caroténoïdes de référence à recycler Fe<sup>II</sup>

Nous avons observé que le fer ferreux, instable en présence d'oxygène et en conditions acides dans le milieu micellaire, était oxydé moins vite en présence de  $\beta$ -carotène. En effet, les caroténoïdes étant oxydables en présence de Fe<sup>III</sup>, nous avons suggéré que la réaction d'oxydo-réduction entre Fe<sup>III</sup> libéré et le  $\beta$ -carotène recycle Fe<sup>II</sup> et contrebalance ainsi l'oxydation spontanée du fer. Cette hypothèse a été extrapolée aux autres caroténoïdes. De plus, les cinétiques obtenues en présence de Fe<sup>III</sup> comme initiateur de l'oxydation ont mis en évidence des vitesses d'oxydo-réduction différentes selon les caroténoïdes.

Une expérience complémentaire a été effectuée afin d'évaluer la capacité relative des trois caroténoïdes de référence à réduire Fe<sup>III</sup>, par mesure du ralentissement de l'oxydation spontanée de Fe<sup>II</sup>. Les résultats ont confirmé que les trois caroténoïdes réagissaient de façon similaire mais avec des vitesses de réaction légèrement différentes. En effet, la dégradation du fer II semblait plus ralentie en présence de  $\beta$ -carotène, qu'avec le lycopène, puis l'astaxanthine (figure A.1). Le  $\beta$ -carotène est le meilleur réducteur des trois.



**Figure A.1 :** Conversion de 50  $\mu\text{mol/L}$  de fer II (en pointillés) en fer III (lignes continues), en milieu micellaire aqueux stabilisé par 4 mmol/L de Brij 35, à pH 4 et 37°C, en l'absence de caroténoïdes (en noir) puis en présence de 10  $\mu\text{mol/L}$  de  $\beta$ -carotène (en orange), de lycopène (en rouge) ou d'astaxanthine (en rose).

La dégradation légèrement plus lente de l'astaxanthine par rapport à celles des deux autres caroténoïdes (figure A.2), mesurées simultanément à la conversion du fer, va dans le sens d'un effet réducteur moins fort du xanthophylle.

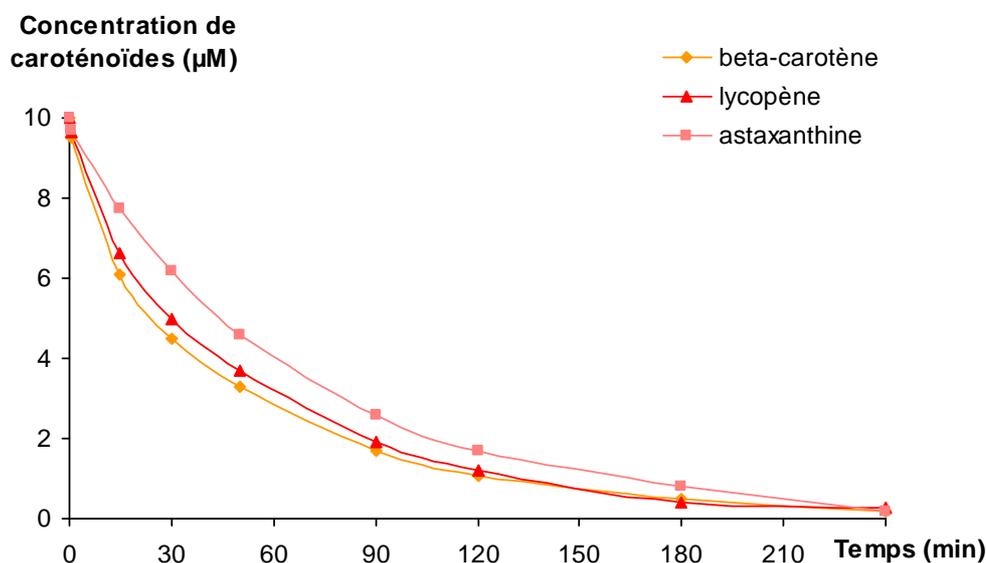


Figure A.2 : Dégradation de 10 µmol/L de β-carotène (en orange), de lycopène (en rouge) ou d'astaxanthine (en rose) en présence de 50 µmol/L de fer II, en milieu micellaire aqueux stabilisé par 4 mmol/L de Brij 35, à pH 4 et 37 °C.

Ces observations sont en adéquation avec la longueur de la phase d'initiation observée lors de la dégradation des caroténoïdes par ajout de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , qui est interprétée comme le temps nécessaire à la production de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par réaction redox et est plus longue pour l'astaxanthine, que pour le lycopène et le β-carotène. Par extension, il est probable que les caroténoïdes de HU36 et de GB1, pour lesquels aucune phase d'initiation n'a été observée, stabilisent encore mieux  $\text{Fe}^{\text{II}}$  que les trois caroténoïdes de référence (non-mesuré lors de l'expérience).



## 5. SYNTHÈSE DE LA PROBLÉMATIQUE A

Dans ce premier chapitre, l'objectif était de déterminer la résistance relative à l'oxydation des caroténoïdes bactériens issus de HU36 et de GB1 et de caroténoïdes de référence ( $\beta$ -carotène, lycopène et astaxanthine), dans un système chimique modèle du compartiment gastrique soumis à un stress oxydant induit par le fer (sous des formes et à des concentrations variables).

Dans un premier temps, le modèle de l'étude a été développé en utilisant uniquement le  $\beta$ -carotène comme source de caroténoïdes. Puis, il a été appliqué aux deux cocktails de caroténoïdes bactériens et aux trois caroténoïdes de référence, en présence de fer libre ( $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Fe}^{\text{III}}$  à des concentrations de 0,1 à 100 équiv.) et de fer héminique ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ , à des concentrations de 0,001 à 2 équiv.). Les principales réalisations ont été :

- la mise au point d'un système micellaire stabilisé par du Brij<sup>®</sup>35, par adaptation d'un modèle chimique utilisé au laboratoire, qui garantit l'absence d'interactions entre le fer et le tensioactif et une teneur minimale en peroxydes en début de réaction, lesquels peuvent modifier les cinétiques d'oxydation par le fer ;
- l'adaptation de méthodes existantes de dosage du fer II par la ferrozine et des hydroperoxydes par le FOX2, aux conditions et aux concentrations du modèle chimique utilisé (concentrations de 0 à 150  $\mu\text{mol/L}$ , calcul correctif pour  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans un milieu contenant du fer...) ;
- la mise au point d'une méthode de dosage du fer III par le xylénol orange, permettant de suivre spécifiquement les deux formes redox du fer libre au cours des cinétiques d'oxydation ;
- la mise au point d'une méthode d'analyse par UPLC-MS permettant de séparer totalement les caroténoïdes composant les extraits bactériens issus de HU36 et de GB1 et de les caractériser (spectres UV, masses) ;
- la mise au point d'une méthode d'extraction et d'analyse par UPLC-MS permettant de rechercher les produits de dégradation des caroténoïdes oxydés en présence de fer.

L'analyse des produits de dégradation a révélé qu'en conditions gastriques modèles, l'oxydation des caroténoïdes induite par le fer libre des produits de dégradation identiques quelle que soit la forme de fer présente, d'abord des produits d'oxydation (époxydes, diépoxydes), puis des produits de coupure (aldéhydes, cétones, alcools) et enfin des molécules de faibles poids moléculaires, dont des acides. La caractérisation des produits dérivés du  $\beta$ -carotène a pu être bien réalisée, avec l'isolement de 25 composés solubles (dont l'identification a pu être proposée pour 21 d'entre eux) et de 9 composés volatils qui ont été identifiés). En revanche, les produits de dégradation du lycopène et de l'astaxanthine n'ont pas été identifiés (sauf le volatil 6-méthyl-5-hepténone issu du lycopène) et aucun produit nouvellement formé n'a pu être mis en évidence dans le cas des caroténoïdes de HU36 et de GB1.

Les mécanismes réactionnels ont par ailleurs été explorés à l'aide de méthodes de modélisation mathématique appliquées à l'ensemble des courbes cinétiques obtenues. Un certain nombre d'éléments ont été mis en évidence, les différences cinétiques observées entre les différentes formes de fer et les différents caroténoïdes sont dues à des mécanismes réactionnels spécifiques dans chaque cas :

- le fer II est instable dans le modèle en conditions acides et induit des réactions radicalaires rapides et pro-oxydantes, qui suivent des cinétiques bi-exponentielles ;
- malgré une initiation rapide de la réaction (probablement liée à leur polarité qui les expose à la périphérie des micelles), les caroténoïdes bactériens sont nettement moins sensibles à la dégradation par les radicaux de  $Fe^{II}$  que les caroténoïdes de référence, d'une part en raison de leurs groupements terminaux qui limitent la réactivité des molécules (effet stabilisateur de C=O, extrémités de la chaîne polyénique non-accessibles), mais probablement aussi grâce à un effet protecteur des pigments les plus polaires sur les autres caroténoïdes du cocktail.  
Donc, sensibilité à  $Fe^{II}$  :  $\beta$ -carotène = lycopène ( $R_0$  croissants avec  $[Fe^{II}]_{t0}$ ) > astaxanthine ( $R_0$  constant) >> HU36 jaunes > HU36 orange = GB1 ;
- le fer II en large excès exerce un pouvoir antioxydant par inhibition des radicaux libérés lors de sa dégradation ;
- le fer III est oxydant et induit des réactions redox avec les caroténoïdes ( $Car/Car^{*+}$ ), dont la vitesse initiale varie avec la présence de groupements électroattracteurs (meilleurs réducteurs :  $\beta$ -carotène > lycopène > astaxanthine > HU36 > GB1), mais aussi en fonction de la polarité qui modifie leur localisation dans les micelles, exposant davantage les caroténoïdes de HU36 et de GB1 (à la

périphérie) à l'attaque oxydante de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  :  $R_0$  supérieurs à ceux des caroténoïdes de référence.

- l'oxydation des caroténoïdes par le fer III est globalement plus lente que la dégradation induite par le fer II et reste donc minoritaire. Lors d'ajout de fer III, la réaction redox avec les caroténoïdes correspond à une phase d'initiation de la dégradation, qui accélère subitement car le fer II formé induit instantanément des réactions radicalaires.

Donc, stabilité sur plusieurs heures de réaction lors d'une initiation par  $\text{Fe}^{\text{III}}$  :  $\beta$ -carotène > lycopène > astaxanthine > HU36 > GB1 ;

- la metmyoglobine agit avec des effets oxydants importants (par arrachage d'un électron) à très faible concentration, mais est inhibée lorsque sa concentration augmente et que le milieu réactionnel ne contient pas d'autres sources de radicaux libres ;
- la sensibilité des caroténoïdes observée en présence de metmyoglobine est corrélée à leurs potentiels de réduction relatifs (liés à la présence ou pas de groupements électro-attracteurs) :  $\beta$ -carotène, lycopène > astaxanthine > HU36 > GB1. La localisation des caroténoïdes dans les micelles (en fonction de leur polarité) ne semble pas avoir d'effet significatif sur leur stabilité en présence de MbFe.



---

Problématique B :

**RÔLE DES  
CAROTÉNOÏDES  
CONTRE  
L'OXYDATION LIPIDIQUE**

---



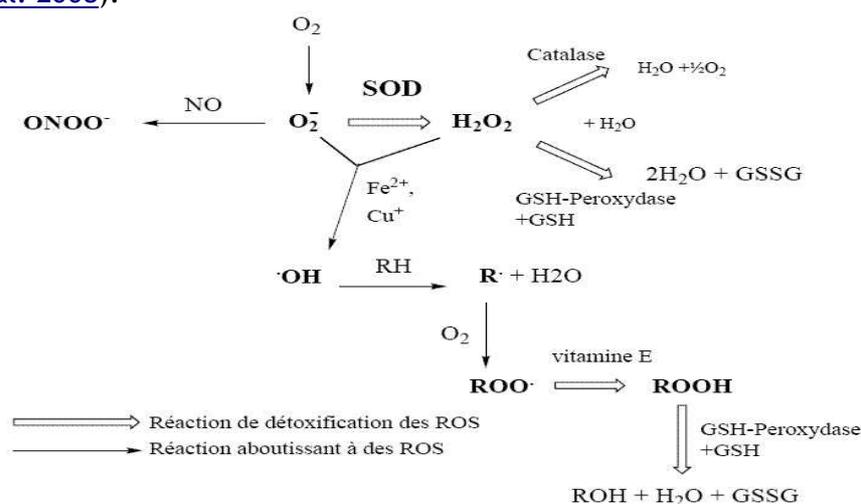
# 1. ÉTAT DE L'ART : PEROXYDATION LIPIDIQUE ET POUVOIR ANTIOXYDANT

## 1.1. L'alimentation et le stress oxydatif

### 1.1.1. Définition du stress oxydatif

C'est un concept qui fait l'objet de recherches depuis quelques décennies dans le monde des sciences biologiques et médicales. Ce phénomène se définit comme un déséquilibre entre la production et l'activité de composés pro-oxydants dans l'organisme et la capacité de celui-ci à éliminer les intermédiaires réactifs oxygénés ou à réparer les dommages causés (figure 59). Il en résulte une exposition des cellules à des espèces réactives dérivées de l'oxygène ou de l'azote (ERO et ERA, en anglais : ROS et RNS). Par assimilation, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est considéré comme une ERO car, en présence de fer (sous forme ionique), il se dismute en deux radicaux hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) (réaction de Haber-Weiss).

Ces « radicaux » oxydent les molécules et accélèrent la mort cellulaire. Cet état est observé physiologiquement au cours du vieillissement et il accompagne également de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives...). Il se traduit par l'accumulation de produits d'oxydation des biomolécules (lipides, protéines, acides nucléiques) au niveau plasmatique et au niveau cellulaire. Il est possible d'évaluer le stress oxydant par la quantification de ces produits d'oxydation ([Michel, Bonnefont-Rousselot et al. 2008](#)).



**Figure 59** : Système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (SOD : superoxyde dismutase, GSH-peroxydase : glutathion peroxydase). L'équilibre de ce système est une condition pour éviter l'apparition d'un stress oxydant.

## 1.1.2. Réactions radicalaires et effets toxiques des radicaux libres chez l'homme

### 1.1.2.1. Les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) dans la cellule

Un radical libre (tableau XI) est un atome ou une molécule contenant un (ou plusieurs) électron(s) non-apparié(s) sur l'orbite électronique la plus externe, ce qui les rend très réactifs. Les radicaux libres réagissent avec les acides nucléiques, les lipides, les protéines et les glucides des tissus voisins ([Cillard and Cillard 2006](#)), causant des lésions oxydantes par extension de proche en proche.

Tableau XI : Principaux radicaux libres

Radicaux libres	Caractéristiques
$O_2^{\bullet -}$ (anion superoxyde de l'oxygène : 1 degré de réduction)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formé dans la plupart des réactions d'autoxydation et par des chaînes de transport d'électrons.</li> <li>- Peu réactif, mais peut libérer des ions <math>Fe^{2+}</math> à partir de complexes protéines sulfurées-fer ou de la ferritine.</li> <li>- Libère du <math>H_2O_2</math> par dismutation spontanée ou par catalyse enzymatique.</li> <li>- Précurseur de la formation de <math>HO^{\bullet}</math>, catalysée en présence de métaux.</li> </ul>
$H_2O_2$ (peroxyde d'hydrogène : 2 degrés de réduction)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formé par dismutation de <math>^{\bullet}O_2^-</math> ou par réduction de <math>O_2</math>.</li> <li>- Soluble dans les lipides, peut diffuser dans les membranes.</li> </ul>
$HO^{\bullet}$ (radical hydroxyl : 3 degrés de réduction)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formé par la réaction de Fenton et la décomposition du peroxy-nitrite</li> <li>- Très réactif, attaque la plupart des composés cellulaires.</li> </ul>
$ROOH$ (hydroperoxyde)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formé par réaction radicalaire avec des composés cellulaires comme les lipides et les bases nucléiques.</li> </ul>
$RO^{\bullet}$ , alkoxy and $ROO^{\bullet}$ (radicaux oxygénés alkoxy- et peroxy-)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produits en présence d'oxygène, par addition radicalaire sur les doubles liaisons conjuguées, ou par perte d'hydrogène.</li> <li>- Les formes lipidiques participent aux réactions de peroxydation des acides gras.</li> </ul>
$HOCl$ (acide hypochloreux)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formé à partir de <math>H_2O_2</math> par l'enzyme myeloperoxydase (halogénéodépendante).</li> <li>- Soluble dans les lipides, oxyde spontanément les composés cellulaires protéiques, y compris les groupements thiol, amine ou méthionine.</li> </ul>
$ONOO^{\bullet -}$ (peroxynitrite)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formé par réaction rapide entre <math>O_2^{\bullet -}</math> et <math>NO^{\bullet}</math>.</li> <li>- Soluble dans les lipides oxyde spontanément les composés cellulaires protéiques, y compris les groupements thiol, amine ou méthionine.</li> <li>- Libère de l'acide peroxy-nitreux par protonation, pouvant induire des coupures homolytiques formant des radicaux hydroxyles et du dioxyde d'azote.</li> </ul>

### 1.1.2.2. Production des ERO et des ERA dans la cellule et catalyseurs métalliques

La plupart des radicaux libres sont d'origine endogène et proviennent de la chaîne respiratoire, du NADPH, et de l'activité de la xanthine oxydase, alors que les espèces réactives du NO sont essentiellement produites par la monoxyde d'azote synthétase ([Berger 2006](#)). La première source d'ERO en conditions physiologiques dans l'organisme est la libération d'oxygène activé depuis les mitochondries au cours de la phosphorylation oxydante. La xanthine oxydase, les NADPH oxydases et le cytochrome P450 produisent des ions superoxydes. Le peroxyde d'hydrogène est libéré par de nombreuses enzymes, dont plusieurs oxydases. En conditions normales, ces espèces réactives ont un rôle dans la signalisation cellulaire. Toutefois, l'homéostasie cellulaire dépend de l'équilibre entre la production et la consommation des ERO.

Les radicaux libres peuvent aussi être d'origine exogène car on en trouve dans les médicaments, le tabac, les drogues, les aliments riches en acides gras et ils peuvent également être générés par les radiations.

Les catalyseurs métalliques sont nombreux. En particulier, le fer, le cuivre, le chrome, le vanadium ou le cobalt sont des métaux de transition qui entrent dans des cycles redox, catalysant la production de radicaux et des ERO ([Miller, Buettner et al. 1990](#); [Valko, Morris et al. 2005](#)). La plupart des enzymes productrices de ERO contiennent l'un de ces métaux. Lorsque ces métaux sont sous forme libre dans les systèmes biologiques (non-inclus dans des complexes protecteurs avec des protéines...), le niveau de stress oxydant peut être considérablement augmenté. De plus, l'interaction entre ces métaux de transition et des protéines oxydées par les ERO ou les ERA peuvent induire la formation de produits réactifs qui s'accumulent au cours du temps et contribuent au vieillissement et à diverses pathologies ([Devasagayam, Tilac et al. 2004](#)).

Certains composés organiques peuvent aussi catalyser la production d'ERO. Les principaux sont les quinones. En effet, elles entrent dans des cycles redox avec les semiquinones et les hydroxyquinones, favorisant la libération d'espèces superoxydes à partir du dioxygène, puis de peroxyde d'hydrogène. L'acide urique est aussi un agent réducteur participant au stress oxydant. Il est impliqué dans plusieurs maladies, dont le syndrome métabolique. Autre exemple : l'homocystéine (acide aminé soufré issu du catabolisme de la méthionine ou de la cystathionine) est pro-inflammatoire et est liée

notamment aux risques d'athérosclérose, de maladie d'Alzheimer, d'affections neuropsychiatriques ou de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

### 1.1.2.3. Aspects chimiques et biologiques du stress oxydant chez l'Homme

Chimiquement, le stress oxydant est associé à la fois à une augmentation des espèces oxydantes et à une diminution des défenses antioxydantes (par exemple, le glutathion, antioxydant majeur des cellules par captation des radicaux libres) ([Michel, Bonnefont-Rousselot et al. 2008](#)). Les ERO sont responsables de la dénaturation des protéines, de la lipoperoxydation, et de l'oxydation de l'ADN, induisant des dommages cellulaires et tissulaires.

Les effets biologiques de ce stress oxydant dépendent de la capacité des cellules à retrouver leur état d'origine. Le stress oxydant devient une situation pathologique dès que le système de protection est submergé par les ERO et ERA. Les conséquences les plus graves sont la mort cellulaire (apoptose), qui peut avoir lieu même à des niveaux d'oxydation modérés, voire la nécrose accompagnée de la perte d'ATP ([Imlay 2003](#)). A long terme, le stress oxydant touche essentiellement l'ADN ([Evans and Cooke 2004](#)).

Le stress oxydant est un facteur d'inflammation et de mutagenèse, mais il est aussi considéré comme une des principales causes de cancer et jouerait un rôle dans des maladies neurodégénératives (chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer par exemple, des lipides et protéines peroxydés s'accumulent dans les lysosomes des cellules du cerveau ([Devasagayam, Tilac et al. 2004](#))), mais aussi dans plusieurs pathologies plus courantes telles que les maladies cardio-vasculaires (l'oxydation des LDL de la paroi vasculaire est précurseur de la formation de la plaque ([Rice-Evans and Gopinathan 1995; Baudin 2006](#))), les accidents vasculaires cérébraux, les syndromes de fatigue chronique, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes. Enfin, il contribue au processus du vieillissement (théorie du vieillissement radicalaire de Harman) ([Sohal 2002](#)). À l'inverse, des stress ponctuels pourraient être bénéfiques contre le vieillissement grâce à des réactions de défense de l'organisme.

## 1.1.3. Cas particulier de la peroxydation lipidique, cibles et conséquences

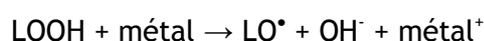
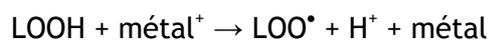
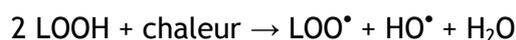
La peroxydation lipidique est un phénomène qui se produit par l'intermédiaire de réactions radicalaires en chaîne non contrôlées ([Min and Ahn 2005](#)) (figure 60).

- Initiation :  $LH \rightarrow H^\bullet + L^\bullet$  (radical d'acide gras, avec électron non-apparié, qui se délocalise)

- Propagation :  $L^\bullet + O_2 \rightarrow LOO^\bullet$  (radical hydroperoxyde)



- Initiations secondaires :  $LOOH + \text{chaleur} \rightarrow LO^\bullet + HO^\bullet$



- Terminaison :  $L^\bullet + OH^\bullet \rightarrow ROH$

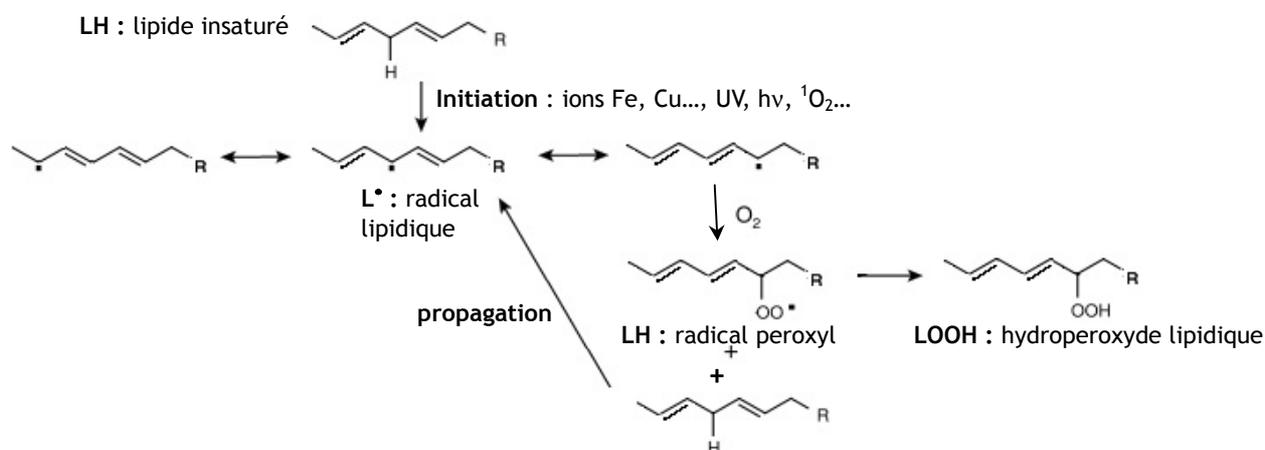


Figure 60 : Etapes de la peroxydation lipidique.

Tous les lipides contenant des acides gras insaturés sont concernés, quelle que soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) ([Cillard and Cillard 2006](#)).

*In vitro*, l'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour les industries agroalimentaires et cosmétiques qui utilisent de plus en plus des acides gras hautement insaturés, tels que ceux de la série n-3 ( $\omega$  3), très sensibles à l'autoxydation. La formation des espèces réactives de l'oxygène dans les aliments peut se faire par

réactions enzymatiques, chimiques, photochimiques ou par irradiation ([Choe and Min 2006](#)). L'oxydation des lipides alimentaires entraîne des altérations qualitatives (rancissement, libération d'aldéhydes, d'alcools et d'hydrocarbures volatils), nutritionnelles (déstructuration des nutriments essentiels), voire même une toxicité due aux produits issus de la peroxydation lipidique (peroxydes, aldéhydes, produits cancérigènes) ([Michel, Bonnefont-Rousselot et al. 2008](#); [Mercadante, Capitani et al. 2010](#)). L'oxydation transférée aux protéines et aux glucides libère d'autres produits de coupure et composés carbonyles de faibles masses molaires. De plus, les vitamines et les micronutriments sont facilement oxydés, en particulier par l'oxygène singulet ([Choe and Min 2006](#)).

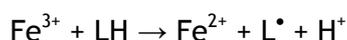
*In vivo*, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. L'oxydation des lipides alimentaires insaturés peut se poursuivre ou démarrer au cours de la digestion en raison des conditions de pH ([Kanner and Lapidot 2001](#)), des initiateurs d'oxydation absorbés avec les aliments ou de l'effet pro-oxydant des sels biliaires de l'intestin ([Terao, Ingemansson et al. 1995](#)). Or, l'accumulation de lipides oxydés dans le tube digestif est une des causes de l'augmentation des lipides oxydés dans le sang (mesurés dans les chylomicrons, protéines de transport des micronutriments lipidiques) ([Staprans, Rapp et al. 1994](#)). Cette source d'oxydation pourrait favoriser la formation de la plaque d'athérome dans les vaisseaux sanguins ([Staprans, Pan et al. 1998](#); [Ursini, Zamburlini et al. 1998](#)) et être un facteur de la propagation du stress oxydant dans les cellules de l'organisme. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines. La lipoperoxydation des membranes altère leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...) ([Niki, Yoshida et al. 2005](#); [Cillard and Cillard 2006](#)). L'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur déterminant dans le déclenchement de l'apoptose des cellules. Les lipoprotéines telles que les LDL, riches en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique ([Spiteller 1998](#); [Yoshida, Ito et al. 2003](#)).

#### 1.1.4. Rôle du fer alimentaire dans la peroxydation lipidique

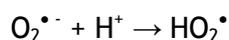
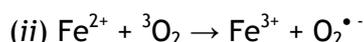
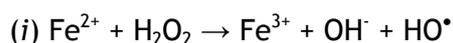
Dans l'alimentation, la formation spontanée de radicaux libres à partir des acides gras, ou la réaction avec l'oxygène de l'air sont des réactions thermodynamiquement défavorables. Les mécanismes d'initiation de la peroxydation lipidique impliquent souvent

des métaux de transition. Le fer, sous forme à la fois libre et hémique, est le principal catalyseur des changements oxydants dans les tissus ([Baron and Andersen 2002](#); [Lapidot, Granit et al. 2005](#); [Min and Ahn 2005](#)). Il initie l'oxydation des lipides polyinsaturés (triacylglycérols, phospholipides...). En particulier, le fer II est instable en milieu aqueux, où il réagit avec l'oxygène moléculaire et libère du fer III et des anions radicalaires superoxydes ([Jomova 2011](#)). Quant au fer III, il est peu soluble dans l'eau à pH neutre et précipite sous forme d'hydroxyde de fer Fe(OH)<sub>3</sub>.

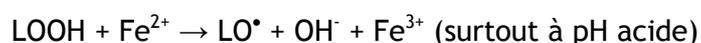
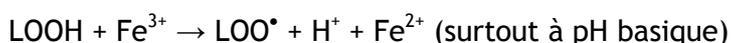
L'initiation directe de la peroxydation par les métaux de transition peut se faire par réactions d'oxydo-réduction. Pour le fer :



En présence des formes réduites des métaux de transition, l'initiation directe de la peroxydation lipidique se fait par réactions radicalaires ([Qian and Buettner 1999](#)). Parmi les réactions radicalaires catalysées par les métaux de transition, la réaction de Fenton (i) et la réaction de Haber-Weiss (ii) sont majoritaires. Pour le fer :



Des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes sont alors produits à partir des formes réduites du fer et de peroxyde d'hydrogène (propagation). Les hydroperoxydes formés persistent dans les tissus et peuvent réinitier la peroxydation en présence de fer ([Carlsen, Møller et al. 2005](#); [Min and Ahn 2005](#)) :



Le radical HO<sup>•</sup> est considéré comme le plus néfaste pour les processus biologiques. Les radicaux formés peuvent notamment induire des modifications au niveau des acides aminés (ex : formation de méta-tyrosine et d'ortho-tyrosine à partir de la phenylalanine). Chez l'homme, l'hémochromatose (fatigue, douleurs articulaires, atteintes hépatiques, cardiaques ou endocriniennes) est une pathologie associée à des teneurs excessives de fer dans les tissus (et donc à la libération de radicaux anions superoxydes toxiques), provoquée par une altération de l'équilibre redox du fer ([Jomova 2011](#)). Les dommages sont encore plus importants avec des formes libres, non-complexées, donc non-protégées.

La metmyoglobine ( $MbFe^{III}$ , figure 61) et la méthémoglobine ( $HbFe^{III}$ ) sont connues pour leur rôle dans l'oxydation des membranes lipidiques .

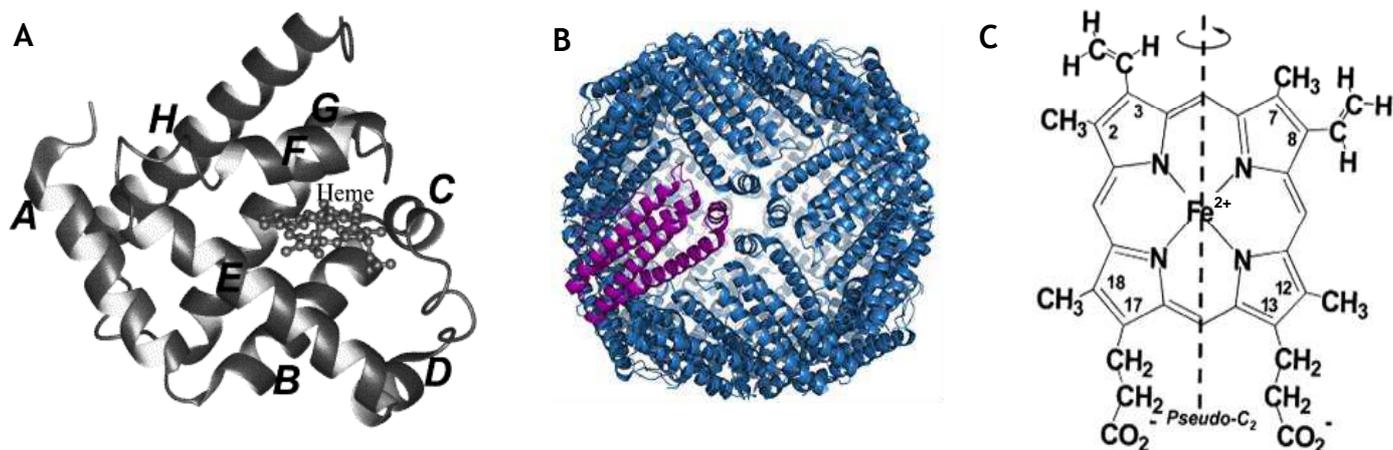
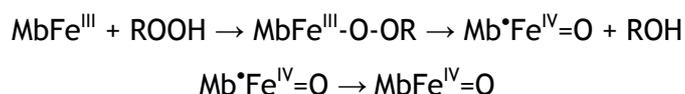


Figure 61 : (A) Configuration de la metmyoglobine et formes dissociées (B) ferritine et (C) hème.

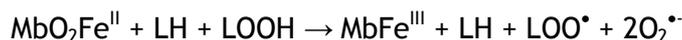
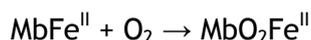
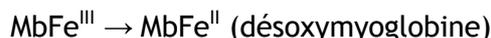
$MbFe^{III}$  et  $HbFe^{III}$  peuvent agir dans divers milieux contenant des lipides, mais l'effet pro-oxydant de ces molécules et les mécanismes en jeu sont dépendants de la polarité du milieu ([Edholm, Nordlander et al. 2000](#)), du pH, de la concentration en acides gras et de leur nature ([Baron and Andersen 2002](#)). En effet, au pH physiologique (pH 7),  $MbFe^{III}$  ne provoque une oxydation que si le ratio entre les acides gras et l'hème est supérieur à 300. La metmyoglobine est alors spontanément dénaturée et l'hématine libérée dans le milieu provoque une peroxydation lipidique rapide (figure 62). À l'inverse, lorsque les lipides sont présents en faibles concentrations, des interactions se créent entre les protéines héminiques et les acides gras par liaisons électrostatiques et hydrophobes au niveau de sites spécifiques de la partie protéique.  $MbFe^{III}$  est alors neutralisée et présente un effet antioxydant. Ce phénomène est plus prononcé avec des acides gras à longue chaîne. En revanche, en milieux légèrement acides (pH 5.5 à 6),  $MbFe^{III}$  est un pro-oxydant puissant quelle que soit la concentration de lipides. Toutefois, il semble que l'initiation de l'oxydation nécessite la présence de peroxydes préformés (figure 63).  $MbFe^{III}$  réagit par exemple avec  $H_2O_2$  et libère un intermédiaire réactionnel, la perferrylmyoglobine ( $Mb^*Fe^{IV}=O$ ), qui n'est pas oxydante, mais forme la ferrylmyoglobine ( $MbFe^{IV}=O$ , absorbe à 590 nm) par autoréduction (réaction spontanée, mal connue) ([Baron and Andersen 2002](#); [Carlsen, Møller et al. 2005](#); [Vulcain, Goupy et al. 2005](#); [Goupy, Vulcain et al. 2007](#)) :



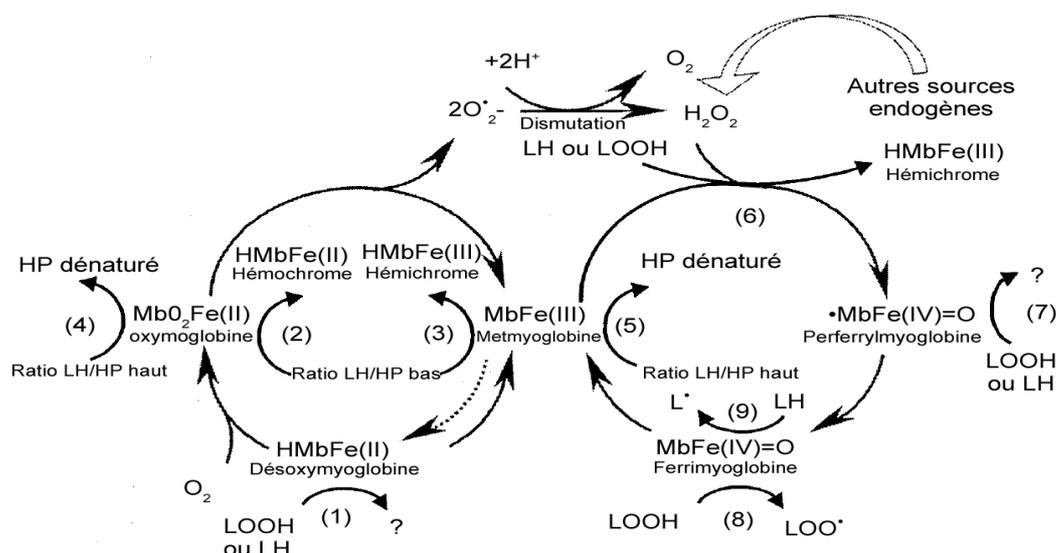
La ferrylmyoglobine est très fortement oxydante en présence de lipides ([Min and Ahn 2005](#)) et la réaction d'oxydation (indépendante du pH et de la concentration de lipides) régénère  $MbFe^{III}$  :



La forme physiologiquement active de la myoglobine dans les tissus de l'organisme,  $MbO_2Fe^{II}$ , est également un initiateur de l'oxydation lipidique :



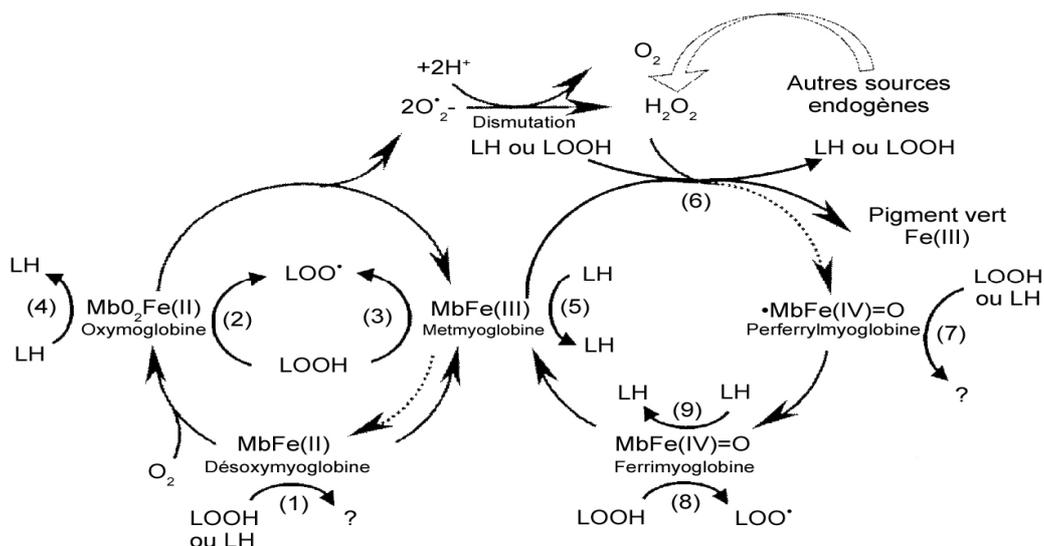
Enfin, l'oxydation des lipides, initiée par le cycle de la metmyoglobine en présence de peroxydes, produit de nouveaux peroxydes qui accélèrent à leur tour l'oxydation de  $MbFe$ . Ces réactions en boucle induisent un emballement de l'oxydation ([Faustman, Sun et al. 2010](#)).



**Figure 62:** Contribution des différentes formes de metmyoglobine à la peroxydation lipidique, à pH 7. HP : protéine hémique. LH : lipides insaturés. LOOH : hydroperoxydes lipidiques.  $LOO^{\bullet}$  : radicaux peroxydes lipidiques. ([Baron and Andersen 2002](#)).

Conversion de  $MbO_2Fe^{II}$  en  $MbFe^{III}$  par autoxydation ; conversion de  $MbFe^{IV}=O$  en  $MbFe^{III}$  par autoréduction ; conversion enzymatique de  $MbFe^{III}/MbFe^{II}$ .

1) Capacité inconnue de  $MbFe^{II}$  à oxyder LH ou LOOH. 2 et 3) Si LH/HP faible,  $MbO_2Fe^{II}$  et  $MbFe^{III}$  sont converties en  $HbFe^{II}$  et  $HbFe^{III}$  non-réactifs. 4 et 5) Si LH/HP > 300,  $MbO_2Fe^{II}$  et  $MbFe^{III}$  sont dénaturées, libérant l'hème et induisant une oxydation de LH et LOOH par l'hématine. 6) En présence de lipides et de peroxyde d'hydrogène,  $MbFe^{III}$  est convertie en  $MbFe^{IV}=O$ , qui ne semble pas avoir d'effet direct sur LH ou LOOH (7), mais évolue en  $MbFe^{IV}=O$ , qui induit une oxydation de LH et LOOH (8 et 9).



**Figure 63:** Contribution des différentes formes de metmyoglobine à la peroxydation lipidique, à pH 5.5-6 (mécanisme similaire avec  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  à pH 4). LH : lipides insaturés. LOOH : hydroperoxydes lipidiques.  $\text{LOO}^\bullet$  : radicaux peroxydes lipidiques ([Baron and Andersen 2002](#)).

Conversion de  $\text{MbO}_2\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  par autoxydation ; conversion de  $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$  en  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  par autoréduction ; conversion enzymatique de  $\text{MbFe}^{\text{III}}/\text{MbFe}^{\text{II}}$ .

1) Capacité inconnue de la désoxymyoglobine à oxyder LH ou LOOH. 2/4 et 3/5)  $\text{MbO}_2\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  induisent l'oxydation des LH et LOOH. 6) En présence de lipides et de peroxyde d'hydrogène,  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  est convertie en  $\text{Mb}^*\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ , qui ne semble pas avoir d'effet direct sur LH ou LOOH (7), mais évolue en  $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ , qui induit une oxydation de LH et LOOH (8 et 9).

En milieux plus acides (pH 4), l'hématine ( $\text{HmFe}^{\text{III}}$ ), le cofacteur métallique de la metmyoglobine, est rapidement libéré dans le milieu (la protéine est progressivement dégradée) ([Goupy, Vulcain et al. 2007](#)).  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  réagit ensuite selon des mécanismes de l'oxydation des lipides identiques à ceux décrits pour  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  à pH 5,5-6 (figure 63), avec des cinétiques plus rapides ([Goupy, Vulcain et al. 2007](#)).

## 1.2. Mécanismes d'action des antioxydants d'origine alimentaire contre l'oxydation lipidique, cas des caroténoïdes

### 1.2.1. Les antioxydants, définition et variabilité de leurs mécanismes d'action

Les antioxydants sont des substances présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable et capables de retarder ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Ils agissent en éliminant les radicaux libres ou en diminuant le stress oxydant ([Berger 2006](#)).

Les antioxydants peuvent agir contre l'oxydation de deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation ([Niki, Yoshida et al. 2005](#); [Cillard and Cillard 2006](#); [Léger 2006](#); [Laguerre, Lopez-Giraldo et al. 2007](#)).

Les antioxydants primaires, dits aussi « antioxydants vrais » ou « antiradicalaires » (AH) sont des molécules capables d'interrompre la chaîne autocatalytique de l'oxydation. Ils bloquent les radicaux lipidiques ( $L^{\bullet}$  et  $LOO^{\bullet}$ ) par transfert d'un atome d'hydrogène  $H^{\bullet}$  pour former des produits non radicalaires (LH et LOOH). Ils peuvent aussi transformer les radicaux alkoxy ( $RO^{\bullet}$  en ROH), bloquant ainsi la formation des aldéhydes responsables du rancissement des lipides ([Roginsky and Lissi 2005](#)).

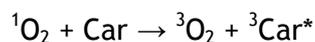
Les antioxydants secondaires, ou « préventifs », sont des composés capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques, le piégeage de l'oxygène, la conversion des hydroperoxydes en espèces non radicalaires, l'absorption des radiations UV ou la désactivation de l'oxygène singulet (exemple de la détoxification par les systèmes antioxydants enzymatiques endogènes dont la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase).

### 1.2.2. Effets des caroténoïdes contre l'oxydation lipidique

Les caroténoïdes exercent une activité antioxydante par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes distincts bien que probablement complémentaires (ex : antioxydants à la fois briseurs de chaîne d'oxydation et piègeurs de l'oxygène singulet) ([Pryor, Prier et al. 1980](#)).

### 1.2.2.1. Piégeage de l'oxygène singulet

Les caroténoïdes sont les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet. Ce mode d'action induit l'inhibition de l'initiation de la peroxydation lipidique et s'exerce par la désactivation de  $^1\text{O}_2$  en  $^3\text{O}_2$  ([Krinsky 1989](#); [Stahl and Sies 2003](#)) :



Grâce au long système polyénique conjugué de ces molécules, l'excès d'énergie de leur état excité est dissipé au travers d'interactions vibrationnelles et rotationnelles avec le solvant ou avec leur environnement :



Par ce mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, le caroténoïde peut commencer un nouveau cycle de piégeage du  $^1\text{O}_2$  et constitue par conséquent un piègeur non stœchiométrique. Il est estimé que chaque molécule de  $\beta$ -carotène, par exemple, pourrait piéger environ 1 000 molécules de  $^1\text{O}_2$  avant de réagir chimiquement et de former un produit.

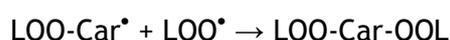
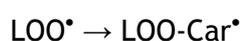
Dans des systèmes lipidiques membranaires, l'efficacité des caroténoïdes à piéger l'oxygène singulet dépend de plusieurs facteurs :

- la concentration de l'antioxydant,
- la localisation et la mobilité de l'antioxydant dans la membrane,
- la présence de groupements actifs riches en électrons sur la molécule,
- la solubilité de l'oxygène singulet à travers la membrane.

Dans une étude utilisant des liposomes comme modèles des membranes lipidiques, le lycopène s'est avéré un antioxydant nettement plus puissant que d'autres caroténoïdes tels que le  $\beta$ -carotène, l'astaxanthine ou la canthaxanthine et environ six fois plus efficace que l' $\alpha$ -tocophérol pour piéger l'oxygène singulet ([Fukuzawa, Inokami et al. 1998](#)). Une étude complémentaire ([Yu, Zhao et al. 2001](#)) a déterminé que du lycopène extrait d'un concentré de tomate a un  $\text{IC}_{50}$  égal à 0,1 mg/L contre l'oxygène singulet.

### 1.2.2.2. Blocage des radicaux libres par addition

Les caroténoïdes briseurs de chaînes inhibent les radicaux qui propagent l'oxydation. L'interruption de la peroxydation par des caroténoïdes tels que le  $\beta$ -carotène s'exerce *via* la formation d'adduits ([Martin, Ruck et al. 1999](#); [Krinsky and Yeum 2003](#)) :



La capacité des caroténoïdes à inhiber la propagation de la peroxydation lipidique dépend de leur réactivité avec les radicaux (Cf. Problématique A, § 1.5.2) et de leur localisation dans les systèmes (ex : milieux homogènes, micelles, bicouches de phospholipides...), mais aussi de leur vitesse de dégradation et de la réactivité de leurs produits d'oxydation.

Le pouvoir antioxydant a tendance à augmenter avec le nombre de doubles liaisons conjuguées. Par exemple, des tests d'oxydation dans des liposomes ([Klebanov, Kapitanov et al. 1998](#)) ont démontré que le lycopène inhibe mieux la peroxydation des lipides induite par le fer II ou la lumière que le  $\beta$ -carotène et que, dans les deux cas, le lycopène agit par réaction avec les radicaux peroxydes (inhibition de la propagation de l'oxydation). Une étude complémentaire ([Yu, Zhao et al. 2001](#)) a déterminé que du lycopène extrait d'un concentré de tomate a un  $IC_{50}$  égal à 0,75 mg/L contre les anions superoxydes (concentration nécessaire pour diviser par deux la vitesse de la peroxydation) et de 0,05 mg/L contre les radicaux hydroxyles de la réaction de Fenton, ce qui confirme son efficacité à limiter la propagation de l'oxydation lipidique (l' $IC_{50}$  global du lycopène contre l'oxydation de l'acide linoléique est de 1 mg/L), et qu'il agit en quelques secondes seulement. Par ailleurs, des études ont mis en évidence une corrélation entre les potentiels d'ionisation des caroténoïdes (calculés par mesure de l'énergie de la plus haute orbitale atomique ou de la libération d'énergie lors d'une oxydation à un électron) et leurs efficacités relatives à inhiber la peroxydation lipidique par piégeage des radicaux ([Soffers, van Haandel et al. 1999](#)).

Une étude sur l'oxydation des acides gras de l'huile de tournesol à 30°C a montré que le  $\beta$ -carotène, le lycopène et la lutéine sont plus efficaces pour inhiber la libération de produits secondaires volatils ([Kiokias, Dimakou et al. 2009](#)), que la production de diènes conjugués.

Une étude récente sur l'activité des produits de coupure du lycopène ([Goupy, Reynaud et al. 2011](#)) a montré que les apolycopénals 6' et 8' sont plus antioxydants que le lycopène natif en milieu micellaire, en partie en raison de leur polarité plus forte. De plus, l'apolycopénal le plus long a le plus fort pouvoir antioxydant (la longueur est favorable à la délocalisation de l'électron non-apparié le long de la chaîne polyénique). À longueur de chaîne égale, les fonctions ester et alcool induisent des pouvoirs antioxydants plus faibles. Enfin, les produits les plus courts, porteurs de fonctions acide carboxylique (ex : acide 14'-

apolycopénoïque) semblent se comporter comme des antioxydants hydrophiles et peuvent avoir un effet directement sur les métalloprotéines initiatrices de l'oxydation lipidique. En conclusion, l'activité antioxydante apparente du lycopène peut être augmentée par l'activité de ses produits d'oxydation.

À l'inverse, l'addition de radicaux libres sur certains caroténoïdes comme le  $\beta$ -carotène et l' $\alpha$ -carotène, peut induire un effet secondaire pro-oxydant s'ils sont en trop fortes concentrations ([Liebler and McClure 1996](#); [Yi, Andersen et al. 2011](#)). En effet, la réaction de ces caroténoïdes avec des radicaux lipidiques alkyles, alkoxyles et alkylperoxydes libère des radicaux de caroténoïdes peu stables ([Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)), qui peuvent propager l'oxydation et s'élever toxiques dans les tissus biologiques ([Haila, Lievonen et al. 1996](#); [Palozza 1998](#); [Young and Lowe 2001](#)). Cet effet pro-oxydant du  $\beta$ -carotène à forte concentration est favorisé par de fortes pressions partielles en oxygène ([Palozza 1998](#)).

En revanche, les formes libres et estérifiées de la lutéine, par exemple, ont le même pouvoir antioxydant contre les peroxydes d'acides gras ([Subagio and Morita 2001](#)).

#### 1.2.2.3. Effets mécaniques

Une étude sur l'oxydation des lipides dans les liposomes ou les membranes a mis en évidence un effet de la position de la zéaxanthine et de l'astaxanthine dans les bicouches sur leur activité protectrice contre des radicaux pro-oxydants lipophiles. En effet, le fait que ces deux xanthophylles traversent et stabilisent la bicouche lipidique réduirait efficacement la diffusion des radicaux à travers la membrane et participerait à l'inhibition de la peroxydation ([Liang, Tian et al. 2009](#)). Il s'agit alors d'un effet indirect des caroténoïdes contre les radicaux.

#### 1.2.3. Hypothèses sur les interactions entre antioxydants

Dans l'alimentation, lorsque des antioxydants solubles dans des milieux différents et/ou ayant des modes d'actions différents sont utilisés simultanément, ils peuvent être plus actifs que ce que permettraient d'anticiper leurs efficacités individuelles. Des mécanismes d'interaction peuvent se traduire en termes de synergies ou de complémentarités, qui jouent un rôle central dans le système de défense de l'organisme contre le stress oxydant ([Léger 2006](#)). Les caroténoïdes peuvent ainsi interagir soit entre eux, soit avec d'autres antioxydants. Les mécanismes de synergie entre antioxydants

peuvent en outre avoir lieu aussi bien dans des solutions homogènes que dans des systèmes organisés (micelles, émulsions, liposomes, lipoprotéines) ([Goupy, Vulcain et al. 2007](#)).

La polarité des différents antioxydants intervient dans ces interactions. Notamment, les tocophérols, tocotriénols,  $\beta$ -carotène, lycopène... sont liposolubles, la vitamine C (ou acide ascorbique) est hydrosoluble, alors que les polyphénols sont globalement plus hydrosolubles que liposolubles. L' $\alpha$ -tocophérol, qui se positionne au niveau des interfaces entre phases aqueuse et lipidique, peut interagir avec d'autres molécules présentes dans l'un ou l'autre des deux compartiments. Il réagit par exemple en synergie avec la quercétine, en la régénérant ([Goupy, Vulcain et al. 2007](#)).

Un autre antioxydant, la vitamine C, développe des synergies actives avec les antioxydants lipophiles, notamment le  $\beta$ -carotène et la vitamine E (dont l' $\alpha$ -tocophérol) ([Zhang and Omaye 2001](#)). Le  $\beta$ -carotène localisé dans le cœur lipophile des membranes lipidiques capte les radicaux libres et est alors converti en ses formes radical cation ( $\text{Car}^{\bullet+}$ ) ou radical cation peroxy ( $\text{Car-OO}^{\bullet+}$ ), qui sont plus polaires que le  $\beta$ -carotène et peuvent être orientées vers les compartiments hydrophiles. La vitamine C peut alors réparer les radicaux du  $\beta$ -carotène ([Burke, Edge et al. 2001](#); [Mortensen, Skibsted et al. 2001](#)).

Lorsqu'ils sont associés, le  $\beta$ -carotène et l' $\alpha$ -tocophérol agissent en synergie pour réduire la formation de malondialdéhydes (produits d'oxydation des acides gras polyinsaturés) ([Mortensen, Skibsted et al. 2001](#); [Yeum, Aldini et al. 2009](#); [Karabulut 2010](#)). En effet, l'action antioxydante du  $\beta$ -carotène contre les peroxydes d'acides gras a tendance à générer des composés oxydés radicalaires (en particulier à forte concentration de caroténoïde). Il est alors possible que l' $\alpha$ -tocophérol, fort donneur d'électrons ou d'atomes d'hydrogène, réduise les radicaux peroxydes du  $\beta$ -carotène ( $\text{LOO-Car-OO}^{\bullet}$ ) ainsi que ses radicaux cations ( $\text{Car}^{\bullet+}$ ) ([Takahashi, Shibasaki-Kitakawa et al. 2003](#)). Inversement, le  $\beta$ -carotène pourrait, dans une moindre mesure, aussi recycler l' $\alpha$ -tocophérol à partir des radicaux  $\alpha$ -tocophéroxyles ( $\alpha\text{-TO}^{\bullet}$ ) ([Böhm, Edge et al. 1997](#)). Une combinaison positive a également été observée entre la lutéine et l' $\alpha$ -tocophérol contre l'autoxydation des triglycérides. Cet effet positif pourrait être attribué au fait que l' $\alpha$ -tocophérol retarde la formation des produits de dégradation potentiellement pro-oxydants de la lutéine ([Haila, Lievonen et al. 1996](#)).

Certains antioxydants eux-mêmes peu efficaces contre l'oxydation lipidique peuvent amplifier l'activité d'un autre antioxydant à fort potentiel pour interrompre la

chaîne d'oxydation ([Goupy, Vulcain et al. 2007](#)). Ils agiraient alors par complémentarité de mécanismes, encore mal connue. L'étude de l'inhibition de la peroxydation lipidique initiée par un pro-oxydant lipophile dans des liposomes a montré qu'alors que le  $\beta$ -carotène et le lycopène n'inhibent presque pas l'oxydation lorsqu'ils sont seuls, ils augmentent tous deux nettement l'efficacité de la zéaxanthine (qui est déjà un bon antioxydant dans ce modèle) lorsqu'ils sont en combinaison avec ce xanthophylle ([Liang, Tian et al. 2009](#)). En effet, l'astaxanthine positionnée à l'interface peut réagir directement avec les radicaux libres, mais aussi assurer le transfert d'électrons vers les caroténoïdes apolaires localisés dans le cœur lipidique, qui ont alors un rôle réducteur important. Par ailleurs, les interactions entre des caroténoïdes et d'autres antioxydants à faible potentiel n'ont été que très peu étudiées jusqu'à présent (on trouve surtout des données sur les combinaisons de polyphénols ou les associations  $\beta$ -carotène, vitamine C et tocophérol).

Une étude *in vivo* avec du  $\beta$ -carotène, du lycopène et de la lutéine a montré que ces trois caroténoïdes ont un effet plus important lorsqu'ils sont mélangés que lorsqu'ils sont ingérés individuellement (quantités totales identiques, de 12 mg), contre les dommages de l'ADN dans les lymphocytes ([Yeum, Aldini et al. 2009](#)).

### 1.3. Les tests de compétition pour la mesure du pouvoir antioxydant

#### 1.3.1. De nombreux tests disponibles selon les études à réaliser

Il existe une multitude de tests pour la mesure de l'activité antioxydante d'un composé ou d'un aliment, ([Roginsky and Lissi 2005](#); [Laguerre, Lopez-Giraldo et al. 2007](#); [Yeum, Aldini et al. 2009](#)). On peut les séparer en deux catégories. D'une part, les tests mesurant le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un radical coloré stable et facile à détecter :

- « trolox equivalent antioxydant capacity » (TEAC), qui est un test de réduction du radical-cation ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)), utilisé pour des milieux hydrophiles comme les fluides biologiques (plasma sanguin) ou des extraits aqueux ([Re, Pellegrini et al. 1998](#)),
- « ferric-reducing ability of plasma » (FRAP), qui est un test de réduction de l'ion Fe<sup>3+</sup>, utilisé pour des milieux hydrophiles comme les fluides biologiques (plasma sanguin) ([Pulido, Bravo et al. 2000](#)),

- test de réduction du radical stable DPPH°, qui est approprié à la mesure de l'activité antioxydante des composés de jus de fruits et légumes ou d'extraits. D'autre part, ceux faisant intervenir une compétition entre l'antioxydant et une cible à protéger (pigments, lipides). C'est le cas des tests de capture des radicaux peroxydes, tous applicables aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et aux extraits de fruits et légumes :

- « total radical-trapping antioxydant parameter » (TRAP), pour des milieux hydrophiles, où le substrat d'oxydation est soit du DCFH (2',7'-dichlorodihydrofluoresceine), soit du R-phycoérythrine, et où le radical induisant l'oxydation est l'AAPH (2,2'-azobis-(2-amindinopropane)-dihydrochloride),
- « oxygen radical-absorbing capacity » (ORAC), pour des milieux hydrophiles, où le substrat d'oxydation est du R-phycoérythrine ; et où le radical induisant l'oxydation est l'AAPH (2,2'-azobis-(2-amindinopropane)-dihydrochloride),
- « ORAC lipophile », pour des antioxydants extraits dans un solvant, où le substrat d'oxydation est la fluoresceine, et où le radical induisant l'oxydation est l'AAPH (2,2'-azobis-(2-amindinopropane)-dihydrochloride),
- test d'activité antioxydante lipophile, où le substrat d'oxydation est du DPHPC (1-palmitoyl-2-((2-(4-(6-phenyl-*trans*-1,3,5-hexatriényl)phényl)éthyl)-carbonyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine), et où le radical induisant l'oxydation est l'AAPH (2,2'-azobis-(2-amindinopropane)-dihydrochloride),
- « total antioxydant performance » (TAP), pour des milieux lipophiles, où le substrat d'oxydation est du BODIPY (acide 4,4'-difluoro-5-(4-phényl-1,3-butadiényl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène-3-undécanoïque), et où le radical induisant l'oxydation est le MeO-AMVN (2,2'-azobis-(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile).

Par ailleurs, la capacité des caroténoïdes à piéger les radicaux libres et les adduits radicalaires est bien mesurée par la technique de mesure de spin (détection de radicaux instables) et l'enregistrement de spectres de résonance paramétrique électronique dans des solvants organiques ([Haila, Nielsen et al. 1997](#); [Iannone, Rota et al. 1998](#); [Polyakov, Kruppa et al. 2001](#)).

Les résultats de mesure du pouvoir antioxydant dans les aliments divergent souvent entre les multiples études disponibles. Ces variations sont essentiellement dues à la diversité des méthodes utilisées, même pour un initiateur donné de l'oxydation. Il est

important de prendre en considération que chaque méthode décrit un mécanisme particulier et donne des indications sur l'efficacité des antioxydants *via* ce mécanisme uniquement. Une standardisation des méthodes serait importante (sélection d'un nombre limité de tests : ORAC, TEAC ; simplification des protocoles ; initiation de l'oxydation à l'aide des radicaux les plus pertinents par rapport aux conditions naturelles) ([Rodriguez-Amaya 2010](#)).

Dans le cas des caroténoïdes, les tests adaptés aux milieux hydrophiles restent insuffisants pour déterminer l'activité des molécules emprisonnées dans des micelles, au cœur de gouttelettes lipidiques, ou au sein des lipoprotéines du plasma. Les mesures réalisées après extraction des caroténoïdes dans des solvants organiques sont une alternative mais ne permettent pas d'évaluer les interactions entre les caroténoïdes et les autres composants (protéines, autres antioxydants...) des milieux dans lesquels ils sont présents.

### 1.3.2. Inhibition de la peroxydation lipidique

Le fait de produire des radicaux dans un milieu lipidique et de suivre la peroxydation lipidique et son inhibition en présence de divers antioxydants dans ce compartiment permet de mesurer l'activité antioxydante totale des molécules présentes. C'est un modèle pertinent pour étudier le pouvoir antioxydant dans des solutions micellaires ([Pryor 1993](#); [Nagler, Lankin et al. 2003](#); [Vulcain, Goupy et al. 2005](#); [Goupy, Vulcain et al. 2007](#)) ou des émulsions légèrement acides ([Kiokias, Dimakou et al. 2009](#)). Cette méthode est particulièrement bien adaptée aux caroténoïdes ([Terao, Nagao et al. 1992](#)) et présente l'avantage de prendre en compte les interactions entre les caroténoïdes et les autres composants de leur environnement.

Dans le tractus digestif, les métalloprotéines (en particulier celles à noyaux ferrique) présentes dans les aliments peuvent accélérer l'oxydation des lipides alimentaires poly-insaturés accumulés en concentrations importantes à l'occasion d'un repas ([Garcia, Martinez-Torres et al. 1996](#)). Pour cette étude ciblant le compartiment gastrique, la métmyoglobine (MbFe<sup>III</sup>) et le fer libre ont donc été choisis comme initiateurs de la peroxydation lipidique dans des modèles physico-chimiques : des micelles d'acide linoléique et de caroténoïdes stabilisées par un tensioactif non-ionique (Brij<sup>®</sup>35) en milieux aqueux tamponnés ; puis une émulsion d'huile de tournesol et de caroténoïdes en milieu aqueux légèrement acide, stabilisée par des phospholipides de soja

## 2. PUBLICATION III - INHIBITION BY NOVEL BACTERIAL CAROTENOIDS OF IRON-INDUCED PEROXIDATION OF LINOLEIC ACID IN MODEL GASTRIC CONDITIONS: COMPARISON WITH COMMON CAROTENOIDS

*Journal of Agricultural and Food chemistry, en préparation pour soumission*

CHARLOTTE SY<sup>1,2</sup>, MALIKA BOUTALEB<sup>1,2</sup>, CLAIRE DUFOUR<sup>1,2</sup>, PATRICK BOREL<sup>3-5</sup>, CATHERINE CARIS-VEYRAT<sup>1,2</sup>, & OLIVIER DANGLES<sup>2,1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR408, Safety and Quality of Plant Products, Site Agroparc, 84000, Avignon, France

<sup>2</sup> University of Avignon, UMR408, UMR408, 84000, Avignon, France

<sup>3</sup> INRA, UMR1260 "Lipid Nutrients and Prevention of Metabolic Diseases", F-13385 Marseille, France

<sup>4</sup> INSERM, ERL U1025 "Bioavailability of Micronutrients", F-13385 Marseille, France

<sup>5</sup> Aix-Marseille Univ, faculté de Médecine, F-13385, France

\* Corresponding author. E-mail address: olivier.dangles@univ-avignon.fr

### ABSTRACT

---

Recently isolated spore-forming pigmented marine bacteria, *Bacillus indicus* HU36 and *Bacillus firmus* GB1 are sources of carotenoids with original structures (about fifteen distinct yellow and orange O-alkylglycosides and about thirteen distinct pink O-acylglycosides, respectively). These carotenoids were evaluated for their ability to inhibit iron-induced peroxidation of linoleic acid micelles or sunflower oil emulsions in comparison with  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin. Lipid peroxidation was performed at pH 4 or pH 5.8 and with heme iron (metmyoglobin MbFe<sup>III</sup>) or free iron (Fe<sup>II</sup>) as the peroxidation initiator, so as to simply simulate gastric conditions. Lipid hydroperoxide formation and carotenoid degradation were followed by UV-vis spectroscopy and specific indicators of the antioxidant activity were estimated in each model. Bacterial carotenoids came up as better inhibitors of MbFe<sup>III</sup>-induced lipid peroxidation than common carotenoids, possibly because of their higher stability in the presence of MbFe<sup>III</sup> and/or their possible location closer to the interface in micelles and lipid droplets (due to their polar glycosyl moieties). However, they were less efficient than lycopene against Fe<sup>II</sup>-induced lipid peroxidation. Moreover, the peroxidation curves suggest that the reference carotenoids mainly inhibit the propagation phase of lipid peroxidation, while inhibition by the bacterial carotenoids could also occur during the initiation stage. However, complementary experiments showed that the bacterial carotenoids were unable to reduce the one-electron oxidised form of metmyoglobin (ferrylmyoglobin), a model of initiating species in heme-induced lipid peroxidation.

---

**KEYWORDS:**  *$\beta$ -carotene, lycopene, astaxanthin, bacterial carotenoids, iron, emulsion, lipid peroxidation, antioxidant activity.*

## INTRODUCTION

Lipid peroxidation is detrimental to food quality and to the integrity of biological lipid assemblies (cell membranes, lipoproteins) [1, 2]. When initiated by reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation is a radical chain mechanism producing lipid hydroperoxides (primary products) and a complex distribution of secondary products via reactive lipid oxyl and peroxy radicals [3-5]. Radicals and electrophiles (aldehydes, epoxides) formed during lipid peroxidation can also damage proteins and DNA, and those events are likely involved in the development of degenerative diseases [4, 6-9]. The simultaneous ingestion of dietary iron and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) inevitably contaminated by hydroperoxides can induce lipid peroxidation in the gastric compartment. Indeed, dietary iron, which is abundant in meat, both in its heme and free forms [10, 11], is a major source of oxidative stress in the gastro-intestinal (GI) tract [12], due to its ability to produce ROS from hydroperoxides [12-14]. Moreover, in gastric conditions, lipid peroxidation may be fast due to high dioxygen concentrations, acidic pH and constant mixing [15].

Due to their limited intestinal absorption and extensive catabolism in humans, dietary antioxidants (polyphenols, carotenoids) are increasingly thought to exert a large part of their beneficial health effects in the gastro-intestinal tract, in particular, by inhibiting the peroxidation of dietary PUFAs [15-16]. It is therefore biologically significant to devise simple chemical models of the gastric compartment to investigate the capacity of carotenoids and other dietary antioxidants to scavenge ROS formed during iron-induced lipid peroxidation [17].

Besides, pigmented microorganisms are increasingly considered as potential alternative sources of a wide range of carotenoids with both C40 and C30 backbones for the food and nutraceutical industries. In this work, novel carotenoids extracted from two marine bacterial strains were investigated for their antioxidant activity in the gastric compartment. Initially, the *Bacillus indicus* HU36 and mutant *Bacillus firmus* GB1 strains were selected for their high production of carotenoids, the resistance of their spores to UV radiations [18] and their probiotic properties [19]. The HU36 strain isolated in human faeces produces orange-yellow pigments (global  $\lambda_{\text{MAX}}$  = 429, 454 and 485 nm) in variable proportions depending on whether they are in the vegetative cell or spore forms [20]. The most abundant pigments in HU36 are glycosyl-apolycopene esters and methyl-glycosyl-8'-apolycopenoate esters with saturated fatty acid secondary chains [20]. The GB1 strain isolated from human ileum produces deep-pink pigments (global  $\lambda_{\text{MAX}}$  = 463, 492 and

524 nm), the main one being 4,4'-diglycosyl-4,4'-diapolycopenoic ester [18]. For comparison, three common carotenoids were also investigated: the hydrocarbons  $\beta$ -carotene and lycopene abundant in fruit and vegetables, and the xanthophyll astaxanthin produced by yeasts and typically consumed with fishes and crustaceans. These three pigments are the main carotenoids commercially available in today's market in synthetic or natural forms [21].

Our models involve micelles and emulsions so as to mimic the environment of dietary carotenoids in the GI tract [23, 24]. The experimental conditions used were adapted from previously published procedures [17, 24]. Peroxidation was initiated either by free ferrous iron or by metmyoglobin and followed at pH 5.8 and 4, respectively corresponding to the early phase and mid phase of digestion. In a first step, the inhibition of lipid peroxidation by carotenoids was followed by monitoring the accumulation of lipid hydroperoxides. Then, secondary products of lipid peroxidation were also analysed. Possible antioxidant mechanisms were investigated by assessing the distribution of the carotenoids between the oil and aqueous phases of the emulsion and their ability to reduce ferrylmyoglobin, a one-electron oxidised form of metmyoglobin and a model of initiating species in heme-induced lipid peroxidation.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Natural (all-*E*)-lycopene from tomato oleoresin ( $C_{40}H_{56}$ ,  $M = 536 \text{ g.mol}^{-1}$ , > 90%) was obtained from Conesa. Novel carotenoid extracts from *Bacillus* strains (HU36 and GB1) were displayed by members of the COLORSPORE project's consortium (Small Collaborative Project No. 207948, funded by FP7 and coordinated by the Royal Holloway University of London) [25]. Synthetic type II (all-*E*)- $\beta$ -carotene ( $C_{40}H_{56}$ ,  $M = 536 \text{ g.mol}^{-1}$ , > 95%), synthetic (all-*E*)-astaxanthin ( $C_{40}H_{52}O_4$ ,  $M = 596 \text{ g.mol}^{-1}$ , > 98%), polyoxyethylenglycol 23 lauryl ether (Brij<sup>®</sup>35), (9-*Z*,12-*Z*)-octadecadienoic acid (linoleic acid, > 99%), phospholipids L- $\alpha$ -lecithin from soybean (> 30%  $\alpha$ -phosphatidylcholine),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (> 99.5%), myoglobin from equine heart (> 90%, essentially salt-free), xylenol orange tetrasodium salt and butyl hydroxytoluene (BHT, 2,(6)-di-tert-butyl-*p*-cresol) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4'-4''-disulfonic acid monosodium, 97%) was from Fluka (St-Quentin-Fallavier, France). Sunflower oil was food grade (Auchan, France). The buffers used in the experiments are a 0.2 mol/L and a 0.02 mol/L acetate buffers (pH 4.0) and a 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 5.8). Water was purified through a Millipore Q-Plus.

Methanol was from Merck (Darmstadt, Germany) and of LC-MS grade. All other solvents were from Fisher-Scientific (Loughborough, UK). Methylene chloride was of UPLC grade and isopropanol were of analytical grade.

**UV-visible spectroscopy.** All spectra were recorded on a Specord S-600 diode-array UV-Vis spectrophotometer (optical pathlength = 1 cm) equipped with an 8-cell rail, a magnetic stirring device and a thermostatic bath (Analytic Jena).

**Preparation of carotenoid stock solutions.** Crude bacterial extracts from HU36 and GB1 were dissolved in  $CH_2Cl_2/MeOH$  (1/1, v/v). Cocktails of purified bacterial carotenoids (~ 90%) were obtained by eluting the crude extracts by liquid chromatography on a  $C_{18}$  column. The pure eluent was evaporated and redissolved in  $CH_2Cl_2/MeOH$  (1/1, v/v). Three pure carotenoids were chosen as reference molecules to evaluate the stability of bacterial carotenoids: synthetic (all-*E*)- $\beta$ -carotene (purity > 95%), natural (all-*E*)-lycopene from tomato oleoresin (purity > 90%) and synthetic (all-*E*)-astaxanthin (purity > 98%). Stock standard carotenoid solutions (ca. 500  $\mu\text{mol/L}$ ) were prepared by dissolving the dry samples (2.68 mg for  $\beta$ -carotene and lycopene, 2.98 mg for astaxanthin, 3.75 mg HU36 carotenoids and 3.90 mg for GB1 carotenoids) in 10 mL  $CH_2Cl_2$ . The concentrations of stock carotenoid solutions were calculated precisely by absorbance measurement. The molar

absorption coefficients used were 128,500 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 460 nm for β-carotene [26], 178,000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 482 nm for lycopene, 125,000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 486 nm for astaxanthin, 165,000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 454 nm for HU36 carotenoids and 225,300 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> at 502 nm for GB1 carotenoids in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The average molecular weights of the HU36 and GB1 carotenoids (750 g.mol<sup>-1</sup> and 784 g.mol<sup>-1</sup> respectively) and their molar absorption coefficients were taken from the literature [27].

**Preparation of the micellar model of the gastric compartment.** Experiments were carried out in mildly acidic aqueous solutions to approach gastric conditions [22], namely at pH 5.8 (immediately after meal) and pH 4 (30 min after meal). A 0.2 mol/L acetate buffer and a 0.2 mol/L phosphate buffer were chosen for experiments at pH 4.0 and 5.8, respectively. Both have low metal-chelating capacities. Because of potential contamination by metal impurities in buffer salts, purification of the buffer solutions was achieved by elution on a chelating resin (Chelex 100<sup>®</sup>, Bio-Rad).

The non-ionic surfactant Brij<sup>®</sup>35 (polyoxyethylenglycol dodecyl ether) was used for the preparation of carotenoid-containing micelles. Brij<sup>®</sup>35 was chosen for its good stability and very low content in hydroperoxides which could react with iron [28]. Brij<sup>®</sup>35 (2.42 mg) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) to obtain a 40 mmol/L stock solution.

Linoleic acid was used as substrate of peroxidation. A 28 mmol/L stock solution was prepared by dissolving 39.25 mg commercial linoleic acid in 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Aliquots of stock carotenoid solutions were mixed with 2 mL stock surfactant solution and 250 μL linoleic acid stock solution. After evaporation of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under reduced pressure and solubilisation of the dried viscous residue in 20 mL aqueous buffer, initial concentrations were 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35, 0.7 mmol/L linoleic acid and 0 to 8 μmol/L carotenoid. Micelles were formed by stirring the solution on a magnetic plate until total homogenization. The micellar medium was perfectly limpid.

**Preparation of the emulsion model of the gastric compartment.** Experiments were carried out at pH 4 (0.02 mol/L acetate buffer) and 37°C. Sunflower oil was purified from endogenous α-tocopherol by adsorption on activated neutral alumina (15 g for 30 mL oil) at 4°C for 24 hours. The concentrations of stock carotenoid solutions were calculated precisely by absorbance measurement. An aliquot of stock carotenoid solution and 638 mg soya phospholipids (40 % in α-phosphatidylcholine) were dispersed into 1.8 g sunflower oil. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the dried viscous residue was dissolved in 16.4 mL acetate buffer and homogenized by vigorous stirring to initiate emulsification. Then, the mixture was kept on ice and emulsification was completed by six

45-second sonication cycles, with interruptions of 30 s to prevent heating. The final concentrations in the emulsion were 25 or 100  $\mu\text{mol/L}$  in carotenoids, 10% (v/v) in oil and 13.3 g/L (17.4 mmol/L) in  $\alpha$ -phosphatidylcholine.

**Emulsion physical characterisation apparatus.** Emulsions were first analysed by optical microscopy (x 2,000). Then, the particle size distributions of the emulsion droplets were measured using a laser diffraction instrument (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Particle size was determined at different time points of the reaction and on several emulsions.

**Preparation of iron solutions.** For experiments in the micellar system, oxidation was initiated by free ferrous ions or metmyoglobin. Stock 20 mmol/L  $\text{Fe}^{\text{II}}$  solution was prepared by dissolving 11.18 mg ferrous sulphate heptahydrate in 2 mL 0.1 mol/L sulphuric acid. Stock 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MbFe}^{\text{III}}$  solution was prepared by dissolving 8.9 mg myoglobin from equine heart in 1 mL milliQ water. Because of the poor solubility of myoglobin, the stock solution was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  filter and its concentration was controlled by absorbance measurement at 505 nm, using  $\epsilon = 97,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [29]. Dilutions to 1/20 of the previous stock solutions were made to obtain solutions of 1 mmol/L  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and 25  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MbFe}^{\text{III}}$ .

For experiments in the emulsion system, only  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  was used. About 18 mg myoglobin from equine heart were dissolved in 1 mL acetate buffer (0.02 mmol/L, pH 4) and the solution was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  filters. In order to measure its exact concentration, the solution was diluted in milliQ water (pH ca. 7) and its absorbance was measured. Then, the stock solution was diluted in pH4 acetate buffer to obtain exactly a 1 mmol/L  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  solution.

**Inhibition of lipid peroxidation by carotenoids in the micellar system.** 1.96 mL of the micellar system containing 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35, 0.7 mmol/L linoleic acid and 0.5 to 8  $\mu\text{mol/L}$  carotenoid (control experiment without carotenoid) were transferred into macro quartz spectrophotometer cells protected from light, covered with Teflon stoppers and kept under magnetic stirring at a constant temperature of 37°C. At  $t_0$ , oxidation was initiated by addition of 40  $\mu\text{L}$  diluted iron solution to the reaction medium. Inhibition of linoleic acid oxidation by the carotenoids was evaluated at pH 4 with two different initiators:  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ) and  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ). At pH 5.8, linoleic acid peroxidation was initiated by  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  only. Iron concentrations were chosen so as to ensure a gradual accumulation of lipid hydroperoxides. Each experiment was run in triplicate.

UV-vis spectra of the reaction medium were recorded regularly from 200 to 1,000 nm (base-line recorded on acetate buffer). Lipid peroxidation was followed by measuring the concentration of conjugated dienes (mainly hydroperoxides + minor amounts of alcohols). Their absorbance was directly recorded at 234 nm. The residual carotenoid concentration was simultaneously measured at the  $\lambda_{\text{MAX}}$  value in the visible range.

**Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup> titration.** Fe<sup>II</sup>-induced peroxidation experiments in the micellar system were repeated in round bottom flasks with larger volumes of solution to permit the monitoring of the redox state of iron. Aliquots (1 mL) of the medium were taken-up at t = 0 (before addition of iron), 2, 6, 12, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min. The carotenoid and its products were extracted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v). After 2 min centrifugation at 10<sup>4</sup> rpm, 250  $\mu$ L of the aqueous phase were mixed with 750  $\mu$ L of a 1mmol/L ferrozine solution in milliQ water [30]. Titration of Fe<sup>III</sup> was adapted from the FOX2 method typically used for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> titration [31]. A solution of 10<sup>-4</sup> mol/L xylenol orange in MeOH / 0.25 mol/L sulphuric acid (9/1, v/v) was prepared to detect ferric iron specifically.

After 15 min incubation at room temperature, a stable coloration was obtained. The samples were then transferred to the spectrophotometer cell to record the absorbance at 564 nm for Fe<sup>II</sup> and at 559 nm for Fe<sup>III</sup>. Calibration curves, previously constructed with Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup> solutions in acetate buffer, were linear in the range 0.5 - 150  $\mu$ mol/L for Fe<sup>II</sup> and 0.5 - 125  $\mu$ mol/L for Fe<sup>III</sup>.

**Inhibition of lipid peroxidation by carotenoids in the O/W emulsion.** 5 mL of the oil-in-water emulsion at pH 4 (17.4 mmol/L  $\alpha$ -phosphatidylcholine, 10% oil (v/v), 25 or 100  $\mu$ mol/L carotenoid) were transferred into small glass flasks protected from light and kept under magnetic stirring at a constant temperature of 37°C. At t<sub>0</sub>, oxidation was initiated by addition of ca. 200  $\mu$ L MbFe<sup>III</sup> solution to the reaction medium (initial MbFe<sup>III</sup> concentration: 40  $\mu$ mol/L). Inhibition of lipid oxidation was evaluated with each carotenoid sample. Each experiment was monitored for 6 hours and run in triplicate.

Regular sampling of 100  $\mu$ L was carried out in the reaction medium. Aliquots were diluted into 1.9 mL iPrOH and centrifuged at 10<sup>4</sup> rpm for 2 min to discard phospholipids by precipitation. The carotenoid concentration was followed by absorbance measurement at  $\lambda_{\text{MAX}}$  on the supernatant. Then, 200  $\mu$ L of the supernatant were collected and diluted again into 1.8 mL iPrOH. Lipid peroxidation was followed by measuring the concentration of conjugated dienes. Their absorbance was recorded by UV-vis spectroscopy at 233 nm (base-line recorded on iPrOH).

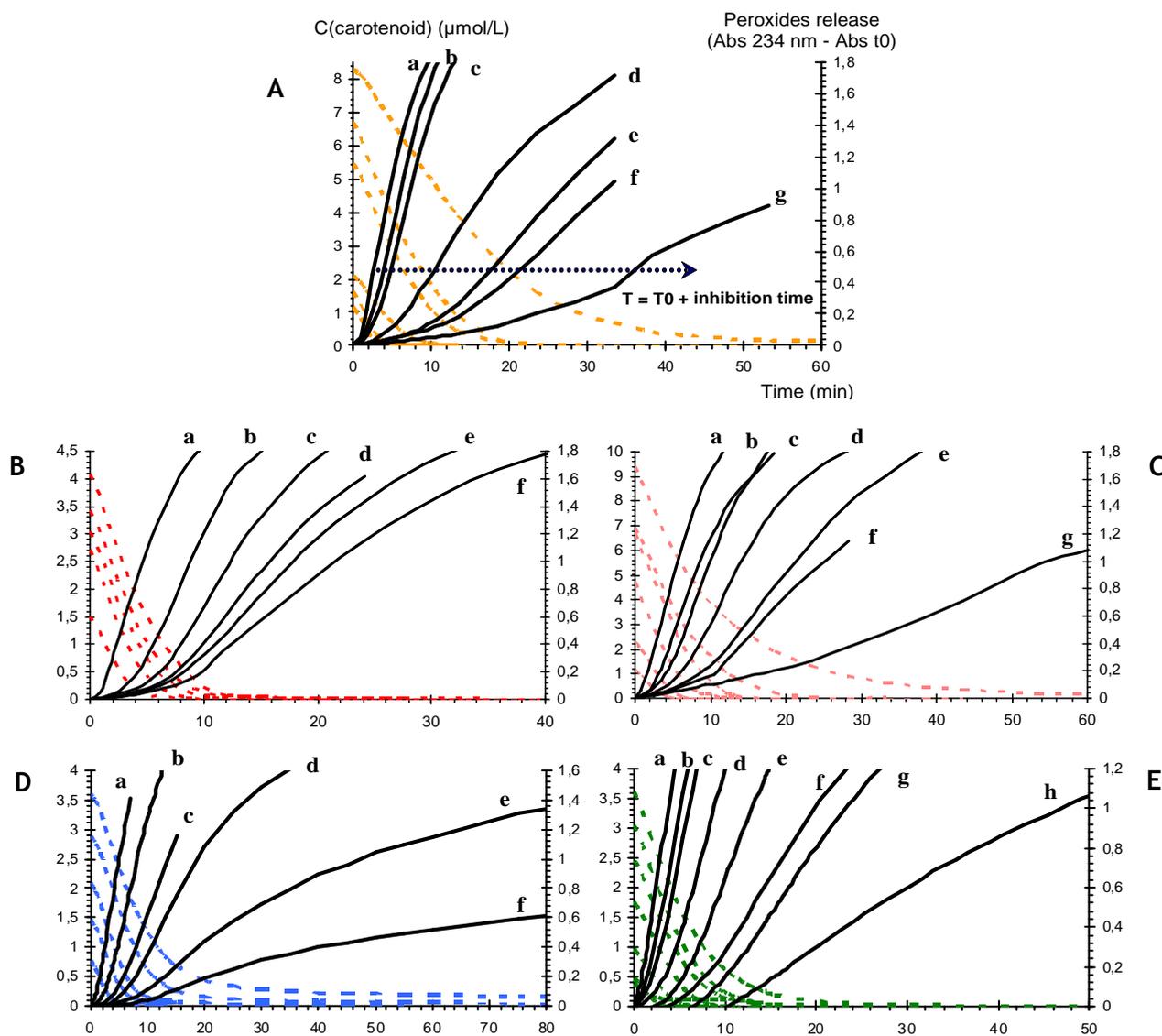
**Ultracentrifugation of the emulsions.** 5 mL of the oil-in-water emulsion at pH 4 were transferred to polyvinyl flasks. Ultracentrifugation was conducted at 35000 rpm for 1 h at 4°C. Two phases were collected: a lipid supernatant and an aqueous lower phase. Carotenoids were extracted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> from the two phases and their concentrations were measured by UV-vis spectroscopy.

**Reduction of ferrylmyoglobin by the carotenoids.** The experimental procedure was adapted from Vulcain et al. [17]. Ferrylmyoglobin (MbFe<sup>IV</sup>=O) was first formed in a spectrophotometer cell (2 mL) by adding small volumes (60 µL) of a concentrated aqueous solution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mmol/L, final concentration in the cell = 30 µmol/L) to a 60 µmol/L MbFe<sup>III</sup> solution in a pH 7 phosphate buffer containing 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35. Spectral changes featuring the conversion of MbFe<sup>III</sup> (specific peak at 505 nm) into MbFe<sup>IV</sup>=O (specific peak at 590 nm) were recorded in the visible range until stability (2-3 min). Then, small volumes (about 50 µL) of a concentrated solution of carotenoid in MeOH/THF (1/1, v/v) were added (final concentrations of the carotenoids in the cell = 0 or 25 or 100 µmol/L) and the reduction of MbFe<sup>IV</sup>=O back to MbFe<sup>III</sup> was monitored at 590 nm.

**GC-MS analysis of volatile lipid oxidation products.** Secondary lipid oxidation products were analysed on a GC QP 20120 apparatus (Schimadzu), Direct head-space micro-extraction was performed with a carboxen/polydimethylsiloxane (PDMS) fibre (10 mm length, 0.75 µm film width, Supelco) for 25 min at 37°C. Direct splitless injection was carried out in GC with helium and volatile compounds were separated on a capillary CP-Sil 8 CB column (5% phenylmethyl polysiloxane, 30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.5 µm film width, Varian) using the following temperature gradient: 35°C for 2 min, increase to 150°C (5°C min<sup>-1</sup>), increase to 250°C (20°C min<sup>-1</sup>), then 2 min at 250°C. Detection was performed by electronic impact (70 eV). Mass spectra were recorded in the range m/z = 29 - 300 with a speed of 4 scans.s<sup>-1</sup>. Product identification was achieved by using the NIST (National Institute of Standards and Technology) databank.

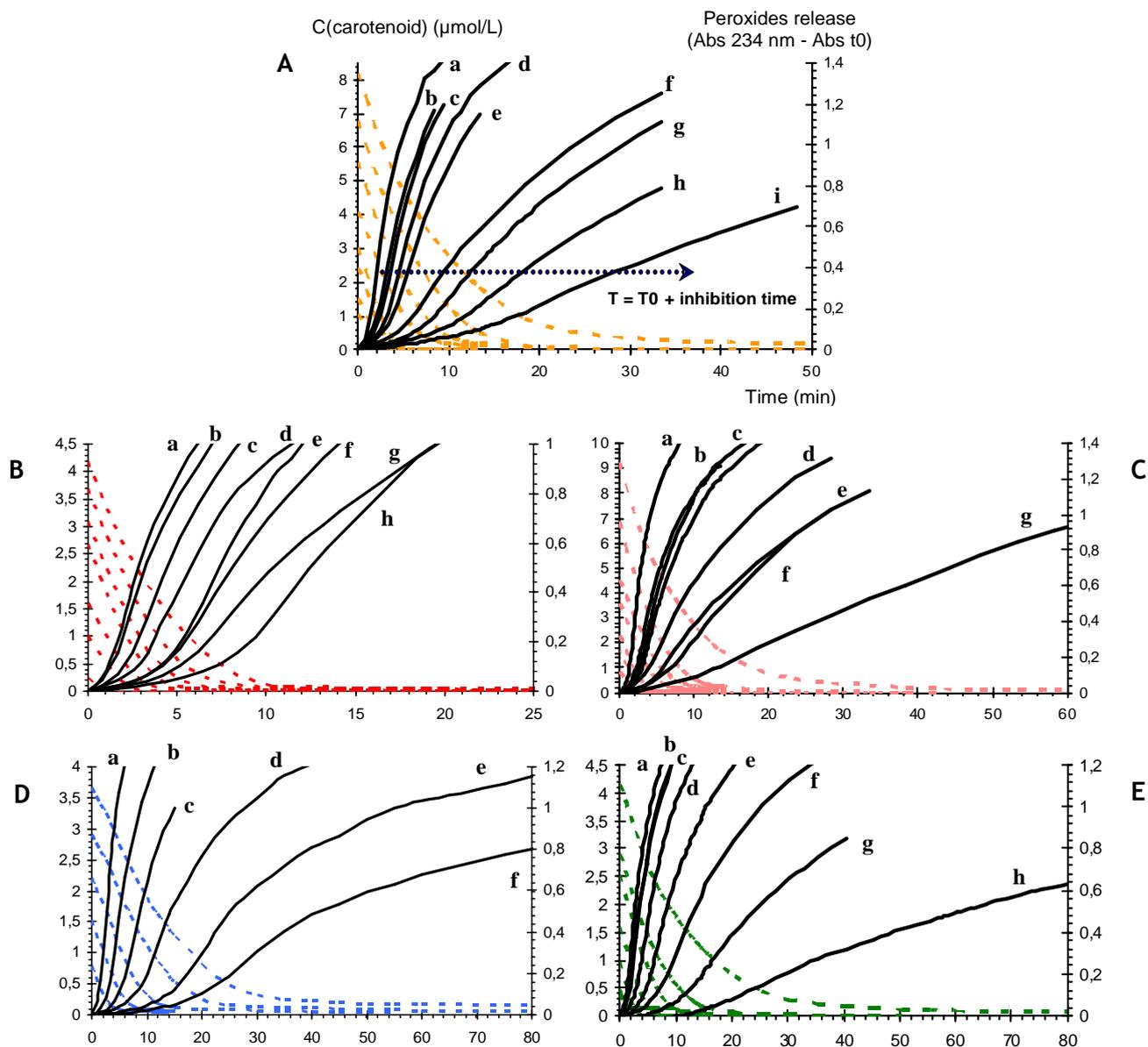
## RESULTS

Inhibition of lipid peroxidation by carotenoids in the micellar model. Kinetic curves for the accumulation of conjugated dienes (CD: LOH and LOOH from the oxidation of linoleic acid by iron) were plotted without antioxidant (control) and with increasing carotenoid concentrations in the three micellar models (figures 1, 2 & 3, A-E).

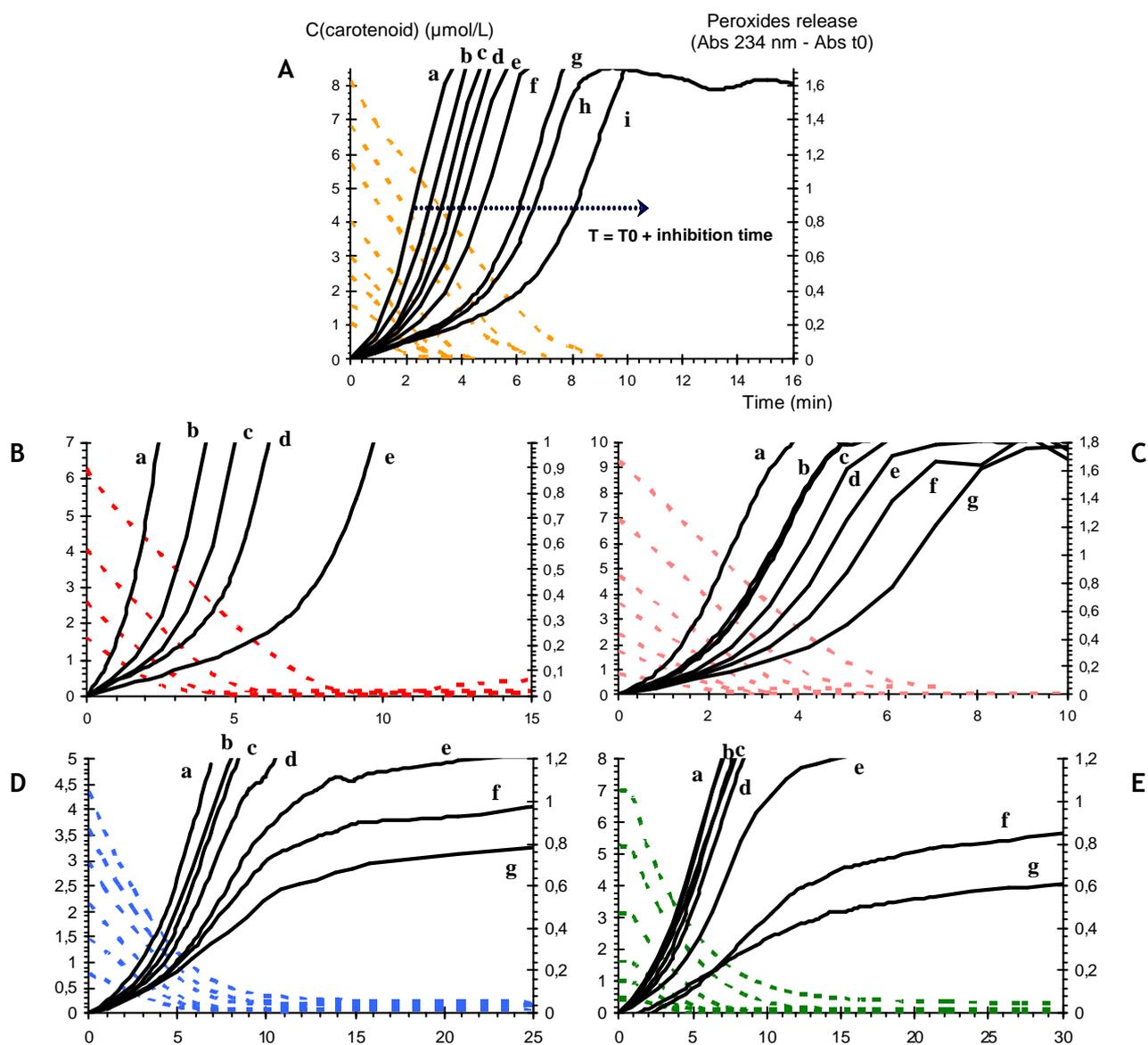


**Figure 1.** Inhibition of  $MbFe^{III}$ -induced peroxidation of linoleic acid (pH 5.8), by  $\beta$ -carotene (a=control, b=1.1, c=1.6, d=2.4, e=5.6, f=6.8 and g=8.2  $\mu\text{mol/L}$ ), lycopene (a=control, b=1.6, c=2.7, d=3.1, e=3.7 and f=4.2  $\mu\text{mol/L}$ ), astaxanthin (a=control, b=1.2, c=2.3, d=4.6, e=6.6, f=6.8 and g=9.2  $\mu\text{mol/L}$ ), HU36 carotenoids (a=control, b=0.7, c=1.45, d=2.1, e=2.9, f=3.6  $\mu\text{mol/L}$ ), GB1 carotenoids (a=control, b=0.4, c=0.5, d=1, e=1.7, f=2.5, g=3.2 and h=3.7  $\mu\text{mol/L}$ ). Plain curves: CD accumulation ( $A_{234\text{nm}}-A_{t0}$ ). Dashed curves: carotenoid consumption.

Whatever the carotenoid, MbFe<sup>III</sup>-induced lipid peroxidation was globally faster at pH 4 (figure 1, A-E) than at pH 5.8 (figure 2, A-E).



**Figure 2.** Inhibition of MbFe<sup>III</sup>-induced peroxidation of linoleic acid (pH 4), by  $\beta$ -carotene (a=control, b=1.1, c=1.6, d=2.4, e=3.1, f=4, g=5.6, h=6.8 and i=8.2  $\mu\text{mol/L}$ ), lycopene (a=control, b=0.23, c=1, d=1.6, e=2.7, f=3.1, g=3.7 and h=4.2  $\mu\text{mol/L}$ ), astaxanthin (a=control, b=0.8, c=1.6, d=2.3, e=3.5, f=6.8 and g=9.2  $\mu\text{mol/L}$ ), HU36 carotenoids (a=control, b=0.75, c=1.5, d=2.2, e=2.9 and f=3.7  $\mu\text{mol/L}$ ), GB1 carotenoids (a=control, b=0.4, c=0.5, d=1, e=1.6, f=2.6, g=3 and h=4.2  $\mu\text{mol/L}$ ). **Plain curves:** CD accumulation ( $A_{234\text{nm}}-A_{t0}$ ). **Dashed curves:** carotenoid consumption.



**Figure 3.** Inhibition of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -induced peroxidation of linoleic acid (pH 4), by  $\beta$ -carotene (a=control, b=1.1, c=1.6, d=2.4, e=3.1, f=4, g=5.6, h=6.8 and i=8.2  $\mu\text{mol/L}$ ), lycopene (a=control, b=1.6, c=2.7, d=4.2 and e=6.2  $\mu\text{mol/L}$ ), astaxanthin (a=control, b=1.6, c=2.3, d=3.5, e=4.6, f=6.8 and g=9.2  $\mu\text{mol/L}$ ), HU36 carotenoids (a=control, b=0.75, c=1.5, d=2.2, e=2.9, f=3.7 and g=4.4  $\mu\text{mol/L}$ ), GB1 carotenoids (a=control, b=0.5, c=1, d=1.6, e=3.1, f=5.2 and g=6.9  $\mu\text{mol/L}$ ). Plain curves: CD accumulation ( $A_{234\text{nm}}-A_{t0}$ ). Dashed curves: carotenoid consumption.

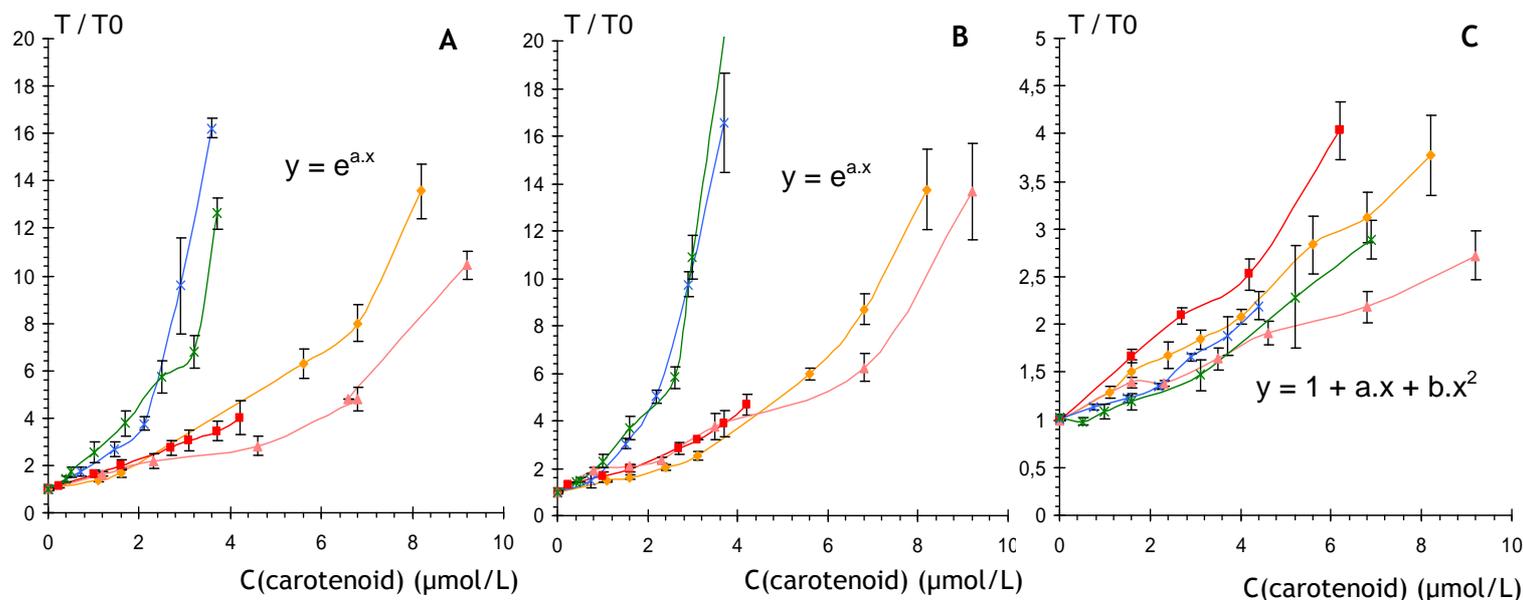
In all three models, peroxidation proceeded with an induction period, during which the accumulation of LOH and LOOH was slow and which corresponded to the period necessary to consume the carotenoids. In  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ -initiated oxidation (figures 1 & 2, A-E), the propagation rate was also lower than in control with both reference and bacterial carotenoids (even after consumption of all carotenoids). In  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -initiated oxidation (figure 3, A-E), reference carotenoids had no effect on the propagation rate, while bacterial carotenoids induced a saturation in CD accumulation.

The  $RT = T/T_0$  ratio was calculated for all carotenoid concentrations, with  $T_0$  = time required to produce a fixed CD concentration in the control experiment, e.g that corresponding to a 0.7 increase in the absorbance at 234 nm from its value at time zero (addition of iron);  $T$  = time required to produce the same CD concentration in the presence of carotenoids (table 1).

**Table 1.** Kinetic parameters of the inhibition of peroxidation of sunflower oil fatty acids by the diverse carotenoids in the emulsion system.

Carotenoids	MbFe, pH 5.8			MbFe, pH 4			Fe <sup>II</sup> , pH 4		
	C <sub>t0</sub> (μmol/L)	T/T <sub>0</sub>	half-life (min)	C <sub>t0</sub> (μmol/L)	T/T <sub>0</sub>	half-life (min)	C <sub>t0</sub> (μmol/L)	T/T <sub>0</sub>	half-life (min)
β-carotene	0	1.0		0	1.0		0	1.0	
	1.1	1.4	1.1	1.1	1.5	0.9	1.1	1.3	1.4
	1.6	1.7	1.7	1.6	1.6	1.3	1.6	1.5	1.3
	5.6	6.3	5.1	2.4	2.0	1.5	2.4	1.7	1.0
	6.8	8.0	5.8	3.1	2.5	1.7	3.1	1.8	1.4
	8.2	13.6	12.4	5.6	6.0	3.5	4.0	2.1	1.9
				6.8	8.7	4.9	5.6	2.8	2.6
				8.2	13.7	6.1	6.8	3.1	2.1
lycopene	0	1.0		0	1.0		0	1.0	
	0.2	1.1		0.2	1.3	0.4	1.6	1.7	1.2
	1.0	1.6		1.0	1.7	1.1	2.7	2.1	1.8
	1.6	2.0	1.8	1.6	2.0	1.3	4.2	2.5	2.2
	2.7	2.7	2.5	2.7	2.8	1.6	6.2	4.0	3.5
	3.1	3.0	2.9	3.1	3.2	2.1			
	3.7	3.4	3	3.7	3.9	2.3			
	4.2	4.0	3.6	4.2	4.7	2.8			
astaxanthin	0	1.0		0	1.0		0	1.0	
	1.2	1.6	1.7	0.8	1.9	0.9	1.6	1.4	1.0
	2.3	2.2	2.6	1.6	2.1	1.3	2.3	1.4	1.2
	4.6	2.8	3.2	2.3	2.4	1.5	3.5	1.6	1.6
	6.8	4.8	4.6	3.5	3.8	2.6	4.6	1.9	1.9
	6.6	4.8	5.5	6.8	6.2	3.6	6.8	2.2	2.5
	9.2	10.5	8.0	9.2	13.7	5.8	9.2	2.7	2.8
HU36 carotenoids	0	1.0		0	1.0		0	1.0	
	0.7	1.8	2.1	0.8	1.5	1.8	0.8	1.1	2.6
	1.5	2.7	3.1	1.5	3.0	3.1	1.5	1.2	2.6
	2.1	3.8	3.8	2.2	5.0	4.9	2.2	1.3	2.6
	2.9	9.6	5.7	2.9	9.7	7.7	2.9	1.7	2.7
	3.6	16.2	7.1	3.7	16.5	10.0	3.7	1.9	2.9
GB1 carotenoids	0	1.0		0	1.0		0	1.0	
	0.4	1.4	1.5	0.4	1.4	0.9	0.5	1.0	2.5
	0.5	1.7	1.3	0.5	1.5	0.6	1.0	1.1	2.6
	1.0	2.6	2.2	1.0	2.3	1.3	1.6	1.2	2.7
	1.7	3.8	2.8	1.6	3.6	2.2	3.1	1.5	2.9
	2.5	5.7	3.3	2.6	5.8	3.3	5.2	2.3	3.5
	3.2	6.8	3.6	3.0	10.9	4.6	6.9	2.9	3.2
	3.7	12.6	4.8	4.2	26.5	7.9			

The  $RT = f(C)$  curves ( $C$  = initial carotenoid concentration) were plotted for each carotenoid in the three models:  $MbFe^{III}$  at pH 4 and 5.8 (figure 4, A & B) and  $Fe^{II}$  at pH 4 (figure 4, C). When lipid peroxidation was initiated by  $MbFe^{III}$ , an exponential relationship was highlighted:  $RT = \exp(aC)$ . When lipid peroxidation was initiated by free  $Fe^{II}$ , a polynomial relationship was highlighted:  $RT = 1 + aC + bC^2$ .



**Figure 4.** Exponential or polynomial modelling of the antioxidant activity of the diverse carotenoids in the micellar medium (A) in the presence of  $MbFe^{III}$ , pH 5.8 and (B) in the presence of  $MbFe^{III}$ , pH 4 and (C) in the presence of  $Fe^{II}$ , pH 4.

The  $IC_{50}$  parameter (in  $\mu\text{mol/L}$ ), commonly used to evaluate the antioxidant capacity, is the carotenoid concentration giving a  $T$  value twice as large as the control period with no antioxidant [17, 32]. The  $IC_{50}$  parameter can be estimated from the  $RT$  vs.  $C$  curves:

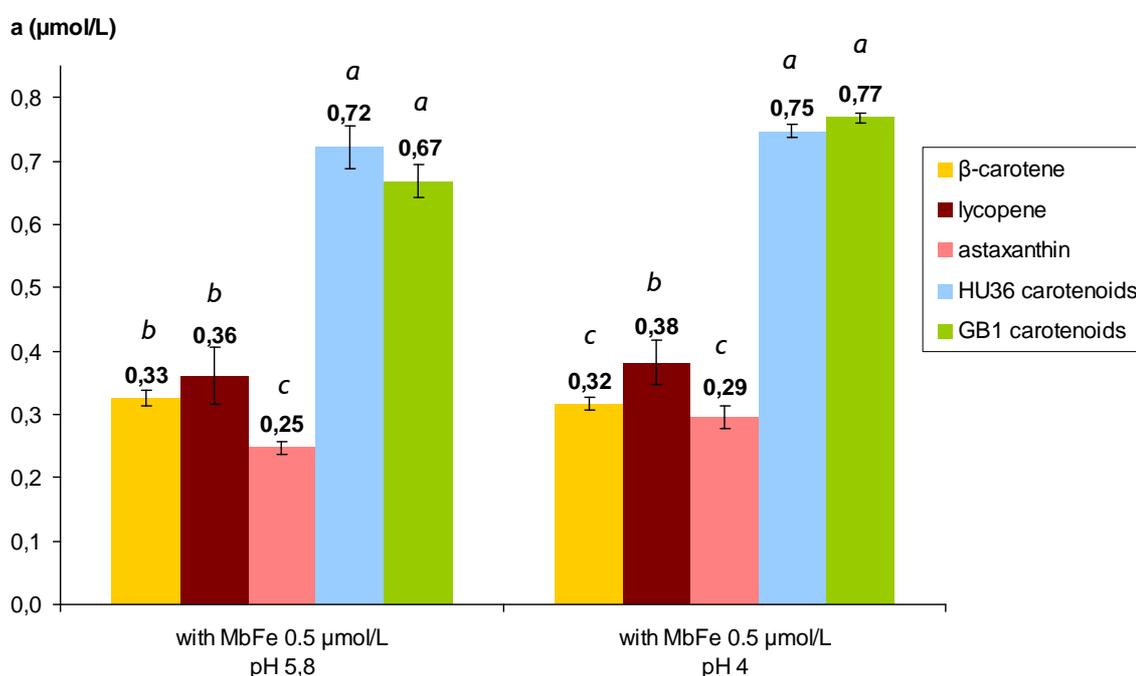
$$IC_{50} = \ln 2 / a, \text{ in the } MbFe^{III} \text{ models}$$

$$IC_{50} = (\sqrt{a^2 + 4b} - a) / (2b), \text{ in the } Fe^{II} \text{ model}$$

The lower the  $IC_{50}$  value, the more efficient the antioxidant. However, antioxidants having low  $IC_{50}$  (around 1  $\mu\text{mol/L}$ ) may be difficult to discriminate. Furthermore,  $IC_{50}$  does not correctly reflect the impact of an increase in the carotenoid concentration on the inhibition of linoleic acid peroxidation. Thus, with  $MbFe^{III}$  at pH 5.8 or 4, the “ $a$ ” coefficient was preferred. Parameter “ $a$ ” is expressed in  $L.\mu\text{mol}^{-1}$  and is directly proportional to the antioxidant capacity per concentration unit. For results with  $Fe^{II}$  at pH 4, both the  $IC_{50}$  parameter and the “ $a$ ” and “ $b$ ” coefficients (expressed in  $L.\text{mol}^{-1}$  and

$L^2 \cdot mol^{-2}$ , respectively) were considered. Statistical ANOVA tests (Statview software, version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, USA) were used to discriminate carotenoids by their antioxidant capacity.

When linoleic acid oxidation was initiated by heme iron, bacterial carotenoids from HU36 or GB1 were found significantly better antioxidants than the three reference carotenoids with “a” factors about twice as high (figure 5). The pH of the micelle solution had a low impact on the relative antioxidant capacities of the carotenoids: at pH 5.8,  $\beta$ -carotene and lycopene were found slightly better antioxidants than astaxanthin, whereas at pH 4, lycopene was slightly more efficient than  $\beta$ -carotene and astaxanthin.

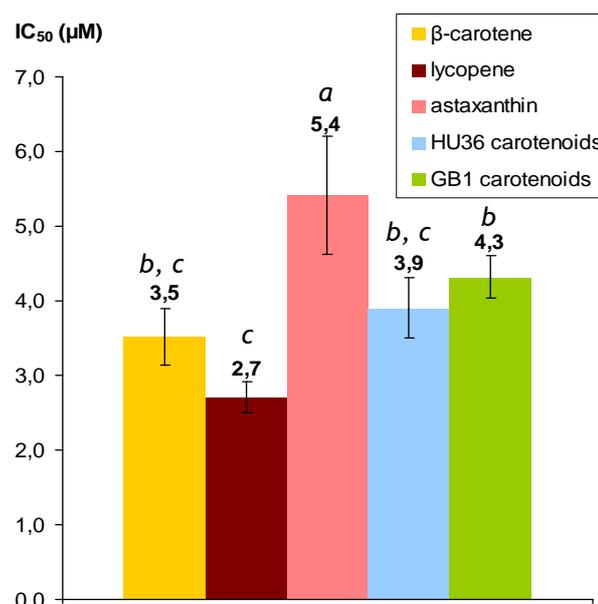


**Figure 5.** Comparison of factor « a » in  $RT = exp(aC)$ , with  $C = [0 ; 10 \mu mol/L]$ , for the diverse carotenoids in the micellar medium pH 5.8 and pH 4, in the presence of  $MbFe^{III}$ . Means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

When oxidation was initiated by  $Fe^{II}$ , purified bacterial carotenoids were not found better inhibitors than reference carotenoids. Lycopene had the lower  $IC_{50}$  value and astaxanthin was the least efficient antioxidant against  $Fe^{II}$ -induced lipid peroxidation (figure 6). Moreover, from the “a” and “b” coefficients (table 2), it can be concluded that the bacterial carotenoids are less efficient than the reference carotenoids at low concentrations, but that this gap tends to vanish when the concentration increases.

**Table 2.** Comparison of factors “a” and “b” ( $\pm$  SD) in  $RT = 1 + aC + bC^2$ , with  $C = [0 ; 10 \mu\text{mol/L}]$ , for the diverse carotenoids.

	a ( $\mu\text{mol/L}$ )	b ( $\mu\text{mol}^2/\text{L}^{-2}$ )
$\beta$ -carotene	0.251 ( $\pm 0.026$ )	0.010 ( $\pm 0.003$ )
lycopene	0.288 ( $\pm 0.024$ )	0.031 ( $\pm 0.004$ )
astaxanthine	0.193 ( $\pm 0.031$ )	-0.001 ( $\pm 0.001$ )
HU36 carotenoids	0.060 ( $\pm 0.074$ )	0.053 ( $\pm 0.029$ )
GB1 carotenoids	0.039 ( $\pm 0.105$ )	0.063 ( $\pm 0.021$ )

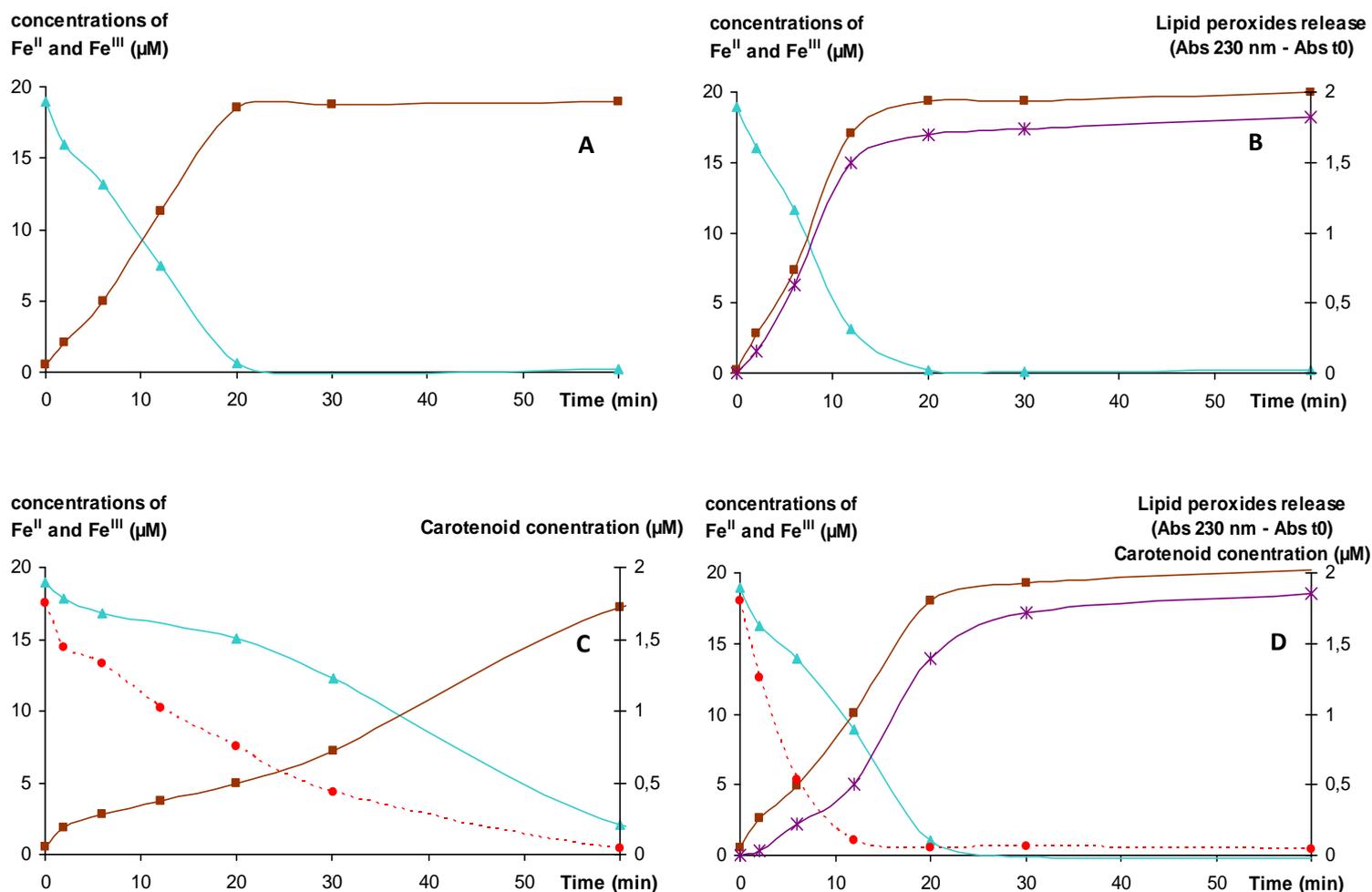


**Figure 6.** Comparison of the  $IC_{50}$  index, for the diverse carotenoids in the micellar medium pH 4, in the presence of  $Fe^{II}$ . Means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

**Reduction of ferrylmyoglobin by the carotenoids.** When  $MbFe^{III}$  is treated by  $H_2O_2$  (0.5 equiv.) in the absence of antioxidant, formation of ferrylmyoglobin ( $MbFe^{IV}=O$ ) can be observed at 590 nm [17]. When an antioxidant is added, a decay of  $A_{(590\text{ nm})}$  occurs if  $MbFe^{IV}=O$  is reduced. In the presence of 100  $\mu\text{mol/L}$  astaxanthin, HU36 or GB1 carotenoids, reduction of ferrylmyoglobin was slow and indistinguishable from that observed in the control experiment with MeOH alone. In the presence of  $\beta$ -carotene or lycopene, a slight stabilisation of  $MbFe^{IV}=O$  compared to the control was observed (data not shown). Thus, those carotenoids do not significantly react with  $MbFe^{IV}=O$ .

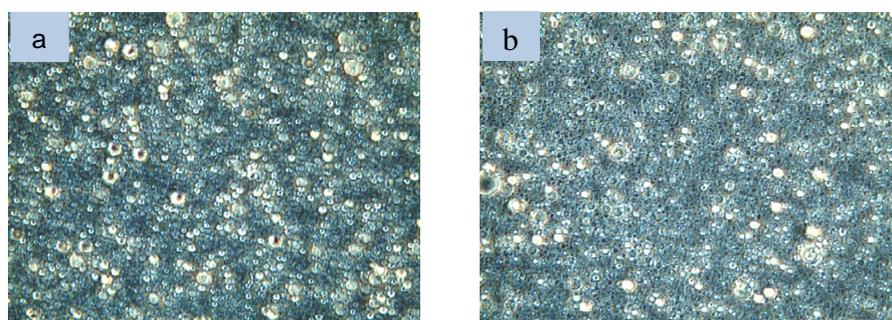
**Changes in the iron redox state during  $Fe^{II}$ -induced linoleic acid peroxidation.** Except in strongly acidic conditions,  $Fe^{II}$  is known to be very sensitive to autoxidation [33]. In the pH 4 micellar solution without carotenoids and linoleic acid,  $Fe^{II}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ) is totally converted into  $Fe^{III}$  after 20 min (figure 7, A). Moreover, the total iron concentration remained constant along the time, confirming that the titration methods used are reliable. In the presence of linoleic acid (0,7  $\mu\text{mol/L}$ ), the conversion of  $Fe^{II}$  into  $Fe^{III}$  was slightly accelerated, due to the simultaneous production of lipid hydroperoxides liable to react

with Fe<sup>II</sup> (figure 7, B). On the contrary, in the presence of carotenoids, the conversion of Fe<sup>II</sup> into Fe<sup>III</sup> was much slower (figure 7, C), suggesting that the carotenoids reduce Fe<sup>III</sup> released in the solution and/or high-valence intermediates involved in Fe<sup>II</sup> autoxidation (ferryl and perferryl species, [33]). This inhibition of Fe<sup>II</sup> autoxidation by carotenoids was also observed in the presence of linoleic acid, although much less pronounced. Moreover, carotenoids slow down the production of lipid hydroperoxides (figure 7, D).



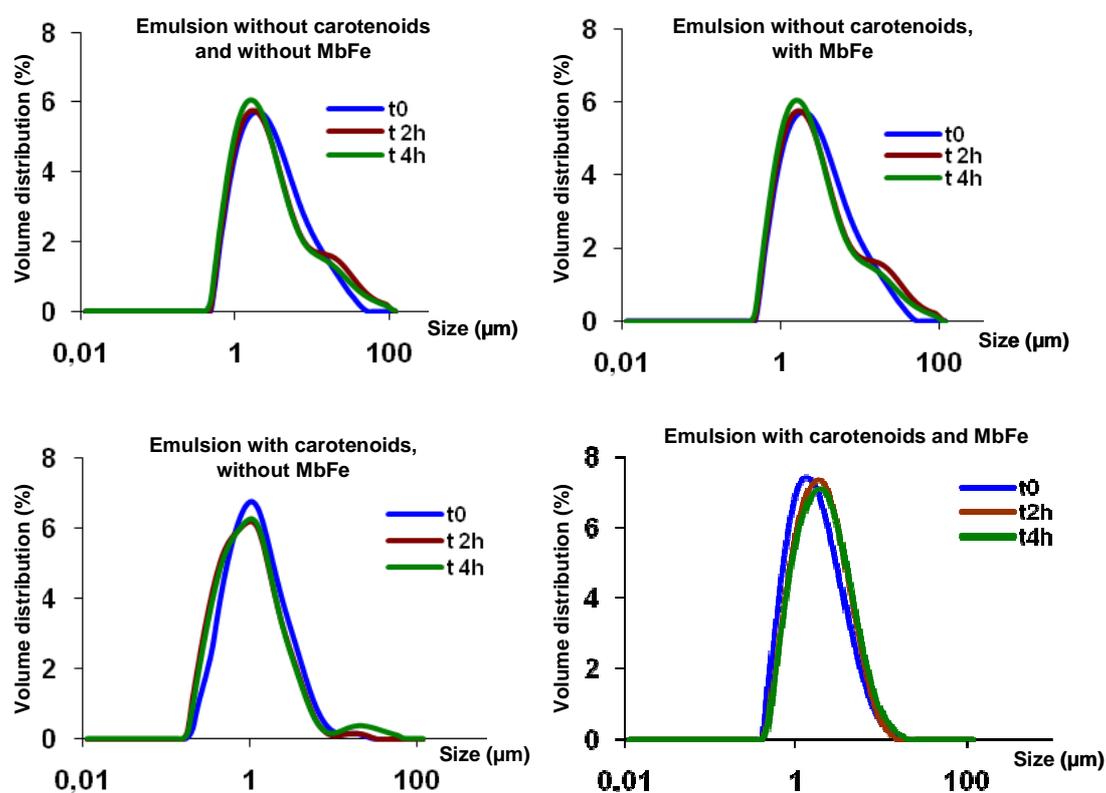
**Figure 7.** Conversion of Fe<sup>II</sup> (▲) into Fe<sup>III</sup> (■) measured from two independent titrations, production of lipid peroxides (\*) and carotenoid degradation (dashed curve, ●) in acetate buffer pH 4 + Brij<sup>®</sup>35, 37°C. **A:** Fe<sup>II</sup> (20 μmol/L), **B:** Fe<sup>II</sup> (20 μmol/L) + linoleic acid (0,7 mmol/L), **C:** Fe<sup>II</sup> (20 μmol/L) + lycopene (2 μmol/L), **D:** Fe<sup>II</sup> (20 μmol/L) + linoleic acid (0,7 mmol/L) + lycopene (2 μmol/L) dashed curves: Fe<sup>II</sup> (125 μmol/L) + β-carotene (17 μmol/L).

**Physical characteristics of emulsions.** Analysis by optical microscopy revealed an homogeneous distribution of lipid droplets in emulsions (figure 8, A & B).



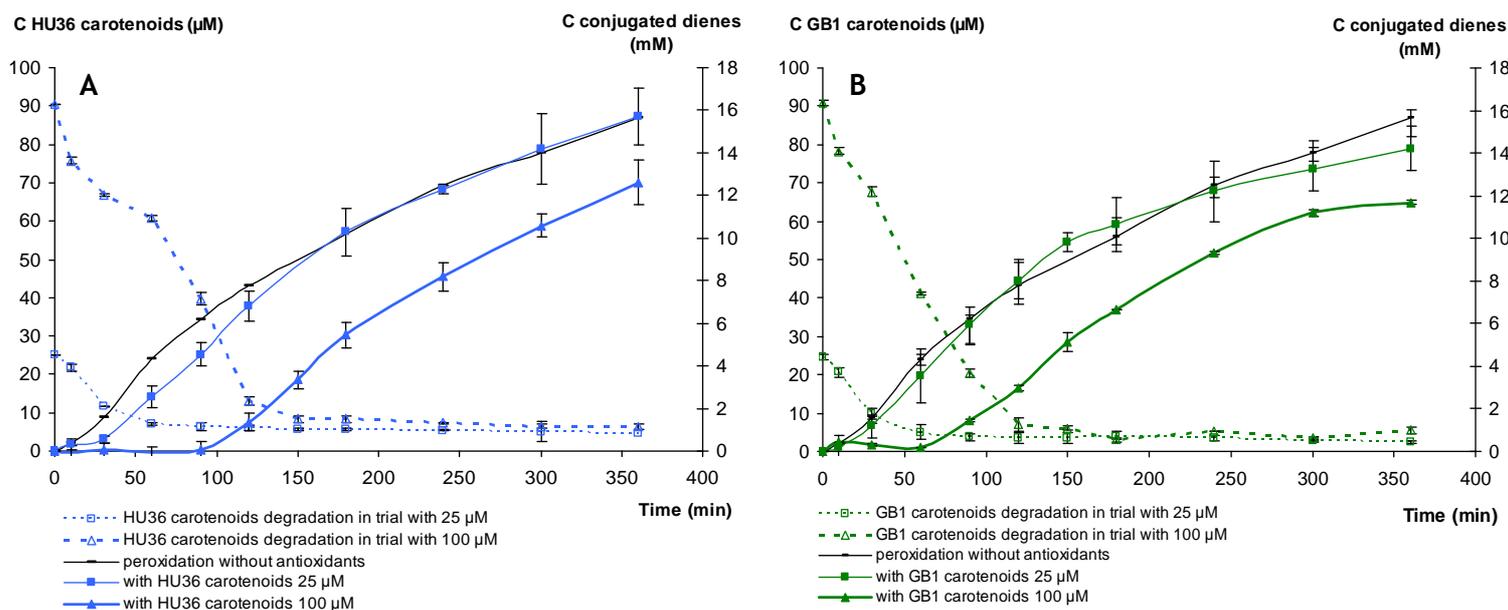
**Figure 8.** Microscopic observation of the emulsion ( $\times 2000$ ), (A) just after sonication and (B) after 5 hours incubation under stirring at  $37^{\circ}\text{C}$ .

Analysis by laser granulometry indicated that the droplet size was between  $0.4$  and  $20\ \mu\text{m}$ , with a major population between  $1$  and  $3\ \mu\text{m}$  (mode  $6-8\%$ ). The droplet diameter  $D_{[3,2]}$  (based on the average surface area) was  $1.45 \pm 0.13\ \mu\text{m}$ . Moreover, emulsions were stable over the whole duration of the kinetic measurements (figure 9).



**Figure 9.** Granulometric measurements on the emulsions over 4 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Inhibition of lipid peroxidation by carotenoids in the emulsion model.** In the emulsions, heme-induced lipid peroxidation (induction period of *ca.* 5 min without antioxidant) was much slower than in the micellar model and higher carotenoid concentrations were necessary to achieve substantial inhibition. Kinetic curves for the accumulation of conjugated dienes were plotted for 6 hours without antioxidant and with two carotenoid concentrations (25 and 100  $\mu\text{mol/L}$ ). With 25  $\mu\text{mol/L}$  HU36 carotenoids (figure 10, A), the onset of peroxidation was delayed by about 25 min. However, after 3 hours, CD concentration was the same as the one measured in the control. With higher carotenoid concentrations (100  $\mu\text{mol/L}$ ), the induction phase was extended to 88 min. On the other hand, the peroxidation rate during the propagation phase was the same as in the control. Measurements of pigment concentrations revealed that almost all the carotenoids were consumed during the induction period of CD accumulation. GB1 carotenoids gave similar results (figure 10, B). For instance, the onset of peroxidation was delayed by 60 min with 100  $\mu\text{mol/L}$  carotenoids.



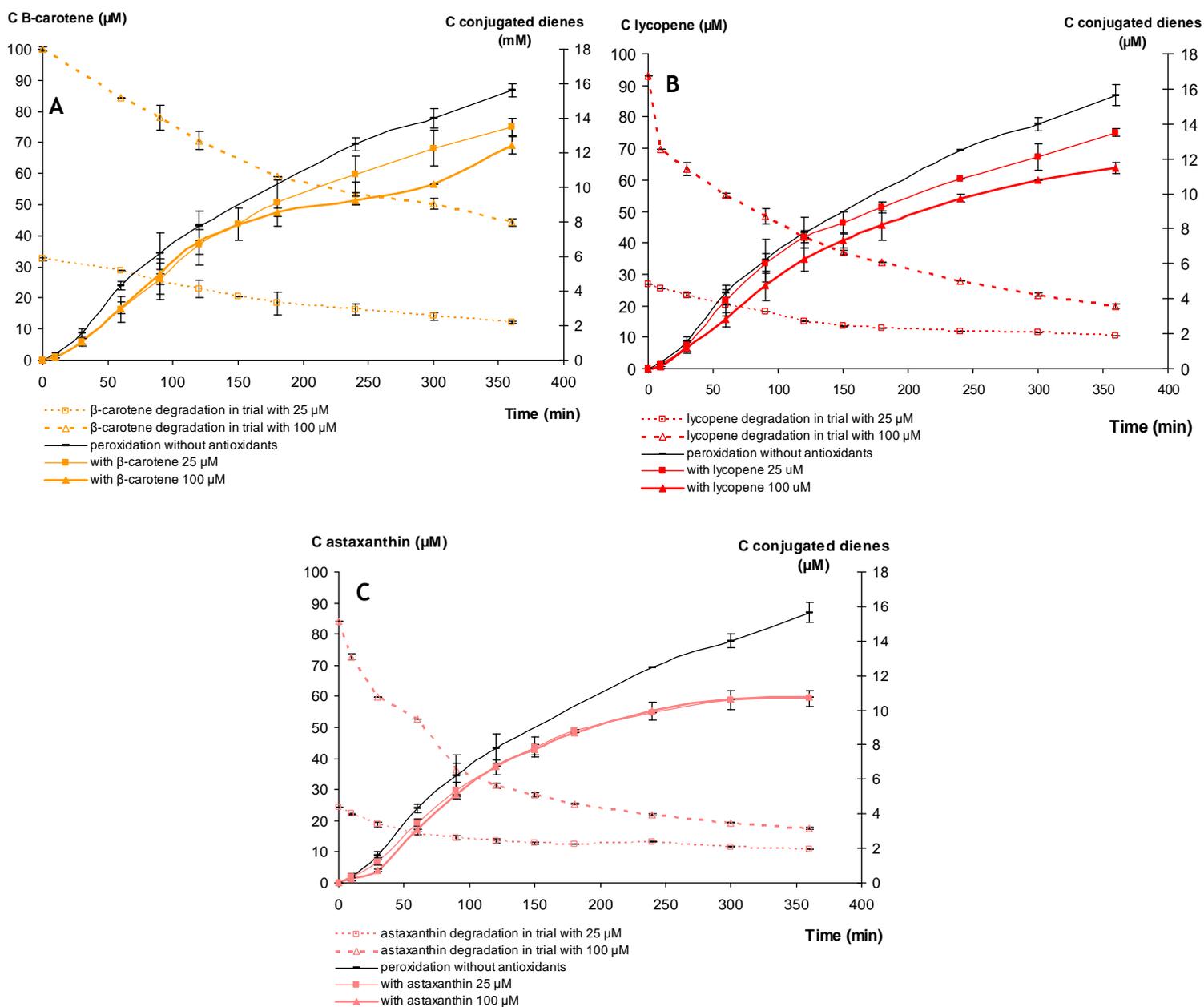
**Figure 10.** Comparison of the accumulation of conjugated dienes (plain curves) in the control system and in the presence of increasing concentrations of bacterial carotenoids (A) from HU36 and (B) from GB1. Plain curves: CD accumulation ( $A_{234\text{nm}} - A_{t0}$ ). Dashed curves: carotenoid consumption.

In conclusion, HU36 and GB1 carotenoids significantly inhibit heme-induced lipid peroxidation in mildly acidic emulsions. They act by prolonging the induction phase (table 3). Once the bacterial carotenoids have been consumed, peroxidation resumes and is as fast as in the control experiment. Thus, it may be suggested that colourless carotenoid oxidation products do not inhibit lipid peroxidation in this model.

**Table 3.** Kinetic parameters of the inhibition of peroxidation of sunflower oil fatty acids by the diverse carotenoids in the emulsion system.

Carotenoid	Initial carotenoid concentration (µmol/L)	Duration of initiation phase (min)	% inhibition (after 6 hours)	Carotenoid half-life (min)
control (without carotenoids)	-	5.3	-	-
β-carotene	32.5	7.0	14.2	240
	100.0	6.8	22.0	305
lycopene	26.9	6.7	12.7	170
	93.0	7.0	24.3	95
astaxanthin	24.4	13.4	23.2	180
	84.1	20.8	20.2	85
HU36 carotenoids	25.1	30.0	4.5	27
	90.6	88.0	43.7	82
GB1 carotenoids	24.6	15.9	12.6	25
	90.9	60.6	35.9	55

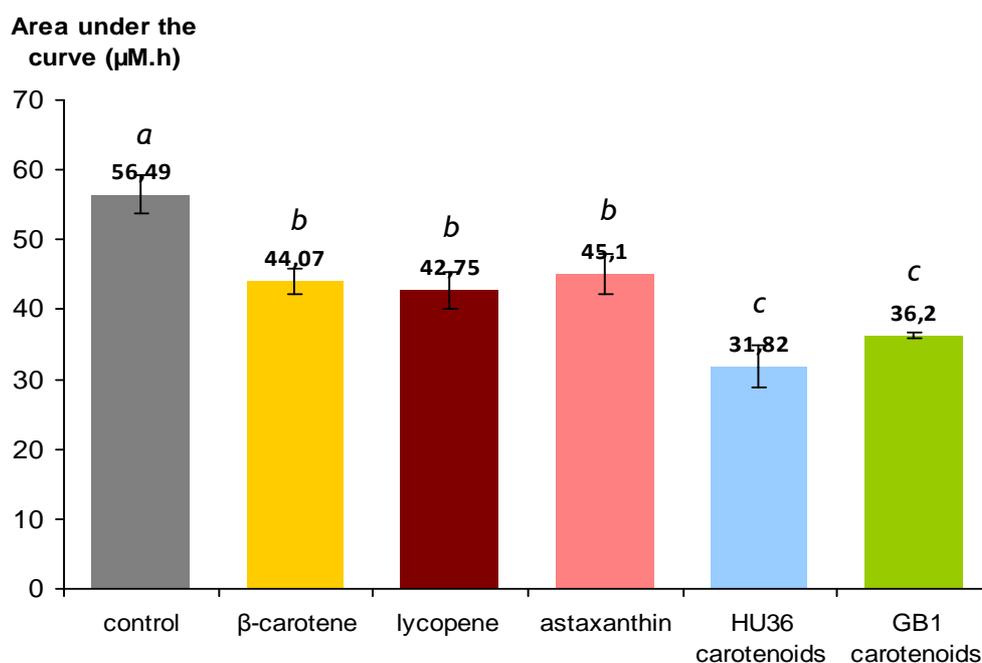
Unlike bacterial carotenoids, β-carotene and lycopene (figure 11, A & B) did not significantly increase the induction period of peroxidation, even at high concentrations (100 µmol/L). Only astaxanthin (figure 11 C) induced a slight delay of about 20 min when added at 100 µmol/L. However the three reference carotenoids were partially consumed during this period, especially lycopene and astaxanthin, but to a lesser extent than bacterial carotenoids. The inhibition of lipid oxidation by the reference carotenoids was more obvious during the propagation phase. Moreover, the inhibition of lipid peroxidation was not proportional to the carotenoid concentration in this model.



**Figure 11.** Comparison of the accumulation of conjugated dienes (plain curves) in the control system and in the presence of increasing concentrations of (A) β-carotene, (B) lycopene and (C) astaxanthin. Dashed curves represent the degradation of the carotenoids during peroxidation. Plain curves: CD accumulation ( $A_{234nm} - A_{t0}$ ). Dashed curves: carotenoid consumption.

In conclusion, the reference carotenoids mainly lower the peroxidation rate during the propagation phase. It may be suggested that some carotenoid oxidation products are responsible for this inhibition.

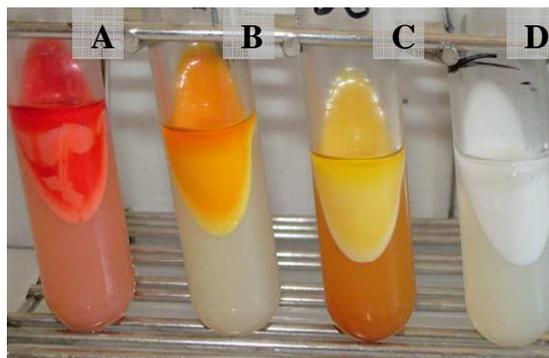
The areas under the curves of CD accumulation (in  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$ ) calculated over 6 h of lipid peroxidation were used as a quantitative indicator to compare the antioxidant activity of the carotenoids. Statistical ANOVA tests showed that HU36 and GB1 carotenoids were significantly better antioxidants than the three standard carotenoids (figure 12). Moreover,  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin could not be discriminated by their ability to inhibit lipid peroxidation in this model.



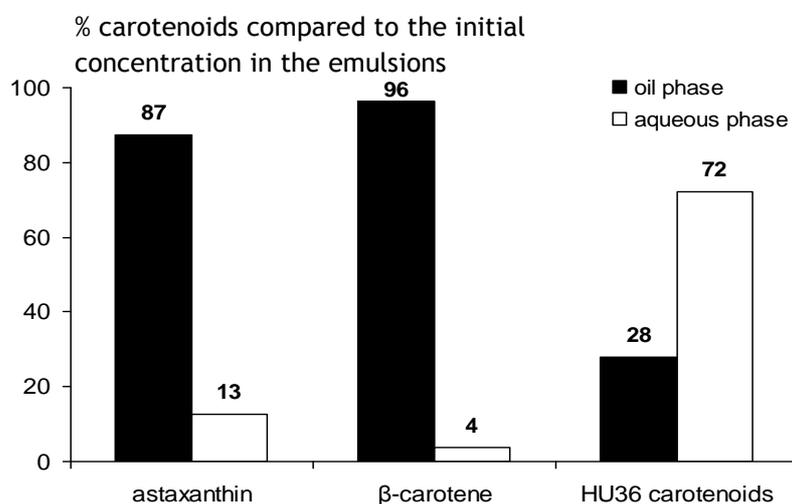
**Figure 12.** Comparison of the inhibition of polyunsaturated lipids' oxidation by 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  of the diverse carotenoids during 6 hours. Means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

**Characterisation of volatile oxidation products.** Secondary lipid oxidation products were identified by GC-MS as aldehydes, ketones and alcohols: penten-3-one, pentanal, hexanal, 2-hexenal, 2-heptenal, 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol, (*E*)-2,4-heptadienal, (*Z*)-2,4-heptadienal and 2-octenal. Hexanal, pentanal, 2-heptenal and 1-octen-3-one were the main products.

**Distribution of the carotenoids between the oil and aqueous phases of the emulsions.** Ultracentrifugation of emulsion systems containing astaxanthin,  $\beta$ -carotene or HU36 carotenoids highlighted differences of solubility of these carotenoids in oil and in water. Astaxanthin and  $\beta$ -carotene were found mainly in the oil + phospholipid fractions, while HU36 carotenoids were more equally distributed between the two fractions, with a majority in the aqueous phase (figures 13 & 14).



**Figure 13.** Aspect of the emulsion systems after 1 h ultracentrifugation at 4°C, 35,000 rpm. Astaxanthin (A),  $\beta$ -carotene (B) and HU36 carotenoids (C) were separated differently between the oil and the aqueous phases. A control (D) did not contain carotenoids.



**Figure 14.** Percentage of carotenoids recovered in the oil and in the aqueous phases separated by ultracentrifugation of emulsions systems containing 65  $\mu\text{mol/L}$  carotenoids initially. These results suggest that astaxanthin,  $\beta$ -carotene and lycopene are located inside the lipid droplets of the emulsion while bacterial carotenoids lie at the interface.

## DISCUSSION

The main objective of this study was to assess the mechanisms explaining the relative efficiency of carotenoids from different sources to inhibit the oxidation of polyunsaturated fatty acids in mildly acidic solutions. To achieve that aim, we used two possible chemical models to mimic the gastric compartment: *i*) a micellar model with linoleic acid stabilised by a synthetic tensioactive agent [17, 32, 34], which was adapted to study the effects of carotenoids towards different forms of iron at pH 4 and pH 5.8, and *ii*) an oil in water emulsion model [24, 35] which was adapted to better understand the mechanisms of the antioxidant activity of those carotenoids in more complex systems. Previous works reported the efficiency of dietary antioxidants in inhibiting heme-induced lipid peroxidation [17, 24, 34] in concentrations close to the ones attained after meals rich in plant product; and the effect of the structure of carotenoids and carotenoid-derived products on their radical scavenging activity and on their antioxidant activity.

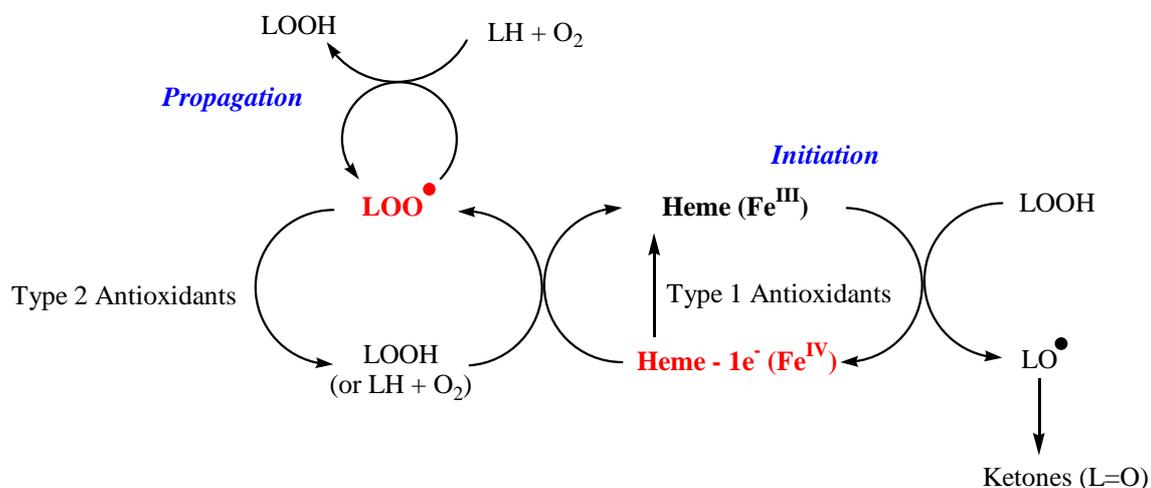
### **Inhibition of the MbFe<sup>III</sup>-induced peroxidation of linoleic acid (micellar model)**

At pH 5.8, the peroxidation is initiated by the metalloprotein while at pH 4, denaturation takes place and the peroxidation is initiated by the sole cofactor (hemin) [32]. Consequently, the onset of peroxidation is typically faster at pH 4.

The induction period of lipid peroxidation was well correlated with the period required for consuming most carotenoids. Induction periods are typical of antioxidants acting in the lipid phase by scavenging the propagating lipid peroxy radicals (chain-breaking antioxidants, scheme 1). Moreover, we confirmed that the carotenoids of this study do not reduce ferrylmyoglobin, a suitable model of peroxidation initiator. Lipid peroxy radical scavenging is more likely to operate by addition of the radicals onto the conjugated hydrocarbon chain than by electron transfer (scheme 1) [32].

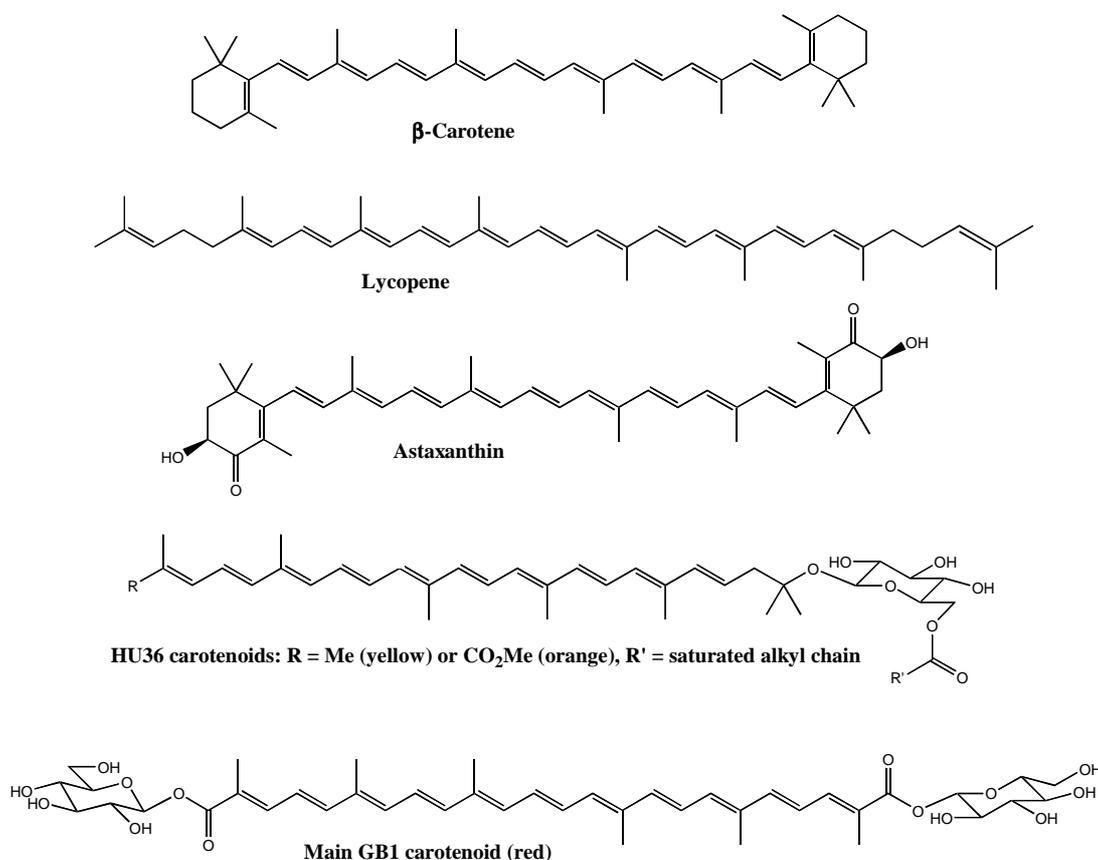
However, the propagation rate of inhibited peroxidation remained lower than in control, even if the carotenoids were totally consumed. This trend was more pronounced with the bacterial carotenoids, especially HU36 with which a strong saturation in CD accumulation was observed. Thus, some carotenoid oxidation products seem able to inhibit lipid peroxidation. In particular, short-chain polar compounds could inhibit the initiation step by reducing hypervalent iron, like hydrophilic antioxidants [34] (scheme 1). It must also be noted that the heme cofactor is gradually consumed during lipid peroxidation as evidenced by the decay of the Soret band [17, 32]. Hence, saturation in CD accumulation could also reflect a gradual shift from heme-induced lipid peroxidation to a much less

efficient mechanism induced by free iron. Depending on their reducing character, iron binding properties and location, antioxidants could also influence this transition.



**Scheme 1.** Mechanism of the MbFe<sup>III</sup>-induced peroxidation of linoleic acid. Type 1 antioxidants: polyphenols, polar short-chain apocarotenoids. Type 2 antioxidants:  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and long-chain apocarotenoids [32, 35].

### Structure vs. reactivity in micelles



**Figure 16.** Structures of carotenoids investigated.

The carotenoids examined in this study may be divided into three categories according to their structures: the carotene lycopene and  $\beta$ -carotene (hydrocarbons), the xanthophyll astaxanthin (ketocarotenoid) and the bacterial carotenoids from HU36 and GB1 (glycosides and glycosylesters).

In micellar solutions, when oxidation was initiated by heme iron, bacterial carotenoids from HU36 or GB1 were found significantly better antioxidants than the three reference molecules. The order of antioxidant activity was glycosylated carotenoids > carotenes > xanthophyll.

Among carotenes, a difference was also noticed between lycopene and  $\beta$ -carotene, especially at pH 4. The higher antioxidant activity of lycopene correlates with previous studies which highlighted that the reactivity of carotenes with radical species increases with the number of coplanar conjugated double bonds [36]. Indeed, they both have 11 conjugated double bonds but in the case of  $\beta$ -carotene, the two bonds belonging to the cyclohexane rings are not coplanar with the rest of the polyene chain, thus reducing the conjugation.

The relative abilities of carotenoids to inhibit lipid peroxidation can also be influenced by the presence of functional groups with different polarities. In our models, these structural differences can modify both the inherent capacity of carotenoids to scavenge peroxy radicals [36, 37] and their location in micelles [34]. Ketocarotenoids are globally less efficient scavengers of radicals than carotenes and hydroxycarotenoids: the carbonyl group raises the energy of the radical adduct and the corresponding transition state of the scavenging reaction ; higher energies of activation and lower rate constants are obtained, [36]). This correlates with the lower antioxidant activity found for astaxanthin (figure 16), compared to  $\beta$ -carotene and lycopene. Bacterial carotenoids from HU36 and GB1 have carbonyl groups that might lower their antioxidant activity. However, they also have polar terminal groups (figure 16) that increase their polarity and facilitate their location at the edge of the micelles, thus favouring the formation of carotenoid-LOO<sup>•</sup> adducts [16]. Indeed, long-chain apocarotenoids with a polar head (CO<sub>2</sub>H, CHO) were shown to be as potent as, and sometimes more potent than, the parent carotenoids, in agreement with their higher affinity for the interface (higher log*P* value) [34]. On the other hand, bacterial carotenoids were shown to be more resistant to metmyoglobin-induced autoxidation (in the absence of lipids, *Cf.* article II) and could thus be more available for radical scavenging during lipid peroxidation than the reference carotenoids.

Finally, it must also be stressed that, being mixtures of several carotenoids, the GB1 and HU36 purified extracts may also benefit from some protective interplay between their components.

### **Influence of the organization of the model: micelles vs. oil/water emulsion**

The hierarchy emerging from the simple micelle model (bacterial carotenoids > reference carotenoids) was translated in the more elaborated emulsion model.

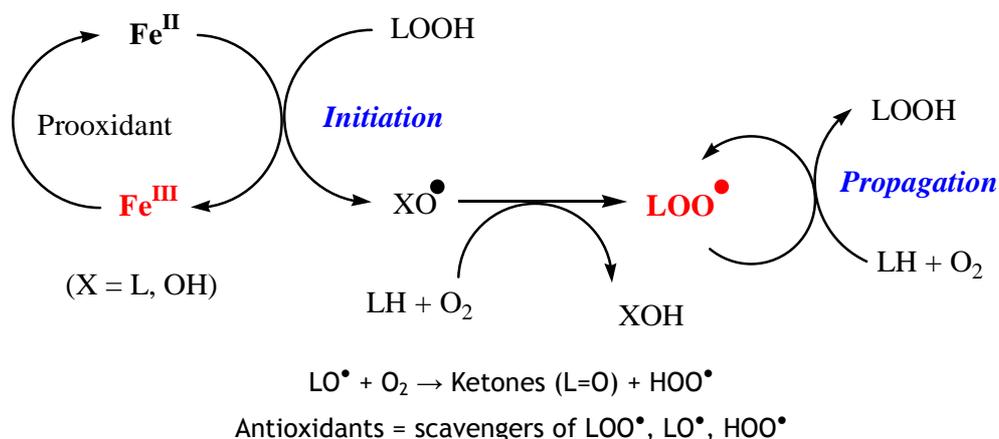
The correlation between the period needed to consume most astaxanthin or bacterial carotenoids (which must lie relatively close to the surface of the lipid droplets) and the duration of the induction period of lipid peroxidation, was also confirmed. HU36 and GB1 carotenoids are particularly efficient chain-breaking antioxidants in the emulsion model. However, it was not the case for the carotenes, which had almost no effect on the duration of the induction period of lipid peroxidation and which showed longer half-lives in this model.

At some stage of  $\beta$ -carotene and lycopene degradation, a decrease of the propagation rate was observed, probably linked to the activity of their oxidation products, which are more polar and could interact more easily with lipid peroxy radicals or initiating species [34]. Conversely, bacterial carotenoids did not reduce the propagation rate of inhibited peroxidation compared to the control, indicating that their colourless oxidation products do not inhibit lipid peroxidation.

### **Inhibition of the Fe<sup>II</sup>-induced peroxidation of linoleic acid (micellar model)**

A similar mechanism as the one described for MbFe<sup>III</sup>-induced peroxidation applies, but with substantial differences (scheme 2):

- a Fe<sup>II</sup> / Fe<sup>III</sup> redox cycle now operates (instead of a Fe<sup>III</sup> / Fe<sup>IV</sup> redox cycle as with heme iron),
- the reaction between Fe<sup>III</sup> and the lipid hydroperoxides or the PUFA itself is very slow, so that initiation now involves the ROS released from the homolytic cleavage of LOOH by Fe<sup>II</sup> (Fenton reaction),
- the reduction of Fe<sup>III</sup> to Fe<sup>II</sup> by the antioxidant can no longer be considered protective but rather prooxidant since Fe<sup>II</sup>, which is critical to ROS formation, is regenerated



**Scheme 2.** Mechanism of the  $Fe^{II}$ -induced peroxidation of linoleic acid.

Interestingly, lycopene,  $\beta$ -carotene and astaxanthin, are able to maintain a large part of iron under the prooxidant  $Fe^{II}$  form in the absence of linoleic acid (figure 7). As direct electron transfer from carotenoids to  $Fe^{III}$  is a slow reaction, this phenomenon is more likely a consequence of the ability of the reference carotenoids to scavenge ROS produced by reaction between  $Fe^{II}$  and  $O_2$  (ferryl and perferryl species) and which are intermediates in the autoxidation of  $Fe^{II}$  into  $Fe^{III}$  (Cf. articles I & II). However, they are much less efficient at recycling iron in the presence of lipids, because of their fast consumption by reactions with lipid peroxy radicals, which induces a quick degradation of the carotenoids.

In low concentrations, the bacterial carotenoids are only weak inhibitors of  $Fe^{II}$ -induced peroxidation of linoleic acid and less protective than the reference carotenoids. However, in larger concentrations, they cause a marked saturation in CD accumulation that is observed after their complete consumption. By contrast, this saturation at low CD concentrations is not observed with the reference carotenoids. Besides, the saturating CD concentration is clearly attained after total conversion of  $Fe^{II}$  into  $Fe^{III}$  (figure 7). Hence, early saturation of lipid peroxidation with bacterial carotenoids suggests that their oxidation products, which are rapidly formed during radical scavenging, are not reducing enough to recycle  $Fe^{II}$  from  $Fe^{III}$ , but may interact with and stabilize  $Fe^{III}$ , so that peroxidation stops.

## CONCLUSION

The kinetics of the inhibition of lipid peroxidation by bacterial carotenoids are noticeably different from the ones of  $\beta$ -carotene, lycopene and astaxanthin, due to major structural differences. Based on the high efficiency of bacterial carotenoids in prolonging the induction phase of oxidation in mildly acidic models of the gastric compartment, they might have a positive post-prandial effect by limiting the amount of oxidized lipids transferred into plasma. Indeed, previous studies highlighted a relationship between dietary oxidized lipids and oxidation in plasma lipoproteins ([Staprans, Rapp et al. 1994](#)). Consequently, whereas the significance of the antioxidant effect of carotenoids in cells remains controversial, their antioxidant effects in the gastro-intestinal tract, where they are in the micromolar range, could participate in the reduction of plasma hydroperoxides and of oxidized lipids in chylomicrons (which are detrimental factors linked to higher risks of atherosclerosis ([Ursini, Zamburlini et al. 1998](#))). This is corroborated by the results of an intervention trial on men which revealed an effect of the consumption of lycopene-rich food on the reduction of the oxidation of low density lipoproteins ([Bub, Waltz et al. 2000](#)). Similar *in vivo* studies with HU36 or GB1 carotenoids would provide further information on their antioxidant potential.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the European Community's Seventh Framework Program (Colorspore, Small Collaborative Project Integrated European Project N° 207948). Special thanks are given to Paul Fraser, Laura Perez and Reena khaneja (Royal Holloway University of London, UK) for providing carotenoid-rich bacterial extracts. We thank the company Conesa (Spain) for its gift of (all-*E*)-lycopene.

## REFERENCES

1. Choe, E.; Min, D. B., Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2006, 46, (1), 1-22.
2. Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N., Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 338, 668-676.
3. Michel, F.; Bonnefont-Rousselot, D.; Mas, E.; Draï, J.; Thérond, P., Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique* 2008, 66, (6), 605-620.
4. Rice-Evans, C. A.; Gopinathan, V., Oxygen toxicity, free radicals and antioxydants in human disease : biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays Biochemistry* 1995, 29, 39-63.
5. Cillard, J.; Cillard, P., Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* 2006, 13, (1), 24-29.
6. Baudin, B., Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio* 2006, 2, (1), 43-52.
7. Sohal, R. S., Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine* 2002, 33, (1), 37-44.
8. Evans, M. D.; Cooke, M. S., Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 2004, 26, (5), 533-542.
9. Spiteller, G., Linoleic acid peroxidation - The dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein - And its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lipids* 1998, 95, 105-162.
10. Igene, J. O.; King, J. A.; Pearson, A. M.; Gray, J. I., Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1979, 27, (4), 838-842.
11. Garcia, M. N.; Martinez-Torres, C.; Leets, I.; Tropper, E.; Ramirez, J.; Layrisse, M., Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: Iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1996, 7, (1), 49-54.
12. Baron, C. P.; Andersen, H. J., Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, (14), 3887-3897.
13. Jomova, K., Advances in metal-induced oxidative stress and human stress in human disease. *Toxicology* 2011.
14. Faustman, C.; Sun, Q.; Mancini, R.; Suman, S. P., Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* 2010, 86, (1), 86-94.
15. Kanner, J.; Lapidot, T., The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 2001, 31, (11), 1388-1395.
16. Halliwell, B.; Zhao, K. C.; Whiteman, M., The gastro-intestinal tract: A major site of anti-oxidant action ? . *Free Radical Research* 2000, 33, 819-830.
17. Vulcain, E.; Goupy, P.; Caris-Veyrat, C.; Dangles, O., Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radical Research* 2005, 39, (5), 547-563.
18. Khaneja, R.; Perez-Fons, L.; Fakhry, S.; Baccigalupi, L.; Steiger, S.; To, E.; Sandmann, G.; Dong, T. C.; Ricca, E.; Fraser, P. D.; Cutting, S. M., Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 2010, 108, (6), 1889-1902.
19. Hong, H. A.; Huang, J. M.; Khaneja, R.; Hiep, L. V.; Urdaci, M. C.; Cutting, S. M., The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 105, (2), 510-520.

20. Perez-Fons, L.; Steiger, S.; Khaneja, R.; Bramley, P. M.; Cutting, S. M.; Sandmann, G.; Fraser, P. D., Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2010, 1811, (3), 177-185.
21. Mortensen, A., Supplements. In *Carotenoids, Volume 5: nutrition and health*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.; Synnove, Eds. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 2009; pp 67-82.
22. Tyssandier, V.; Reboul, E.; Dumas, J. F.; Bougteloup-Demange, C.; Armand, M.; Marcand, J.; Sallas, M.; Borel, P., Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2003, 284, (6), G913-G923.
23. Armand, M.; Borel, P.; Pasquier, B.; Dubois, C.; Senft, M.; Andre, M.; Peyrot, J.; Salducci, J.; Lairon, D., Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 1996, 271, (1), G172-G183.
24. Lorrain, B.; Dangles, O.; Genot, C.; Dufour, C., Chemical Modeling of Heme-Induced Lipid Oxidation in Gastric Conditions and Inhibition by Dietary Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58, (1), 676-683.
25. Duc, L. H.; Fraser, P. D.; Tam, N. K. M.; Cutting, S. M., Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *Fems Microbiology Letters* 2006, 255, (2), 215-224.
26. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., *Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy*. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 1994; Vol. 1B.
27. Marshall, J. R.; Wilmoth, G. J., Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *Journal of Bacteriology* 1981, 147, (3), 900-913.
28. Mancuso, J. R.; McClements, D. J.; Decker, E. A., Ability of iron to promote surfactant peroxide decomposition and oxidize alpha-tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (10), 4146-4149.
29. Mikkelsen, A., Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobin: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1995, 200, 171-177.
30. El Hajji, H.; Nkhili, E.; Tomao, V.; Dangles, O., Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research* 2006, 40, (3), 303-320.
31. Södergren, E.; Nourooz-Zadeh, J.; Berglund, L.; Vessby, B., Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1998, 37, (3), 137-146.
32. Goupy, P.; Vulcain, E.; Carls-Veyrat, C.; Dangles, O., Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. *Free Radical Biology and Medicine* 2007, 43, (6), 933-946.
33. Welch, K. D.; Davis, T. Z.; Aust, S. D., Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffer, ligands and chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002, 397, 360-369.
34. Goupy, P.; Reynaud, E.; Dangles, O.; Caris-Veyrat, C., Antioxydant activity of (all-E)-lycopene and synthetic apo-lycopenoids in a chemical model of oxidative stress in the gastro intestinal tract. *New Journal of Chemistry* 2011, in press.
35. Lorrain, B.; Dufour, C.; Dangles, O., Influence of serum albumin and the flavonol quercetin on the peroxidase activity of metmyoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* 2010, 48, (9), 1162-1172.
36. Mortensen, A.; Skibsted, L. H., Importance of Carotenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, (8), 2970-2977.
37. Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A., Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 1996, 384, 240-242.

### 3. PUBLICATION IV - INTERACTIONS BETWEEN CAROTENOIDS OF A NOVEL BACTERIAL EXTRACT AND THEIR IMPACT ON STABILITY, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND SYNERGISM WITH PHENOLIC ANTIOXIDANTS

*Résultats préliminaires*

CHARLOTTE SY<sup>1,2</sup>, PATRICK BOREL<sup>3-5</sup>, CATHERINE CARIS-VEYRAT<sup>1,2</sup>, & OLIVIER DANGLES<sup>2,1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR408, Safety and Quality of Plant Products, Site Agroparc, 84000, Avignon, France

<sup>2</sup> University of Avignon, UMR408, UMR408, 84000, Avignon, France

<sup>3</sup> INRA, UMR1260 "Lipid Nutrients and Prevention of Metabolic Diseases", F-13385 Marseille, France

<sup>4</sup> INSERM, ERL U1025 "Bioavailability of Micronutrients", F-13385 Marseille, France

<sup>5</sup> Aix-Marseille Univ, faculté de Médecine, F-13385, France

\* Corresponding author. E-mail address: olivier.dangles@univ-avignon.fr

#### ABSTRACT

---

Recently isolated spore-forming pigmented marine bacteria, *Bacillus indicus* are sources of oxygenated carotenoids with original structures (about fifteen distinct yellow and orange pigments with glycosylester groups). In this study, we evaluated the stability (sensitivity to iron-induced autoxidation) and antioxidant activity (inhibition of iron-induced lipid peroxidation) of combinations of bacterial HU36 carotenoids with the bacterial vitamin menaquinone and with other phenolic antioxidants (vitamin E, polyphenols). An important synergistic effect between HU36 carotenoids and less efficient antioxidants such as rutin and chlorogenic acid was demonstrated in micelles. For comparison,  $\beta$ -carotene and lycopene were also tested in combinations. Combining antioxidants acting *via* complementary mechanisms could be the key for optimising the activity of the bacterial carotenoid cocktail.

---

**KEYWORDS:** *carotenoids, marine bacteria, menaquinone,  $\alpha$ -tocopherol, polyphenols, metmyoglobin, iron, oxidation, antioxidant activity.*

## INTRODUCTION

Consumption of carotenoids may reduce the risks of developing chronic diseases associated with oxidative stress. Part of this protection could take place prior to intestinal absorption [1-3], first because carotenoids accumulate in much larger concentrations in the gastro-intestinal (GI) tract than in plasma and reserve tissues, and second because the GI tract may undergo substantial oxidative stress in postprandial conditions [4-6]. Dietary iron for instance is highly present in food (especially in red meat), both in the heme and free forms [7, 8] and is a potent initiator of lipid peroxidation [9, 10], especially in acidic conditions. In the gastric conditions, dietary lipid peroxidation may actually be fast due to high dioxygen concentrations, mild temperature (37°C), a pH varying between 6 (postprandial) and 2 (empty stomach) and constant mixing [2].

In solutions and organized lipid assemblies like micelles, liposomes, emulsions and lipoproteins, carotenoids and other dietary antioxidant molecules can interact. Previous studies have highlighted the possibility of regeneration of some antioxidants by others [11, 12]. For instance, antioxidant synergism has been demonstrated by using combinations of  $\alpha$ -tocopherol, vitamin C and  $\beta$ -carotene or lutein [13-20]. The mechanisms which are proposed involve transfers of electrons or hydrogen atoms between antioxidants partitioned between the aqueous and lipid phases, *via* antioxidants located at the interface. Fewer studies were conducted with combinations of carotenoids. For instance, in membranes, lycopene or  $\beta$ -carotene significantly prolongs the antioxidant activity of the xanthophyll zeaxanthin by reducing its radical [21].

In this work, we investigated possible mechanisms underlying the high stability and antioxidant activity of novel carotenoids extracted from a marine bacterial strain (figure 1). *Bacillus indicus* HU36 strain was initially selected for its high production of carotenoids, the resistance of its spores to UV radiations [22] and its probiotic properties [23]. It was isolated in human faeces and synthesises orange-yellow pigments in variable proportions depending on whether they are in the vegetative cell or spore forms [22]. The most abundant pigments in the extract were determined as 1-(6-C<sub>n:0</sub>)-glycosyl-apo-8'-lycopene esters and methyl-1-(6-C<sub>n:0</sub>)-glycosyl-apo-8'-lycopenoate. Other isoprenoids were also evidenced [24]. In particular, menaquinone MQ-7, a form of vitamin K<sub>2</sub> was extracted with the carotenoids in the crude extracts. Menaquinones are constituents of bacterial cytoplasmic membranes and play important roles in electron transport, oxidative phosphorylation, active transport, and endospore formation [25]. MQ-7 being potentially redox active, its influence on the stability and antioxidant activity of the bacterial

carotenoids was tested. The common dietary carotenoids  $\beta$ -carotene and lycopene were also investigated for comparison.

Studies were made in micelle models [26] so as to mimic the environment of dietary carotenoids in the GI tract [27, 28]. Peroxidation was initiated either by free ferrous iron or by metmyoglobin and followed at pH 5.8 and 4, respectively corresponding to the early phase and mid-phase of digestion. Degradation of carotenoids and formation of lipid oxidation products were followed by UV-visible spectroscopy.

In a first step, the effect of the bacterial vitamin menaquinone (figure 1) on stability and antioxidant properties of HU36 carotenoids were evaluated and a comparative experiment was conducted with  $\beta$ -carotene. Then, combinations of carotenoids with similar structures ( $\beta$ -carotene and lycopene, figure 1) were evaluated in order to try and understand possible interactions in the cocktail of bacterial carotenoids. Finally, purified HU36 carotenoids were combined with other antioxidants (figure 1) in order to suggest formulations that could optimise and enhance their stability and antioxidant properties.

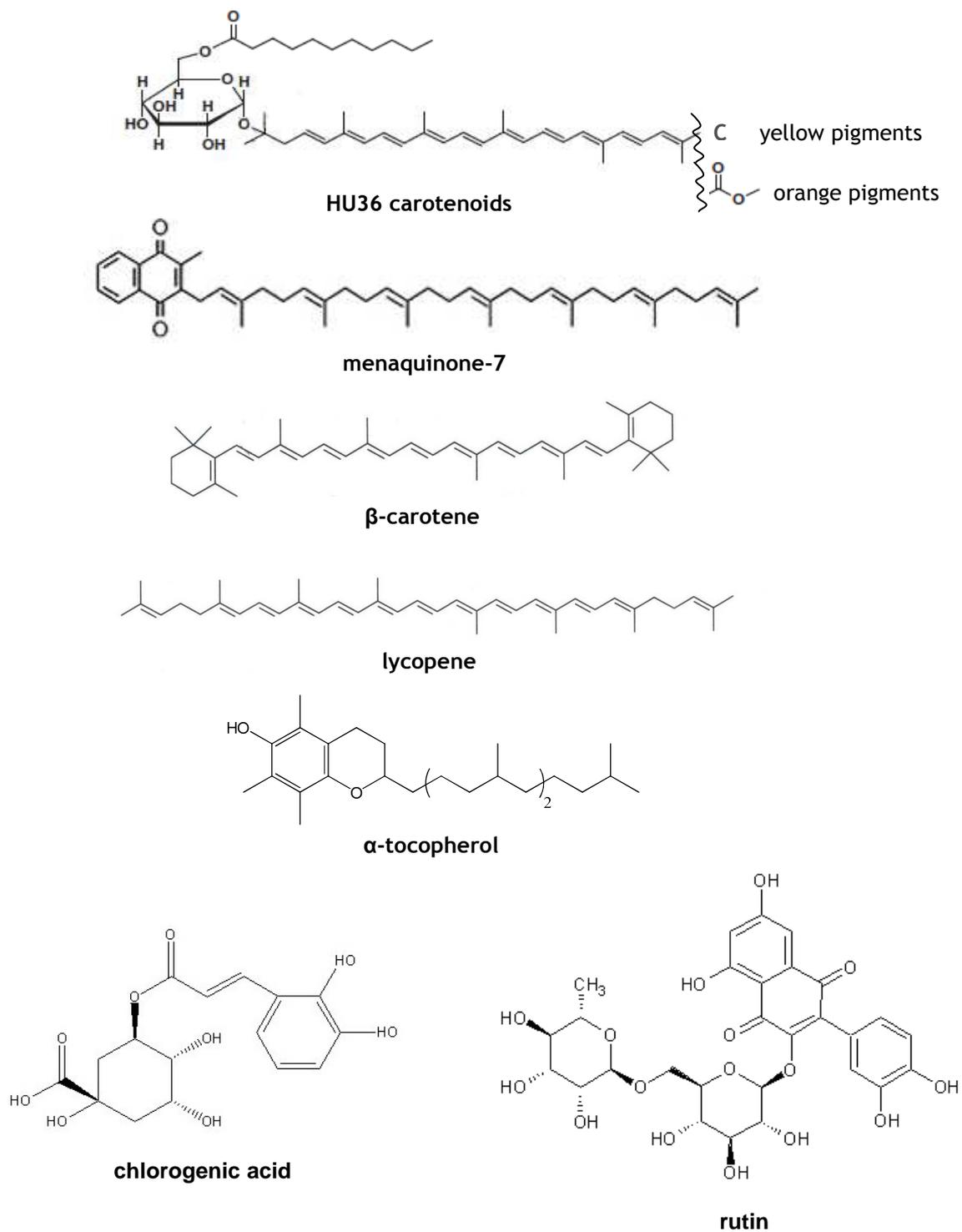


Figure 1. Structures of the molecules used in this study.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Natural (all-*E*)-lycopene from tomato oleoresin (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, M = 536 g.mol<sup>-1</sup>, > 90%) was obtained from Conesa. Novel carotenoid extracts from *Bacillus* strains (HU36 and GB1) were displayed by members of the COLORSPORE project's consortium (Small Collaborative Project No. 207948, funded by FP7 and coordinated by the Royal Holloway University of London) [29]. Synthetic type II (all-*E*)-β-carotene (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, M = 536 g.mol<sup>-1</sup>, > 95%), polyoxyethylenglycol 23 lauryl ether (Brij<sup>®</sup>35), (9-*Z*,12-*Z*)-octadecadienoic acid (linoleic acid, > 99%), FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (> 99.5%) and myoglobin from equine heart (> 90%, essentially salt-free) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). The buffers used in the experiments are a 0.2 mol/L acetate buffer (pH 4.0) and a 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 5.8). Water was purified through a Millipore Q-Plus.

Methanol (MeOH) was from Merck (Darmstadt, Germany) and of LC-MS grade. All other solvents were from Fisher-Scientific (Loughborough, UK). Methylene chloride (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and acetonitrile were of UPLC grade and ethyl acetate (EtOAc) was of analytical grade.

### Purification of novel bacterial carotenoid extracts

**Fractionation of the molecules of crude bacterial extracts by liquid chromatography.** The crude bacterial extracts from HU36 were dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1/1, v/v), filtered through glass cotton to eliminated residues of the culture medium and dried by evaporation under reduced pressure. For purification, about 250 mg dry crude extract was redissolved in the smallest volume of methanol and laid at the top of a burette with sintered glass filter, filled with a 30 cm length, 2 cm diameter C18 silica gel column 47 x 60 μm A.P.S. (DAVISIL<sup>®</sup> Chromatographic Silica Media for separation and purification applications, grade 633N, GRACE VYDAC, Maryland, US). The C18 silica gel was previously moistened with methanol, CH<sub>3</sub>COOH 1% and the column was rinsed with MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). The elution of the content of the bacterial extract was performed with a two-solvent gradient and the flow rate was maintained regular with a flow of Argon. Solvent A was MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) and solvent B was EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20, v/v). The gradient was: 250 mL A 100%, 75 mL A 90% B 10%, 75 mL A 85% B 15%, 75 mL A 80% B 20%, 100 mL A 75% B 25%, 250 mL A 65% B 35%, 75 mL A 50% B 50%, 50 mL de A 40% B 60%, 75 mL A 20% B 80%, 50 mL B 100%. The elution fractions were progressively collected in 25 mL glass tubes. MQ-7 was expected to be eluted last, after the bacterial carotenoids, in a colourless fraction. A sample of each fraction was filtered through a 20 μm PTF filter and analyzed by UPLC-MS

to control the absence of menaquinone in coloured fractions. After each new purification, the C18 silica gel was regenerated by several washings with milli-Q water and a MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mixture (1/1, v/v).

**Structural analysis of the fractions.** Reversed-phase ultra-fast liquid chromatography analyses were performed on a Waters Acquity™ Ultra Performance LC® system equipped with a diode array detector and coupled with a Brüker-daltonics 3-D high capacity ion trap mass spectrophotometer (esquire HCT™ ultra MS®). A Waters Acquity™ reversed-phase C18 column type HSS T3 (2.1 x 150 mm, 1.8 µm particule size) was used. For the separation, gradient elution was done at 25°C, using a mobile phase of two solvents at a flow rate of 0.5 mL/min. Eluent A contained 5 µmol/L HCOOH and 10 mmol/L HCOONH<sub>4</sub> in a mixture of acetonitrile:MeOH:H<sub>2</sub>O (60:20:20, v/v). Eluent B contained 5 µmol/L HCOOH in EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20, v/v). The elution started with 100% eluent A for 2 min. Then the gradient was: an increase from 0 to 55% B over 14.5 min, holding 45% A and 55% B for 0.5 min, 55 to 60% B in 7 min (to remove all polar compounds), 60 to 70% B in 3 min, holding 30% A and 70% B for 1 min, back from 70 to 0% B in 0.01min, and finally holding 100% A and 0% B again for 2 min (to rinse the system and put it back to the initial conditions before the following injection). Absorbance was measured by UV detection every 2 nm from 250 to 800 nm, with a time interval of 0.1 min. The effluent of the column went towards the ion source of the MS. The ionisation mode was alternating APCI (chemical ionisation under atmospheric pressure), the corona intensity was 1,000 nA, the cone pressure was 40 psi and the flow rate of dry gaz was 4 L/min at a temperature of 300°C. Spectra were acquired every 40ms with a mass range of 50 to 1,000 m/z. For the detection, target masses were 350 for t = 0-7 min, 600 for t = 7-11.5 min and 750 for t = 11.5-26 min. The Bruker software of the MS provides masses of the ions. In each fraction, m/z = 649.3 corresponding to menaquinone was searched. Then, the pure fractions were collected, gathered and evaporated under reduced pressure. Finally a pure bacterial carotenoid stock solution was obtained by redissolving the dry residue in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, v/v).

**Evaluation of the average molar absorption coefficients of the bacterial carotenoids.** An average extinction coefficient was calculated for the cocktail of bacterial carotenoids from HU36, since it was always studied as a global mixture and it tends to be used so in the future. These coefficients were estimated by comparison with other bacterial carotenoids previously described in the literature. This method gives only an approximate value but is relevant. Moreover, weighing the carotenoids was not possible

since silica residues were present in the extracts after purification, thus modifying the actual weight. Staphyloxanthin ( $C_{51}H_{79}O_8$ ), or  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-O-(4,4'-diaponeurosporen-4-oate)-6-O-(12-methyl-tetradecanoate), was chosen as standard for HU36 carotenoids. It is an apolycopenoic molecule with a glucose moiety and a fatty acid chain at one end (figure 2).

For this reference molecule, the  $A^{1\%}$  coefficient was 1,920 at 462 nm in petroleum ether [30]. The coefficient given in  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  in the same solvent was calculated according to the formula:  $\epsilon = A^{1\%} \times (\text{molecular weight} / 10)$ . The average coefficient of the purified cocktail of HU36 carotenoids was thus calculated at 462 nm in petroleum ether using the average molecular mass previously determined from the characterisation of the carotenoid content with the partners of the project: 750 g/mol. Then, extinction coefficients at the maximum of absorbance in other solvents (in particular in  $CH_2Cl_2$ ) were deduced from spectrophotometric measurements: 165,000  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  at 454 nm.

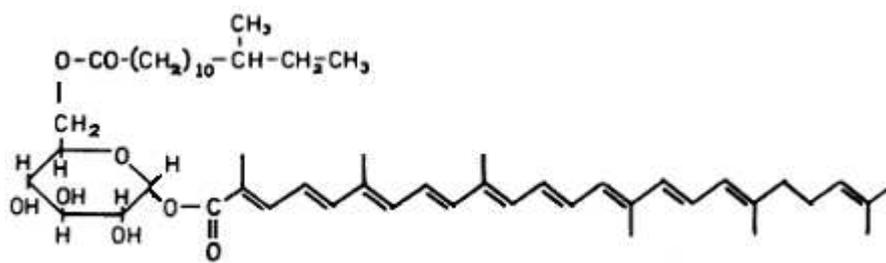


Figure 2. Structure of staphyloxanthin produced by *Staphylococcus aureus* [30]

**Quantification of bacterial carotenoid and menaquinone contents in the initial crude extract.** After analysis of the eluted fractions, the total volume of pure carotenoids was measured. Then, a sample was taken, evaporated under reduced pressure and dissolved in the same volume of methylene chloride for spectrophotometric measurement. Absorbance was recorded at  $\lambda_{MAX}$  and their concentration and total amount were calculated using the extinction coefficient determined previously. Total extracted MQ-7 was quantified by UPLC-MS analysis. The concentration of this vitamine was determined by using a standard curve established with a commercial reference of menaquinone.

## Chemical models of the gastric compartment

**Stock solutions of antioxidants.** Four stock carotenoid solutions (around 1 mmol/L) were used: crude bacterial extract from HU36, purified bacterial carotenoids from HU36, and all-trans lycopene and all-trans  $\beta$ -carotene. Bacterial extracts and purified carotenoids were prepared in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1/1, v/v) and lycopene and  $\beta$ -carotene were dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The concentrations of stock carotenoid solutions were calculated precisely by spectrophotometric measurement. The molar absorption coefficients used were  $128,500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  at 460 nm for  $\beta$ -carotene [31],  $178,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  at 482 nm for lycopene and  $165,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  at 454 nm for HU36 carotenoids in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

A 232  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha$ -tocopherol solution, a 1 mmol/L chlorogenic acid solution, and a 350  $\mu\text{mol/L}$  rutin solution were also prepared by dissolving 1.00 mg, 3.54 mg and 2.74 mg in 10 mL MeOH respectively.

**Micellar system.** Both stability and antioxidant activity tests were performed by using this model adapted from previously published studies [26]. Experiments were made at 37°C, pH 4 and pH 5.8 in the aqueous reaction medium. An acetate buffer solution 0.2 mol/L was used for reactions at pH 4 and a phosphate buffer solution 0.2 mol/L was used for reactions at pH 5.8. The non-ionic surfactant, Brij<sup>®</sup>35 (polyoxyethylenglycol dodecyl ether) was used for the preparation of carotenoid-containing micelles. Brij<sup>®</sup>35 was chosen for its good stability and very low content in hydroperoxides which could react with iron [32]. Brij<sup>®</sup>35 was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to obtain a 40 mmol/L stock solution. Linoleic acid was used as substrate of peroxidation only for antioxidant activity tests (the model did not contain lipids for stability tests). A 28 mmol/L stock solution was prepared by dissolving 39.25 mg commercial linoleic acid in 5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Aliquots of stock carotenoid solutions and/or other antioxidant solutions were mixed with 2 mL stock surfactant solution and 0 or 250  $\mu\text{L}$  linoleic acid stock solution. After evaporation of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under reduced pressure and solubilisation of the dried viscous residue in 20 mL aqueous buffer, initial concentrations were 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35 and 10  $\mu\text{mol/L}$  carotenoid for stability tests; and 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35, 0 or 0.7 mmol/L linoleic acid, 0 to 8  $\mu\text{mol/L}$  carotenoid and/or 0 to 100  $\mu\text{mol/L}$  of another antioxidant for antioxidant activity tests. Micelles were formed by stirring the solution on a magnetic plate until total homogenization. The micellar medium was limpid.

**Iron solutions.** Oxidation was initiated by free ferrous ions, free ferric ions or metmyoglobin (heme iron).

Stock 500 mmol/L Fe<sup>III</sup> solution was prepared by dissolving 404.0 mg ferric nitrate nonahydrate in 2 mL 0.1 mol/L nitric acid, stock 500 mmol/L Fe<sup>II</sup> solution was prepared by dissolving 279.4 mg ferrous sulphate heptahydrate in 2 mL 0.1 mol/L sulphuric acid and stock 500 µmol/L MbFe<sup>III</sup> solution was prepared by dissolving 8.9 mg myoglobin from equine heart in 1 mL milliQ water. Because of the poor solubility of myoglobin, the stock solution was filtered and its concentration was controlled by absorbance measurement at 505 nm, using  $\epsilon = 97,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [33]. Diluted iron solutions were then prepared by dilution of the previous stock solutions. For stability tests, seven Fe<sup>II</sup> solutions (0.5 to 25 mmol/L) were obtained in sulfuric acid, seven Fe<sup>III</sup> solutions (0.05 to 25 mmol/L) were obtained in nitric acid, and seven MbFe<sup>III</sup> solutions (0.5 to 500 µmol/L) were obtained in milliQ water. For antioxidant activity tests, only solutions of 1 mmol/L Fe<sup>II</sup> and 25 µmol/L MbFe<sup>III</sup> were prepared.

### Stability study and lipid peroxidation inhibition

**UV-Visible Spectroscopy.** All spectra were recorded on a Specord S-600 diode-array UV-Vis spectrophotometer (optical pathlength is 1 cm), equipped with an 8-cell rail, a magnetic stirring device and a thermostatic bath (Analytic Jena).

**Kinetics of carotenoid oxidation in micelles.** Stability measurements were performed at pH4 and 37°C. 1.96 mL of the micellar system containing 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35 and 10 µmol/L carotenoids alone or in combination (+ control experiment without antioxidants) were transferred into macro quartz spectrophotometer cells. At t<sub>0</sub>, oxidation was initiated by addition of 40 µL diluted iron to the reaction medium. Oxidation was initiated by concentrations of iron in the range 1-50 µmol/L Fe<sup>II</sup>, or 1-50 µmol/L Fe<sup>III</sup> or 0.01-0.5 µmol/L MbFe<sup>III</sup>. The concentrations of residual carotenoids and coloured products were measured directly by UV-vis spectroscopy in the micellar medium (base-line recorded on acetate buffer).

Spectra were recorded at regular intervals for 4 hours, from 300 to 1,000 nm and kinetic curves were plotted at the  $\lambda_{\text{MAX}}$  value in the visible range for each carotenoid sample. Results were expressed in % of the initial carotenoid content:

$$\% \text{ residual carotenoids} = [ \text{Abs}(\lambda_{\text{MAX}}) t / \text{Abs}(\lambda_{\text{MAX}}) t_0 ] \times 100.$$

**Antioxidant activity in the micellar solution.** 1.96 mL of the micellar system containing 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35, 0.7 mmol/L linoleic acid and increasing concentrations of carotenoids and/or  $\alpha$ -tocopherol, rutin or chlorogenic acid (+ control experiment without antioxidants) were transferred into macro quartz spectrophotometer cells. At  $t_0$ , oxidation was initiated by addition of 40  $\mu$ L diluted iron to the reaction medium. Inhibition of linoleic acid oxidation by the carotenoids was evaluated at pH 4 with two different initiators:  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (20  $\mu$ mol/L) and  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  (0.5  $\mu$ mol/L). At pH 5.8, linoleic acid peroxidation was initiated by  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  only. Iron concentrations were chosen so as to ensure gradual accumulation of lipid hydroperoxides.

Lipid peroxidation was followed by measuring the concentration of conjugated dienes (CD: mainly hydroperoxides + minor amounts of alcohols) for about 90 minutes. Their absorbance was directly recorded by UV/vis spectroscopy at 234 nm [12, 26] (baseline recorded on acetate buffer or phosphate buffer). The residual carotenoid concentration was simultaneously measured at the  $\lambda_{\text{MAX}}$  value in the visible range.

Kinetic curves for the accumulation of conjugated dienes in the micellar model were plotted without antioxidant (control) and with increasing antioxidant concentrations. Inhibition of linoleic acid peroxidation by carotenoids was measured as the delay in hydroperoxide accumulation: the  $RT = T/T_{\text{control}}$  ratio was calculated for all antioxidant molecule, with  $T_{\text{control}}$  = time required to produce a fixed CD concentration in the control experiment, e.g the one corresponding to a 0.5 increase in the absorbance at 234 nm from its value at time zero (addition of iron); and  $T$  = time required to produce the same CD concentration in the presence of carotenoids. The  $RT = f(C)$  curve ( $C$  = initial antioxidant concentration) were plotted for each antioxidant in the three models:  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 4 and 5.8 and  $\text{Fe}^{\text{II}}$  at pH 4.

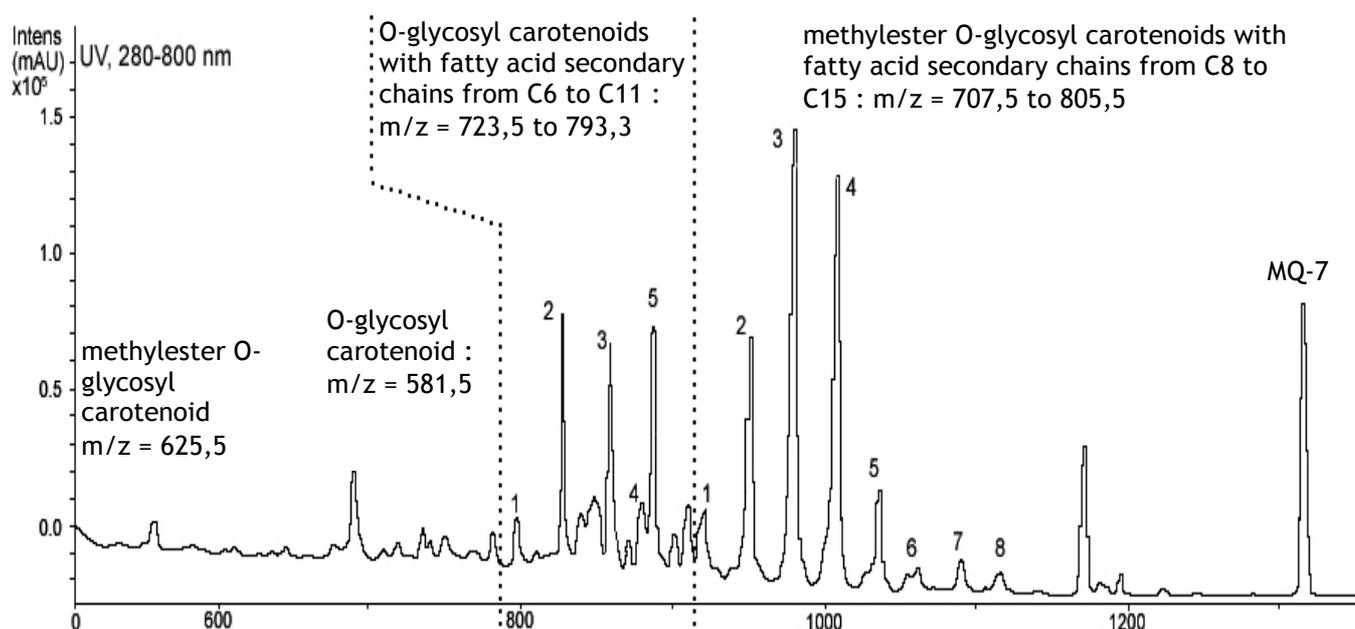
**Reduction of Ferrylmyoglobin by the Carotenoids.** The experimental procedure was adapted from previous studies [26]. Ferrylmyoglobin ( $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) was first formed in a spectrophotometer cell (2 mL) by adding small volumes (60  $\mu$ L) of a concentrated aqueous solution of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mmol/L, final concentration in the cell = 60  $\mu$ mol/L) to a 60  $\mu$ mol/L  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  solution in a pH 7 phosphate buffer containing 4 mmol/L Brij<sup>®</sup>35. Spectral changes featuring the conversion of  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  (specific peak at 505 nm) into  $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$  (specific peak at 590 nm) were recorded in the visible range until stability (2-3 min). Then, small volumes (about 50  $\mu$ L) of a concentrated solution of carotenoid in MeOH/THF (1/1, v/v) were added (final concentrations of the carotenoids in the cell = 0 or 25 or 100  $\mu$ mol/L) and the reduction of  $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$  back to  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  was monitored at 590 nm.

**Statistic analyses.** Each treatment was run in triplicate. The experimental results were expressed as means  $\pm$  SD. Differences between means were assessed using ANOVA followed by the post-hoc Tukey-Kramer's test for parametric data.

## RESULTS

### Composition of the HU36 carotenoid extract.

UPLC-MS analyses of the crude bacterial extract containing HU36 carotenoids confirmed the literature [24]. Two main groups of pigments were identified: orange glycosyl carotenoids with maximal visible absorptions at 445, 468, 496 nm and yellow glycosyl carotenoids with maximal visible absorptions at 429, 454, 484 nm. The shortest forms (without fatty acids as secondary chains) were eluted first, then their corresponding esters, acylated by fatty acids (5 carotenoids with saturated acyl chains from C7 to C10 for orange carotenoids and 8 carotenoids with saturated acyl chains from C8 to C15 for yellow carotenoids). The analyses also revealed more hydrophobic isoprenoids and the last pic corresponded to MQ-7 ( $m/z = 649.3$ ), a menaquinone with a chain involving 7 isoprenyl subunits (figure 3).



**Figure 3.** Chromatograms obtained by UPLC analyses and UV/vis detection between 280 and 800 nm on crude bacterial extracts from HU36, containing carotenoids and MQ-7 before purification.

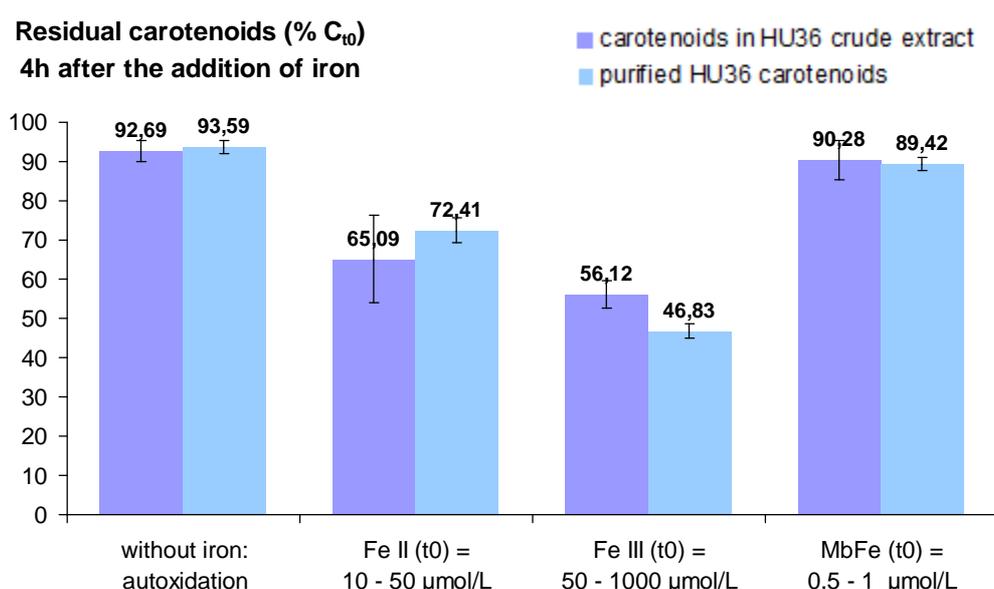
After purification of about 250 mg of crude extract, 3.5  $\mu$ mol of pure HU36 carotenoids (mixture of yellow and orange pigments) and 20  $\mu$ mol of MQ-7 were obtained.

### Influence of MQ-7 on the stability and antioxidant properties of carotenoids.

**Stability and antioxidant activity of MQ-7.** The inhibition of MQ7 of linoleic acid peroxidation was investigated in the micellar solution. MQ-7 was globally more efficient against lipid peroxidation at pH 5.8 than at pH 4, but had a much lower antioxidant activity than carotenoids, with very high  $IC_{50}$  values:  $30.46 \pm 1.01 \mu\text{mol/L}$  with  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 5.8,  $59.36 \pm 8.54 \mu\text{mol/L}$  with  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 4, and  $47.36 \pm 5.34 \mu\text{mol/L}$  with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  at pH 4. From the shape of kinetic curves (data not shown), MQ-7 slightly prolonged the induction period and slows down propagation. Contrarily to carotenoids, MQ-7 was not degraded in the presence of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  or  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  (data not shown).

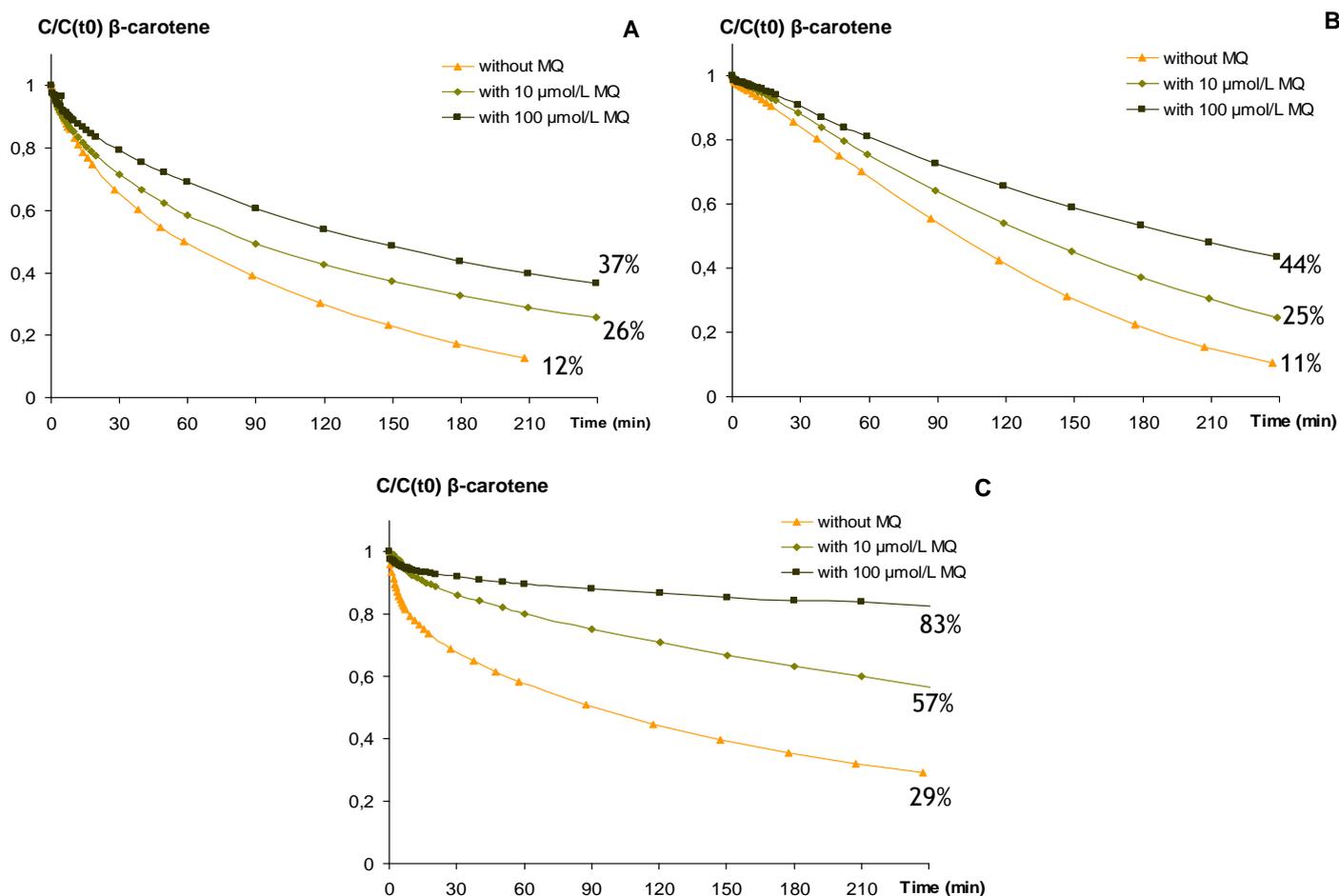
**Stability of HU36 bacterial carotenoids towards iron.** The stability of the crude HU36 extract was compared with the one of the purified extract (without MQ-7).

At pH 4 in the absence of iron, carotenoid concentrations remained almost constant in both samples. The slight degradation observed was attributed to "spontaneous" autoxidation. After 4 h of reaction with iron, the most intense degradation was achieved with a carotenoids/iron ratio of *ca.* 5 for  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , 10 for  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and 0.05 for  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ . Both samples were very stable towards  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ , with only 10% consumption in 4 h. Carotenoids were more degraded after 4 h when oxidation was initiated by  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (around 50% degradation) than by  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (around 30% degradation) (figure 4). No significant difference in stability was observed between crude and purified bacterial carotenoids in the presence of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  or  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ . Purified carotenoids were found slightly less stable than the samples containing MQ-7 in the presence of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .



**Figure 4.** Comparison of the stability of 10  $\mu\text{mol/L}$  HU36 carotenoids with and without MQ-7 after 4 h of reaction at pH 4, without iron and after addition of different forms of iron as oxidation initiators.

**Stability of  $\beta$ -carotene towards iron.** The stability of  $\beta$ -carotene was compared in the presence and absence of MQ-7 in increasing concentrations. The kinetic profiles of the curves were similar, but the presence of MQ-7 significantly stabilised  $\beta$ -carotene, especially in the presence of heme iron (figure 5, A-C). The stability of  $\beta$ -carotene was increased two-fold with 1 equiv. MQ-7 and three- to four-fold with 10 equiv. MQ-7.



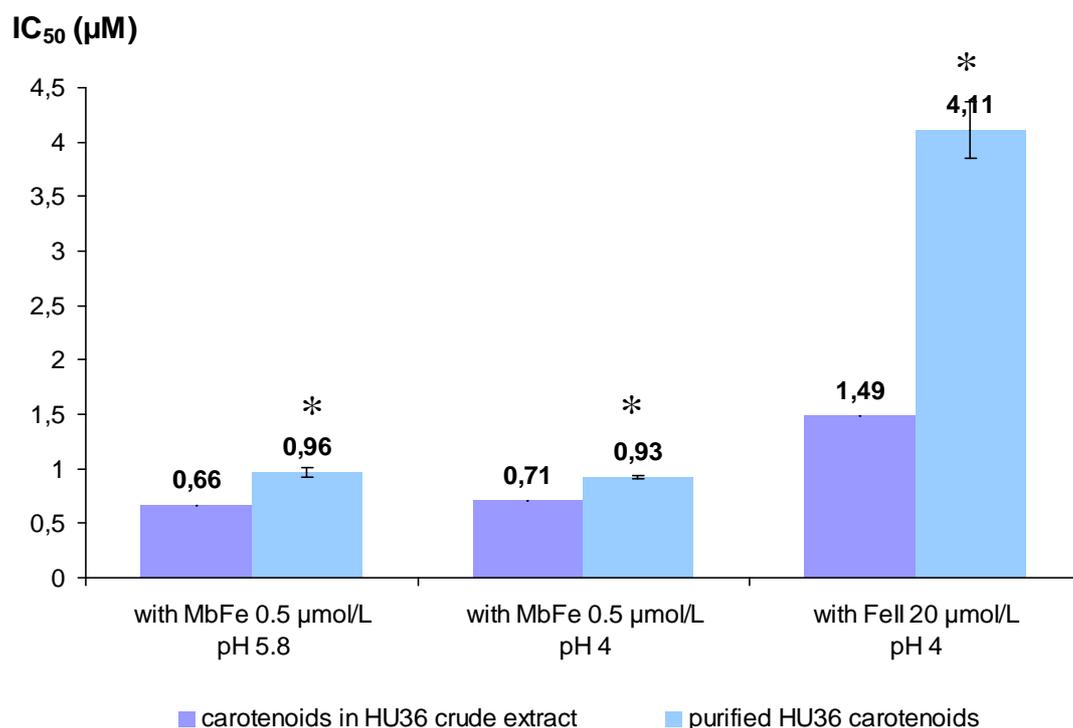
**Figure 5.** Kinetics of the degradation of  $\beta$ -carotene (initially 10  $\mu\text{mol/L}$ ) with increasing concentrations of menaquinone, over 4 hours of reaction in aqueous buffer pH 4, after addition of (A)  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , (B)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and (C)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  as oxidation initiators.

**Antioxidant activity of HU36 bacterial carotenoids in micelles.** The RT vs. C curves followed an exponential relationship ( $RT = \exp(aC)$ ) when lipid peroxidation was initiated by  $MbFe^{III}$ ; and a polynomial relationship ( $RT = 1 + aC + bC^2$ ) when lipid peroxidation was initiated by  $Fe^{II}$ . The  $IC_{50}$  parameter (expressed in  $\mu\text{mol/L}$ ), commonly used to evaluate the antioxidant capacity of molecules [12, 26]. It is the antioxidant concentration corresponding to a period T twice as large as the control period without antioxidant. The  $IC_{50}$  parameter can be estimated from the of RT vs. C curves:

$$IC_{50} = \ln(2) / a \text{ with } MbFe^{III}$$

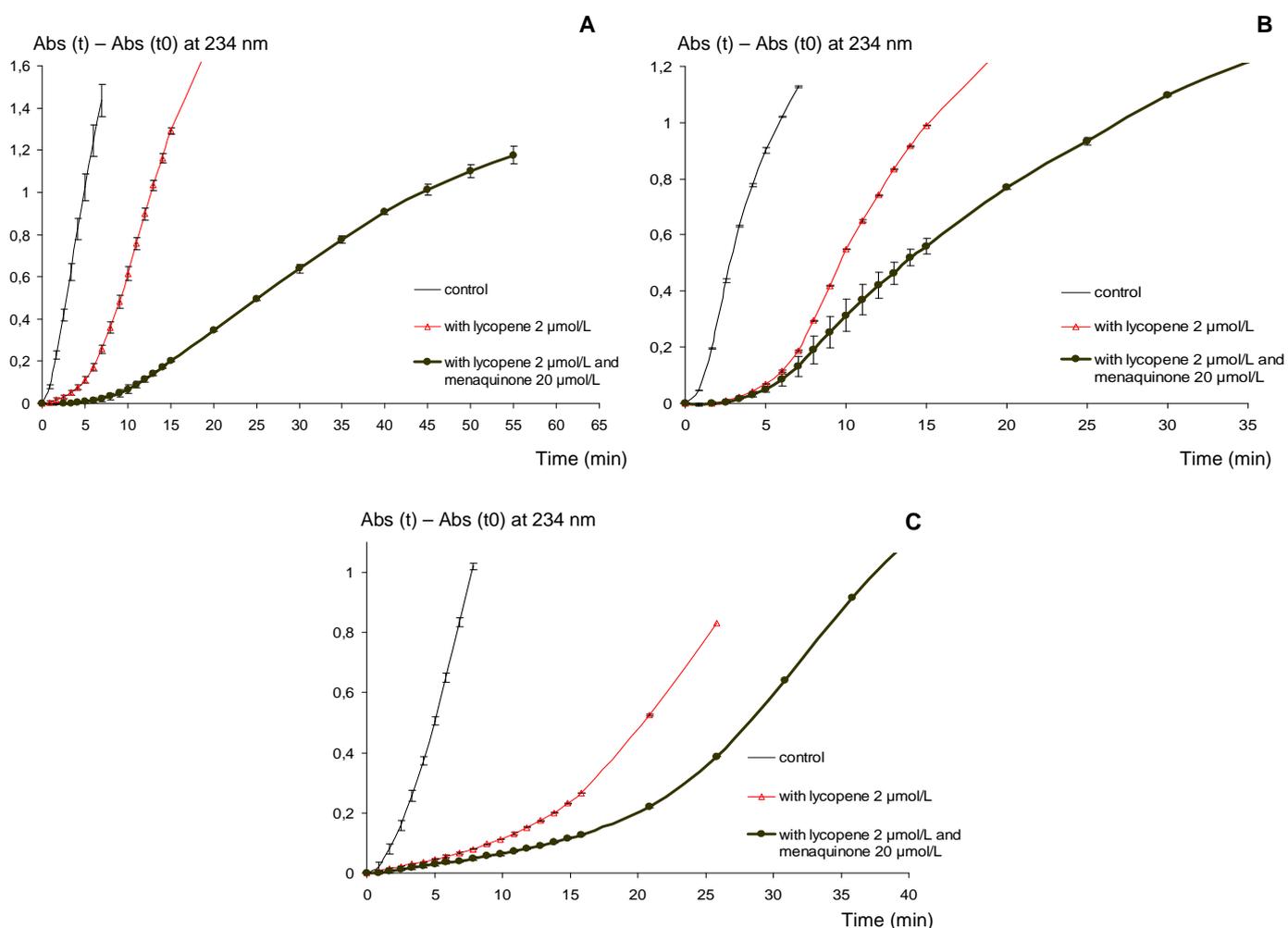
$$\text{and } IC_{50} = (\sqrt{a^2 + 4b} - a) / (2b) \text{ with } Fe^{II}.$$

The lower the  $IC_{50}$  value, the more efficient the antioxidant. In the three models of linoleic acid peroxidation, purified carotenoids were found less antioxidant activity than the sample containing MQ-7. More specifically, the antioxidant activity of the crude extract was increased by 45% in  $MbFe^{III}$ -induced peroxidation at pH5.8 and by 30% at pH 4. Remarkably, the antioxidant activity was more than twice as high in  $Fe^{II}$ -induced peroxidation at pH 4.



**Figure 6.** Comparison of the antioxidant factor  $IC_{50}$  in the models with 0.7 mmol/L linoleic acid, for the bacterial carotenoids from HU36 in the crude extract with MQ-7 and after purification.

**Antioxidant activity of lycopene in micelles.** Lycopene is a potent inhibitor of linoleic acid peroxidation with  $IC_{50}$  values of *ca.* 2  $\mu\text{mol/L}$  in  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - or  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ -induced peroxidation (data not shown). The delays of linoleic acid peroxidation induced by 2  $\mu\text{mol/L}$  lycopene and by a solution containing 2  $\mu\text{mol/L}$  lycopene and 20  $\mu\text{mol/L}$  menaquinone were compared. The molar ratio between lycopene and MQ-7 was in the same range as in the HU36 crude extract. When lycopene and MQ-7 were combined, the delay in linoleic acid peroxidation was 3 times (figure 7 A), 1.6 times (figure 7 B) and 1.3 times (figure 7 C) as high as with lycopene alone, with  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 5.8,  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 4 and  $\text{Fe}^{\text{II}}$  at pH 4, respectively. Thus, the effect of MQ-7 on lycopene activity was maximal with  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 5.8 and minimal with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  at pH 4, in sharp contrast with the HU36 carotenoids.

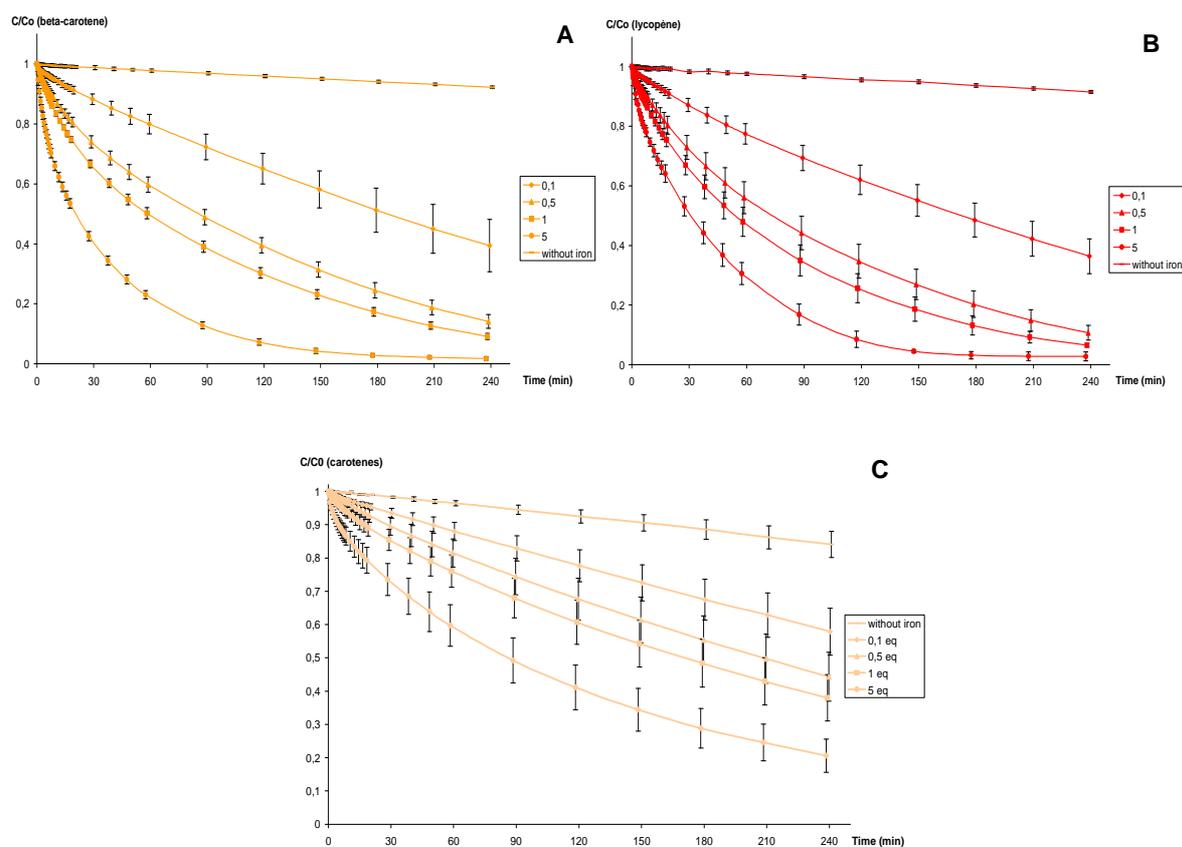


**Figure 7.** Accumulation of hydroperoxides released from the oxidation of 0.7 mmol/L linoleic acid in the presence of iron, without antioxidants (control), with lycopene alone and with a combination of lycopene and menaquinone **(A)** initiated by 0.5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 5.8, **(B)** initiated by 0.05  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 4 and **(C)** initiated by 20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{\text{II}}$  at pH 4.

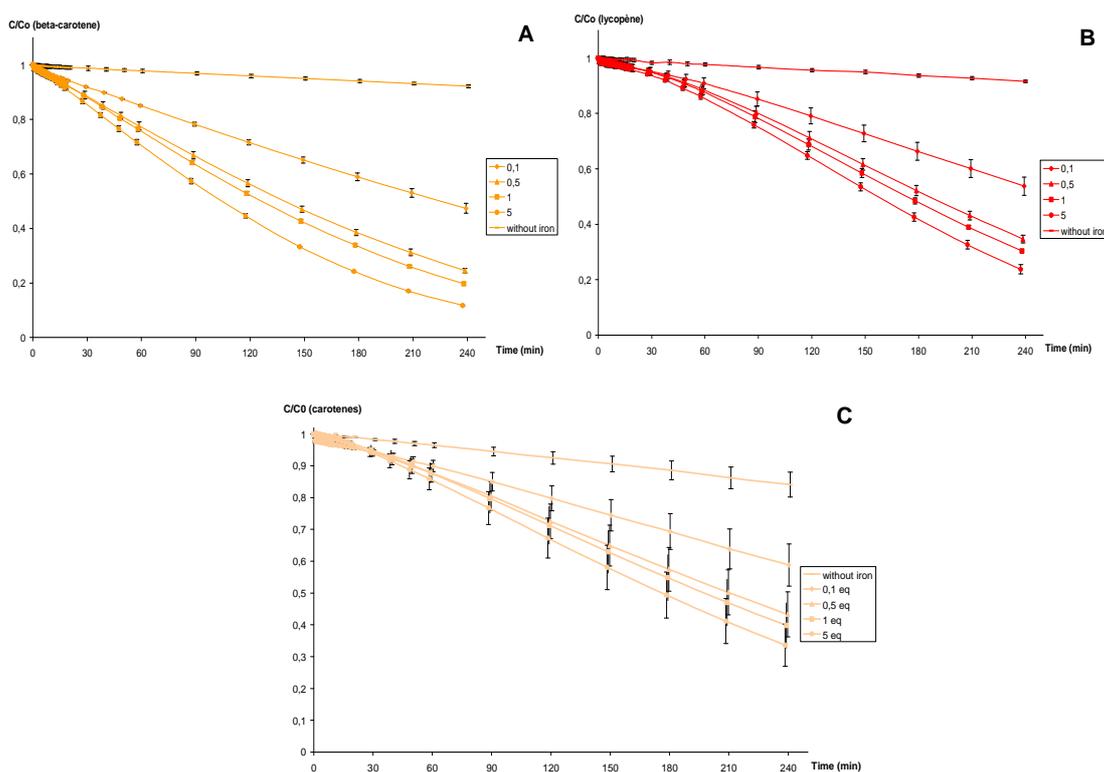
### Stability and antioxidant activity of combinations of carotenoids.

In comparison with lycopene and  $\beta$ -carotene, bacterial carotenoids were found significantly more stable in all models (*Cf.* article II) and better inhibitors of  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ -induced lipid peroxidation (*Cf.* article III). However, it was not clear whether these properties reflect the intrinsic stability and antioxidant activity of the individual carotenoids, or whether interactions between components of the mixture are important. In complementary experiments, lycopene and  $\beta$ -carotene were incorporated simultaneously in the micellar model in order to evaluate their possible interactions.

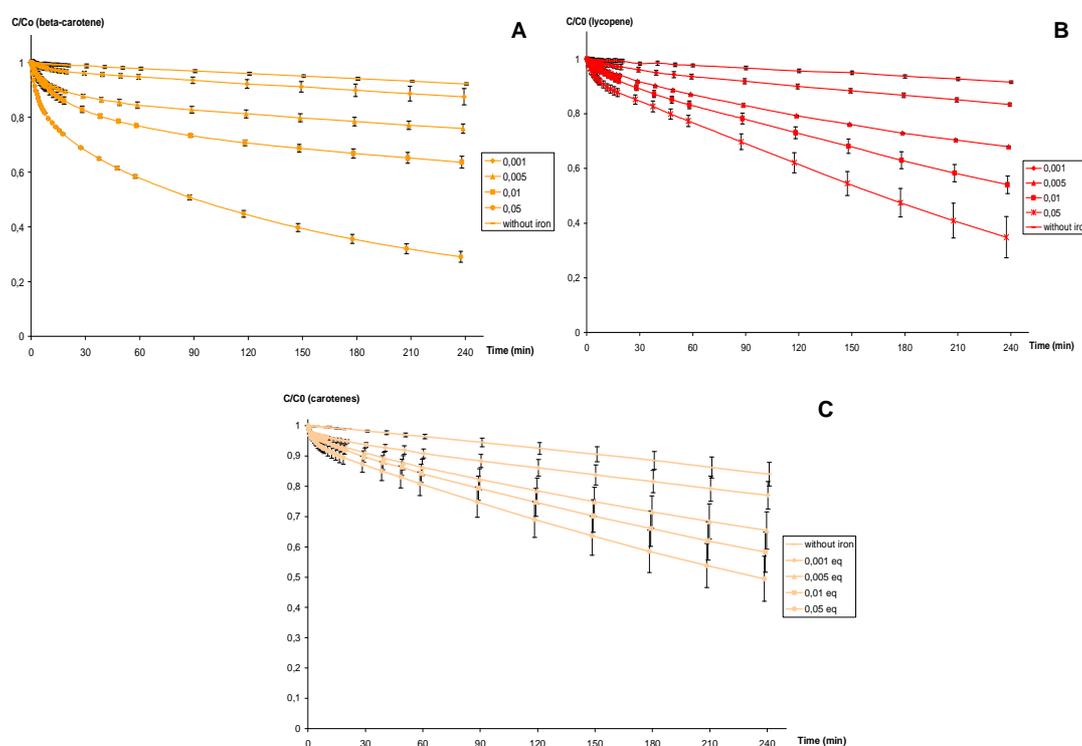
**Stability of  $\beta$ -carotene and lycopene alone and in combination.** The oxidation kinetics of  $\beta$ -carotene and lycopene alone (10  $\mu\text{mol/L}$  each) in the micellar solution at pH 4 were compared to the one of a mixture of the two carotenes in equimolar concentrations (total concentration: 10  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{MAX}} = 480 \text{ nm}$ ). Whatever the form and concentration of iron considered, the stability of  $\beta$ -carotene and lycopene towards iron increased in the mixture (figures 8, 9 & 10). Similar mutual protection may occur in the bacterial cocktail.



**Figure 8.** Ratio (compared to the initial concentration) of (A) residual  $\beta$ -carotene, (B) residual lycopene and (C) residual combination of lycopene and  $\beta$ -carotene, during the reaction with increasing concentrations of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in the micellar medium pH 4 at  $37^\circ\text{C}$ .

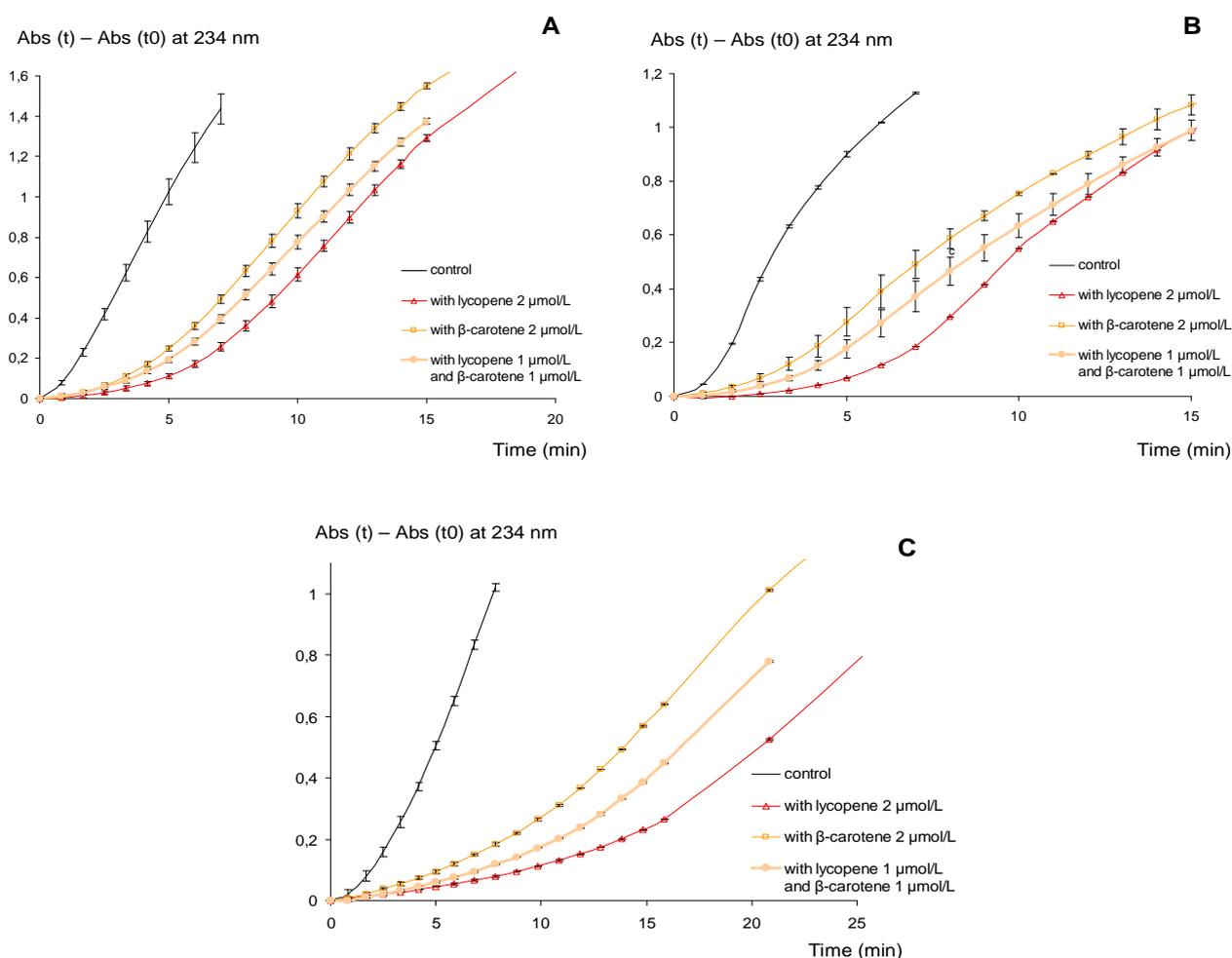


**Figure 9.** Ratio (compared to the initial concentration) of (A) residual  $\beta$ -carotene, (B) residual lycopene and (C) residual combination of lycopene and  $\beta$ -carotene during the reaction with increasing concentrations of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  in the micellar medium pH 4 at  $37^\circ\text{C}$ .



**Figure 10.** Ratio (compared to the initial concentration) of (A) residual  $\beta$ -carotene, (B) residual lycopene and (C) residual combination of lycopene and  $\beta$ -carotene during the reaction with increasing concentrations of  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  in the micellar medium pH 4 at  $37^\circ\text{C}$ .

**Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene and lycopene alone and in combination.** Linoleic acid peroxidation was inhibited by 2  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -carotene alone, 2  $\mu\text{mol/L}$  lycopene alone and by a combination of 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -carotene plus 1  $\mu\text{mol/L}$  lycopene (figure 11). Whatever the iron initiator ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$  or  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) and the pH (5.8 or 4), the induction period of linoleic acid peroxidation was longer with lycopene than with  $\beta$ -carotene, confirming that lycopene is a better antioxidant than  $\beta$ -carotene. Moreover, in all experiments, the equimolar mixture of lycopene and  $\beta$ -carotene displayed an intermediate behaviour corresponding to an average of single antioxidant activities. Consequently, the antioxidant activities of lycopene and  $\beta$ -carotene are additive and no synergism is observed. Similar additivity may occur in the bacterial cocktail.

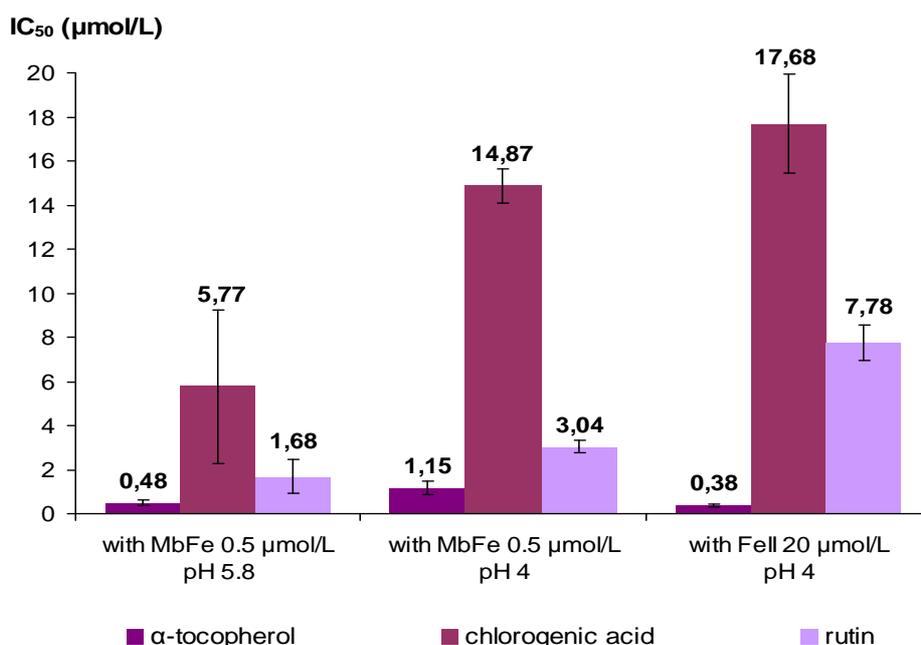


**Figure 11.** Kinetic curves representing the inhibition of linoleic acid peroxidation induced by lycopene,  $\beta$ -carotene and by a combination of the two carotenes with total concentrations of 2  $\mu\text{mol/L}$  in the micellar medium in the presence of (A)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 5.8, (B)  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  at pH 4 and (C)  $\text{Fe}^{\text{II}}$  at pH 4.

### Interactions between carotenoids and phenolic antioxidants.

Phenolic antioxidants may act in synergy with HU36 carotenoids, either by protecting them from oxidation during lipid peroxidation (thus prolonging their chain-breaking activity within the lipid phase), or by acting through a complementary antioxidant mechanism (e.g. iron chelation, reduction of hypervalent heme iron).

**Antioxidant capacities of phenolic antioxidants.** The ability of  $\alpha$ -tocopherol and of two polyphenols (rutin and chlorogenic acid) to inhibit lipid peroxidation was first studied with individual antioxidants in the micellar model. From the shape of peroxidation curves (data not shown)  $\alpha$ -tocopherol induced a longer induction period that is consistent with the well-known activity of  $\alpha$ -tocopherol to act as a chain-breaking antioxidant by reducing the propagating  $\text{LOO}^{\bullet}$  radicals [26]. By contrast, rutin and chlorogenic acid did not prolong the induction period, but peroxidation was continuously slowed down. This is typical of antioxidants acting on the initiation step [12]. Indeed, the two polyphenols are located in the aqueous phase, where they are in contact with iron. Whatever the form of iron used to induce oxidation ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$  or  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) and the pH (5.8 or 4), the RT vs. C curve would be fitted to a polynomial equation:  $RT = 1 + aC + bC^2$ . Antioxidant activities were evaluated through  $\text{IC}_{50}$  values. In all cases, the antioxidant hierarchy was:  $\alpha$ -tocopherol > rutin > chlorogenic acid (figure 12). Moreover, all three phenolic antioxidants were more efficient at pH 5.8 than at pH 4, against lipid peroxidation initiated by  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ .



**Figure 12.** Comparison of the antioxidant factor  $\text{IC}_{50}$  in the micellar models with 0.7 mmol/L linoleic acid, for  $\alpha$ -tocopherol, chlorogenic acid and rutin.

### Impact of phenolic antioxidants on the antioxidant activity of HU36 carotenoids.

The possible interactions between HU36 carotenoids and the phenolic antioxidants were first tested in the micellar solution. Each antioxidant was used at concentrations close to its IC<sub>50</sub> value: 1 µmol/L for purified HU36 carotenoids, 0.4 µmol/L for α-tocopherol, 15 µmol/L for chlorogenic acid and 5 µmol/L for rutin. In each model (MbFe<sup>III</sup> at pH 5.8, MbFe<sup>III</sup> at pH 4 and Fe<sup>II</sup> at pH 4), the accumulation of hydroperoxides (LOOH) was monitored in a control without antioxidant, with HU36 carotenoids, with the selected phenol and with a HU36 carotenoids + phenol combination. Then, a simulated curve assuming additive behaviour was constructed by summing the antioxidant activities observed with both antioxidants at fixed LOOH concentrations, *i.e.* when ΔAbs = 0.5 (figure 13):

$$RT_{theoretical} = RT_1 + RT_2$$

$$\text{with } RT_1 = T_1/T_{control} \text{ and } RT_2 = T_2/T_{control}$$

Interactions between antioxidants were finally evaluated by comparing the simulated and experimental peroxidation curves corresponding to combinations of antioxidants: additivity if the curves coincide, synergy if the experimental curve expresses longer delays ( $RT_{experimental} > RT_{theoretical}$ ), antagonism in the opposite case ( $RT_{experimental} < RT_{theoretical}$ ). Quantitative data of these interactions were calculated in percentage of synergism or antagonism observed and are reported in table 1:

$$\% \text{ synergy or antagonism} = 100 \times (RT_{experimental} - RT_{theoretical}) / RT_{theoretical}$$

In the inhibition of MbFe<sup>III</sup>-initiated peroxidation, synergistic interactions were highlighted between HU36 carotenoids and the two polyphenols but not between HU36 carotenoids and α-tocopherol (additivity). By contrast, antagonism was the rule when lipid peroxidation was induced by Fe<sup>II</sup>.

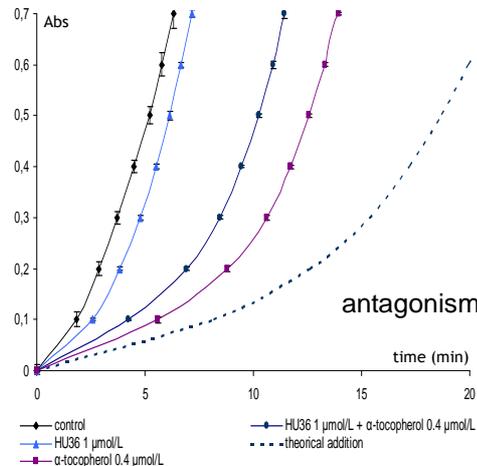
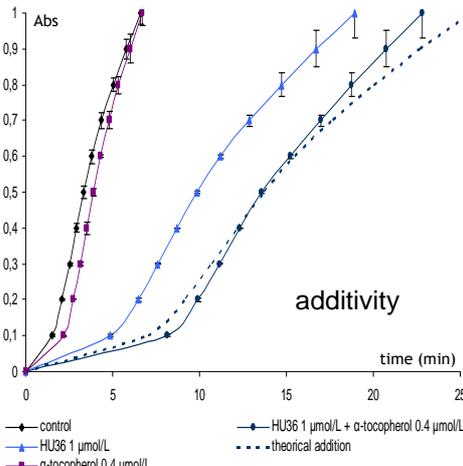
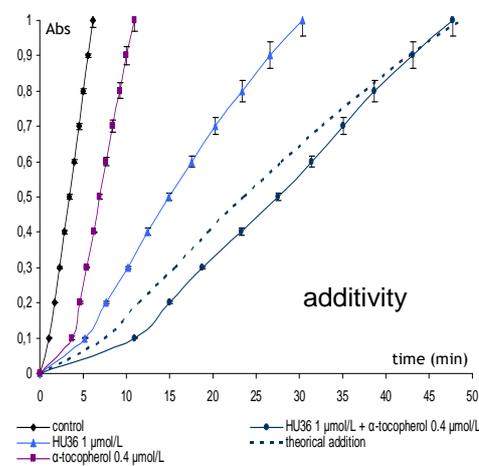
Moreover, the simultaneous monitoring of carotenoid consumption showed that α-tocopherol and the polyphenols did not significantly protect the carotenoids in the presence of iron. Thus, synergism cannot be explained by a recycling of the bacterial carotenoids by the phenolic antioxidants.

with MbFe 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ,  
pH 5.8

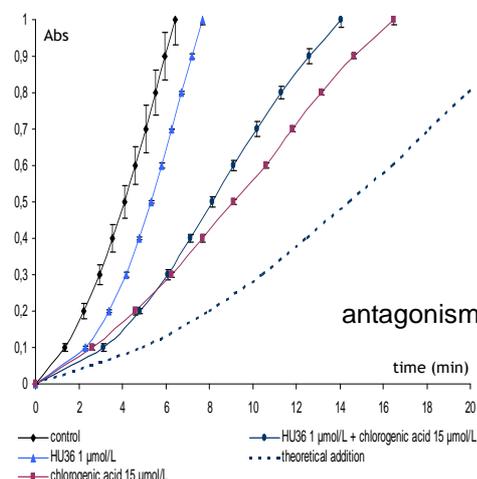
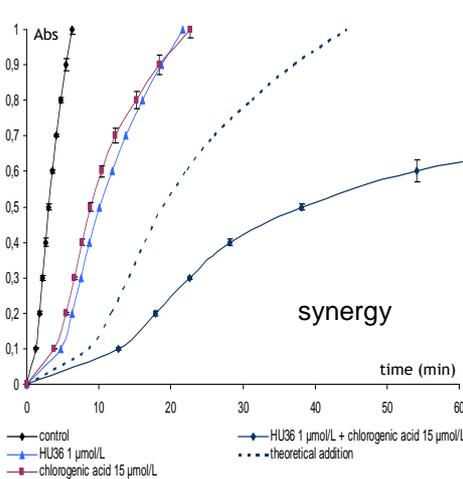
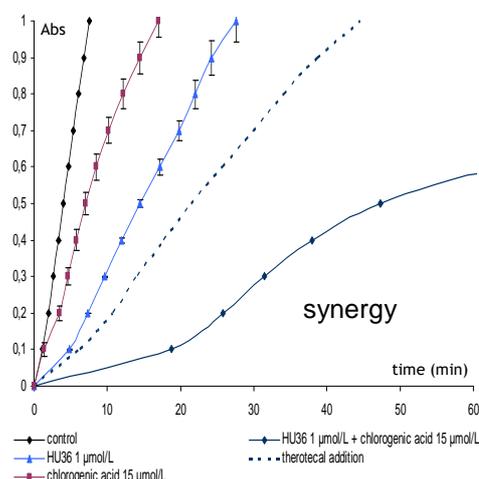
with MbFe 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ,  
pH 4

with Fe<sup>II</sup> 20  $\mu\text{mol/L}$ ,  
pH 4

HU36 carotenoids and  $\alpha$ -tocophérol



HU36 carotenoids and chlorogenic acid



HU36 carotenoids and rutin

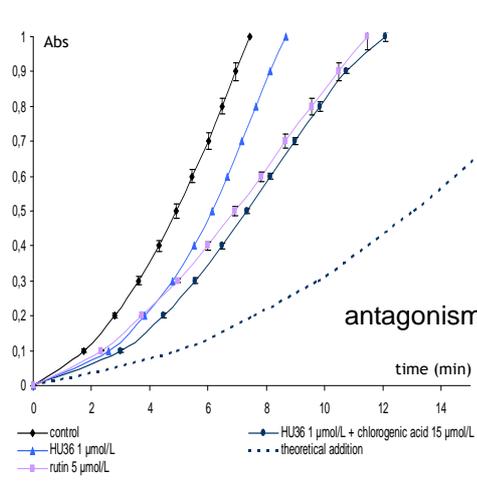
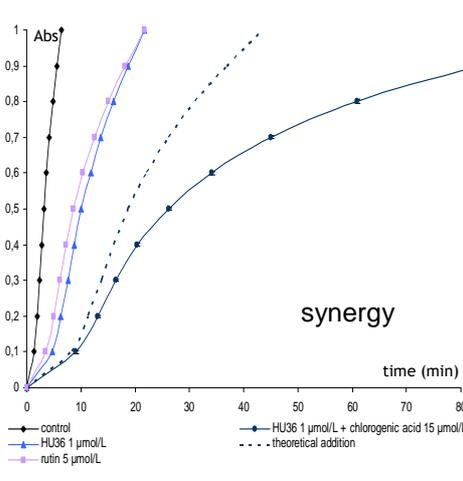
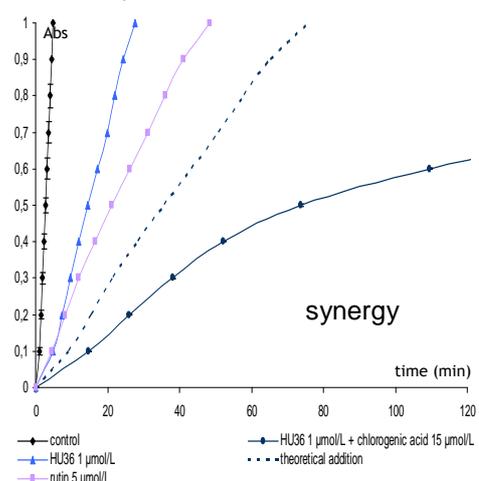


Figure 13. Interactions between 1  $\mu\text{mol/L}$  HU36 carotenoids and 0.4  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha$ -tocopherol, or 15  $\mu\text{mol/L}$  chlorogenic acid, or 5  $\mu\text{mol/L}$  rutin to inhibit linoleic acid peroxidation in the micellar system. Dashed curves: mathematic simulation of the additive effect of the two antioxidants.

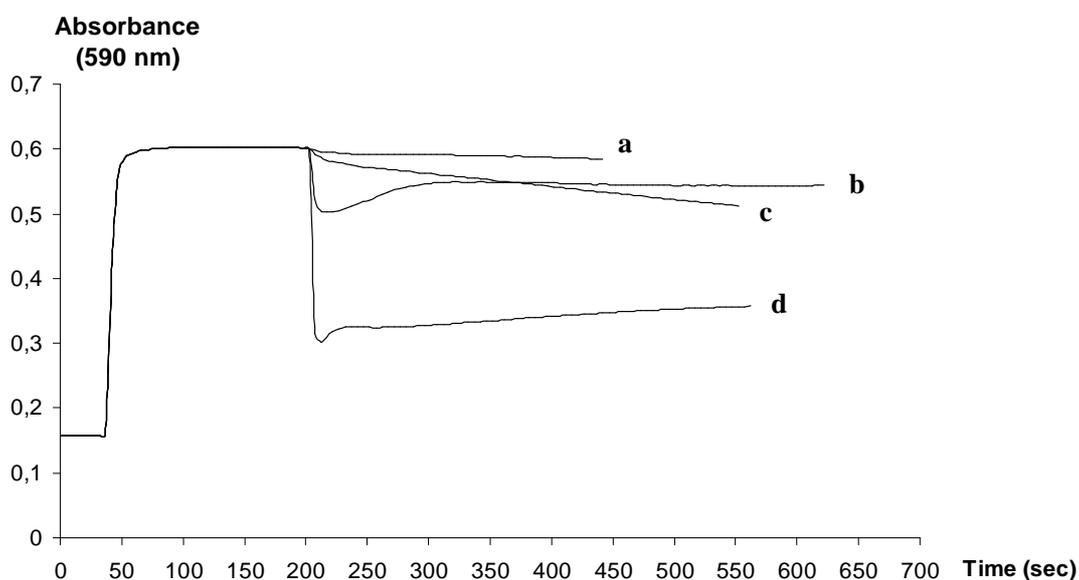
**Table 1.** Percentages of interactions taking place between 1  $\mu\text{mol/L}$  HU36 carotenoids and phenolic antioxidants during iron-initiated linoleic acid peroxidation in the micellar models.

	% of synergy or antagonism *, when $\Delta\text{Abs} = 0.5$		
	0.5 $\mu\text{mol/L}$ MbFe <sup>III</sup> , pH 5.8	0.5 $\mu\text{MOL/L}$ MbFe <sup>III</sup> , pH 4	20 $\mu\text{mol/L}$ Fe <sup>II</sup> , pH 4
HU36 1 $\mu\text{mol/L}$ + $\alpha$ -tocopherol 0.4 $\mu\text{mol/L}$	-	-	- 44.4
HU36 1 $\mu\text{mol/L}$ + chlorogenic acid 15 $\mu\text{mol/L}$	+ 118.5	+ 101.6	- 42.8
HU36 1 $\mu\text{mol/L}$ + + rutin 5 $\mu\text{mol/L}$	+ 105.3	+ 39.0	- 42.3

\* Calculated from the difference between  $RT_{\text{experimental}} = T/T_{\text{control}}$  (obtained with the mixture of two antioxidants) and  $RT_{\text{theoretical}} = RT_1 + RT_2 = (T_1/T_{\text{control}}) + (T_2/T_{\text{control}})$  (obtained with individual antioxidants): % synergy or antagonism =  $100 \times (RT_{\text{experimental}} - RT_{\text{theoretical}}) / RT_{\text{theoretical}}$ , and results are null in the case of additivity, positive in the case of synergy and negative in the case of antagonism.

### Reduction of ferrylmyoglobin by antioxidants.

When MbFe<sup>III</sup> is treated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 equiv.) in the absence of antioxidant, formation of ferrylmyoglobin (MbFe<sup>IV</sup>=O) can be followed at 590 nm (figure 14, [26]). MbFe<sup>IV</sup>=O, is a potent initiator of lipid peroxidation [6, 34] although its role in the absence of added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be questioned [35]. A decay of the absorbance at 590 nm following the addition of an antioxidant is observed if the latter is able to enter the heme cavity and to reduce the iron-oxo group to regenerate MbFe<sup>III</sup>. In the presence of  $\alpha$ -tocopherol, reduction of ferrylmyoglobin was slow and indistinguishable from that observed in the control experiment with MeOH alone. In the presence of  $\beta$ -carotene or lycopene, the carotenoids even slightly stabilised MbFe<sup>IV</sup>=O compared to the control. The addition of HU36 carotenoids induced a very partial reduction of MbFe<sup>IV</sup>=O into MbFe<sup>III</sup>. These results demonstrate that the lipophilic antioxidants carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol do not significantly react with hypervalent iron. By contrast, chlorogenic acid and rutin markedly reduce MbFe<sup>IV</sup>=O [36]. Thus, these hydrophilic antioxidants can reach the heme in the aqueous medium and quickly reduce the peroxidation initiator. The observation of distinct behaviours for lipophilic and hydrophilic antioxidants in the inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid is in agreement with the literature [12, 34].



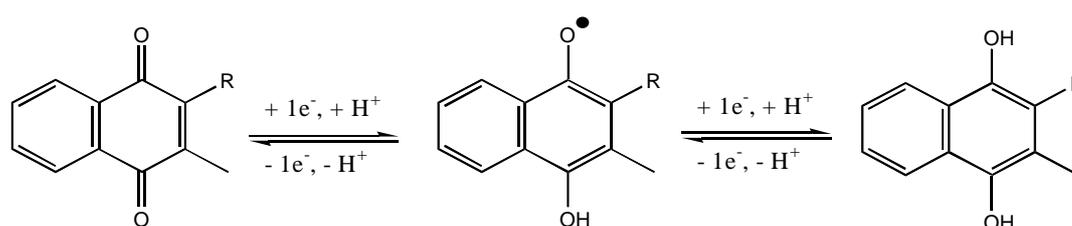
**Figure 14.** Time dependence of the absorbance at 590 nm following the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30  $\mu$ mol/L) to a solution of metmyoglobin (60  $\mu$ mol/L) in a pH 4 acetate buffer containing 4 mmol/L Brij 35, 37 °C ; and impact of the addition of 100  $\mu$ mol/L antioxidants ( $\beta$ -carotene (a), HU36 carotenoids (b)  $\alpha$ -tocopherol (c), and chlorogenic acid (d)).

## DISCUSSION

The stability and lipid-protecting activity of antioxidant mixtures were investigated in this work using the following combinations: mixtures of carotenoids, carotenoids + MQ-7, carotenoids + phenolic antioxidants.

MQ-7 does not significantly inhibit iron-induced autoxidation of HU36 carotenoids (a weak protection was evidenced with Fe<sup>III</sup> only). However, the protection is very significant with  $\beta$ -carotene, especially in the presence of heme iron. Thus, protection is very dependent on the iron form and of carotenoids under consideration. Although MQ-7 is a poor antioxidant compared to HU36 carotenoids and lycopene, it can efficiently increase the antioxidant activity of carotenoids when used in relatively high concentration (10 equiv.). This effect is maximal in Fe<sup>II</sup>-induced lipid peroxidation with the bacterial carotenoids and in heme-induced peroxidation with lycopene. However, MQ-7 is not degraded in the presence of iron.

Although not an electron-donor by itself, MQ-7 may be involved in redox cycling with its one-electron reduced (semiquinone) and two-electron reduced (hydroquinone) forms (figure 16, [37, 38]) with carotenoids (or some carotenoid derivatives) acting as electron donors depending on their location and reducing capacity. Although in low concentrations, such reduced forms of MQ-7 could effectively transfer electrons to lipid peroxy radicals and reactive iron species involved in Fe<sup>II</sup> autoxidation or initiation of lipid peroxidation.



**Figure 16.** The different redox forms of MQ-7 (R = heptaisoprenyl chain).

When used in combination,  $\beta$ -carotene and lycopene exhibit a slightly higher stability towards iron-induced autoxidation than the individual carotenoids in equivalent concentrations. Possibly, each carotenoid may be protected by the radical-scavenging activity of the other. However, HPLC analysis would be required to reveal whether one carotenoid is more significantly spared than the other. Stability of the cocktail of HU36

carotenoids (15 pigments with closely related structures) might be reinforced by similar interactions.

A mixture of lycopene and  $\beta$ -carotene displays the same efficiency at inhibiting lipid peroxidation as that expected from the activity of the individual pigments (additivity). Thus, the antioxidant activity of HU36 carotenoids might also correspond to the additive contribution of the individual carotenoids in the cocktail.

Combinations of HU36 carotenoids and polyphenols displayed synergistic activities in the inhibition of linoleic acid peroxidation induced by heme iron but not by free iron. Complementary experiments have highlighted that chlorogenic acid and rutin rapidly reduce ferrylmyoglobin, a potential initiator of lipid peroxidation, while HU36 carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol are essentially inactive. On the other hand,  $\alpha$ -tocopherol and the bacterial carotenoids must act as chain-breaking antioxidants by direct scavenging of the propagating lipid peroxy radicals in the lipid phase. Thus, complementary antioxidant mechanisms can be suggested for the polyphenols and bacterial carotenoids that may result in synergy. The heme cofactor of metmyoglobin was already proposed as a key component of synergism between  $\alpha$ -tocopherol and quercetin [12]. In that work, it was shown that  $\alpha$ -tocopherol, while unable to reduce the iron-oxo center of ferrylmyoglobin, can protect the porphyrin nucleus from oxidative degradation (evidenced by the decay of the Soret band) *via* the corresponding radical cation. Moreover, quercetin, which can quickly reduce  $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ , is partially spared when quercetin +  $\alpha$ -tocopherol mixtures are used for the inhibition of lipid peroxidation while  $\alpha$ -tocopherol consumption is enhanced. Hence, the synergism observed was attributed to a regeneration of quercetin (and/or some of its oxidation products with a residual antioxidant activity) from its radical by  $\alpha$ -tocopherol *via* electron transfer through the porphyrin nucleus. A similar mechanism may apply between polyphenols and the bacterial carotenoids.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the European Community's Seventh Framework Program (Colorspore, Small Collaborative Project Integrated European Project N° 207948). Special thanks are given to Paul Fraser, Laura Perez and Reena khaneja (Royal Holloway University of London, UK) for providing carotenoid-rich bacterial extracts. We thank the company Conesa (Spain) for its gift of (all-*E*)-lycopene.

## REFERENCES

1. Lapidot, T.; Granit, R.; Kanner, J., Lipid proxidation by "free" iron ions and myoglobin as affected by dietary antioxidants in simulated gastric fluids. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 3390-3393.
2. Kanner, J.; Lapidot, T., The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 2001, 31, (11), 1388-1395.
3. Halliwell, B.; Zhao, K. C.; Whiteman, M., The gastro-intestinal tract: A major site of anti-oxidant action ? . *Free Radical Research* 2000, 33, 819-830.
4. Staprans, I.; Rapp, J. H.; Pan, X. M.; Kim, K. Y.; Feingold, K. R., Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler. Throm.* 1994, 14, 1900-1905.
5. Spiteller, G., Linoleic acid peroxidation - The dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein - And its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lipids* 1998, 95, 105-162.
6. Jomova, K., Advances in metal-induced oxidative stress and human stress in human disease. *Toxicology* 2011.
7. Igene, J. O.; King, J. A.; Pearson, A. M.; Gray, J. I., Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1979, 27, (4), 838-842.
8. Garcia, M. N.; Martinez-Torres, C.; Leets, I.; Tropper, E.; Ramirez, J.; Layrisse, M., Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: Iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1996, 7, (1), 49-54.
9. Baron, C. P.; Andersen, H. J., Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, (14), 3887-3897.
10. Faustman, C.; Sun, Q.; Mancini, R.; Suman, S. P., Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* 2010, 86, (1), 86-94.
11. Léger, C. L., Antioxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action antioxydante, interactions. *OCL* 2006, 13, (1), 59-69.
12. Goupy, P.; Vulcain, E.; Carls-Veyrat, C.; Dangles, O., Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. *Free Radical Biology and Medicine* 2007, 43, (6), 933-946.
13. Zhang, P.; Omaye, S. T., Beta-carotene: interactions with alpha-tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2001, 12, 38-45.
14. Burke, M.; Edge, R.; Land, E. J.; Truscott, T. G., Characterisation of carotenoid radical cations in liposomal environments: interaction with vitamin C. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 2001, 60, (1), 1-6.
15. Mortensen, A.; Skibsted, L. H.; Truscott, T. G., The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, 385, (1), 13-9.
16. Karabulut, I., Effects of alpha-tocopherol, beta-carotene and ascorbyl palmitate on oxidative stability of butter oil triacylglycerols. *Food Chemistry* 2010, 123, 622-627.
17. Yeum, K. J.; Aldini, G.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I., Antioxidant/pro-oxidant actions of carotenoids. In *Carotenoids, Volume 5: nutrition and health*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.; Synnove, Eds. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 2009; pp 235-268.
18. Takahashi, A.; Shibasaki-Kitakawa, N.; Yonemoto, T., A rigorous kinetic model for beta-carotene oxidation in the presence of an antioxidant, alpha-tocopherol. *Journal of the American Oil Chemists Society* 2003, 80, (12), 1241-1247.

19. Böhm, F.; Edge, R.; Land, E. J.; Mc Garvey, D. J.; Truscott, T. G., Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, (3), 621-622.
20. Haila, K. M.; Nielsen, B. R.; Heinonen, M. I.; Skibsted, L. H., Carotenoid reaction with free radicals in acetone and toluene at different oxygen partial pressures. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 1997, 204, (2), 81-87.
21. Liang, J.; Tian, Y.-X.; Yang, F.; Zhang, J.-P.; Skibsted, L. H., Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chemistry* 2009, 115, (4), 1437-1442.
22. Khaneja, R.; Perez-Fons, L.; Fakhry, S.; Baccigalupi, L.; Steiger, S.; To, E.; Sandmann, G.; Dong, T. C.; Ricca, E.; Fraser, P. D.; Cutting, S. M., Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 2010, 108, (6), 1889-1902.
23. Hong, H. A.; Huang, J. M.; Khaneja, R.; Hiep, L. V.; Urdaci, M. C.; Cutting, S. M., The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 105, (2), 510-520.
24. Perez-Fons, L.; Steiger, S.; Khaneja, R.; Bramley, P. M.; Cutting, S. M.; Sandmann, G.; Fraser, P. D., Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2010, 1811, (3), 177-185.
25. Das, A.; Hhugenholtz, J.; Van Halbeek, H.; Ljungdahl, L., Structure and Function of a Menaquinone Involved in Electron Transport in Membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of bacteriology* 1989, 171, 5823-5829.
26. Vulcain, E.; Goupy, P.; Caris-Veyrat, C.; Dangles, O., Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radical Research* 2005, 39, (5), 547-563.
27. Tyssandier, V.; Reboul, E.; Dumas, J. F.; Bougteloup-Demange, C.; Armand, M.; Marcand, J.; Sallas, M.; Borel, P., Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2003, 284, (6), G913-G923.
28. Armand, M.; Borel, P.; Pasquier, B.; Dubois, C.; Senft, M.; Andre, M.; Peyrot, J.; Salducci, J.; Lairon, D., Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 1996, 271, (1), G172-G183.
29. Duc, L. H.; Fraser, P. D.; Tam, N. K. M.; Cutting, S. M., Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *Fems Microbiology Letters* 2006, 255, (2), 215-224.
30. Marshall, J. R.; Wilmoth, G. J., Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *Journal of Bacteriology* 1981, 147, (3), 900-913.
31. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy. Birkhauser Verlag AG: Basel Switzerland, 1994; Vol. 1B.
32. Mancuso, J. R.; McClements, D. J.; Decker, E. A., Ability of iron to promote surfactant peroxide decomposition and oxidize alpha-tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (10), 4146-4149.
33. Mikkelsen, A., Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobine: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1995, 200, 171-177.
34. Carlsen, C. U.; Møller, J. K. S.; Skibsted, L. H., Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews* 2005, 249, (3-4), 485-498.
35. Lorrain, B.; Dufour, C.; Dangles, O., Influence of serum albumin and the flavonol quercetin on the peroxidase activity of metmyoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* 2010, 48, (9), 1162-1172.

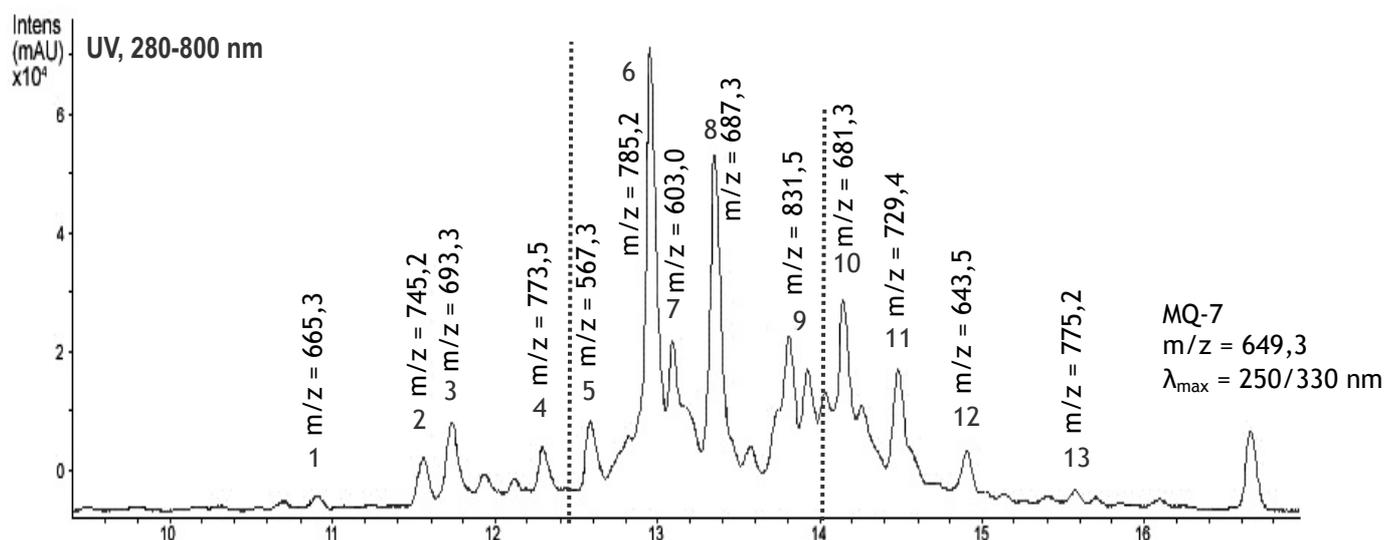
36. Jorgensen, L. V.; Skibsted, L. H., Flavonoid deactivation of ferrylmyoglobin in relation to ease of oxidation as determined by cyclic voltammetry. *Free Radical Research* 1998, 28, (3), 335-351.
37. Roginsky, V. A.; Pisarenko, L. M.; Bors, W.; Michel, C., The kinetics and thermodynamics of quinone-semiquinone-hydroquinone systems under physiological conditions. *Journal of the Chemical Society* 1999, *Perkin transactions 2*, (4), 871-876.
38. Song, Y.; Buettner, G. R., Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* 2010, 49, (6), 919-962.

## 4. AUTRES RÉSULTATS

### 4.1. Composition des extraits de caroténoïdes de GB1, avant et après purification par chromatographie liquide

Les échantillons de caroténoïdes issus de GB1 ont été traités et étudiés comme ceux de HU36 afin d'évaluer leurs possibles interactions avec d'autres molécules (vitamines, polyphénols).

L'analyse par UPLC-MS de l'extrait brut a révélé la présence d'un groupe de divers pigments (figure B.1), dont le principal est un apolycopénoïde diglycosyl ester ( $m/z = 785,5$ ), avec des absorbances maximales à 468, 496 et 528 nm ou à 472, 502 et 534 nm. Le chromatogramme a aussi révélé la présence d'un composé plus hydrophobe que les caroténoïdes, qui est élué en dernier ( $m/z = 649,3$ ). Il s'agit d'un autre isoprénoïde, la ménaquinone (MQ-7, forme polymérisée de la vitamine K<sub>2</sub>), déjà identifiée dans l'extrait brut de HU36.



**Figure B.1** : Chromatogramme obtenu par analyse UPLC et détection UV/vis entre 280 et 800 nm, à partir de l'extrait bactérien brut de GB1 et contenant des caroténoïdes et de la ménaquinone avant l'étape de purification.

Après la purification d'environ 150 mg d'extrait bactérien brut par chromatographie liquide sur une colonne de silice greffée en C18, des fractions pures ont été récupérées. L'analyse de leur contenu par mesure spectrophotométrique a permis d'évaluer le contenu

en caroténoïdes purs de GB1 à 2  $\mu\text{mol}$ . De plus, l'analyse par UPLC de la fraction extraite contenant la ménaquinone a permis d'évaluer son contenu à 4,6  $\mu\text{mol}$ . Comme pour les caroténoïdes de HU36, ces résultats confirment l'importance de la phase de purification avant d'étudier les propriétés physico-chimiques du cocktail de caroténoïdes bactériens de GB1.

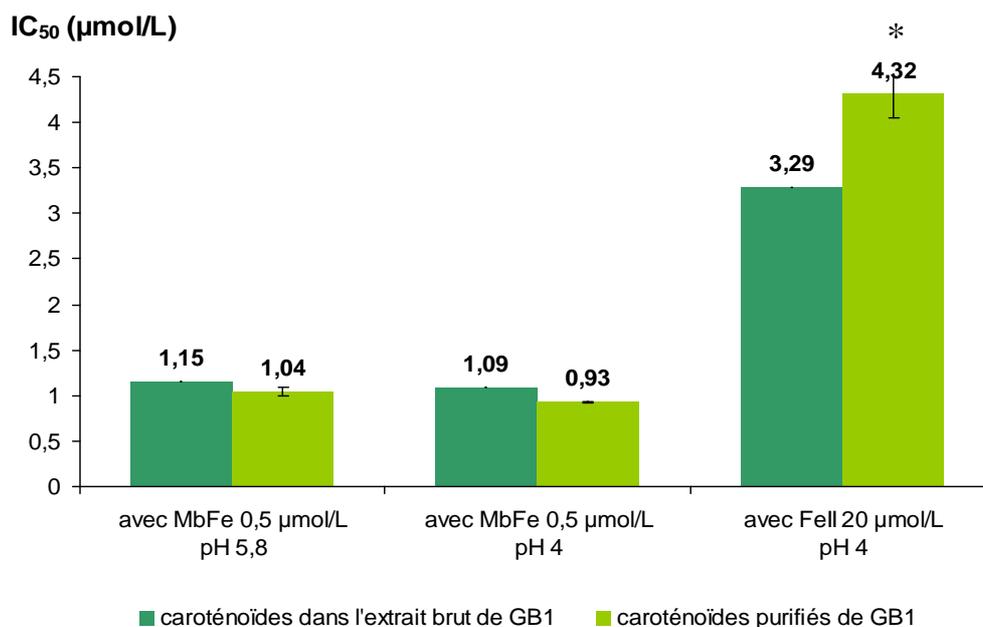
#### 4.2. Influence de la présence de MQ-7 sur le pouvoir antioxydant des caroténoïdes de GB1

Le pouvoir antioxydant des caroténoïdes de GB1 a été comparé avec et sans ménaquinone, dans le système micellaire contenant de l'acide linoléique et stabilisé par du Brij<sup>®</sup>35, lors d'initiations de la peroxydation lipidique par MbFe à pH 5,8, par MbFe à pH 4 ou par Fe<sup>II</sup> à pH 4. Dans chaque cas, le ratio  $RT = T/T_0$  (correspondant au délai induit par les caroténoïdes pour atteindre un niveau donné d'oxydation, par rapport au contrôle sans antioxydants) a été calculé en fonction de la concentration de caroténoïdes (C).

Comme pour HU36, que l'échantillon de caroténoïdes contienne ou pas de la ménaquinone, le résultat de la modélisation de la courbe RT vs. C est une équation exponentielle lors d'une initiation par MbFe ( $RT = \exp(a.C)$ ) et polynomiale lors d'une initiation par Fe<sup>II</sup> ( $RT = 1 + a.C + b.C^2$ ). Les valeurs du paramètre IC<sub>50</sub> (en  $\mu\text{mol/L}$ ) ont donc été calculées selon les équations suivantes :

$$IC_{50} = \ln(2) / a, \text{ avec MbFe}$$
$$\text{et, } IC_{50} = (\sqrt{a^2 + 4.b} - a) / (2.b), \text{ avec Fe}^{II}.$$

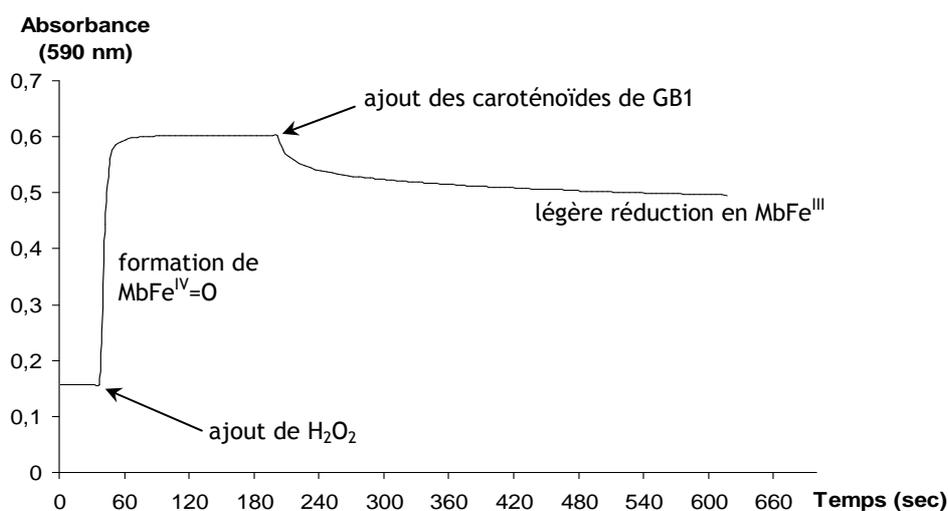
Plus l'IC<sub>50</sub> est faible, plus l'antioxydant est efficace (figure B.2). Dans les modèles où la peroxydation de l'acide linoléique a été initiée par MbFe, aucune différence significative de pouvoir antioxydant n'a été observée entre les échantillons avec et sans ménaquinone. En revanche la ménaquinone a renforcé de 31 % le pouvoir antioxydant des caroténoïdes de GB1 lors d'une oxydation initiée par Fe<sup>II</sup> à pH 4. Comme pour HU36, l'effet de la présence de ménaquinone s'est révélé significatif dans les conditions où les caroténoïdes bactériens purs avaient le plus faible pouvoir antioxydant.



**Figure B.2** : Comparaison de l'indice IC<sub>50</sub>, décrivant le pouvoir antioxydant dans les modèles micellaires contenant 0,7 mmol/L d'acide linoléique, entre les caroténoïdes de GB1 des échantillons bruts avec MQ-7 et ceux obtenus après purification. Moyennes sur 3 répétitions ± E.T. L'étoile indique un résultat significativement différent ( $p < 0,05$ ) d'après le test ANOVA suivi du test de Tuckey/Kramer.

### 4.3. Réduction de la ferrylmyoglobine par GB1

Un test complémentaire de réduction de la ferrylmyoglobine a été effectué avec les caroténoïdes de GB1. Il a révélé que ces caroténoïdes sont peu efficaces pour recycler la forme MbFe<sup>III</sup> de la myoglobine (figure B.3).



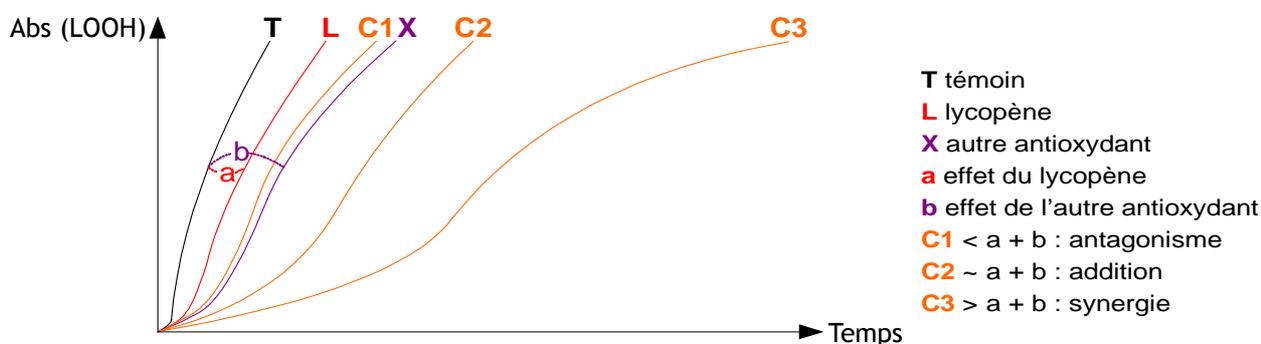
**Figure B.3** : Évolution de l'absorbance à 590 nm, après addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 µmol/L) dans une solution de MbFe<sup>III</sup> (60 µmol/L) à pH 4 ; puis ajout de 100 µmol/L de caroténoïdes de GB1.

#### 4.4. Interactions entre le lycopène et d'autres molécules antioxydantes dans l'inhibition de la peroxydation lipidique

Par comparaison avec les caroténoïdes de HU36, l'effet de la combinaison avec de l' $\alpha$ -tocophérol ou des polyphénols (rutine et acide chlorogénique) a également été testé avec le lycopène.

Il a été évalué dans les modèles micellaires avec l'acide linoléique à 0,7 mmol/L. Chaque antioxydant a été utilisé à une concentration proche de son  $IC_{50}$  (2  $\mu$ mol/L pour le lycopène, 0,4  $\mu$ mol/L pour l' $\alpha$ -tocophérol, 15  $\mu$ mol/L pour l'acide chlorogénique et 5  $\mu$ mol/L pour la rutine). L'accumulation des hydroperoxydes a été suivie dans une expérience contrôle, en présence de lycopène seul, en présence des antioxydants phénoliques seuls et en présence des combinaisons lycopène/antioxydant phénolique. Puis, pour chaque combinaison, l'inhibition théorique de l'oxydation a pu être calculée en additionnant les inhibitions de peroxydation induites par chaque molécule indépendamment, à une concentration donnée de peroxydes, *i.e.*  $\Delta Abs = 0.5 : RT_{théorique} = RT_1 + RT_2$ , avec  $RT_1 = T_1/T_{contrôle}$  et  $RT_2 = T_2/T_{contrôle}$ . Les interactions ont finalement été évaluées en comparant cette inhibition théorique et la courbe expérimentale de la peroxydation lipidique obtenue avec les combinaisons d'antioxydants: addition si la courbe expérimentale et l'inhibition théorique correspondent, synergie si la courbe expérimentale montre une période d'induction plus longue ( $RT_{expérimental} > RT_{théorique}$ ), antagonisme dans le cas contraire ( $RT_{expérimental} < RT_{théorique}$ ) (figure B.4). Les valeurs quantitatives de ces interactions ont été calculées comme le pourcentage de synergie ou d'antagonisme et sont reportées dans le tableau B.1 :

$$\% \text{ synergie ou antagonisme} = 100 \times (RT_{expérimental} - RT_{théorique}) / RT_{théorique}$$



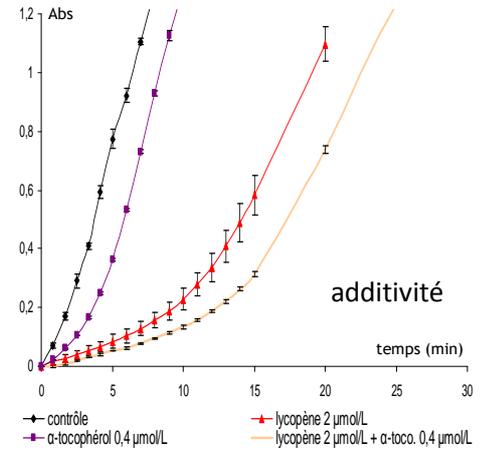
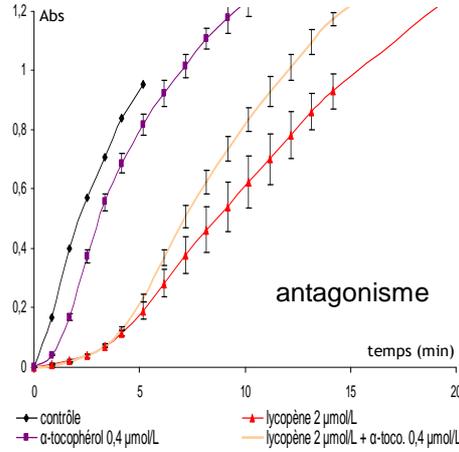
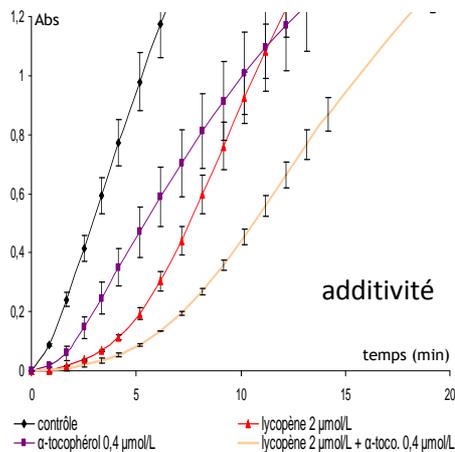
**Figure B.4** : Schéma de principe de la méthode utilisée pour déterminer les types d'interactions existant entre plusieurs antioxydants lors de l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique (a =  $T_L/T$  ; b =  $T_X/T$ ).

avec MbFe 0,5 µmol/L,  
pH 5,8

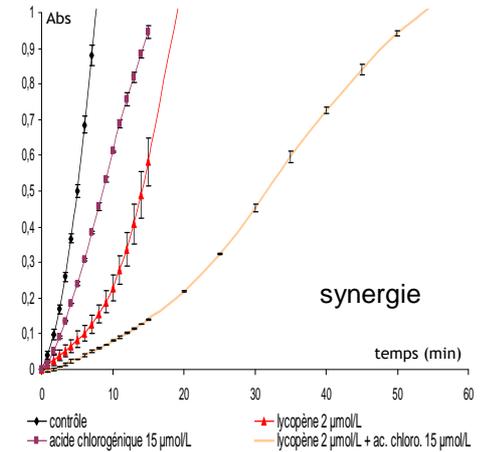
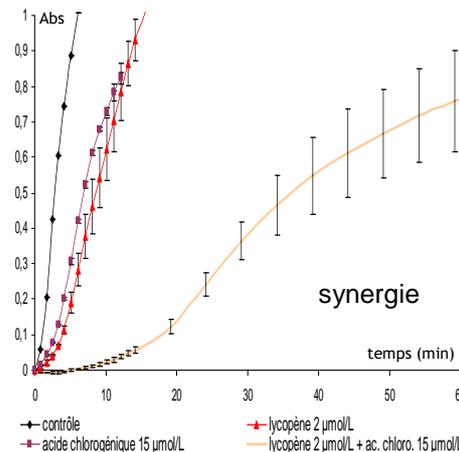
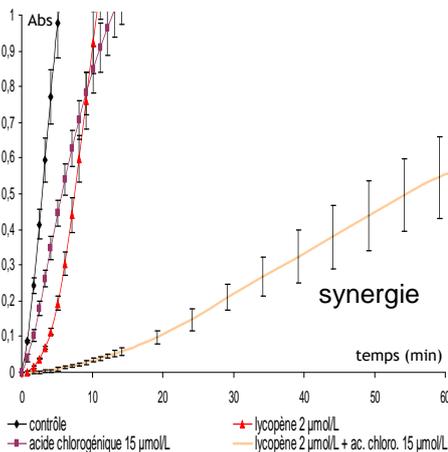
avec MbFe 0,5 µmol/L,  
pH 4

avec Fe<sup>II</sup> 20 µmol/L,  
pH 4

Lycopène et α-tocophérol



Lycopène et acide chlorogénique



Lycopène et rutine

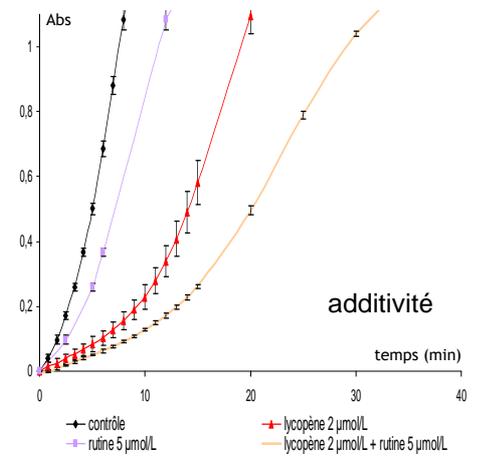
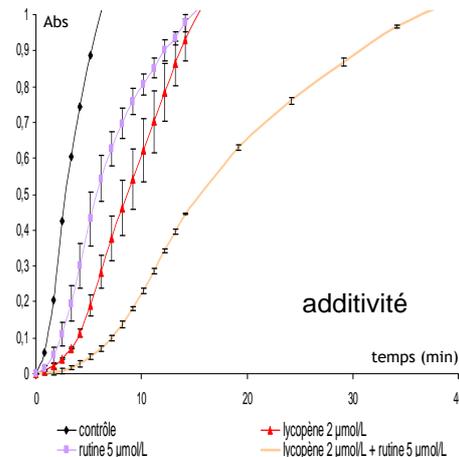
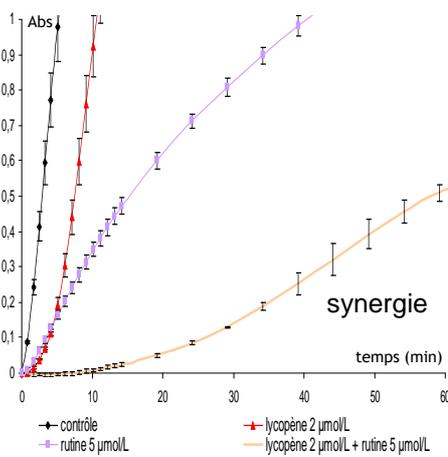


Figure B.5 : Interactions entre 2 µmol/L de lycopène et des antioxydants phénoliques lors de la peroxydation de l'acide linoléique par le fer en modèle micellaire. Moyennes sur 3 répétitions ± E.T.

Comme lors des tests de combinaison avec les caroténoïdes de HU36, aucune synergie n'a été constatée entre le lycopène et l' $\alpha$ -tocophérol (figure B.5) : il y avait soit simple additivité, soit antagonisme (avec MbFe<sup>III</sup> à pH 4). En combinaison avec la rutine, une forte synergie été observée avec MbFe<sup>III</sup> à pH 5,8 mais ne s'est pas confirmée à pH 4. En revanche, les combinaisons lycopène/acide chlorogénique ont induit de très forts effets de synergie (plus importants qu'avec les caroténoïdes de HU36) dans tous les modèles (y compris avec Fe<sup>II</sup> à pH 4, contrairement à ce qui avait été observé pour les caroténoïdes de HU36).

**Tableau B.I** : Pourcentages d'interaction entre 2  $\mu\text{mol/L}$  de lycopène et les chaque antioxydant phénolique, dans l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par le fer en milieu micellaire

	% de synergie ou d'antagonisme *, pour $\Delta\text{Abs} = 0,5$		
	0,5 $\mu\text{mol/L}$ MbFe <sup>III</sup> , pH 5,8	0,5 $\mu\text{MOL/L}$ MbFe <sup>III</sup> , pH 4	20 $\mu\text{mol/L}$ Fe <sup>II</sup> , pH 4
lycopène 2 $\mu\text{mol/L}$ + $\alpha$ -tocophérol 0,4 $\mu\text{mol/L}$	-	- 38,2	-
lycopène 2 $\mu\text{mol/L}$ + acide chlorogénique 15 $\mu\text{mol/L}$	+ 266,7	+ 135,2	+ 37,0
HU36 1 $\mu\text{mol/L}$ + + rutin 5 $\mu\text{mol/L}$	+ 157,0	-	-

\* Calculés à partir de la différence entre  $RT_{\text{expérimental}} = T/T_{\text{contrôle}}$  (obtenu avec le mélange de deux antioxydants) et  $RT_{\text{théorique}} = RT_1 + RT_2 = (T_1/T_{\text{contrôle}}) + (T_2/T_{\text{contrôle}})$  (obtenu avec les deux antioxydants individuellement) : % synergie ou antagonisme =  $100 \times (RT_{\text{expérimental}} - RT_{\text{théorique}}) / RT_{\text{théorique}}$ . Les résultats sont positifs en cas de synergie et négatifs en cas d'antagonisme.

## 5. SYNTHÈSE DE LA PROBLÉMATIQUE B

Dans ce deuxième chapitre, l'objectif était d'étudier le pouvoir antioxydant des caroténoïdes bactériens issus de HU36 et de GB1 et de caroténoïdes de référence ( $\beta$ -carotène, lycopène et astaxanthine), par mesure de leurs capacités relatives à inhiber la peroxydation lipidique dans deux systèmes modèles du compartiment gastrique (une solution micellaire à pH 5,8 ou 4 contenant de l'acide linoléique ; et une émulsion d'huile de tournesol dans l'eau à pH 4), soumis à une oxydation initiée par le fer (sous forme hémérique ou d'ions ferreux libres).

Dans un premier temps, les mesures cinétiques ont été effectuées essentiellement à l'aide du modèle micellaire, adapté à partir d'un modèle déjà utilisé au laboratoire et du modèle stabilisé par du Brij<sup>®</sup>35 développé dans la partie A de la thèse. Il a été appliqué aux deux cocktails de caroténoïdes bactériens et aux trois caroténoïdes de référence, en présence de fer ferreux libre à pH 4 ( $\text{Fe}^{\text{II}}$  à 20  $\mu\text{mol/L}$ ) et de fer hémérique à pH 5,8 et à pH 4 ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$  à 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ), puis à des combinaisons de caroténoïdes et d'autres molécules ayant un effet antioxydant : vitamines (ménaquinone et  $\alpha$ -tocophérol) et polyphénols (rutine et acide chlorogénique).

La principale mise au point effectuée sur ce modèle a consisté à définir un facteur de mesure du pouvoir antioxydant. En effet, l'indice  $\text{IC}_{50}$  souvent utilisé lors des tests d'inhibition de la peroxydation a été jugé insuffisant, dans la mesure où il n'indique que la quantité de molécule antioxydante nécessaire pour diviser par deux le taux d'oxydation (souvent des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{mol}$  pour les caroténoïdes). Or, une autre considération importante a été mise en évidence à partir de la modélisation des cinétiques d'inhibition de l'oxydation : l'effet d'une augmentation de la concentration en antioxydant dans un système varie en fonction de l'antioxydant étudié (caroténoïde ou polyphénol ou vitamine...) et de la forme de fer initiant l'oxydation. Dans les cas étudiés ici, l'inhibition de la peroxydation augmente soit de façon exponentielle soit de façon polynomiale avec l'augmentation de la concentration. Dans d'autres cas elle peut aussi être linéaire ou tendre vers une asymptote... Ainsi, il est intéressant de pouvoir déterminer dans un premier temps l'effet d'une unité de molécule antioxydante sur l'inhibition de la peroxydation, puis l'effet de toute augmentation de la concentration en antioxydant sur cette inhibition. Par exemple, pour tous les caroténoïdes de l'étude, l'augmentation du pouvoir antioxydant est exponentielle avec la concentration de caroténoïdes en présence de MbFe :  $\text{taux d'inhibition} = \exp(a \times \text{concentration})$ . En revanche, le pouvoir antioxydant

des caroténoïdes peut être modélisé par une relation polynomiale en présence de  $Fe^{II}$  :  
taux d'inhibition =  $1 + a \times \text{concentration} + b \times \text{concentration}^2$ .

Dans un deuxième temps, certaines des observations faites sur le premier modèle ont été évaluées dans le modèle plus complexe d'émulsion huile dans eau à pH 4 en présence de fer héminique (40  $\mu\text{mol/L}$ ). Il a été appliqué aux deux cocktails de caroténoïdes bactériens et aux trois caroténoïdes de référence.

Le suivi de la peroxydation lipidique et les tests de combinaison entre antioxydants ont mis en évidence des différences de mécanisme d'inhibition de l'oxydation en fonction de la structure des caroténoïdes et du milieu réactionnel :

- globalement, la peroxydation des lipides est plus rapide à pH 4 qu'à pH 5,8 ;
- les caroténoïdes de HU36 et de GB1 sont de meilleurs antioxydants que le  $\beta$ -carotène, le lycopène ou l'astaxanthine contre l'oxydation induite par MbFe.  
À pH 5,8 : HU36 = GB1 > lycopène =  $\beta$ -carotène > astaxanthine,  
à pH 4 : HU36 = GB1 > lycopène >  $\beta$ -carotène = astaxanthine ;
- les tests de combinaisons laissent penser que le pouvoir antioxydant d'un mélange de caroténoïdes ayant des structures semblables (ex : les cocktails de caroténoïdes bactériens) est égal à la moyenne des pouvoirs antioxydants des caroténoïdes et qu'il n'existe pas de phénomènes de synergie dans ces conditions ;
- l'action des caroténoïdes natifs sur l'inhibition de la peroxydation n'est pas expliquée par un pouvoir réducteur sur la ferrylmyoglobine. Ils sont donc tous des antioxydants "briseurs de chaînes", actifs sur les radicaux des acides gras ;
- en présence de MbFe<sup>III</sup> (ou HmFe<sup>III</sup>) en milieu micellaire, tous les caroténoïdes natifs prolongent la phase d'induction de l'oxydation ; avec une plus grande efficacité dans le cas des caroténoïdes de HU36 et de GB1 (concentration de caroténoïdes plus faible). Après oxydation totale des caroténoïdes natifs, les produits de dégradation des caroténoïdes bactériens semblent aussi avoir un effet plus fort que les produits de dégradation du  $\beta$ -carotène, du lycopène ou de l'astaxanthine sur le ralentissement de la peroxydation (action en milieu aqueux, directement avec l'initiateur de l'oxydation) ;
- en présence de HmFe<sup>III</sup>, en système émulsionné où les caroténoïdes sont plus compartimentés (les carotènes hydrophobes étant au centre des gouttelettes lipidiques), les cinétiques d'accumulation des diènes conjugués révèlent que

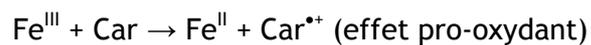
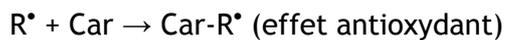
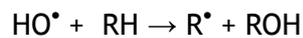
les caroténoïdes bactériens rallongent fortement la phase d'induction de l'oxydation alors que les caroténoïdes de référence natifs n'inhibent pas les radicaux peroxydes. La structure glycosylée des caroténoïdes bactériens favorise une localisation à l'interface entre les phases aqueuse et lipidique de l'émulsion et pourrait influencer leur action antioxydante. Après dégradation totale des caroténoïdes natifs, seuls les produits de dégradation du  $\beta$ -carotène, du lycopène et de l'astaxanthine ralentissent la peroxydation, probablement par formation d'adduits avec l'ion hypervalent  $\text{HmFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ . Au contraire, les produits incolores d'oxydation des caroténoïdes bactériens sont peu ou pas antioxydants dans l'émulsion ;

- le lycopène est un meilleur antioxydant contre l'oxydation induite par  $\text{Fe}^{\text{II}}$  : lycopène > HU36 = GB1 =  $\beta$ -carotène > astaxanthine. On constate de plus que les cinétiques de libération de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et d'accumulation des peroxydes sont corrélées ;
- en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en milieu micellaire, seuls le  $\beta$ -carotène, le lycopène et l'astaxanthine prolongent la phase d'induction, probablement grâce à une réaction conjointe sur les radicaux lipidiques (formés par la peroxydation) et sur les radicaux ferryles et perferryles (intermédiaires de l'oxydation spontanées de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ). Au contraire, les caroténoïdes bactériens n'inhibent pas la peroxydation initiée par  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (ils réagissent peu avec les radicaux issus de la réaction entre  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{O}_2$ , Cf. article I)), alors que leurs produits de dégradation bloquent la peroxydation à forte concentration ;
- en outre, les caroténoïdes de référence ont la capacité de régénérer  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (générateur de radicaux libres) par réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . En présence de lipides cet effet serait pro-oxydant. Toutefois, les caroténoïdes sont rapidement dégradés lors de la peroxydation lipidique, leur effet sur  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est donc limité et aucun phénomène pro-oxydant n'a été observé.

Lorsque les caroténoïdes sont associés à d'autres molécules, leur pouvoir antioxydant peut varier par effets d'interactions. Il est très difficile d'anticiper l'effet d'une combinaison de molécules sur le pouvoir antioxydant du mélange. En effet :

- la ménaquinone-7 (une vitamine K<sub>2</sub>) augmente significativement le pouvoir antioxydant des caroténoïdes bactériens de HU36 et de GB1 en présence de fer II à pH4. En revanche, l'interaction entre le lycopène et MQ-7 est plus efficace en présence de MbFe<sup>III</sup> à pH 5.8. Il semblerait que l'effet de ce faible antioxydant soit particulièrement visible dans des conditions où le caroténoïde auquel elle est associée est peu efficace contre l'oxydation. Son mécanisme d'action reste non-élucidé, mais cette vitamine n'est pas dégradée par le fer et elle a un effet stabilisateur sur les carotènes, mais pas sur les caroténoïdes bactériens. Elle pourrait être impliquée dans des cycles redox sous ses formes réduites, donneuses d'électrons (semiquinone et hydroquinone) ;
- dans le modèle micellaire, la vitamine E (α-tocophérol) n'agit par synergie ni avec les caroténoïdes de HU36 ni avec le lycopène (additivité ou antagonisme), contrairement aux résultats d'études précédentes avec le β-carotène ([Zhang and Omaye 2001](#); [Takahashi, Shibasaki-Kitakawa et al. 2003](#)). De plus, l'α-tocophérol n'a pas d'effet stabilisateur significatif sur les caroténoïdes bactériens ni le lycopène ;
- des combinaisons de rutine ou d'acide chlorogénique avec les caroténoïdes bactériens ou avec le lycopène induisent des synergies en présence de MbFe<sup>III</sup>, malgré un effet antioxydant modéré de ces deux polyphénols individuellement. Les tests de réduction de la ferrylmyoglobine laissent suggérer que ces synergies sont dues à une complémentarité de mécanismes entre les caroténoïdes et ces polyphénols, qui ont la particularité de pouvoir réduire la ferrylmyoglobine (forme la plus oxydante) en metmyoglobine. Par analogie avec la régénération de la quercétine par l'α-tocophérol, démontrée précédemment , les caroténoïdes pourraient également avoir un effet stabilisateur sur ces polyphénols. De plus, l'acide chlorogénique induit un effet de synergie plus important que la rutine ([Goupy, Vulcain et al. 2007](#)) ;
- enfin, des antagonismes ont été mis en évidence entre les caroténoïdes bactériens et l'α-tocophérol ou les polyphénols en présence de fer II. Or, lorsqu'ils sont impliqués dans des cycles réactionnels incluant le fer, les caroténoïdes peuvent altérer les réactions catalysées par le fer II et induire un effet pro-oxydant (même résultat avec la vitamine C et l'α-tocophérol

([Polyakov, Leshina et al. 2001](#))). Les caroténoïdes sont alors dégradés sans ralentir l'oxydation. C'est ce qui a été observé pour les caroténoïdes de HU36 et de GB1 lors de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par Fe<sup>II</sup>. Exemple avec la réaction de Fenton :





---

Problématique C :

**BIOACCESSIBILITÉ  
ET BIODISPONIBILITÉ  
DES CAROTÉNOÏDES**

---

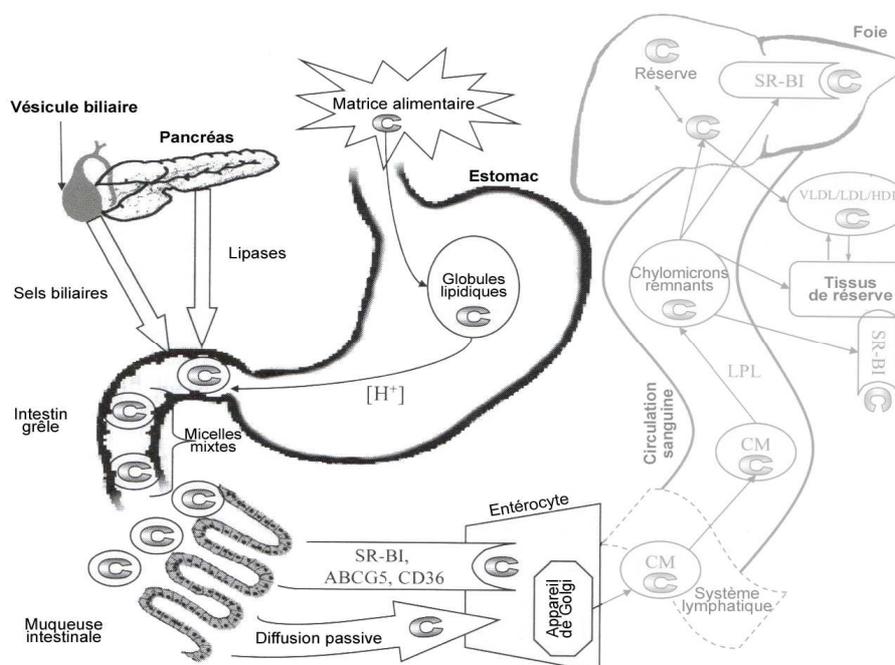


## 1. ÉTAT DE L'ART : BIOACCESSIBILITE, ABSORPTION ET DISTRIBUTION TISSULAIRE

La notion de biodisponibilité correspond à la fraction de caroténoïdes ingérés avec l'alimentation, qui est soit mobilisée par l'organisme pour assurer des fonctions physiologiques, soit stockée. Elle se mesure comme le produit de la bioaccessibilité (part des caroténoïdes de l'aliment qui sont incorporés dans les micelles mixtes) et de l'efficacité de l'absorption intestinale ; et elle tient compte de la répartition des caroténoïdes entre les différents tissus de l'organisme.

### 1.1. Facteurs influençant l'absorption des caroténoïdes

Au cours de la digestion et du métabolisme des lipides (figure 64), une partie des caroténoïdes est d'abord relarguée lors de la fracture de la matrice alimentaire dans l'estomac, puis dispersée dans la phase lipidique du bol alimentaire (Tyssandier, Reboul et al. 2003). À partir du duodénum, une partie des caroténoïdes sont solubilisés dans des micelles mixtes intestinales constituées notamment de sels biliaires (Tyssandier, Lyan et al. 2001), puis véhiculés jusqu'aux microvillosités de la paroi intestinale, absorbés par les cellules muqueuses de l'intestin et incorporés dans des lipoprotéines lymphatiques (Reboul and Borel 2011).



**Figure 64 :** Représentation du transfert des caroténoïdes (C) de la matrice alimentaire vers la face basolatérale des entérocytes. Solubilisation dans les gouttelettes lipidiques - incorporation dans les micelles mixtes avec les autres lipides - passage dans les entérocytes.

À chaque étape, plusieurs facteurs sont susceptibles de modifier la biodisponibilité d'un caroténoïde ([Castenmiller and West 1998](#); [Faure, Fayol et al. 1999](#)), rappelés par le mnémogramme SLAMENGI ([West, C et al. 1998](#)) : *species of carotenoids (S), molecular linkage (L), amount of carotenoid consumed (A), food matrix (M), effectors of absorption (E), nutrient status of the host (N), genetic factors (G), host-related factors (H), mathematical interactions (I)*.

### 1.1.1. Effets de la structure chimique des caroténoïdes

#### 1.1.1.1. Hydrophobicité et isomérisation des caroténoïdes (S)

Des résultats parfois contradictoires sont ressortis des différentes études sur un éventuel lien entre l'hydrophobicité des caroténoïdes et leur biodisponibilité, notamment en raison de la diversité des modèles utilisés : *in vitro* ([Van Het Hof, Brouwer et al. 1999](#); [Sugawara, Kushiro et al. 2001](#)), *in vivo* chez le poisson ([Tyssandier, Borel et al. 1998](#)), ou *in vivo* chez l'homme mais avec un nombre trop restreint de molécules (régime de 4 semaines en épinards, soit 10,8 mg/j de lutéine et 5 mg/j de  $\beta$ -carotène ([Johnson, Hammond et al. 2000](#))). Il semblerait en fait que ce facteur ne doive pas être considéré globalement au regard de la biodisponibilité, mais qu'il serait significatif à certaines étapes du métabolisme. La lipophilie des caroténoïdes pourrait être un facteur déterminant de leur transfert de l'aliment vers la phase lipidique du bol gastrique et il a été démontré qu'elle est négativement corrélée au transfert des caroténoïdes de la phase lipidique vers les micelles mixtes ([Borel, Grolier et al. 1996](#); [Tyssandier, Lyan et al. 2001](#)). En particulier, les molécules d'oxygène des xanthophylles leur confèrent un caractère plus polaire qui facilite leur incorporation à la périphérie des micelles. En revanche, l'absorption par les entérocytes étant en partie assurée de façon active par des transporteurs protéiques membranaires ([During, Hussain et al. 2002](#); [Reboul, Abou et al. 2005](#); [Moussa, Landrier et al. 2008](#); [Reboul and Borel 2011](#)), on peut penser que la polarité des caroténoïdes est beaucoup moins discriminante à cette étape du métabolisme.

Par ailleurs, les caroténoïdes existent sous plusieurs formes isomères, à la fois dans les aliments et dans l'organisme, mais en proportions différentes. Le  $\beta$ -carotène par exemple circule dans le sang et est présent dans les cellules principalement sous forme tout-*trans*, quelle que soit la quantité de 13-*cis* et 9-*cis* dans l'alimentation ([Stahl, Schwartz et al. 1993](#)). À l'inverse, la forme tout-*trans* du lycopène représente moins de 50 % du lycopène total circulant dans le sang et moins de 25 % dans les tissus humains,

alors qu'il est majoritaire (79 à 91 %) dans les sources alimentaires ([Stahl, Schwartz et al. 1992](#)). Cela est dû à une différence d'efficacité entre les isomères, à la fois pour le transfert vers les micelles mixtes et pour l'absorption intestinale. Par exemple, les isomères 13-, 15- et 9-*cis* du  $\beta$ -carotène sont plus facilement micellisés que le  $\beta$ -carotène tout-*trans* ([Ferruzzi, Lumpkin et al. 2006](#); [O'Sullivan, Galvin et al. 2010](#)). Mais à l'inverse ils sont moins bien absorbés que les isomères *trans* ([Gaziano, Johnson et al. 1995](#)). D'autre part, une partie des isomères *cis*-  $\beta$ -carotène, sont reconvertis en molécules tout-*trans* dans le système gastro-intestinal ([You, Parker et al. 1996](#)). De même, le 13-*cis*-lycopène s'isomériser en majorité en forme tout-*trans*, plutôt que de subir une dégradation oxydative. La distribution des isomères atteint ainsi un équilibre à pH gastrique, avec 16 % de 13-*cis*, 16 % de 9-*cis* et 68 % de tout-*trans* lycopène ([Ferruzzi, Lumpkin et al. 2006](#)). La stabilité des différents isomères est aussi différente. À pH gastrique, l'isomère tout-*trans* est plus stable que le 13-*cis*-lycopène, alors que les isomères du  $\beta$ -carotène formés au cours de la digestion sont tous stables ([Ferruzzi, Lumpkin et al. 2006](#)).

#### 1.1.1.2. Cas des formes estérifiées des caroténoïdes (L)

Parmi les caroténoïdes végétaux, la lutéine et la  $\beta$ -cryptoxanthine sont les deux principaux caroténoïdes existant à la fois sous forme libre et sous forme estérifiée. Il est couramment admis que les formes estérifiées ne sont pas absorbées par l'entérocyte ([Borel 2005](#)). Les formes esters ne modifieraient donc pas la bioconversion des caroténoïdes dans l'entérocyte et dans les lipoprotéines ([Castenmiller and West 1998](#)). Toutefois, des études ont montré que les formes libres et estérifiées de la lutéine sont solubilisées à des teneurs similaires dans les gouttelettes lipidiques ([Amar, Aserin et al. 2003](#)) et induisent ensuite des teneurs plasmatiques en lutéine équivalentes ([Bowen, Herbst-Espinosa et al. 2002](#)). L'hydrolyse des formes esters serait donc très efficace dans l'intestin, peut-être grâce à la cholestérol estérase ([Breithaupt, Bamedi et al. 2002](#)) ([Breithaupt, Bamedi et al. 2002](#)) (il a été démontré en revanche que la lipase pancréatique humaine hydrolyse les esters de rétinol mais n'a aucun effet sur l'hydrolyse des esters de la lutéine ou de la  $\beta$ -cryptoxanthine).

Parmi les caroténoïdes synthétisés par des bactéries (que l'on peut parfois retrouver dans une alimentation à base de poissons ou de crustacés), les formes estérifiées et/ou glycosylées sont nombreuses. Des études ont montré qu'ils sont facilement intégrés dans les bicouches lipidiques ([Pintea, Diehl et al. 2005](#)). Des études complémentaires seraient nécessaires pour connaître leur biodisponibilité et pour savoir s'ils peuvent être

hydrolysés par la cholestérol estérase ([Chureeporn and Failla 2006](#)) ou par des glucosidases.

### 1.1.2. Effets des quantités ingérées (A)

Les résultats diffèrent quant à l'impact des quantités de caroténoïdes ingérés lors d'un repas sur leur biodisponibilité ([Borel 2005](#)). Le pourcentage d'absorption pourrait soit diminuer avec une augmentation des quantités ingérées (atteinte d'un palier, lié à la saturation des micelles, à la compétition pour l'absorption intestinale...), soit augmenter linéairement avec les doses. En outre, il est possible que l'effet de la dose soit différent selon la nature des caroténoïdes. Des études "dose/réponse" supplémentaires, portant sur une plus grande diversité de caroténoïdes, seraient nécessaires pour élucider cette question.

### 1.1.3. Facteurs liés à la matrice alimentaire (M)

#### 1.1.3.1. Forme et localisation des caroténoïdes

Dans la nature, les caroténoïdes sont souvent associés à diverses molécules (ex : protéines, lipides...) ou complexes moléculaires (ex : membranaires...) et cela limite leur libération par la matrice alimentaire et donc leur bioaccessibilité et leur absorption. Lorsque les caroténoïdes sont absorbés sous forme de compléments alimentaires, ils ne sont pas emprisonnés dans une matrice, ce qui aurait tendance à augmenter leur biodisponibilité, en particulier lorsqu'ils sont formulés dans de l'huile. Toutefois, certains caroténoïdes comme la lutéine sont moins biodisponibles dans les suppléments que dans les végétaux, ce qui peut être expliqué par le fait qu'il sont plus sensibles à la dégradation lorsqu'il sont formulés à partir de cristaux purs dans certains suppléments.

Par ailleurs, selon qu'ils sont localisés dans les vacuoles, les pépins ([Rodriguez, Lee et al. 1975](#)), la peau, la chair ou les graines (ex : certaines céréales ([Beyer, Al-Babili et al. 2002](#)), graines oléagineuses) des végétaux, ou encore dans les tissus de réserve de certains animaux (ex : truite), la composition de la matrice retient plus ou moins les caroténoïdes. Dans les légumes verts, par exemple, les caroténoïdes sont emprisonnés dans des structures intracellulaires à plusieurs membranes (les chloroplastes), qui limitent leur bioaccessibilité. Les carotènes sont en outre souvent moins facilement libérés que les xanthophylles en raison de leur localisation et de leur forme. Par exemple :

- les caroténoïdes présents dans les carottes sont sous forme cristalline et sont associés à des protéines dans les membranes de tissus rigides (phloème et le parenchyme du xylème) ([Netzel, Netzel et al. 2011](#)),
- le lycopène est cristallisé et associé aux structures membranaires à la fois dans la peau et dans la pulpe des tomates ([Richelle, Bortlik et al. 2002](#)).

#### 1.1.3.2. Effets des procédés de transformation

La préparation des aliments (légumes cuits, jus, sauces), incluant des étapes mécaniques et thermiques, modifie la structure et les compartiments de stockage des aliments ainsi que les liens intermoléculaires ([Yeum and Russell 2002](#); [Van Buggenhout, Alminger et al. 2010](#)). D'un point de vue mécanique, les procédés doux dénaturent les parois cellulaires, augmentent la libération des caroténoïdes localisés dans les compartiments cellulaires, rompent les complexes caroténoïdes-protéines, réduisent les tailles des particules. Dans les carottes, par exemple, une forte différence de bioaccessibilité entre les formes crues et cuites est essentiellement due au fait que les caroténoïdes sont présents sous forme semi-cristalline ou associés à des protéines à l'intérieur des chloroplastes, alors que la chaleur de la cuisson diminue la rigidité des tissus végétaux et dénature les complexes caroténoïdes-protéines, augmentant ainsi la libération des caroténoïdes ([Aherne, Daly et al. 2010](#)). Autre exemple : le taux de lycopène circulant dans le plasma est 65 % plus élevé après une consommation de sauce tomate qu'après une consommation de tomates crues (alors que la sauce ne contient que 20 % de caroténoïdes en plus). L'effet positif des procédés de transformation sur la libération et l'absorption des caroténoïdes varie aussi selon leur nature. Par exemple, la biodisponibilité du  $\beta$ -carotène des épinards passe de 5,1 % dans des feuilles entières, à 6,4 et 9,5 %, lorsqu'elles sont émincées ou mixées, respectivement ; et celle de la lutéine passe de 45 % à 52 et 55 % respectivement ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

Un chauffage doux peut aussi inactiver des enzymes d'oxydation, augmentant alors la stabilité des caroténoïdes. Toutefois, ces procédés, lorsqu'ils sont trop poussés, ont au contraire pour effet d'augmenter la dégradation et l'oxydation des caroténoïdes. Le chauffage poussé (ébullition, friture), par exemple, augmente l'isomérisation et l'oxydation. De nombreuses études appliquées consistent à identifier des conditions idéales de préparation afin d'obtenir le meilleur compromis entre une haute teneur en caroténoïdes et une forte bioaccessibilité.

#### 1.1.4. Effet des nutriments pouvant modifier l'absorption des caroténoïdes (E)

##### 1.1.4.1. Interactions entre caroténoïdes

Lorsque plusieurs caroténoïdes sont ingérés simultanément, ils peuvent avoir un effet inhibiteur réciproque sur leur absorption, leur métabolisme et leur transport, en particulier en présence de fortes concentrations de caroténoïdes. Les mécanismes proposés sont variés ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)) :

- certains caroténoïdes plus antioxydants peuvent en protéger d'autres dans le tube digestif, augmentant alors leur disponibilité,
- compétition pour l'incorporation dans les micelles mixtes,
- compétition pour l'absorption par les entérocytes ([During, Hussain et al. 2002](#)) ou l'incorporation dans les chylomicrons,
- dans la muqueuse intestinale, les caroténoïdes non absorbés peuvent modifier l'activité d'enzymes de coupure,
- les transferts des caroténoïdes entre les lipoprotéines du plasma et les tissus peuvent être modifiés en fonction de leurs concentrations relatives.

Par exemple, une consommation simultanée d'aliments riches en lycopène (15 mg/j) et en lutéine (12 mg/j) a montré un effet de compétition pour l'incorporation dans les chylomicrons à court terme, mais qui disparaît sur de plus longues périodes ([Tyssandier, Cardinault et al. 2002](#)).

##### 1.1.4.2. Effets d'autres composants de l'alimentation : lipides et fibres

Le caractère apolaire des caroténoïdes explique pourquoi leur métabolisme est fortement associé à celui des lipides. Il a été démontré que la graisse alimentaire consommée en même temps que les caroténoïdes, même en quantités modérées (3 à 5 g de lipides par repas), augmente significativement leur absorption et leur taux dans le plasma ([Jayarajan, Reddy et al. 1980](#)). Toutefois, la teneur optimale de lipides alimentaires induisant une absorption maximale varie selon les caroténoïdes ([van Het Hof, West et al. 2000](#)). Par ailleurs, l'efficacité de l'absorption des caroténoïdes varie avec le type de matières grasses, c'est-à-dire de leur composition en acides gras. Par exemple, le  $\beta$ -carotène serait incorporé dans les chylomicrons plus tôt s'il est ingéré avec un repas contenant des triglycérides à longue chaîne ([Borel, Tyssandier et al. 1998](#)). Il semble également être mieux absorbé avec des huiles riches en acides gras monoinsaturés (acide oléique) qu'avec celles riches en chaînes lipidiques poly-insaturées (acide linoléique et

linoléique) ([Hollander and Ruble 1978](#)). Une étude chez le rat a aussi montré une biodisponibilité de la lutéine dans le sang, le foie et les yeux supérieures lors d'une ingestion avec de l'acide oléique (C18:1) plutôt qu'avec de l'acide linoléique (C18:2) ([Lakshminarayana, Raju et al. 2009](#)).

Les stérols végétaux ont pour propriété d'inhiber l'absorption du cholestérol dans l'intestin. Ils induiraient des effets de compétition pour l'incorporation dans les micelles mixtes et en diminueraient l'hydrolyse des esters de cholestérol. Ils semblent avoir un effet similaire sur les caroténoïdes. Par exemple, une diminution de 50 % de l'absorption du  $\beta$ -carotène est atteinte avec une consommation de 2,2 g/j de stérols végétaux ou de leurs esters ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

Il est par ailleurs probable que certaines fibres alimentaires (pectines, guar, cellulose...) diminuent la bioaccessibilité des caroténoïdes par augmentation de la viscosité du milieu et/ou captation des sels biliaires nécessaires à la formation des micelles mixtes solubilisant les caroténoïdes ([Rock and Swendseid 1992](#); [Hoffman, Liinseisen et al. 1999](#)). L'effet négatif sur la biodisponibilité des caroténoïdes dépend des propriétés des fibres (taille, formation de gels, captation de l'eau ou des acides biliaires) et donc de leur effet sur la viscosité du contenu gastro-intestinal. C'est le cas des alginate, des carboxyméthylcelluloses et des méthylcelluloses qui augmentent la viscosité du milieu. En revanche, les pectines agissent aussi par d'autres mécanismes limitants non-élucidés ([Yonekura and Nagao 2009](#)). Certaines études ont rapporté des liaisons entre la pectine et le cholestérol ([Yonekura and Nagao 2009](#)), il est possible qu'elle interagisse aussi directement avec certains caroténoïdes. L'effet des fibres varie également avec la nature des caroténoïdes. Par exemple, la plupart des fibres inhibent l'absorption du lycopène et de la lutéine, mais seules les fibres solubles (pectines, guar, alginate) semblent avoir un impact sur l'absorption du  $\beta$ -carotène ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

### 1.1.5. Facteurs biologiques

#### 1.1.5.1. Transporteurs membranaires des cellules

Il a longtemps été considéré que les caroténoïdes, tout comme les vitamines E et D, étaient absorbés par les cellules de la muqueuse intestinale uniquement par un phénomène de diffusion passive. Or, des études récentes indiquent que le passage des caroténoïdes à travers les membranes cellulaires des entérocytes implique des processus

actifs grâce à des récepteurs protéiques ([Reboul and Borel 2011](#)). En effet, leur inhibition engendre une diminution de l'absorption des caroténoïdes. Les protéines identifiées jusqu'à présent sont connues pour être des transporteurs du cholestérol, qui ont toutefois une faible spécificité et peuvent donc faciliter l'absorption de divers substrats. Les différentes études disponibles tendent à montrer que ces transporteurs n'ont pas le même effet sur tous les caroténoïdes (affinités variables, part de l'absorption active/passive...) ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

Le récepteur SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) comprend un large domaine extracellulaire et est ancré dans les membranes cellulaires de l'intestin. Il a été démontré qu'il joue notamment un rôle dans l'absorption du lycopène ([Moussa, Landrier et al. 2008](#)), de la lutéine ([Reboul, Abou et al. 2005](#)), de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -carotène et de la  $\beta$ -cryptoxanthine par les entérocytes ([During and Harrison 2007](#)).

Le récepteur CD36 (*cluster determinant 36*) est une glycoprotéine membranaire de surface, impliquée dans l'absorption des acides gras à longue chaîne. Il est présent essentiellement au niveau du duodénum et du jéjunum. Il a des fonctions similaires à SR-BI dans la mobilisation des lipides. Il a été démontré qu'il joue notamment un rôle dans l'absorption du  $\beta$ -carotène par les entérocytes ([van Bennekum, Werder et al. 2005](#)).

La protéine membranaire ABCG5 (*ATP-binding cassette G5*) utilise l'ATP pour le transport des lipides à travers les membranes cellulaires de l'intestin. Une corrélation a été démontrée entre le niveau d'expression du gène de cette protéine et la réponse plasmatique après ingestion de lutéine ([Herron, McGrane et al. 2006](#)).

Il est probable que d'autres protéines membranaires soient impliquées mais elles n'ont pas été identifiées.

#### 1.1.5.2. Effets du statut nutritionnel en micronutriments (N)

Des études chez l'animal ont montré que la teneur plasmatique en vitamine A, en rétinoïdes et en caroténoïdes influence le métabolisme des nouveaux caroténoïdes ingérés et, en particulier, limite le clivage de l' $\alpha$ -carotène, du  $\beta$ -carotène et de la  $\beta$ -cryptoxanthine en molécules de rétinol ([Bachmann, Desbarat et al. 2002](#)). En effet, il s'agirait d'un rétro-contrôle évitant l'accumulation de quantités trop élevées de vitamine A, qui est toxique en cas d'excès ([Borel 2005](#)). Une étude chez l'homme a montré qu'une

supplémentation de vitamine A entraîne une augmentation de l'absorption du  $\beta$ -carotène, une très forte diminution de l'excrétion urinaire du  $\beta$ -carotène et une baisse significative du ratio rétinyl ester /  $\beta$ -carotène au niveau de l'absorption intestinale ([Lemke, Dueker et al. 2003](#)) : le  $\beta$ -carotène est alors fortement absorbé (mécanisme non-élucidé) mais peu converti en vitamine A.

#### 1.1.5.3. Effets de facteurs génétiques (G)

Les résultats de plusieurs études associant des complémentations en caroténoïdes chez l'homme et l'évaluation de l'expression de gènes candidats, ont permis de mettre en évidence l'importance de la variabilité allélique de certaines protéines sur la différence d'efficacité d'absorption des caroténoïdes entre individus ([Borel 2011](#)). Les principaux gènes candidats sont des enzymes de coupure comme BCMO1 (15,15'- $\beta$ , $\beta$ -carotène-monoxygénase) et BCDO2 (9,10- $\beta$ , $\beta$ -carotène-dionoxygénase), des transporteurs membranaires de l'entérocyte des tissus de réserve comme SR-BI (*scavenger receptor class B type I*), CD36 (*Cluster Determinant 36*) et NPC1L1 (*Niemann Pick C1-like 1*), des transporteurs membranaires de la rétine comme GSTP1 (*glutathione S-transferase Pi 1*) et HR-LBP (*human retinal lutein-binding protein*), et d'autres protéines dont le rôle dans la biodisponibilité est encore mal déterminé comme ABCG5 (*ATP-binding cassette sub-family G member 5*) et FABPs (*fatty acid binding proteins*). Il a été démontré que des polymorphismes portant sur un nucléotide de ces gènes (ou à proximité) pouvaient altérer l'absorption de certains caroténoïdes. Par exemple :

- l'absorption de la lutéine dépend de BCMO1 et des transporteurs ABCG5 et CD36,
- l'absorption de la zéaxanthine dépend de BCMO1,
- l'absorption du  $\beta$ -carotène dépend de la lipoprotéine lipase (LPL), de BCDO2 et BCMO1 et du transporteur SR-BI,
- l'absorption de l' $\alpha$ -carotène dépend de la LPL et du transporteur SR-BI,
- l'absorption de la  $\beta$ -cryptoxanthine dépend la LPL et du transporteur SR-BI
- l'absorption du lycopène dépend de BCMO1 et des transporteurs FABP et FABP2.

#### 1.1.5.4. Variabilité inter-individuelle (H)

La réponse plasmatique à une consommation d'aliments riches en caroténoïdes varie avec l'âge des individus pour certains caroténoïdes. En effet, une étude a montré que le  $\beta$ -carotène (*cis* ou *trans*), l' $\alpha$ -carotène et la lutéine sont présents en concentrations identiques chez les jeunes (20-35 ans) et les séniors (60-75 ans), alors que le lycopène est 40 % moins absorbé chez le groupe de population le plus âgé ([Cardinault, Tyssandier et al. 2003](#)). Une hypothèse serait que la fréquence des pathologies intestinales augmentant avec l'âge et induisant une acidification dans l'intestin, ceci réduirait l'efficacité de l'absorption des caroténoïdes les plus hydrophobes. En effet, l'acidité du contenu intestinal fait partie des divers facteurs pouvant faire varier la diffusion des caroténoïdes à travers les membranes cellulaires, car elle neutralise les charges négatives à la surface des micelles et des membranes cellulaires ([Hollander 1981](#)).

L'absorption du  $\beta$ -carotène est par ailleurs plus importante chez les femmes que chez les hommes, mais cela pourrait être attribué aux différences morphologiques (poids et composition corporelle) entre individus ([Castenmiller and West 1998](#)).

Chez certaines personnes, le taux de  $\beta$ -carotène circulant n'augmente pas malgré une consommation d'aliments riches en  $\beta$ -carotène. Diverses hypothèses ont été proposées ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)) :

- altération de l'absorption par la muqueuse intestinale (inhibition de l'expression des transporteurs, diminution de la perméabilité membranaire...),
- conversion importante en vitamine A,
- diminution de l'incorporation dans les chylomicrons,
- altération du métabolisme des lipoprotéines.

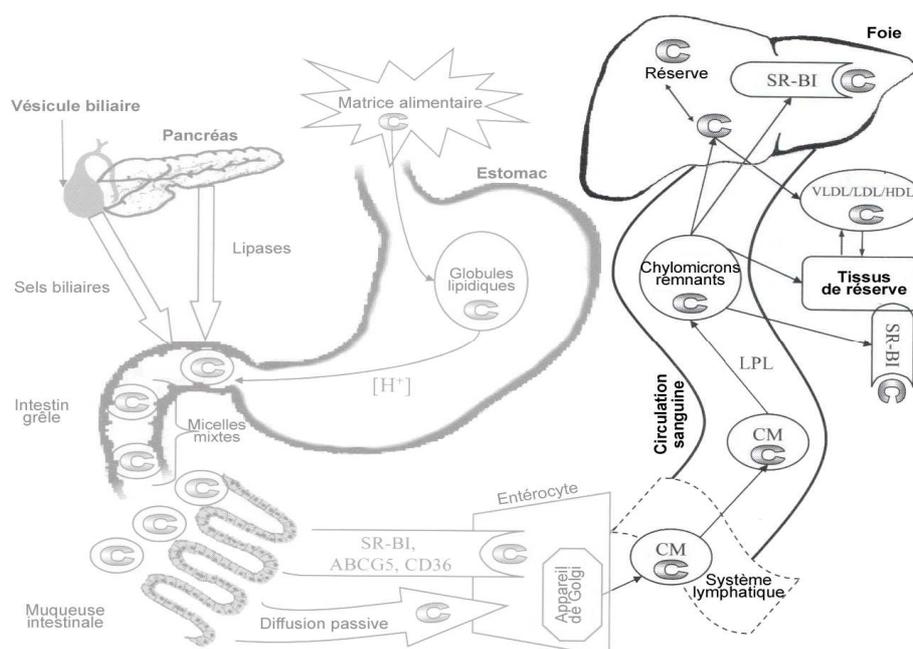
Enfin, l'apparition d'infections peut altérer la biodisponibilité des caroténoïdes ([Castenmiller and West 1998](#)). Cet effet est fréquemment observé chez les populations des pays en voie de développement, confrontées aux infections parasitaires. Les parasites peuvent soit entrer en compétition pour l'absorption des caroténoïdes, soit modifier le fonctionnement normal du tube digestif ([Das, Thurnham et al. 1996](#)).

### 1.1.6. Interactions mathématiques entre les facteurs (I)

Tous les facteurs décrits précédemment sont susceptibles d'intervenir simultanément. Certaines interactions peuvent aussi intervenir. Toutefois, il est difficile d'évaluer quantitativement leurs effets relatifs.

### 1.2. Données sur l'accumulation des caroténoïdes et la distribution dans les tissus

Après passage de la barrière intestinale, les chylomicrons contenant les caroténoïdes sont hydrolysés dans le sang. Les caroténoïdes sont alors véhiculés entre la circulation générale, les tissus de réserve et les tissus périphériques de l'organisme par plusieurs autres lipoprotéines (figure 65) : chylomicrons remnants (du sang vers le foie), VLDL (du foie vers le sang), LDL (du sang vers les tissus de réserve et périphériques), HDL (des tissus de réserve vers le sang).



**Figure 65 :** Représentation du transport des caroténoïdes (C), de la face basolatérale des entérocytes vers la circulation et les tissus de réserve. Entrée dans le système lymphatique par transport à l'intérieur des chylomicrons (CM) - hydrolyse des chylomicrons dans le sang par la lipoprotéine lipase (LPL) - captation des chylomicrons résiduels (remnants) par le foie - caroténoïdes hépatiques soit stockés dans le foie, soit sécrétés dans la circulation et transportés dans les lipoprotéines (VLDL et LDL) puis acheminés vers d'autres tissus de l'organisme.

### 1.2.1. Caroténoïdes circulants

Après l'ingestion, le pic de concentration des caroténoïdes circulants est atteint entre 24 et 48 heures plus tard chez l'homme ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)). C'est le temps nécessaire pour que les chylomicrons riches en caroténoïdes passent dans le foie, soient hydrolysés et pour que les caroténoïdes soient renvoyés dans le sang ([Borel 2005](#)).

Les concentrations mesurées pour les principaux caroténoïdes dans le plasma (55 % du volume sanguin) sont de 0,43 à 0,66  $\mu\text{mol/L}$  pour le lycopène, 0,35 à 0,69  $\mu\text{mol/L}$  pour le  $\beta$ -carotène, 0,22 à 0,43  $\mu\text{mol/L}$  pour la lutéine, 0,21 à 0,37  $\mu\text{mol/L}$  pour la  $\beta$ -cryptoxanthine, 0,08 à 0,22  $\mu\text{mol/L}$  pour l' $\alpha$ -carotène et 0,03 à 0,12  $\mu\text{mol/L}$  pour la zéaxanthine. De plus, la présence de fortes concentrations de cholestérol et de triacylglycérol circulants favorise le transport des caroténoïdes ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)).

### 1.2.2. Répartition dans les tissus de réserve et les organes cibles

Tous les caroténoïdes circulants sont aussi présents dans les tissus de l'organisme, dans des concentrations très variables.

Il semblerait que la distribution tissulaire de certains caroténoïdes dans ces tissus dépende en partie des quantités de récepteurs aux LDL et aux HDL (ex : SR-B1) à leur surface. En effet, certains des récepteurs protéiques des entérocytes ont également été retrouvés au niveau des organes de réserve et des organes périphériques ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)). Le récepteur SR-B1 est connu dans le transport des lipides et du cholestérol entre les lipoprotéines et les tissus de réserve. Il est présent dans les membranes cellulaires des glandes surrénales, des ovaires, du placenta, des reins, de la prostate et du foie. Le récepteur CD36, impliqué dans l'absorption des LDL est présent au niveau des adipocytes, où il facilite le transport du lycopène ([Moussa, Gouranton et al. 2011](#)). La protéine ABCG5 utilise aussi l'ATP pour le transport des lipides à travers les membranes cellulaires dans le foie.

Globalement, le foie, les glandes surrénales et les organes reproducteurs contiennent des concentrations de caroténoïdes dix fois plus élevées que les autres tissus, y compris le tissu adipeux ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)). Mais étant donné leur taille, le foie et le tissu adipeux sont les principaux tissus de stockage.

Le foie contient environ 80 % des caroténoïdes absorbés ([Borel 2005](#)). La caractérisation des liaisons caroténoïdes-protéines dans le foie a montré que les caroténoïdes sont localisés au niveau des membranes cellulaires et mitochondriales ([Lakshman and Manjunath 1999](#)).

Le tissu adipeux contient environ 10 % des caroténoïdes totaux. Les concentrations dans le tissu adipeux sont considérées comme des marqueurs de l'effet d'une consommation chronique de caroténoïdes ([Borel 2005](#)).

Les yeux ne contiennent que quelques caroténoïdes : essentiellement de la lutéine et de la zéaxanthine, un peu de lycopène et leurs métabolites ([Bone, Landrum et al. 2000](#)). Une protéine, la glutathione Pi S-transférase, est un récepteur des xanthophylles au niveau de la macula chez l'homme.

D'autres tissus périphériques comme les ovaires, les testicules, les glandes surrénales ou la prostate accumulent des caroténoïdes de nature et en quantités variables ([Kaplan, Lau et al. 1990](#)), probablement en raison de facteurs qui modifient la captation des caroténoïdes. Les glandes surrénales, par exemple, contiennent de nombreux récepteurs au cholestérol, qui est utilisé pour la synthèse d'hormones stéroïdes. Or, ces récepteurs augmentent également l'incorporation de caroténoïdes et de leurs précurseurs présents dans l'alimentation (par exemple le phytoène et le phytofluène) ([Kaplan, Lau et al. 1990](#)).

### 1.3. Méthodes *in vitro* et *in vivo* pour évaluer la biodisponibilité, pertinence

La biodisponibilité des micronutriments est étudiée à la fois *in vitro*, à l'aide de modèles acellulaires et cellulaires, et *in vivo* à l'aide de modèles animaux ou chez l'homme. Des études cliniques chez l'homme sont nécessairement requises pour déterminer de façon exacte la biodisponibilité et le métabolisme des caroténoïdes ([Rodriguez-Amaya 2010](#)). Plusieurs méthodes existent pour l'estimer ([Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)) :

- une des premières méthodes qui a été utilisée est la détermination du *ratio* ingestion/excrétion. Elle ne prend pas en compte la dégradation des caroténoïdes au cours de la digestion, ni l'éventuelle excrétion des caroténoïdes endogènes ;
- une adaptation plus récente de la méthode précédente est l'utilisation d'isotopes stables de caroténoïdes, qui permettent un suivi sur une plus longue période, de déterminer la conversion en vitamine A dans l'intestin, et d'estimer l'absorption et le métabolisme des caroténoïdes sans artefact dû aux caroténoïdes endogènes ;
- la réponse plasmatique consiste à mesurer les changements de la concentration en caroténoïdes dans le sérum ou le plasma sanguin. Cette méthode est similaire à celle utilisée en pharmacie pour tester les médicaments et évaluer la biodisponibilité relative de plusieurs caroténoïdes. Toutefois, elle est limitée par les variabilités inter-individuelles, ne donne aucune indication sur l'absorption intestinale ni le taux de dégradation et ne prend pas en compte le stockage des caroténoïdes dans les autres tissus.
- l'analyse de la concentration de caroténoïdes et de rétinyl esters dans les différentes fractions lipoprotéiques du sang permet de distinguer les caroténoïdes récemment absorbés (dans les chylomicrons et chylomicrons résiduels) et ceux provenant des tissus de réserve (dans les LDL et les HDL). Cette méthode est couramment utilisée pour les études de biodisponibilité, mais ne permet pas de faire la différence entre les caroténoïdes des chylomicrons résiduels ou des VLDL (qui proviennent du foie), car ils sont difficilement séparables par ultracentrifugation ;
- la spectroscopie Raman peut être utilisée pour mesurer les caroténoïdes *in situ* dans la peau et la rétine.

Ces types d'essais cliniques restent toutefois très onéreux et difficiles à mettre en place. Des systèmes modèles ont été développés et permettent de mieux comprendre les mécanismes de digestion et d'absorption.

### 1.3.1. Méthodes de digestion et d'absorption *in vitro*

Les systèmes de digestion *in vitro* modélisent les diverses phases de la digestion et permettent de mieux comprendre chaque étape de la digestion des caroténoïdes (transfert à partir de la matrice alimentaire, effets du pH, des enzymes ou des sels biliaires sur l'incorporation dans les micelles puis l'absorption...). De nombreux chercheurs ont ainsi adapté et utilisé un dispositif mis en place par Miller *et al.* en 1981 ([Garrett, Failla et al. 1999](#); [Granado-Lorencio, Olmedilla-Alonso et al. 2007](#); [Canene-Adams and Erdman Jr 2009](#)), constitué de deux étapes. Brièvement, une digestion initiale est réalisée à l'aide d'un mélange de pepsine et d'HCl, pendant 1 à 2 heures, à 37°C, pour simuler les conditions gastriques. Elle est suivie d'une digestion en présence de sels biliaires et de pancréatine pendant 2 heures à 37°C, pour simuler les conditions régnant dans l'intestin. Ces protocoles ont parfois été réduits à deux phases de 30 minutes pour l'étude de vitamines et de certains caroténoïdes ([Reboul, Richelle et al. 2006](#)). Ce genre d'expérimentations est très utilisé pour estimer la bioaccessibilité des composés phénoliques ou d'antioxydants, c'est-à-dire leur relargage hors de la matrice alimentaire (fruits...) et leur disponibilité pour l'absorption à travers l'intestin. Il est aussi utilisé pour étudier la stabilité ou la transformation de microconstituants au cours de la digestion.

Pour les études *in vitro* d'absorption intestinale, le modèle de cellules Caco-2 est le plus fréquemment utilisé pour évaluer le transport de divers nutriments (acides gras, cholestérol, caroténoïdes, vitamines...) au niveau de la paroi de l'intestin. Il donne des résultats avec une bonne reproductibilité et qui sont bien corrélés aux données connues *in vivo* ([Artursson and Karlsson 1991](#)). Les cellules Caco-2 se différencient spontanément en monocouches de cellules polarisées (une face apicale permettant l'absorption et une face basolatérale pour les sécrétions) et présentent des caractéristiques morphologiques et biochimiques similaires à celles des entérocytes humains après différenciation. Par ailleurs, le clone TC-7 est plus homogène que la lignée mère des cellules Caco-2 et il possède une activité  $\beta$ -carotène-15,15'-dioxygénase, comme dans l'organisme humain ([During, Albaugh et al. 1998](#); [Grès, Julian et al. 1998](#)).

La combinaison entre le modèle de digestion *in vitro* simulant le compartiment gastrique et des cultures de Caco-2 permettant d'évaluer l'absorption intestinale s'est avérée un outil fiable ([Rodriguez-Amaya 2010](#)). C'est la méthode la plus souvent utilisée pour évaluer les effets de facteurs alimentaires tels que la nature chimique des nutriments, la matrice alimentaire ou les procédés de transformation sur la biodisponibilité d'ions ou de composés organiques. Des études ont démontré que ces systèmes modèles donnent des résultats cohérents avec ceux des études chez l'homme, malgré une certaine variabilité entre les différents protocoles, ce qui atteste de leur validité ([Reboul, Richelle et al. 2006](#); [Rodriguez-Amaya 2010](#)).

Concernant les quatre caroténoïdes de référence utilisés dans cette étude, les expériences effectuées à partir d'aliments naturellement riches en caroténoïdes ont tout d'abord montré une stabilité importante (environ 80 %) lors des procédés de digestion *in vitro* ([Chureeporn, Schwartz et al. 2004](#); [Ferruzzi, Lumpkin et al. 2006](#); [Granado-Lorencio, Olmedilla-Alonso et al. 2007](#); [Pullakhandam and Failla 2007](#)).

La bioaccessibilité du  $\beta$ -carotène est très variable en fonction des types d'aliments testés, de 2 % à partir des courges, des épinards ou des carottes crues, à environ 15-20 % à partir des carottes cuites ([Garrett, Failla et al. 1999](#); [Chureeporn, Schwartz et al. 2004](#); [Reboul, Richelle et al. 2006](#); [Aherne, Daly et al. 2010](#)). Dans le cas du lycopène, il a été montré que même si environ 20 % de la quantité présente dans les aliments peuvent être transférés dans la phase aqueuse du milieu gastrique à l'issue de la digestion, seulement 2 % sont finalement micellisés en raison de la forte cristallisation de cette molécule linéaire ([Garrett, Failla et al. 1999](#); [Reboul, Richelle et al. 2006](#)). La lutéine est un caroténoïde particulièrement bien micellisé, quelles que soient les sources alimentaires. Les mesures effectuées à l'aide du modèle de digestion *in vitro* à partir de divers légumes (tomates, feuilles d'épinards blanchies, émincées ou en purée) ont systématiquement donné des résultats de bioaccessibilité entre 35 et 55 % ([Garrett, Failla et al. 1999](#); [Chureeporn, Schwartz et al. 2004](#); [Reboul, Richelle et al. 2006](#); [Pullakhandam and Failla 2007](#)). L'astaxanthine a en revanche plus rarement été étudiée *in vitro*.

Les études précédentes consistant à incuber des micelles mixtes riches en caroténoïdes (obtenues par digestion *in vitro*) sur des cultures de cellules Caco-2 rapportent des résultats d'efficacité d'absorption assez variables : 3 à 10 % pour la lutéine, 8 à 18 % pour l'astaxanthine et environ 5 % pour le  $\beta$ -carotène ([Dhuique-Mayer, Borel et al. 2007](#); [O'Sullivan, Ryan et al. 2007](#); [Netzel, Netzel et al. 2011](#)). Cette variabilité peut être

en partie expliquée par les différences de concentrations de caroténoïdes déposées sur les cellules et par les temps d'incubation choisis, deux facteurs susceptibles de modifier plus ou moins l'efficacité d'absorption selon les molécules. En effet, l'absorption intestinale augmente de façon linéaire avec la concentration de caroténoïdes, jusqu'à atteindre un état de saturation ([Garrett, Failla et al. 1999](#); [O'Sullivan, Ryan et al. 2007](#)), et de façon curviligne au cours du temps (sur plusieurs heures) ([Garrett, Failla et al. 1999](#); [Liu, Glahn et al. 2004](#)).

### 1.3.2. Bilans organiques chez l'animal

L'utilisation de modèles animaux en complément des études *in vitro* présente l'avantage d'avoir accès aux tissus de réserve, ce qui permet de mieux comprendre le métabolisme et la distribution des caroténoïdes dans l'organisme ([Rodriguez-Amaya 2010](#)).

Plusieurs modèles animaux sont disponibles pour l'étude des caroténoïdes. Aucun ne reproduit totalement les mécanismes physiologiques d'absorption et de métabolisme des caroténoïdes chez l'homme. Le choix du modèle d'étude doit surtout prendre en considération les objectifs spécifiques de chaque étude, mais aussi les coûts et les autorisations et réglementations éthiques liés à chaque animal ([Lee, Boileau et al. 1999](#)). Par exemple, les gerbilles et les furets sont les meilleurs modèles pour l'étude de l'absorption et du métabolisme des caroténoïdes. Les gerbilles permettent également d'évaluer l'effet des caroténoïdes sur les risques de maladies cardiovasculaires et la fonction immunitaire. Toutefois, ces deux animaux requièrent que les animaleries de laboratoire soient agréées pour travailler avec des espèces sauvages, ce qui est rarement le cas. Les veaux préruminants sont aussi un bon modèle et sont en outre adaptés aux études des déficits en vitamine A et à l'étude des effets des caroténoïdes sur la fonction immunitaire, mais il s'agit de modèles beaucoup plus coûteux et nécessitant des installations nettement plus imposantes que les autres animaux. Malgré leurs similitudes avec l'homme, les primates sont très rarement utilisés pour les études de nutrition, car ils sont coûteux, requièrent beaucoup de soins, sont des espèces protégées donc peu disponibles, et présentent des résultats très variables selon les espèces. Les rats et souris sont très souvent utilisés pour les études sur les caroténoïdes, car ils sont bien caractérisés, leur génome est parfaitement connu et de nombreuses espèces sont disponibles. Ils sont également faciles à manipuler en animalerie. Ce sont de bons modèles pour l'absorption des caroténoïdes car ils peuvent absorber une grande diversité de molécules. Toutefois, ils ne sont pas parfaits pour les mesures de métabolisation car ce

sont des animaux qui métabolisent très fortement les caroténoïdes pro-vitaminiques A. C'est la raison pour laquelle les études sont parfois effectuées avec des doses supraphysiologiques (au-delà de 1 mg/kg). Ces rongeurs sont par ailleurs des modèles assez complets puisqu'ils permettent d'évaluer l'effet des caroténoïdes sur diverses pathologies (déficit en vitamine A, risque cardiovasculaire, fonction immunitaire, inflammation du tissu adipeux). D'autres animaux comme les cochons, hamsters, poussins et lapins ont parfois été sélectionnés pour certaines études. La caille, par exemple, est aujourd'hui l'animal privilégié pour l'étude de l'effet des caroténoïdes sur la rétine, car sa macula est très similaire à celle de l'homme.

Dans tous les cas, l'extrapolation des résultats à l'homme doit être faite avec beaucoup de précautions, en prenant en compte les différences physiologiques majeures (vitesses du métabolisme, nature des enzymes de digestion...)

Dans les études faisant état de gavages effectués sur des rats sur de courtes périodes avec des doses physiologiques de caroténoïdes (gavages simples ou multiples avec des doses d'environ 20 µg par animal, soit 100 µg/kg) ([Baskaran, Sugawara et al. 2003](#); [Lakshminarayana, Raju et al. 2006](#); [Raju, Lakshminarayana et al. 2006](#); [Lakshminarayana, Raju et al. 2009](#); [Marisiddaiah and Baskaran 2009](#); [Mamatha and Baskaran 2011](#)), ces quantités se sont avérées suffisantes pour mettre en évidence une augmentation de la concentration de caroténoïdes en post-prandial dans le foie (environ 100 pmol/g pour la lutéine et 80 pmol/g pour le β-carotène) et dans le plasma (les taux maximums sont retrouvés 2 à 4 heures après l'ingestion et sont d'environ 40 pmol/mL pour la lutéine et 30 pmol/mL pour le β-carotène). Cette augmentation reste visible à plus long terme dans le plasma (par exemple, 4 à 7 pmol/mL de lutéine chez des rats à jeun après le dernier gavage).

## 2. PUBLICATION V - BIOAVAILABILITY OF CAROTENOIDS FROM SPORE-FORMING BACILLUS STRAINS, USING *IN VITRO* AND *IN VIVO* MODELS

*Journal of Nutrition, en préparation pour soumission*

CHARLOTTE SY<sup>1-5</sup>, BEATRICE GLEIZE<sup>1-3</sup>, STEPHANIE CHAMOT<sup>4,5</sup>, FREDERIC CARLIN<sup>4,5</sup>, OLIVIER DANGLES<sup>5,4</sup>, JEAN-FRANÇOIS LANDRIER<sup>1,3</sup>, CATHERINE CARIS VEYRAT<sup>4,5</sup>, & PATRICK BOREL<sup>1-3\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1260, "Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques", F-13385, Marseille, France

<sup>2</sup> INSERM, ERL 1025, "Biodisponibilité des Micronutriments", F-13385, Marseille, France

<sup>3</sup> Aix-Marseille Univ, Faculté de Médecine, F-13385, Marseille, France

<sup>4</sup> INRA, UMR408, "Safety and Quality of Plant Products", 84000, Avignon, France

<sup>5</sup> Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408, 84000, Avignon, France

\* Corresponding author. E-mail address: patrick.borel@univmed.fr

### ABSTRACT

Carotenoids are lipid microconstituants of the human diet. Though they are thought to have beneficial effect on human health, their bioavailability is very low. Pigmented bacterial strains have gained interest for their potential to provide natural carotenoids with original structures and that might have improved solubility and stability during digestion. In this study, bioaccessibility, absorption efficiency and tissue distribution of bacterial carotenoids from two spore-forming *Bacillus* strain, HU36 and GB1, were investigated. Their nutritional potential was evaluated by comparison with the widely used  $\beta$ -carotene. In addition, we evaluated the impact of the form in which those carotenoids are ingested (either as pure molecules or enclosed in lyophilized bacterial material), on their bioavailability and their concentration in blood and reserve tissues. Results of *in vitro* digestion, together with complementary incorporation/transfer experiments in artificial mixed micelles, showed that bioaccessibility of bacterial carotenoids is higher than that of  $\beta$ -carotene, essentially because of their higher polarity and thus their higher solubility. When bacterial carotenoids were used as pure molecules, the most apolar carotenoids of the cocktails were less stable than the others, and were found in lower amounts in mixed micelles at the end of the digestion procedure. When bacterial carotenoids were used enclosed in lyophilized bacterial material, most of them were released in the medium during gastric digestion (the first phase of digestion), being then available for incorporation in mixed micelles in the presence of bile salts during duodenal digestion. Then, our experiments with Caco-2 cells revealed that bacterial carotenoids are readily absorbed by the human intestinal cell, with efficiency similar to the one of  $\beta$ -carotene. We also highlighted the absence of selectivity between the diverse carotenoids in the bacterial cocktails. The *in vivo* bioavailability study on rats revealed that HU36 carotenoids were slightly more bioavailable than  $\beta$ -carotene and GB1 carotenoids. We also showed that, after three days force-feeding, bioavailability in the post-prandial period was almost totally given by the amount of carotenoids recovered in the liver plus adipose tissue while blood concentration was not a valid marker. Finally, the form of carotenoids (as pure molecules or in lyophilised bacterial material) did not impact their global bioavailability but significantly influenced their distribution between liver and adipose tissue.

**KEYWORDS:** bacterial carotenoids, vegetative cells, spores,  $\beta$ -carotene, *in vitro* digestion model, micelles, bioaccessibility, Caco-2, intestinal absorption, rat.

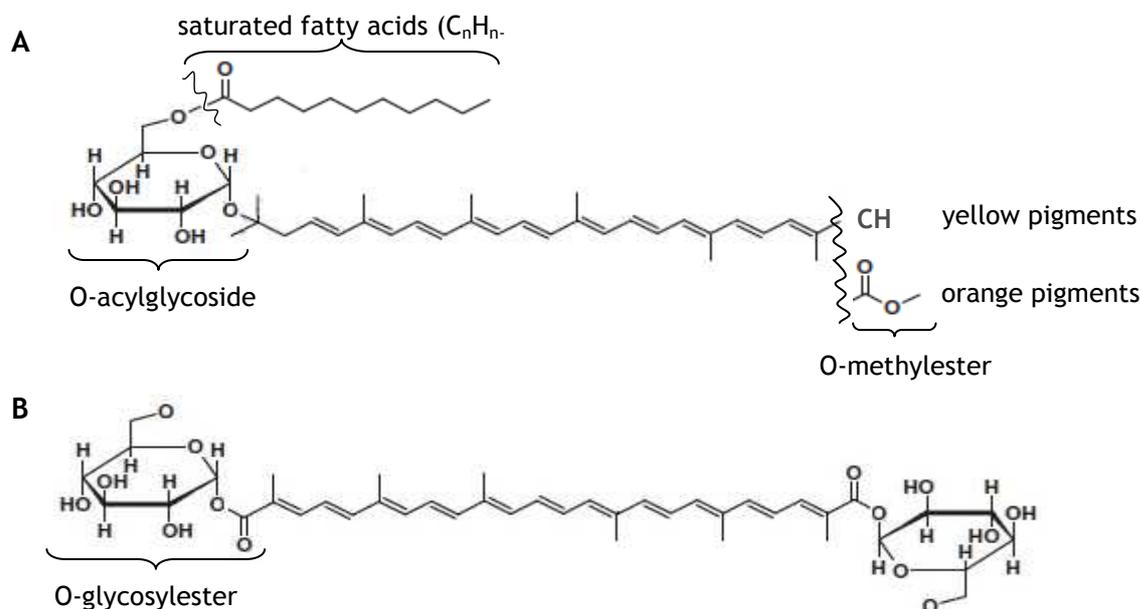
## INTRODUCTION

Carotenoids are lipophilic micronutrients not biosynthesized by humans but widespread in nature and that may have important beneficial properties for human health when ingested with the diet [1-3]. Epidemiological studies have associated the consumption of carotenoid-rich food (especially fruits and vegetables) with reduced risks of age-related macular degeneration, the incidence of certain cancers, inflammation or cardiovascular diseases [4-8]. Their role on health is assured by antioxidant activity [9], signalling pathways [10], and expression of genes [7,11].

However, carotenoids potential beneficial effects on cell protection are obviously linked to the concentrations of these molecules in blood and tissues and depend on food intake, metabolism and transport through the organism. Bioavailability, defined as the fraction of dietary carotenoids that is recovered in target tissues to exert its biological effects, is very variable and requires release from the food matrix, mixed micelle formation, uptake into intestinal mucosal cells, packing into chylomicrons, and secretion into the lymphatic system. These critical steps are influenced by a complex set of factors like carotenoid species, interactions, food matrix or nutrient status and genetic factors of the host [12]. Bioavailability refers to the fraction of the carotenoid ingested that becomes available for utilization in normal physiological functions or for storage in the human body.

Health promoting properties have lead to substantial interest in carotenoids as nutritional supplements, especially from natural sources [13].  $\beta$ -Carotene was one of the first carotenoids to arouse interest and it is one of the natural occurring molecules which have been intensively studied for a long time now. The use of  $\beta$ -carotene is also very dynamic in functional foods. It has good pigment properties and fundamental roles as the main precursor of vitamin A [4,14] and as abioactive compound [15-17]. Besides, bacterial carotenoid sources have gained interest in the past years due to their ability to act as probiotics and their potential to provide a suitable biosource of a diverse range of carotenoids with both C40 and C30 backbones [18] and with improved solubility and stability for the food and feed industry [13]. A diverse range of spore-forming *Bacillus* species has also been isolated that contain various red, pink or yellow-orange carotenoid pigments. Among bio-and genotypes *Bacillus* ssp., the *B. indicus* HU36 and mutant *B. firmus* GB1 strains are of a particular interest for their high production of carotenoids, the resistance of their spores to UV-radiations [19] and their amenable probiotic properties [20]. The HU36 strain was isolated in human faeces and synthesis orange-yellow pigments in variable proportions depending whether they are in the vegetative cell or spore forms [19]. The corresponding extract of carotenoids absorbs visible light at 429, 454, 485 nm.

The most abundant pigments in the extract were determined as 1-glycosyl-3-4-dehydro-8'-apolycopene and methyl-1-glycosyl-3-4-dehydro-8'-apolycopenoate esters with fatty acid secondary chains from C7 to C15 (figure 1A) [18]. The GB1 strain was isolated from human ileum and produces deep-pink pigments which absorb at 463, 492, 524 nm [19], the main one being 4,4'-diglycosyl-4,4'-diapolycopenoic diester, figure 1B).



**Figure 1.** Chemical structures of the main carotenoids synthesised by (A) HU36 and (B) GB1 spore-forming strains.

In this study, bioavailabilities of total carotenoids found in HU36 or GB1 vegetative cells and spores were measured both *in vitro* and in an animal model. Bioavailability data of these bacterial pigments were compared to the ones of  $\beta$ -carotene, used as a reference molecule naturally present in food. *In vitro* trials aimed at assessing the transfer of carotenoids from the food matrix (or bacterial material) to digestion mixed micelles formed of lipids and bile salts (the physiological transport form of carotenoids), and then through enterocytes, were made using a two-step sequential digestion procedure coupled with a Caco-2, TC-7 cell model of the intestinal barrier. Additional experiments were set up to assess: *i*) the bacterial status during the digestion process; *ii*) solubility, micellarization and uptake mechanisms of the carotenoids. All trials were made in triplicates. Then, *in vivo* experiments on a rat model gave further assessments about carotenoid transfers between plasma and accumulation tissues and the importance of peripheral organs in the estimation of carotenoid bioavailability.

## MATERIALS AND METHODS

**Supplies and chemicals.** Foods were purchased from a local supermarket and chosen without antioxidants, acidifiers or preservatives: canned steamed carrot kept with sugar, salt and water (Daucy), plain yogurt (Danone). Novel carotenoid extracts from *Bacillus* strains (HU36 and GB1) and lyophilized cells were displayed by members of the COLORSPORE project's consortium (Small Collaborative Project No. 207948, funded by FP7 and coordinated by the Royal Holloway University of London) [13]. Pure all-*trans*  $\beta$ -carotene (> 95%) was kindly provided by DSM LTD (Basel, Switzerland). Salts (NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), mucin,  $\alpha$ -amylase, pepsin, porcine pancreatin and porcine bile extract, were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). 2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (phosphatidylcholine), 1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lysophosphatidylcholine), mono-olein, free cholesterol, oleic acid, sodium taurocholate, pyrogallol, were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). FBS (foetal bovine serum) was purchased from Biomedica (Issy-les-Moulineaux, France). DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing 4.5 g/L glucose and trypsin/EDTA (500 and 200 mg/L respectively), non-essential amino acids, penicillin/streptomycin, PBS (phosphate buffered saline solution) and PBS containing 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> and 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (PBSCM) were from Gibco® BRL (Cergy-Pontoise, France). Apo-8'-carotenal (> 95%) used as internal standard for HPLC carotenoid analysis, was from Fluka. Pyrogallol (used as antioxidant preservative) was from Sigma Life science (St-Quentin-Fallavier, France). Hexane, methanol, dichloromethane and methyl-*tert*-butyl-ether (MTBE) were of HPLC grade and purchased from Carlo Erba Reactifs SDS (Val-de-Reuil, France). The Uptima bicinchoninic acid assay (BC assay) protein quantification small kit was from Interchim (Montluçon, France).

**Preparation of the test meals used in the in vitro digestion experiments to measure carotenoid bioaccessibility.** Experiments were made twice for each carotenoid (or carotenoid cocktail); first by using pure molecules ( $\beta$ -carotene crystals and bacterial extracts provided by the project partners, which were purified by liquid chromatography before the study) in order to measure the intrinsic bioaccessibility of carotenoids (*i.e.* without the effect of the food matrix), then with foods rich in each carotenoid studied. For experiments with pure carotenoids, stock solutions were dispersed in groundnut oil and evaporated to obtain concentrations of about, but precisely, 750  $\mu$ mol/L in oil. The first digestions were conducted on the oil alone, while for experiments with foods, the food sources of carotenoids were codigested with a standard meal (table 1). The

meal composition was chosen in order to be close to the proportions of each macronutrient (lipids, carbohydrates and proteins) found in regular meals. Potatoes were boiled in tap water, peeled, and hand-pureed. Meat was fried medium in a frying-pan without added fat. Potato puree and fried meat were divided into aliquots and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The food source of  $\beta$ -carotene was chosen so as to provide a high amount of the carotenoid, *i.e.* carrot purée. The digestion of carrot purée was compared to the one of carotenoid-enriched yogurts, *i.e.* lyophilized cells and spores of HU36 and GB1, homogenized in plain yogurts (see table 2). The similar textures limit the variability due to food preparation.

**Table 1:** Composition of the test meals used in the *in vitro* digestion experiments performed to measure carotenoid bioaccessibility.

Experimental conditions	Components	Amount (g) *
with isolated carotenoids	- groundnut oil (containing about but precisely 40 $\mu\text{g}$ carotenoids)	$0.1 \pm 0.02$
	- NaCl 0.9%	$32.0 \pm 0.01$
with carotenoid-rich foods	- potato purée	$6.7 \pm 0.02$
	- beef meat	$1.2 \pm 0.02$
	- olive oil	$0.1 \pm 0.02$
	- carotenoid-rich food	$4.0 \pm 0.02$ **
	- NaCl 0.9%	$32.0 \pm 0.01$

The test meal without carotenoid-rich sources contained 64.5% energy as carbohydrates, 14.5% as fat, and 21.0% as proteins. These proportions are close to US- dietary recommended intake in macronutrients, *i.e.*, 45-65% carbohydrates, 20-35% fat, and 10-35% proteins.

\* Mean  $\pm$  SD of the amounts added in three experiments.

\*\* Detailed carotenoid content of each test-meal is reported in table 2

**Table 2:** Carotenoid content of the test-meals used in the *in vitro* digestion experiments performed to measure carotenoid bioaccessibility.

Carotenoids tested	Carotenoid sources	Amount of carotenoids added in the <i>in vitro</i> digestion experiments ( $\mu\text{g}$ ) *
isolated carotenoids	$\beta$ -carotene	synthetic all- <i>trans</i> > 95%,
	HU36 carotenoids	bacterial extract
	GB1 carotenoids	bacterial extract
cooked commercial food	$\beta$ -carotene	carrot purée
bacterial-enriched food	HU36 carotenoids	lyophilized HU36 material in natural yogurt (1 g / 125 g)
	GB1 carotenoids	lyophilized GB1 material in natural yogurt (1 g / 125 g)

\* Mean  $\pm$  SD of three measurements.

\*\* Amounts of only the main carotenoids found in these foods. Nevertheless note that carrots also contain  $\alpha$ -carotene.

***In vitro* digestion experiments to measure carotenoid bioaccessibility.** We used the *in vitro* digestion model developed by Garrett et al. [21]. The experimental conditions were slightly modified to better take into account physicochemical conditions prevailing in the human gastrointestinal lumen [10,22] and to reduce the amount of non-hydrolysed triglycerides as much as possible at the end of the digestion experiments. Indeed, in a preliminary experiment we found out that, if digestion duration is too short, remaining non-hydrolysed triglycerides trap a fraction of carotenoids and therefore lead to underestimate carotenoid bioaccessibility (artefact). Since almost all triglycerides are hydrolysed *in vivo* [23], it was important to obtain advanced hydrolysis at the end of the experiment in the *in vitro* digestion model to avoid this artefact. Meal components, or only groundnut oil when the bioaccessibility of carotenoids was studied without the effect of the food matrix (see table 1), were mixed with 32 mL NaCl 0.9% in bidistilled water and homogenised in a shaking water bath at 37°C for 10 minutes. Then, 2.5 mL artificial saliva [24] (62 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 15.1 mmol/L NaCl, 6.4 mmol/L KCl, 3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 6 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.16 g/L mucin, 13 g/L α-amylase) were added and the medium was put under ultraturax (5,000 rpm) for 30 seconds to mimic chewing and incubated at 37°C for 10 more minutes. For incubation at 37°C in gastric conditions, the pH of the medium was adjusted to 4.0 (± 0.02 with about 600 µL of 1 mol/L HCl) and then 2 mL porcine pepsin (40 mg/mL in 0.1 mol/L HCl) were added. The medium was finally incubated at 37°C in duodenal conditions: the pH was raised to 6.0 (± 0.02, by adding around 800 µL 0.9 mol/L sodium bicarbonate pH 6.0) to match the pH measured in the human duodenum during digestion and a mixture of porcine bile extract and pancreatin were added (9 mL containing 2 mg/mL pancreatin and 12 mg/mL bile extract in 100 mmol/L trisodium citrate, pH 6.0; and 4 mL porcine bile extract at 0.1 g/mL in 100 mmol/L trisodium citrate, pH 6.0 ). Each experiment with the different carotenoid sources was run in triplicate.

**Monitoring of the bacterial material during *in vitro* digestion.** At regular intervals (t<sub>0</sub>, *i.e.* bacteria in suspension in the test meal ; t = 10 min, *i.e.* after addition of artificial saliva, pH 5.6 ; t = 1 h 10 min, *i.e.* the end of gastric digestion, pH 4 ; t = 2 h 10 min, *i.e.* mid-term of duodenal digestion, pH 6, t = 3 h 10 min, *i.e.* the end of duodenal digestion pH 6), aliquots (250 µL) were taken from the digestion medium. Samples were serially diluted in 0.2 mol/L sodium phosphate buffer at pH 7.0 and 100 µL were manually surface spread on LB (standard nutritional medium) plates in duplicate. This buffer concentration neutralized the pH of the gastric medium. After 24 and 48 h incubation at 37°C, concentrations of total bacterial population (cells and spores) were expressed as a colony forming units per millilitre (cfu/mL). The limit of detection was taken as one colony

on the lowest dilution plate, *i.e.* 10 cfu/mL. To determine spore concentrations, the samples were additionally heated at 75°C for 10 minutes previously to serial dilution in a phosphate buffer and duplicate spreading on LB plates. Besides, the tolerance of HU36 and GB1 spores to porcine bile was studied by tracking changes in bacterial counts in gastric media containing concentrations of porcine bile ranging from 8.09 g/L to 80.90 mg/L (a control did not contain bile salts), in order to determine the minimum dilution rate. After 24, 48 and 72 hours incubation at 37°C, spore concentrations were expressed as colony forming units per millilitre (cfu/mL). The limit of detection was taken as one colony on the lowest dilution plate, *i.e.* 10 cfu/mL.

**Isolation of the micellar fraction from digesta.** Micelles were separated from oil droplets and food particles by ultracentrifugation (2,500 g, for 1 h at 10°C in a Jouan GR412-W rotor, (Saint-Herblain, France), followed by filtration (0.8 and then 0.22 µm filter with Millex®-GS membrane, Millipore MF, Cork, Ireland). Aliquots were stored at -80°C under a blanket of nitrogen until either the tests of intestinal absorption in Caco-2 cells or the HPLC analysis of carotenoids.

**Preparation of synthetic mixed micelles.** Mixed micelles were prepared as previously described [25] to mimic the lipid composition of the mixed micelles recovered in the human duodenum during digestion [23]. Appropriate volumes of stock solutions of the following compounds were transferred to glass flasks to obtain the following final concentrations: 0.04 mmol/L phosphatidylcholine, 0.16 mmol/L lysophosphatidylcholine, 0.3 mmol/L mono-olein, 0.1 mmol/L free cholesterol, 0.5 mmol/L oleic acid. Carotenoid-rich mixed micelles were prepared with additional pure carotenoids for final concentrations of 5 µmol/L. Stock solution solvents were carefully evaporated under nitrogen. The dried residue was solubilized in bidistilled water containing 0.9% NaCl and 5 mmol/L taurocholate and vigorously mixed by a 5-minute homogenization by magnetic stirring and a 5-minute sonication at 25 W (Branson 250W sonifier; Danbury, CT, U.S.A.). The mixtures obtained were filtered through a pre-sterilized 0.22 µm filter (with Millex®-GS membrane, Millipore MF, Cork, Ireland). The resultant solutions were optically clear.

**Determination of the intrinsic solubility of carotenoids in mixed micelles.** Because the incorporation of carotenoids into mixed micelles during digestion (*i.e.* carotenoid bioaccessibility), depends on an array of factors including matrix, pH, lipase activity or bile lipid concentration [26], experiments were performed to evaluate the intrinsic solubility of carotenoids in mixed micelles (*i.e.* the solubility that depends only on

the physico-chemical properties of carotenoids and not on the effect of the food matrix). Two distinct types of experiments were performed.

The first type of experiments aimed to measure the maximal amount of each carotenoid species that can be incorporated in a fixed amount of mixed micelles. To do that, an appropriate volume of solvent stock solutions containing 50 nmol pure carotenoids was mixed with appropriate volumes of solvent stock solutions of the lipid components of the micelles (0.4 nmol phosphatidylcholine, 1.6 nmol lysophosphatidylcholine, 3.0 nmol mono-olein, 1.0 nmol free cholesterol and 5.0 nmol oleic acid). The solvent mixture was then evaporated under nitrogen. Dried lipids and carotenoids, were then homogenized in 10 mL of a solution of 0.9% NaCl and 5 mmol/L taurocholate in bidistilled water and micelles were formed by sonication as previously described. The 0.22  $\mu\text{m}$  filtered solutions were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the amount of carotenoid incorporated in micelles was measured as described thereafter.

The second type of experiment aimed to compare the kinetics of transfer of different carotenoid species from their crystalline forms to carotenoid-free mixed micelles already solubilised in water. To do that, 2 mL aqueous solution of carotenoid-free mixed micelles in 0.9% NaCl and 5 mmol/L taurocholate (containing 0.08 nmol phosphatidylcholine, 0.32 nmol lysophosphatidylcholine, 0.6 nmol mono-olein, 0.2 nmol free cholesterol and 1.0 nmol oleic acid) was formed and then added onto 10 nmol dry carotenoid crystals evaporated in a glass tube. The kinetics of incorporation of the carotenoids in the mixed micelles under moderate stirring (250 rpm) at  $37^{\circ}\text{C}$  and protected from light was followed over 6 hours: every 30 minutes, a sample was collected and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter (with Millex<sup>®</sup>-GS membrane, Millipore MF, Cork, Ireland). Then, the amount of carotenoids was measured as described thereafter.

**Cell culture.** Caco-2 clone TC-7 cells were a gift from Dr M. Rousset (U178 INSERM, Villejuif, France). Caco-2 model is the most frequently model employed to evaluate the intestinal transport of several nutrients, including fatty acids, cholesterol and carotenoids and give reproducible values that closely correlate with *in vivo* data [27]. They spontaneously differentiate into polarized absorptive cell monolayers and display morphological and biochemical characteristics similar to human enterocytes after differentiation. The clone TC-7 is more homogeneous than the parent caco-2 cell line and it possesses  $\beta$ -carotene-15,15'-dioxygenase activity [28,29]. Cells, passages 25-80, were grown in 25 cm<sup>2</sup> flasks (Corning Inc., New York, USA) in the presence of DMEM (glutamine medium) supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 1% non-essential amino acid and 1% antibiotics (complete medium). Cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere of air:CO<sub>2</sub>

(90:10, v/v) and the medium was changed every 48 hours. Monolayers were subcultured with a 4-day passage frequency, when they reached a confluence of approximately 80%, by treatment with 25% trypsin/EDTA. For each experiment, cells were seeded at a density of  $25 \cdot 10^4$  cells/well, and grown on transwells (6-well plate, 24-mm diameter, with 1  $\mu$ m-pore-size polycarbonate inserts, Corning Inc., New York, USA). The apical chamber received 1 mL complete medium and the basolateral chamber received 2 mL complete medium during the first 6 days. For the last 15 days, the complete medium was still used in the basolateral chamber, whereas an FBS-free medium was used in the apical chamber. Media were changed every day for 21 days to obtain confluent differentiated cell monolayers.

***In vitro* carotenoid absorption by Caco-2 cell monolayers.** At the beginning of each experiment, cell monolayers were washed twice with 1 mL PBS. The apical side of the cell monolayers received 1 mL carotenoid-rich micelles (mixed micelles coming from the *in vitro* digestions diluted 1/5 in DMEM or synthetic mixed micelles diluted 1/2 in DMEM, because high concentrations of bile salts deteriorate the cells), while the basolateral side received 2 mL normal medium. Cell monolayers were incubated at 37°C for 3 hours. The time of incubation was chosen from preliminary experiments to obtain sufficient amounts of absorbed carotenoids for accurate measurements. After the incubation period, media from either side of the membrane were harvested. Cell monolayers were washed twice with 1 mL PBS to eliminate adsorbed carotenoids, scraped, and collected in 500  $\mu$ L PBS. All the samples were stored at -80°C under nitrogen until carotenoid extraction and HPLC analysis.

**Measurement of carotenoid bioavailability in an animal model.** The animal model to study carotenoid bioavailability was multiple-dose force-feeding over three days in young (6-weeks old) male albino Wistar rats of normal weight (about 200 grams). Wistar rats are well characterized and can absorb a variety of carotenoids, including  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and lycopene [30]. Experiments were conducted according to animal ethical policies and were approved by the local experimental animal ethic committee. Besides, the innocuousness of the carotenoid extracts and of the bacterial strains producing the carotenoids were studied by other partners of the project [20]. Six groups of eight rats were included in the study: a control group was force-fed with 1 mL groundnut oil without carotenoids and five groups were force-fed with the same amount of oil containing pure carotenoids ( $\beta$ -carotene, purified HU36 carotenoids, purified GB1 carotenoids, HU36 lyophilized cells and spores and GB1 lyophilized cells and spores).

The protocol was as follows: 8 rats randomly chosen among the 40 were kept without food the night before blood collection. A blood sample (600  $\mu$ L) was collected by

intra-cardiac venipuncture. This blood sample permitted to check baseline plasma carotenoid concentrations, which were expected to be null because there were no carotenoids in rat diet. Force-feeding was performed each day over three days with pure carotenoids (or lyophilised bacterial material) incorporated in 1 mL groundnut oil (chosen for its poor content in carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol). Multiple-dose force-feeding over three days was preferred to long-feeding for several reasons: the amounts of bacterial carotenoids available were limited, force-feeding allows a better control of the amounts of carotenoids ingested by the rats and it limits the oxidation of carotenoids if kept for a long time at room temperature.

The rats had free access to basic food and water until the evening prior to the last day of force-feeding. The doses of carotenoids (or lyophilized bacterial cells) incorporated in oil and given to the rats were chosen to bring about 55 nmol carotenoids/rat/day, corresponding to 0.15 mg carotenoid/kg/day (physiological dose, exact concentrations of carotenoids were measured and are reported in table 3).

**Table 3:** Total amounts of carotenoids administered to the rats over the three days of force-feeding experiments

Rat groups	Carotenoids tested	Carotenoid sources	Total amounts of carotenoids administered (nmol) *
<i>Control</i>	(no carotenoid)	-	-
<i>BC</i>	$\beta$ -carotene	synthetic all- <i>trans</i> > 95%	169.4
<i>HC</i>	HU36 carotenoids	carotenoid extract 90% pure	170.3
<i>HS</i>		156.3 mg lyophilized bacteria	165.0
<i>GC</i>	GB1 carotenoids	carotenoid extract 90% pure	169.0
<i>GS</i>		129.3 mg lyophilized bacteria	164.9

\* Rats were each fed three times with about 55 nmol carotenoids suspended in 1 mL groundnut oil administered directly in the esophagus using stainless steel cannula.

The third force-feeding was made on empty stomachs (no access to food the night before). Just before this last force-feeding, an intra-cardiac venipuncture was performed on anesthetized rats to evaluate the effect of the two-day force-feeding on fasting plasma carotenoid concentrations. Then, the third force-feeding experiment was performed and the rats were killed exactly 4 hours later (preliminary experiments showed that it is the time when the maximum amount of newly absorbed carotenoids are recovered in blood, likely in chylomicrons). Blood and tissue samples (liver and adipose tissue) were collected to evaluate: *i*) with blood samples, the effect of a meal rich in carotenoids on the increase

of postprandial plasma concentration of carotenoids, which is an estimate of absorption efficiency, and *ii*) the effect of three days force-feeding on carotenoid concentration in their main storage tissues, *i.e.* adipose tissue and liver, which is an estimate of their bioavailability in these tissues. For the adipose tissue, samples were parts of the epididymal adipose tissue, which is easily collected and a good model of the global adipose tissue in rats [31]. All the tissue samples were immediately plunged in liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until carotenoid analysis.

**Extraction of carotenoids from the various *in vitro* and *in vivo* samples.** The procedure was adapted to the diverse types of samples (aqueous fractions from the *in vitro* digestion experiments and from caco-2 experiments, or animal tissues containing more or less lipid esters).

*Extractions from digesta, micellar fractions and from Caco-2 experiments fractions.* In a glass tube, 500  $\mu\text{L}$  internal standard (apo-8'-carotenal in ethanol) and 2 mL hexane were added to 500  $\mu\text{L}$  sample. The mixture was homogenized for 5 min on a vortex blender and then centrifuged (1,200 g, for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in a Jouan GR412-W rotor, Saint-Herblain, France). The upper phase was collected and 2 mL dichloromethane were added to the lower phase. After another 5-min homogenization and a 5-min centrifugation, the lower phase was collected, pooled with the previously collected volume and evaporated under nitrogen.

*Extractions from plasma samples.* The diverse blood samples from rats, collected in tubes with heparin, were immediately centrifuged in order to separate the plasma, which was then put into liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Extractions were then conducted as described above for the *in vitro* samples.

*Extractions from liver samples* (adapted from [32]). About 150 mg were mixed with 300  $\mu\text{L}$  PBS buffer and crushed with two 3-mm-diameter stainless steel balls in 2 mL Eppendorf tubes using a MM301 ball mill (Retsch, Eragny-sur-Oise, France). A 50  $\mu\text{L}$  aliquot was collected for protein assay. Another 250  $\mu\text{L}$  aliquot was transferred to a glass tube, mixed with 150  $\mu\text{L}$  PBS, 500  $\mu\text{L}$  dichloromethane and 1 mL methanol. After a 5-min homogenization on a vortex blender, 500  $\mu\text{L}$  dichloromethane and 500  $\mu\text{L}$  distilled water were added. The mixture was homogenized for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 10 min /  $10^{\circ}\text{C}$ ). The lower phase was collected and evaporated to dryness under nitrogen. Then, 500  $\mu\text{L}$  distilled water, 500  $\mu\text{L}$  internal standard (apo-8'-carotenal in ethanol) and 2 mL hexane were added on the dry residue. The mixture was homogenized again for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 5 min /  $4^{\circ}\text{C}$ ). The upper phase was collected and 2 mL dichloromethane were added to the lower phase. After

another 1-min homogenization and a 10-min centrifugation, the lower phase was collected, pooled with the previously collected volume and evaporated under nitrogen.

Extractions from adipose tissue samples [32]. About 150 mg were mixed with 300  $\mu\text{L}$  PBS buffer and crushed with two 3-mm-diameter stainless steel balls in 2 mL Eppendorf tubes using a MM301 ball mill (Retsch, Eragny-sur-Oise, France). A 50  $\mu\text{L}$  aliquot was collected for protein assay. Another 250  $\mu\text{L}$  aliquot was transferred to a glass tube, mixed with 150  $\mu\text{L}$  PBS, 500  $\mu\text{L}$  dichloromethane and 1 mL methanol. After a 5-min homogenization on a vortex blender, 500  $\mu\text{L}$  dichloromethane and 500  $\mu\text{L}$  distilled water were added. The mixture was homogenized for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 10 min / 10°C). The lower phase was collected and evaporated to dryness under nitrogen. Then, 1 mL ethanol-KOH (5.5%, m/v) and 100  $\mu\text{L}$  freshly prepared ethanol-pyrogallol (1.2%, m/v) were added to the dry residue and the mixture was incubated at 37°C under stirring for saponification of the lipid esters from the adipose tissue. After a 90-min incubation, 1 mL distilled water, 250  $\mu\text{L}$  internal standard (apo-8'-carotenal in ethanol) and 3 mL hexane were added. The mixture was homogenized for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 10 min / 4°C). The upper phase was collected and rinsed with 1 mL distilled water and 1 mL ethanol. After another 1 min homogenization and 5 min centrifugation, the upper phase was collected and evaporated under nitrogen.

**HPLC analysis of the carotenoids** (method from [32]). After evaporation to dryness, all dried extracts were dissolved in 200  $\mu\text{L}$  methanol:dichloromethane (65:35, v/v). Carotenoids were quantified by reverse-phase HPLC on a Dionex system (equipped with in line degazor, a P680 pump, a cooled automatic sample injector ASI-100 and a UV/visible diode-array detector UVD340U, Dionex France, Vinsins-le-Bretonneux, France), Carotenoids were separated by using a C30 column (250 x 4,6 nm, 5  $\mu\text{m}$ , YMC Separation Technology, Interchim, Montluçon, France), The mobile phase was a gradient of three solvents: A was methanol, B was MTBE and C was bidistilled water. The elution started with 96% A, 2% B and 2% C. Then the gradient was linear until  $t = 27$  min and between 27 and 28 min, the proportions were 80% A, 20% B and 0% C ; between 28 and 29 min the gradient was linear back to the initial conditions (96% A, 2% B and 2% C) and it was kept constant to 32 min. Carotenoids were detected at their maximum of absorbance (455 nm for  $\beta$ -carotene and HU36 carotenoids and 495 nm for GB1 carotenoids). They were identified by retention time and spectral analysis (from 300 to 600 nm) in comparison with pure standards. Quantification was performed using Dionex Chromeleon software (Dionex Chromatography Management system, version 6.80).

**Protein assay on the tissue samples from the *in vivo* study.** Tissue proteins were titrated with bicinchoninic acid protein assay on 96-well microplates. This method is a spectrophotometric assay based on the purple-coloured specific binding between bicinchoninic acid and Cu(I) released by the reduction of Cu(II) by the proteins of the sample. The protocol enables titrations in the range of 5 µg/mL to 250 µg/mL. A standard curve was established with bovine serum albumin. The 50 µL aliquots of liver samples and of adipose tissue samples were diluted respectively to 1/200 and 1/15 in PBS buffer previous to titration, so that the protein concentrations in the samples fall in the range of standard curve.

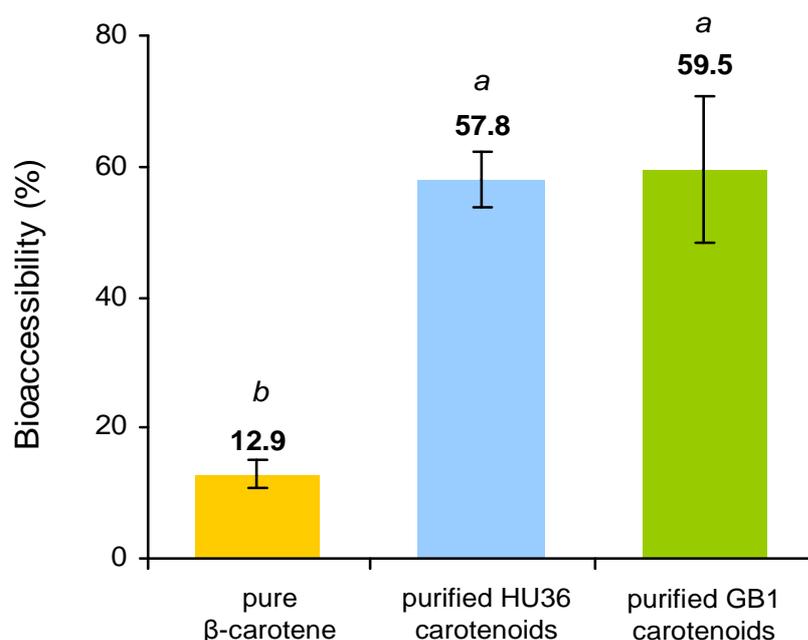
**Calculations and Statistics.** All the *in vitro* experiments were run in triplicate. Bioaccessibility was defined as the percentage of carotenoids recovered in the micellar fraction after *in vitro* digestion, in relation to the amount of carotenoids measured in the digestive medium just before addition of artificial saliva. The solubility of the carotenoids in synthetic mixed micelles was defined as the percentage of carotenoids recovered in the micellar fraction, in relation to the total carotenoids present in the medium. Absorption efficiency of the carotenoids was defined as the percentage of carotenoids recovered in scrapped Caco-2 cells, in relation to the amount of carotenoids initially added on the apical sides of the cell monolayers. *In vitro* bioavailability of the carotenoids was defined as the product of bioaccessibility by Caco-2 cell absorption efficiency.

*In vivo* experiments were run with six to eight animals per group. *In vivo* bioavailability in rats was defined as the percentage of total carotenoids recovered in the plasma plus liver plus adipose tissue, in relation to the total amount of carotenoids administrated to the rats over the three-day force-feeding. On the basis of literature data, we determined that the corporal composition of a 200 g Wistar rat is on average: 8.36 mL plasma ( $2.54 + 0.0291 \times \text{body mass in grams}$ , [33]), 8.3 g liver ( $0.0415 \times \text{body mass in grams}$ , [34]) and about 20 g adipose tissue (10 to 12% of the body mass for rats between 200 and 300 g, [35,37]). Then, protein assays on liver and adipose tissue samples gave the average protein contents in the liver and in the adipose tissue. Thus, the total amount of carotenoids recovered in whole plasma and in both tissues could be calculated from concentration results. Results were expressed as means and standard deviations.

Differences between means were assessed using ANOVA followed by the post-hoc Tukey-Kramer's test for parametric data (*in vitro* results). In the case of non-parametric data (*in vivo* results), they were assessed using the Kruskal-Wallis' test followed by the Mann-Whitney U-test when the Kruskal-Wallis test showed significant differences between groups. *P* values under 0.05 were considered significant. Statistical comparisons were performed using Statview software version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTS

**Bioaccessibility of pure carotenoids as measured by the *in vitro* digestion model.** HPLC analysis performed on the micellar fractions collected after centrifugation revealed that HU36 and GB1 carotenoids were equally bioaccessible with about 60 % of the initial carotenoid content recovered in mixed micelles. The carotene  $\beta$ -carotene was about 4.6 times less bioaccessible (figure 2).

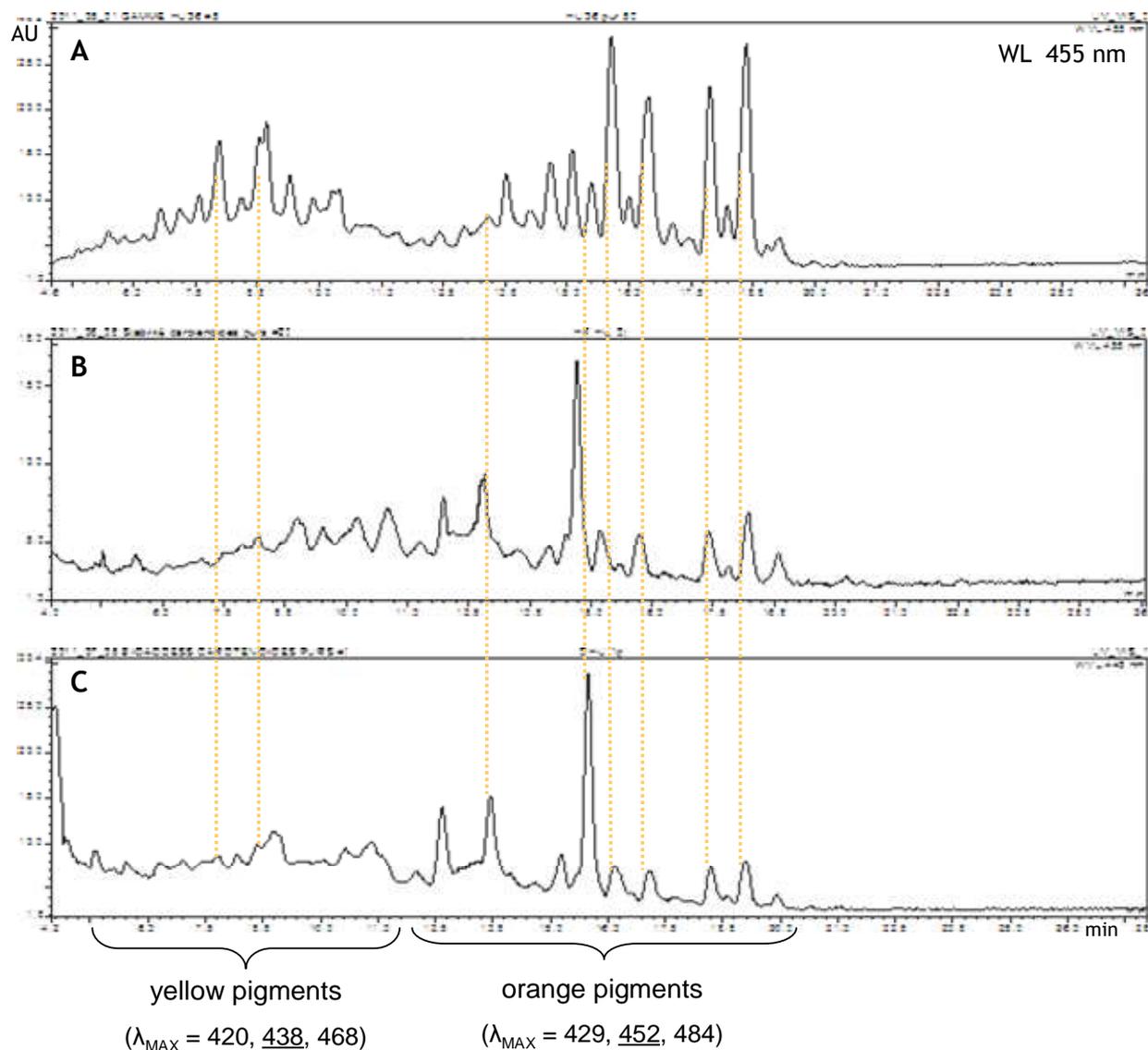


**Figure 2:** Bioaccessibility of isolated carotenoids measured using the *in vitro* digestion model. Means  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

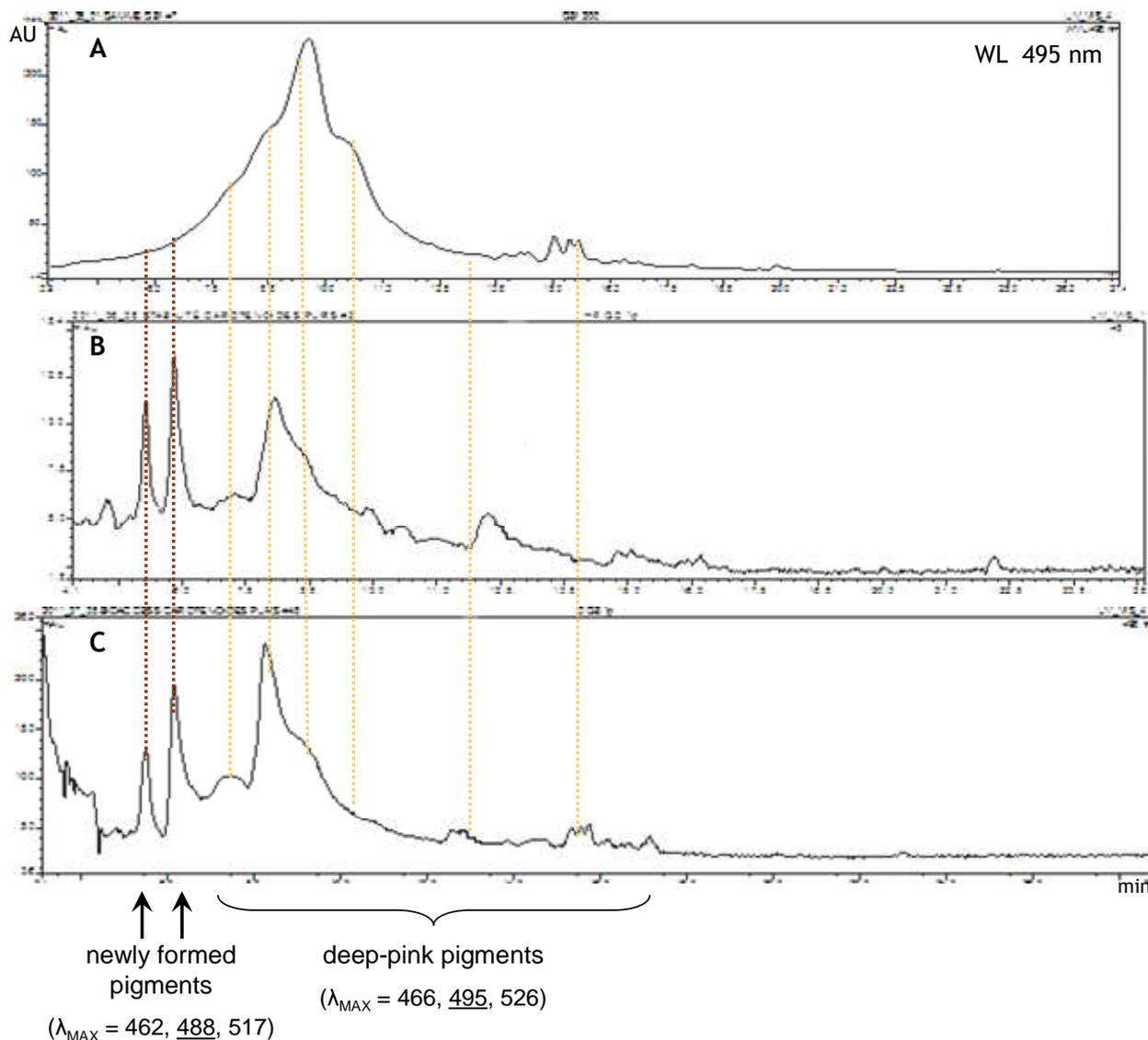
Note that the carotenoids were partially degraded along the digestion procedure. GB1 carotenoids were the least stable during *in vitro* digestion, with  $60.96 \pm 0.60\%$  of the initial content recovered at the end. The residual amounts of  $\beta$ -carotene and of HU36 carotenoids were  $69.46 \pm 1.20\%$  and  $69.51 \pm 4.26\%$  respectively. HPLC analysis on the total carotenoid content revealed that yellow glycosyl carotenoid esters were the most degraded among HU36 carotenoids (figure 3, A & B). The digestion of GB1 carotenoids induced mostly the degradation of the most polar pigments (the ones eluted the last by HPLC analyses). Moreover, two newly-formed pigments were detected (figure 4, A & B), which seemed more hydrophilic than the native GB1 carotenoids.

Besides, HPLC analysis highlighted that all bacterial carotenoids were incorporated into mixed micelles, in the same proportions as they were in the final gastric content after

*in vitro* digestion (figure 3, B & C and figure 4, B & C). HU36 orange glycosyl carotenoid esters were thus recovered in mixed micelles at higher rates than HU36 yellow glycosyl carotenoid esters (figure 3, C). Similarly, the most polar pink pigments and the two new products from GB1 carotenoids were recovered at higher rates in mixed micelles (figure 4, C). Consequently, all HU36 and all GB1 carotenoids were equally soluble in mixed micelles but yellow carotenoids were globally less bioaccessible than orange carotenoids, and GB1 carotenoids were only partly bioaccessible as native molecules.



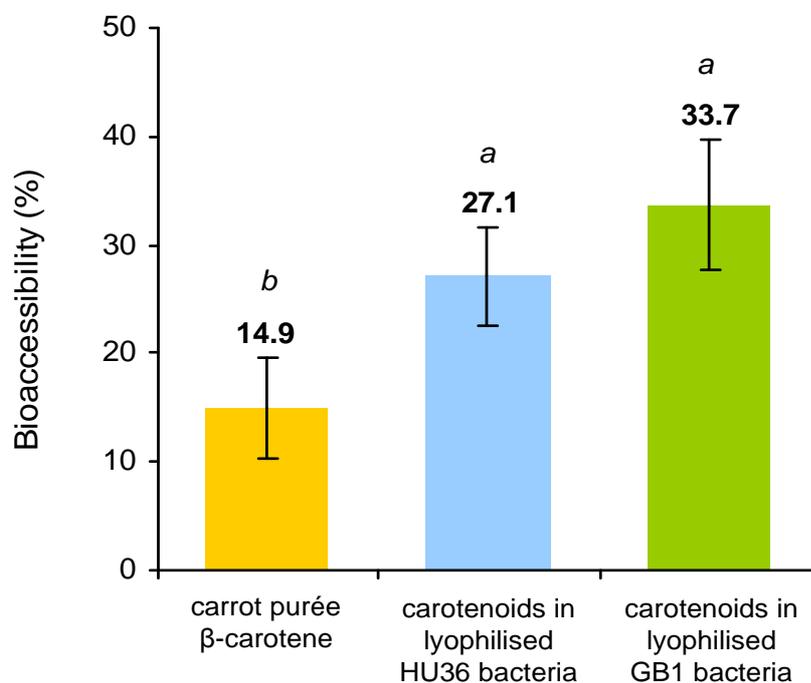
**Figure 3:** Chromatograms obtained by HPLC analysis and UV-vis detection, comparing the carotenoid content in samples of (A) HU36 carotenoids at the beginning of *in vitro* digestion, (B) HU36 carotenoids recovered in the total digestion volume at the end of *in vitro* digestion and (C) HU36 carotenoids incorporated in the aqueous mixed micelle fraction at the end of *in vitro* digestion.



**Figure 4:** Chromatograms obtained by HPLC analysis and UV-vis detection, comparing the carotenoid content in samples of (A) GB1 carotenoids at the beginning of *in vitro* digestion, (B) GB1 carotenoids recovered in the total digestion volume at the end of *in vitro* digestion and (C) GB1 carotenoids incorporated in the aqueous mixed micelle fraction at the end of *in vitro* digestion.

**Bioaccessibility of  $\beta$ -carotene from a carrot purée and of carotenoids from HU36 and GB1 lyophilised cells in yogurt.** The amounts of bacterial carotenoids from both HU36 and GB1 recovered in digestion micelles were higher than the amount of  $\beta$ -carotene. Bacterial carotenoids from lyophilized cells incorporated in plain yogurt have therefore a very good bioaccessibility as compared to the common carotenoid  $\beta$ -carotene (figure 5). However, bioaccessibility of bacterial carotenoids from HU36 and GB1 lyophilized materials was about twice as low as the one of the same carotenoids used as pure molecules. This

difference is due to the fact that these bacterial strains do not expel carotenoids which must therefore be extracted from disrupted cells by the combination of solubilization and of mechanical movements.

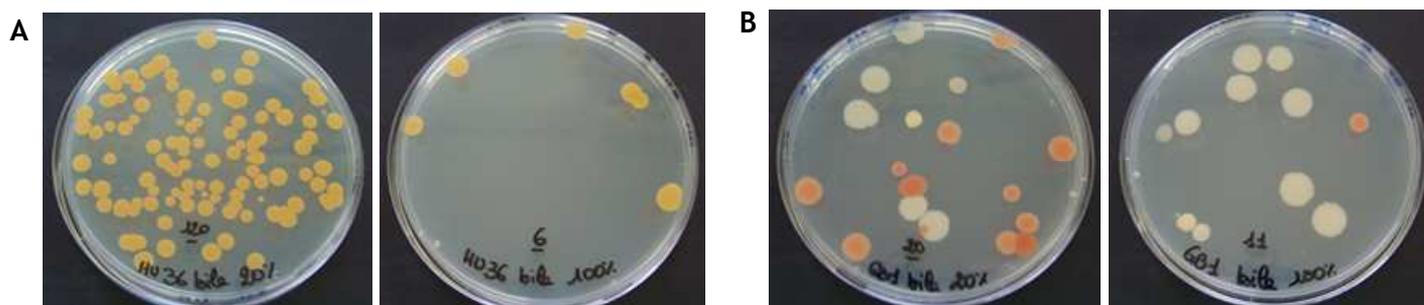


**Figure 5:** Bioaccessibility of carotenoids using the *in vitro* digestion model. Means  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

**Number of bacterial vegetative cells / spores from HU36 or GB1 during the digestion process.** Lyophilized bacterial materials contain both spores and vegetative cells and the carotenoids are not naturally released into the medium. The resistance and the impermeability of the cells and spores are prone to limit the bioaccessibility of the carotenoids. Because *Bacillus* cells can be sensitive to gastric acidity [37], it was necessary to follow the evolution of the bacterial content in order to discuss the incorporation of the carotenoids into mixed micelles. After dilutions in a buffer and culture on Petri plates with LB medium (not selective nutritive medium), the total bacterial population and the spores were numbered. HU36 cells grew very quickly and could be numbered after 24 hours. They were immediately coloured in yellow and became darker while growing. Spores germinated in about 24 hours and gave orange colonies in 24 to 48 hours. Conversely, GB1 cells grew very slowly (in at least 48 hours) and little were viable. They were first white, then

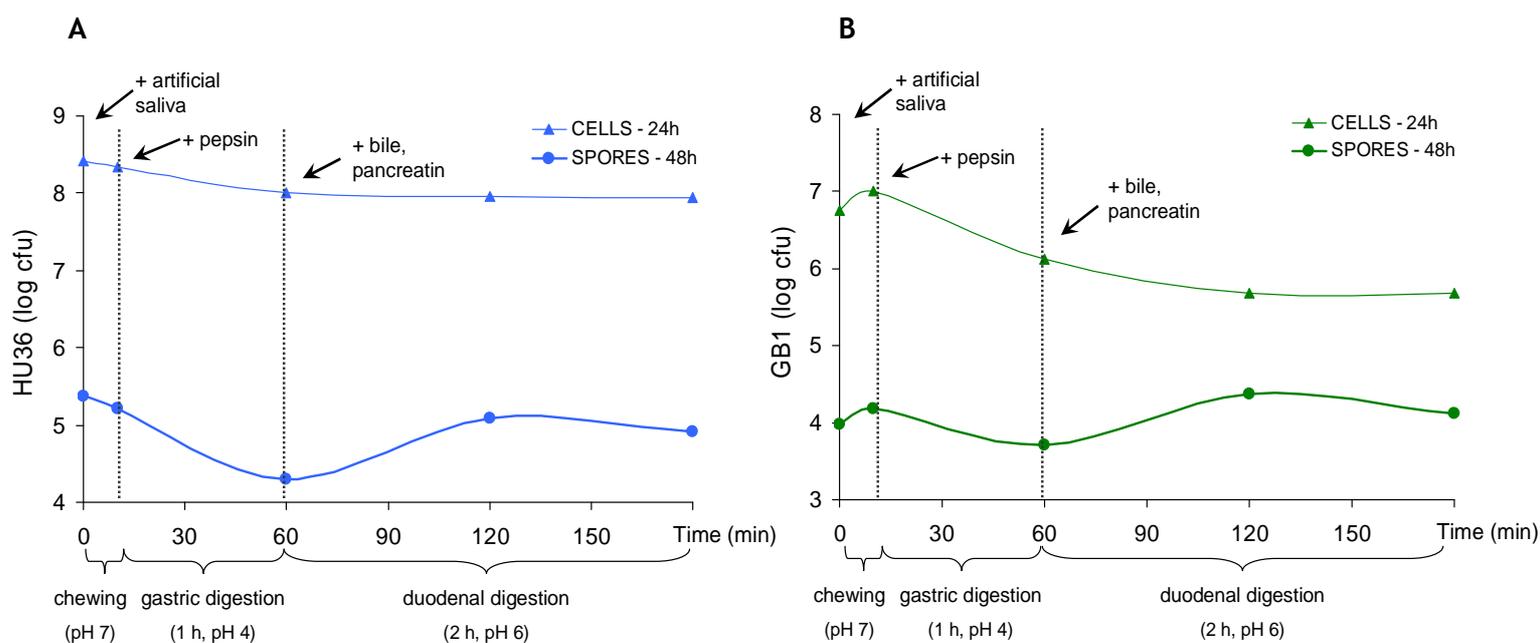
became progressively yellow and were coloured pink only later. Spores germinated in about 24 hours and first gave pale colonies, which became pink after 48 hours.

From the tests of resistance to bile salts (figure 6), we found that germination of spores is altered with bile concentrations of 8.1 g/L (100% of the concentration in the digestion medium), but not with bile concentrations of 1.6 g/L or lower (dilution to 1/5 of the digestion medium).



**Figure 6:** Limit of resistance of (A) HU36 spores and (B) GB1 spores to increasing concentrations of bile salts (expressed in % of the concentration of bile salts added in the *in vitro* digestion model), determined by counts on LB plates.

From a microscopic observation and counts, we found a large majority of vegetative cells in the lyophilized bacterial materials (32 mg were initially added into the digestion medium), with around 1‰ spores in both strains. Initial concentrations of viable cells were about  $8.1 \times 10^6$  cfu/mg lyophilized material for HU36 and  $1.8 \times 10^5$  cfu/mg lyophilized material for GB1. Initial concentrations of spores were  $7.5 \times 10^3$  cfu/mg lyophilized material for HU36 and  $2.9 \times 10^2$  cfu/mg lyophilized material for GB1. The number of cells noticeably decreased along gastric digestion and then stabilised during duodenal digestion (figure 7). The pH 6 was favourable to cell growth, but the presence of bile salts was a limiting factor [38]. Concerning the spores, they tended to disappear along the first hour of digestion. However, more spores were found during the last phase of digestion. Final vegetative cell populations were  $8.9 \times 10^7$  cfu for HU36 and around  $4.8 \times 10^5$  cfu for GB1 (*i.e.* 66% and 92% loss, respectively) and final spore populations were  $8,4 \times 10^4$  cfu for HU36 and  $1,4 \times 10^4$  cfu for GB1 (*i.e.* 65% loss and 38% increase respectively) (figure 7, A & B).



**Figure 6:** Evolution of the number of vegetative bacterial cells and of spores during *in vitro* digestion conducted with 32 mg lyophilized bacterial material of (A) HU36 and (B) GB1 strains

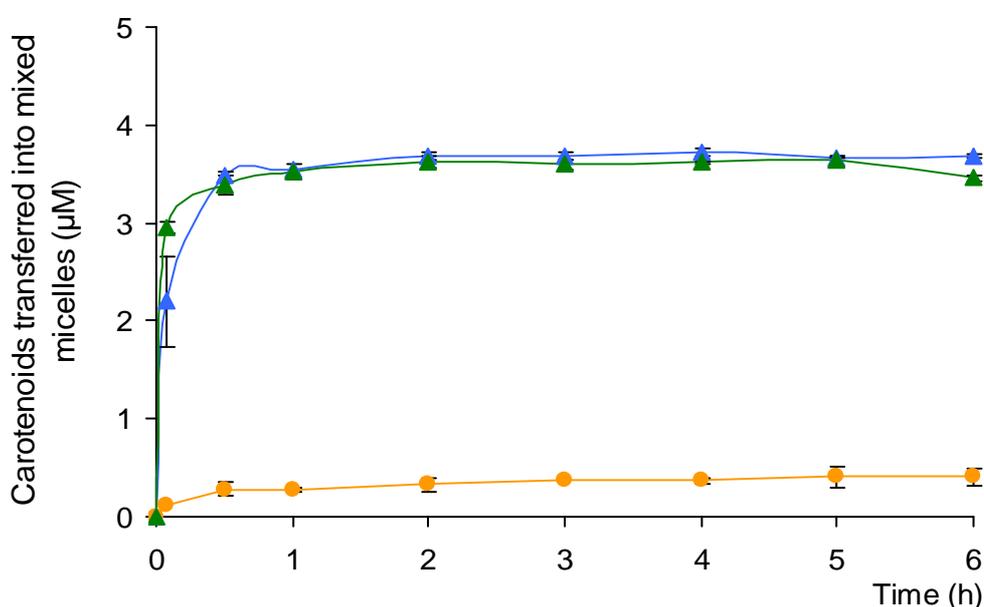
**Incorporation efficiency of pure carotenoid during the preparation of artificial mixed micelles.** When homogenized with phospholipids, cholesterol and glycerol esters (mixed micelle lipids) before the formation of the micelles, incorporation efficiencies of HU36 carotenoids and GB1 carotenoids were over 90% (table 4).  $\beta$ -carotene was incorporated less efficiently in synthetic mixed micelles, with about 50% recovery.

**Table 4:** Incorporation and transfer efficiencies (% of 5  $\mu$ mol/L) of carotenoids in synthetic mixed micelles

	$\beta$ -carotene	HU36 carotenoids	GB1 carotenoids
Incorporation efficiency (%) during the preparation of synthetic mixed micelles	48.60 $\pm$ 3.21 (b)	93.13 $\pm$ 1.32 (a)	92.17 $\pm$ 0.56 (a)
Maximum transfer efficiency (%) in pre-formed mixed micelles during kinetic experiments showed in figure 8	8.25 $\pm$ 2.16 (b)	74.51 $\pm$ 0.81 (a)	72.67 $\pm$ 0.91 (a)

The incorporation efficiency of carotenoids into mixed micelles was evaluated in two different types of experiments. First, by measuring the percentage of incorporation into mixed micelles during their preparation. Second, by measuring the percentage of transfer from carotenoid crystals to pre-formed mixed micelles stabilized in water (see material and methods for more details). Values are means  $\pm$  SD of 3 experiments. For each row, different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means as assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U-test.

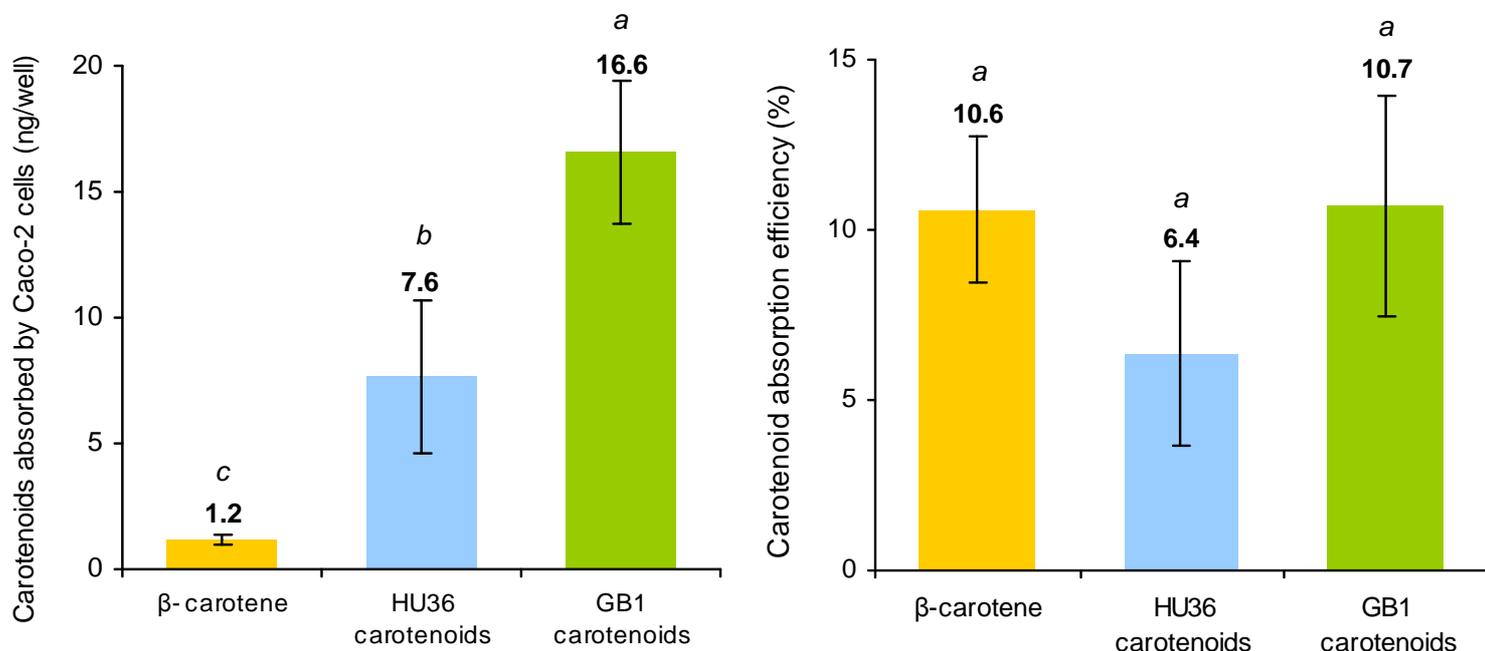
**Kinetics of transfer of pure carotenoids from crystals into pre-formed artificial mixed micelles in water.** In all cases, the maximum solubilization rates were nearly reached in the first 30 to 60 minutes (figure 8). The maximum transfer of carotenoids measured at the plateau, obtained after 30 min to 1 hour revealed that bacterial carotenoids were significantly more transferred from crystals to mixed micelles (over 70%) than  $\beta$ -carotene (around 8%). Moreover, maximum percentages of carotenoids transferred into mixed micelles were lower than the ones measured in the previous experiment (incorporation during mixed micelles' preparation), especially for  $\beta$ -carotene, with an incorporation efficiency 6 times as low (table 4).



**Figure 8:** Kinetics of transfer of (●) pure  $\beta$ -carotene, (▲) purified HU36 carotenoids and (▲) purified GB1 carotenoids from crystals to synthetic mixed micelles solubilized in water. Means  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

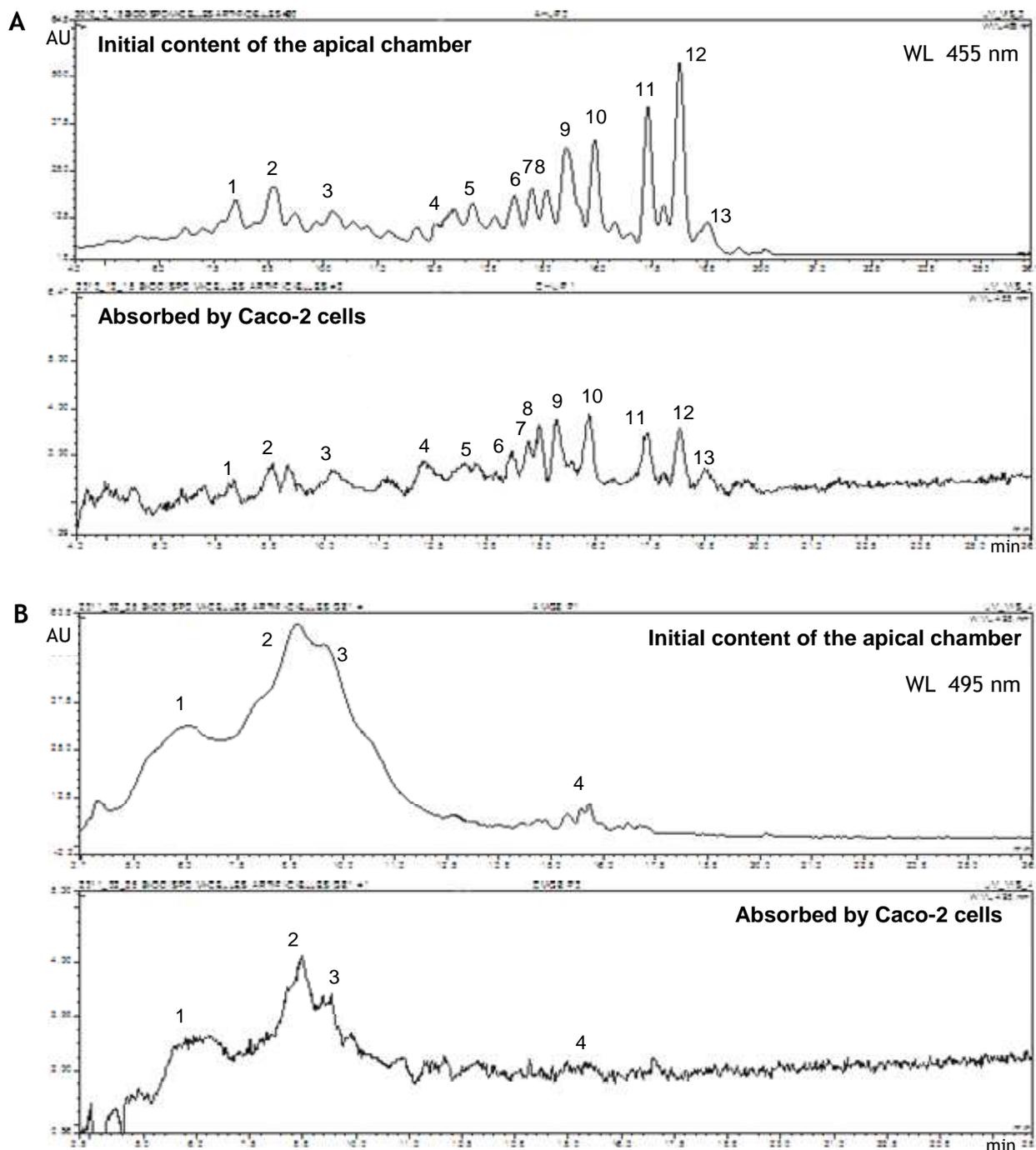
**Uptake of carotenoids by Caco-2 cells.** The intestinal epithelium model was incubated with carotenoid-rich micelles coming from in vitro digestions of test-meals containing the food sources of carotenoids (*i.e.* carrot purée or yogurt enriched in bacterial lyophilised material) and the uptake efficiencies of the three carotenoid species were compared. Note that no  $\beta$ -carotene metabolites, *e.g.* retinol, retinal and retinyl esters, were detected in the cells, showing that the incubation conditions did not allowed  $\beta$ -carotene-dioxygenase to significantly cleave  $\beta$ -carotene. Bacterial carotenoids and

$\beta$ -carotene were all detected (figure 9 A), and thus absorbed, in intestinal cells. Absorption efficiencies of  $\beta$ -carotene, HU36 carotenoids and GB1 carotenoids were not significantly different and were around 6-10% (figure 9 B).



**Figure 9:** Uptake, by Caco-2 cell monolayers, of carotenoids incorporated in mixed micelles that came from *in vitro* digestion experiments. (A) Amounts of carotenoids recovered in cells (in ng/well). (B) Absorption efficiency (% of the carotenoid amount added onto cell monolayers).

We also tried to find whether the intestinal absorption was selective regarding bacterial carotenoids. For that aim, a complementary experiment was conducted by incubating the previously prepared artificial mixed micelles on Caco-2 cell monolayers. Indeed, artificial mixed micelles can accumulate larger amounts of carotenoids than mixed micelles from digestion, thus facilitating the identification of the distinct carotenoids absorbed by Caco-2 cells. After a 3-hour incubation, all the carotenoids contained in bacterial cocktails had been absorbed with similar efficiencies, both for HU36 and GB1: they were recovered in the same proportions as they were when placed in the apical compartment (figure 10). This result suggests that Caco-2 cells do not absorb preferentially some GB1 or HU36 carotenoids.



**Figure 10:** Chromatograms obtained by HPLC analysis and UV-vis detection, comparing the carotenoid content in **(A)** HU36 carotenoids and **(B)** GB1 carotenoids, in mixed micelles placed added in apical chambers of Caco-2 monolayers and absorbed by Caco-2 cells after 3 hours incubation at 37°C in a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere.

*In vitro* bioavailability could then be calculated as the product of previous results. We found  $1.37 \pm 0.35\%$  for pure  $\beta$ -carotene,  $3.68 \pm 1.60\%$  for purified HU36 carotenoids and  $6.37 \pm 2.28\%$  for purified GB1 carotenoids.

**In vivo bioavailability of carotenoids in rats.** No carotenoids were detected either in rat plasma before the force-feeding experiments or in plasma and tissues of rats that were force-fed with carotenoid-free oil (data not shown). Concentrations of carotenoids in plasma and tissues of the other groups after either two or three days force-feeding are shown in table 5. Note that retinyl palmitate, the main metabolite produced by  $\beta$ -carotene-dioxygenase from provitamin A carotenoids, was measured in plasma and liver and that no significant difference was observed between the diverse groups of rats, either before or after force-feeding with the carotenoid-enriched oils. After two days force-feeding, the amounts of carotenoids in the plasma of the rats deprived of food the night before blood withdrawal were around 1  $\mu\text{mol/L}$  for  $\beta$ -carotene, around 20  $\mu\text{mol/L}$  for HU36 carotenoids and around 7-17  $\mu\text{mol/L}$  for GB1 carotenoids. However, standard deviations were high for bacterial carotenoids. Plasma level of  $\beta$ -carotene was higher after three days force-feeding in the post-prandial period (4 hours after the force-feeding) than at fast after the two-day force-feeding period. The differences were not significant for HU36 or GB1 carotenoids. The concentration of HU36 carotenoids in the liver was higher than that of GB1 carotenoids and of  $\beta$ -carotene. In both reserve tissues (liver and adipose tissue), the variability of bacterial carotenoid concentrations was high among rats from a single group.

**Table 5:** Concentrations of carotenoids in plasma, liver and adipose tissues after the force-feeding experiments\*.

	After 2 days force-feeding **	After 3 days force-feeding ***		
	plasma (nmol/L)	plasma (nmol/L)	liver (nmol/g proteins)	adipose tissue (nmol/g proteins)
pure $\beta$ -carotene	0.72 $\pm$ 0.01	6.68 $\pm$ 0.92	0.60 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.27
purified HU36 carotenoids	21.70 $\pm$ 22.16	57.29 $\pm$ 38.58	3.94 $\pm$ 3.15	11.52 $\pm$ 4.09
purified GB1 carotenoids	17.53 $\pm$ 9.75	4.86 $\pm$ 13.04	0.68 $\pm$ 1.28	2.60 $\pm$ 3.05
carotenoids in HU36 bacteria ****	18.22 $\pm$ 17.74	18.77 $\pm$ 26.85	5.88 $\pm$ 3.06	2.55 $\pm$ 2.91
carotenoids in GB1 bacteria ****	7.83 $\pm$ 10.09	7.53 $\pm$ 10.33	1.99 $\pm$ 1.76	1.48 $\pm$ 1.84

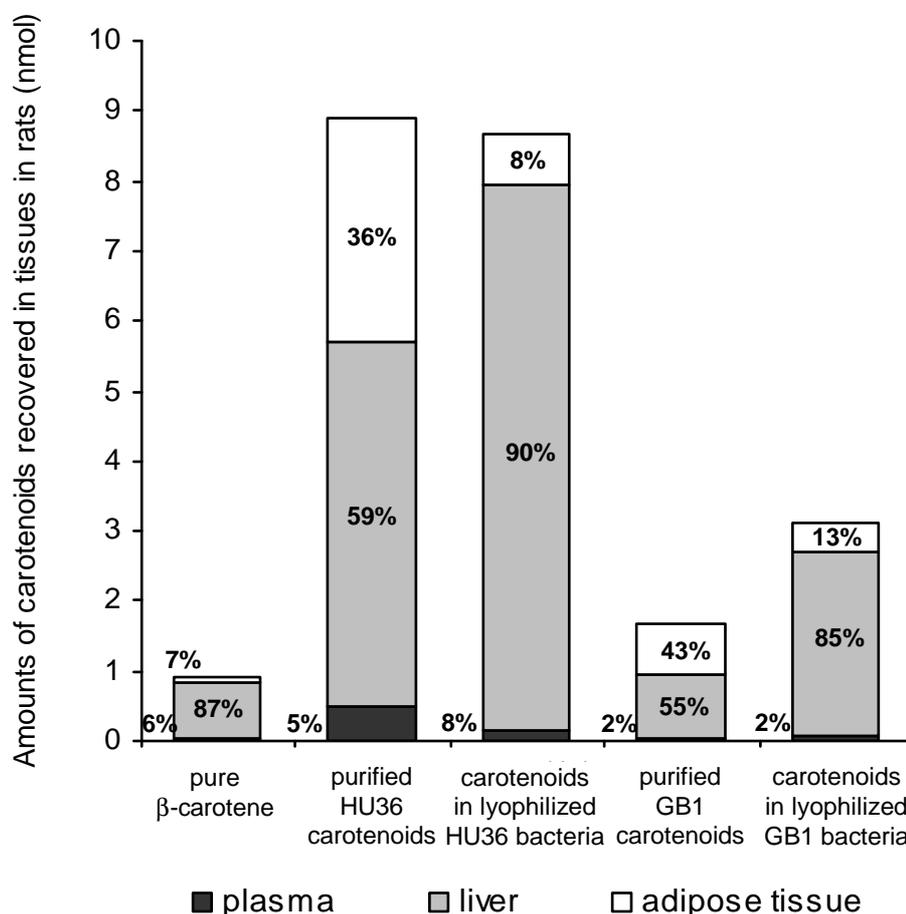
\* Eight rats per group were force-fed each day with 1 mL groundnut oil containing 55 nmol pure carotenoids (for more details, see material and methods). Values are means  $\pm$  SD of 6 to 8 rats.

\*\* In rats deprived of food the last night before blood withdrawal.

\*\*\* During the post-prandial period (4 h after the third force-feeding).

\*\*\*\* Mixture of lyophilized vegetative cells plus spores.

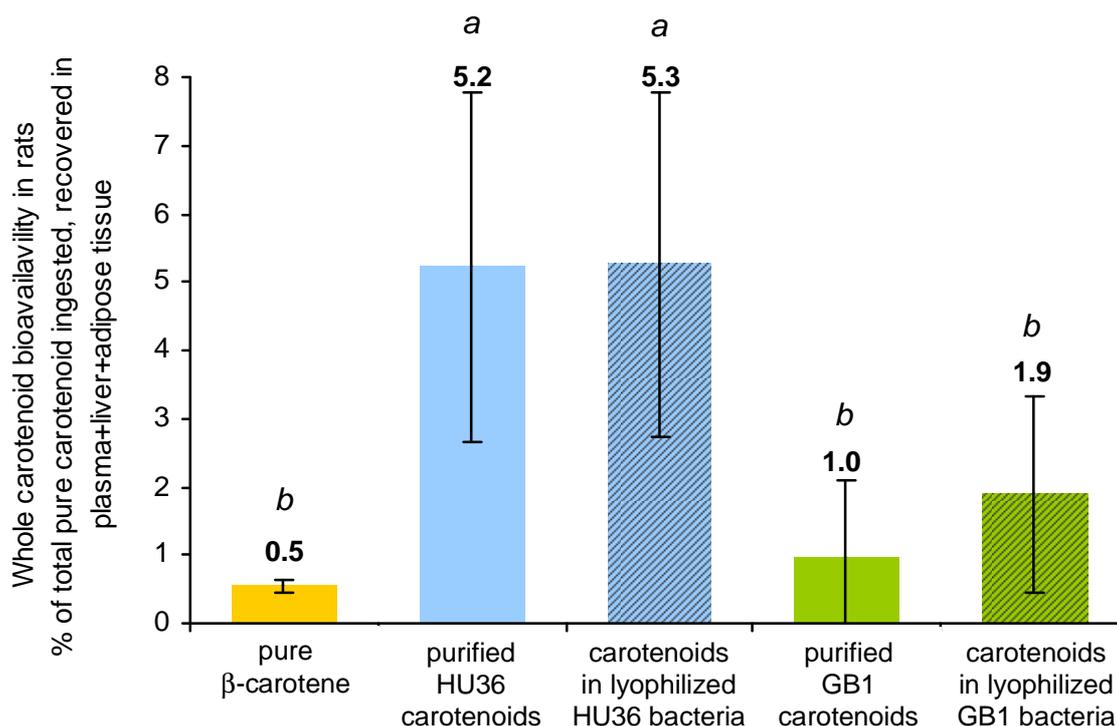
Then, protein assays on liver and adipose tissue samples revealed that the rats had on average 1.3 g liver proteins (about 16% of the liver weight) and 0.28 g adipose tissue proteins (about 1.4% of the adipose tissue mass). The total amounts of carotenoids ( $\pm$  SD) recovered in the rat body, assuming that plasma plus liver plus adipose tissue contain most of the body carotenoids [39], were  $0.92 \pm 0.14$  nmol for  $\beta$ -carotene,  $8.89 \pm 4.35$  nmol for HU36 carotenoids from a purified solution,  $8.67 \pm 4.15$  nmol for HU36 carotenoids from lyophilized cells,  $1.66 \pm 1.90$  nmol for GB1 carotenoids from a purified solution and  $3.12 \pm 2.39$  nmol for GB1 carotenoids from lyophilized cells. Moreover, total amounts of carotenoids recovered in rats were almost totally explained (92 to 98%) by amounts of carotenoids recovered in liver plus adipose tissue in the post-prandial period after three days force-feeding, while, proportionally, very few were recovered in plasma (figure 11).



**Figure 11:** Amounts of carotenoids recovered in rat tissues after Wistar rats were force-fed for 3 days with a mixture of groundnut oil and carotenoids. In each bar, the percentages show the proportions of the carotenoids found in plasma (black section), liver (grey section) and adipose tissue (white section).

Another important finding was the difference in distribution of the bacterial carotenoids between liver and the adipose tissue when ingested either as pure molecules or with lyophilized bacterial material (with cells and spores). Indeed, purified bacterial carotenoids from both HU36 and GB1 were recovered for about two thirds in the liver and one third in the adipose tissue, whereas the same carotenoids ingested with lyophilized bacteria were found mostly (for 85-90%) in the liver, like pure  $\beta$ -carotene (figure 11).

The whole bioavailability was then estimated as the percentage of carotenoids recovered in plasma plus liver plus adipose tissue after killing the rats on the third day of the experiment (each animal ingested about 170 nmol carotenoids in total, see table 3). In this model, HU36 carotenoids were found the most bioavailable, but with a high variability between the rats, and the bioavailability of GB1 carotenoids was statistically similar to the one of  $\beta$ -carotene (figure 12). Moreover, no significant difference in global bioavailability was observed between bacterial carotenoids from HU36 and GB1 either provided purified or as lyophilized bacteria.



**Figure 12:** Whole bioavailability of pure carotenoids in rats, *i.e.* percentage of ingested carotenoid recovered in plasma+liver+adipose tissue, as estimated by using a model of Wistar rats force-fed with 55 nmol carotenoids each day, for 3 successive days. Means  $\pm$  SD of six to eight independent experiments on rats. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney U-test as post-hoc test).

## DISCUSSION

The main objective of this study was to assess the relative effect of the different stages of digestion (*i.e.* release from the food matrix, incorporation into mixed micelles and absorption efficiency) on the bioavailability of carotenoids from HU36 and GB1 *Bacillus* strains (*i.e.* percent of the ingested dose recovered in blood and tissues). To achieve that aim, we used three major complementary models to study the three key steps that govern carotenoid bioavailability: *i)* bioaccessibility, which was measured by using a widely used *in vitro* digestion model [21, 40], *ii)* uptake efficiency by human intestinal cells, which was assessed by the widely used Caco-2 [27-29], *iii)* distribution in tissues, which was assessed by a home-made force-feeding model on rats with physiological doses of carotenoids.

Bioaccessibility of the carotenoids depends on both inherent and environmental factors. First, our results on the incorporation of pure carotenoids in micelles in the *in vitro* digestion model, together with our results on their incorporation efficiency and transfer kinetics in synthetic micelles, clearly show that HU36 and GB1 carotenoids are very easily incorporated in mixed micelles, much better than  $\beta$ -carotene. Their structure is determinant. Indeed their glycosyl groups increase their solubility and thus their transfer from lipid droplets to micelles, while  $\beta$ -carotene is very hydrophobic [41]. Moreover, differences between bioaccessibility values measured with the *in vitro* digestion model and maximal incorporation measured when carotenoids were mixed with micelles during their preparation (58% vs. 93% and 59% vs. 92%, for HU36 and GB1 respectively) can partly be explained by the fact that carotenoids are submitted to degenerative conditions during digestion. HU36 and GB1 carotenoids were indeed degraded by 31% and 19% respectively. In particular, polar yellow glycosyl carotenoid esters were the most degraded in the cocktail of HU36 carotenoids during gastric and duodenal digestions, which correlates with the fact that they were found the least efficiently incorporated into digestion mixed micelles.

Then, we aimed at assessing the effect of the form in which HU36 and GB1 carotenoids can be ingested, *e.g.* as pure molecules or enclosed in lyophilized bacterial material, on their bioaccessibility. To that aim, we compared the results obtained with each form (figures 1 and 5), for carotenoid cocktails from both strains. We found that carotenoids ingested with lyophilized material had a bioaccessibility twice as low as pure molecules. Conversely, the bioaccessibility of  $\beta$ -carotene was similar as pure crystals and when digested in carrot purée. The difference observed for bacterial carotenoids is due to the fact that these two strains do not expel carotenoids in their environment. The double coat of *Bacillus* (plasmic membrane and cellular membrane with peptidoglycans) indeed

limits their permeability and the release of carotenoids. However, numbering experiments conducted on the bacterial populations during *in vitro* digestion highlighted a massive loss (66% and 91%) of viable vegetative HU36 and GB1 cells at pH 4 in the presence of pepsin (gastric digestion), thus increasing the amount of free carotenoids dispersed in the digestive medium, then available for micellarization with bile salts during duodenal digestion at pH 6. Both the higher degradation of GB1 cells and the higher stability of their carotenoids are reasons for the slightly higher bioaccessibility of GB1 carotenoids compared to HU36 carotenoids in the second *in vitro* digestion experiment.

Uptake by intestinal cells is the second key step for carotenoid bioavailability. Results of experiments in Caco-2 showed that absorption efficiencies of  $\beta$ -carotene, HU36 carotenoids and GB1 carotenoids were low (under 10%) and not significantly different. Consequently, absorption efficiency by Caco-2 cells is an important limiting factor limiting carotenoid bioavailability, but has a lower on the relative bioavailability of those different carotenoids. The differences in the molecules' structures did not appear to impact their absorption by the intestinal cells.

We additionally found out in, a complementary absorption experiment with synthetic micelles, that all the carotenoids contained in HU36 or GB1 bacterial cocktails are recovered in Caco-2 cells and what is more they are absorbed with the same efficiency. This suggests that there is no mechanism (*e.g.* preferential affinity or active selectivity) for these bacterial carotenoids.

After absorption, carotenoids are transported by the blood to the liver, then to other tissues of the organism. Liver and adipose tissue are the main storage organs for carotenoids. We set up a force-feeding model in rat in order to compare tissue distribution of pure  $\beta$ -caroten and bacterial carotenoids and of HU36 and GB1 carotenoids ingested with lyophilized material, in similar amounts and conditions. Then, to measure the whole amount of carotenoids recovered in the body, we summed the carotenoids recovered in their main storage tissues (liver, adipose tissue and blood).

The first observation of this study was that though the high variability in rats force-fed with bacterial carotenoids, HU36 carotenoids were more bioavailable than GB1 carotenoids and then  $\beta$ -carotene. Another important finding was that about 90% of whole bioavailability of each carotenoid was explained by bioavailability in liver plus adipose tissue in the postprandial period after three days force-feeding. This results can be due to the accumulation of carotenoids in reserve tissues over the three days, but also but a very quick clearance of blood for these carotenoids. Besides, relative plasma concentrations of

the different carotenoids did not correlate relative whole bioavailabilities, thus suggesting that concentration of carotenoids in plasma is not a valid marker of bioavailability in those conditions, where we measured both carotenoids previously absorbed and transported in VLDL, LDL and HDL and carotenoids newly absorbed and transferred into chylomicrons.

The second important observation was that the form under which bacterial carotenoids were ingested (either as pure molecules or with lyophilized bacterial material) did not impact their bioavailability, but had a huge effect on their distribution between reserve tissues. For both HU36 and GB1 strains, carotenoids from lyophilized material were recovered by 85-90% in the liver, while pure carotenoids were recovered by only 55-60% in the liver and 36-43% in the adipose tissue. The liver is the first organ reached by dietary carotenoids after absorption. An explanation of this astonishing difference could be that the incorporation rate of carotenoids from bacteria cells into digestion mixed micelles is slower than that of purified carotenoids, because of the extended release step simultaneous to cell degradation during gastric digestion. Additional experiments are required to elucidate these interesting findings. Pure  $\beta$ -carotene was also recovered 90% in the liver. This can be due, either to preferential affinity for membrane protein receptors in liver cells, or to the lower solubility of  $\beta$ -carotene, which was found to impact the speed of transfer from mixed micelles to the intestinal mucosa (high rates of triglyceride hydrolysis are required [42]).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the company DSM (Switzerland) for its gift of carotenoids. We also thank Maria-Erica Lopez (head of the laboratory animal house) and Jean-Marc Feuerstein and Mélanie Piednoel for their technical assistance on animal experiments.

## REFERENCES

1. Britton, G. & Khachik, F. (2009) Carotenoids in food. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
2. Khachik, F. (2009) Analysis of carotenoids in nutritional studies. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
3. Mortensen, A. (2009) Supplements. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
4. Krinsky, N. I. & Johnson, E. J. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459-516.
5. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. (2009) Carotenoids: Volume 5: Nutrition and health. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
6. Rock, C. L. (2009) Carotenoids and cancer. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
7. Stahl, W. & Sies, H. (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740: 101-107.
8. Tapiero, H., Townsend, D. M. & Tew, K. D. (2004) The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 58: 100-110.
9. Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J. & Decker, E. A. (2010) Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50: 515-532.
10. Rodriguez-Amaya, D. B. (2010) Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids--A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 726-740.
11. Palozza, P., Serini, S., Ameruso, M. & Verdecchia, S. (2009) Modulation of intracellular signalling pathways by carotenoids. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
12. West, C, E., Castenmiller & J. J. J, M. (1998) Quantification of the SLAMENGLI factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. Hogrefe & Huber, Bern, SUISSE.
13. Duc, L. H., Fraser, P. D., Tam, N. K. M. & Cutting, S. M. (2006) Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *Fems Microbiology Letters* 255: 215-224.
14. Tang, G. W. & Russell, R. M. (2009) Carotenoids as provitamin A. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
15. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. (2008) Special molecules, special properties. In: Carotenoids. Volume 4: Natural functions (Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H., eds.), pp. 1-6. Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
16. Johnson, E. J. (2002) The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care* 5: 56-65.
17. Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. & Sporn, M. B. (1981) Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates. *Nature* 290: 201-208.
18. Perez-Fons, L., Steiger, S., Khaneja, R., Bramley, P. M., Cutting, S. M., Sandmann, G. & Fraser, P. D. (2010) Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811: 177-185.
19. Khaneja, R., Perez-Fons, L., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Steiger, S., To, E., Sandmann, G., Dong, T. C., Ricca, E. et al. (2010) Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 108: 1889-1902.
20. Hong, H. A., Huang, J. M., Khaneja, R., Hiep, L. V., Urdaci, M. C. & Cutting, S. M. (2008) The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 105: 510-520.

21. Garrett, D. A., Failla, M. L. & Sarama, R. J. (1999) Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4301-4309.
22. Tyssandier, V., Reboul, E., Dumas, J. F., Bougteloup-Demange, C., Armand, M., Marcand, J., Sallas, M. & Borel, P. (2003) Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 284: G913-G923.
23. Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J. & Lairon, D. (1996) Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 271: G172-G183.
24. Arvisenet, G. I., Billy, L., Poinot, P., Vigneau, E., Bertrand, D. & Prost, C. (2008) Effect of Apple Particle State on the Release of Volatile Compounds in a New Artificial Mouth Device. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3245-3253.
25. Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., Andre, M., Portugal, H., Jourdeuil-Rahmani, D., Amiot, M. J., Lairon, D. & Borel, P. (2005) Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochemical Journal* 387: 455-461.
26. Tyssandier, V., Lyan, B. & Borel, P. (2001) Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1533: 285-292.
27. Artursson, P. & Karlsson, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175: 880-885.
28. Grès, M.-C., Julian, B., Bourrié, M., Meunier, V., Roques, C., Berger, M., Boulenc, X., Berger, Y. & Fabre, G. (1998) Correlation Between Oral Drug Absorption in Humans, and Apparent Drug Permeability in TC-7 Cells, A Human Epithelial Intestinal Cell Line: Comparison with the Parental Caco-2 Cell Line. *Pharmaceutical Research* 15: 726-733.
29. During, A., Albaugh, G. & Smith, J. C. (1998) Characterization of [beta]-Carotene 15,15'-Dioxygenase Activity in TC7 Clone of Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249: 467-474.
30. Lee, C. M., Boileau, A. C., Boileau, T. W. M., Williams, A. W., Swanson, K. S., Heintz, K. A. & Erdman, J. W. (1999) Review of animal models in carotenoid research. *Journal of Nutrition* 129: 2271-2277.
31. Cinti, S. (2005) The adipose organ. In: *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, pp. 9-15.
32. Gleize, B., Steib, M., Andre, M. & Reboul, E. (2011) Simple and fast high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples. Submitted.
33. Bijsterbosch, M. K., Duursma, A. M., Bouma, J. M. W. & Gruber, M. (1981) The plasma-volume of the wistar rat in relation to the body-weight. *Experientia* 37: 381-382.
34. Hebel, R. & Stromberg, M. W. (1976) Anatomy of the laboratory rat. In: *Anatomy of the laboratory rat.*, p. viii + 173pp.
35. Helies, J. M., Diane, A., Langlois, A., Larue-Achagiotis, C., Fromentin, G., Tome, D., Mormede, P. & Marissal-Arvy, N. (2005) Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes. Res.* 13: 3-10.
36. Lecoq, B., Potrel-Burgot, C., Granier, P., Sabatier, J. P. & Marcelli, C. (2006) Comparison of bone loss induced in female rats by hindlimb unloading, ovariectomy, or both. *Joint Bone Spine* 73: 189-195.
37. Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C. & Schmitt, P. (2004) Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97: 214-219.

38. Clavel, T., Carlin, F., Dargaignaratz, C., Lairon, D., Nguyen-The, C. & Schmitt, P. (2007) Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1568-1575.
39. Borel, P. (2005) Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. *Annales de Biologie Clinique* 62: 165-177.
40. Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I. & Pérez-Gálvez, A. (2009) In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research* 29: 751-760.
41. Cooper, D. A., Webb, D. R. & Peters, J. C. (1997) Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *Journal of Nutrition* 127: S1699-S1709.
42. Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D. & Azais-Braesco, V. (1996) Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research* 37: 250-261.



### 3. PUBLICATION VI - CHEMICAL STRUCTURE OF CAROTENOIDS, BY AFFECTING THEIR HYDROPHOBICITY, IS A KEY FACTOR THAT MODULATE THEIR BIOACCESSIBILITY, ABSORPTION EFFICIENCY AND TISSUE DISTRIBUTION

*Journal of Lipid Research, article soumis*

CHARLOTTE SY<sup>1-5</sup>, BEATRICE GLEIZE<sup>1-3</sup>, OLIVIER DANGLES<sup>4-5</sup>, JEAN-FRANÇOIS LANDRIER<sup>1,3</sup>, CATHERINE CARIS VEYRAT<sup>4-5</sup>, & PATRICK BOREL<sup>1-3\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1260, "Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques", F-13385, Marseille, France

<sup>2</sup> INSERM, ERL 1025, "Biodisponibilité des Micronutriments", F-13385, Marseille, France

<sup>3</sup> Aix-Marseille Univ, Faculté de Médecine, F-13385, Marseille, France

<sup>4</sup> INRA, UMR408, "Safety and Quality of Plant Products", 84000, Avignon, France

<sup>5</sup> Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408, 84000, Avignon, France

\* Corresponding author. E-mail address: Patrick.borel@univmed.fr

#### ABSTRACT

---

Carotenoids are lipid microconstituants of the human diet. Their bioavailability is very low and affected by numerous factors. One of this factor is assumed to be their molecular structure that leads to different physico-chemical properties. However scarce data are available on its effect on absorption and tissue distribution of carotenoids. The aim of this study was to unravel the role of this factor on the key steps that govern carotenoid bioavailability, *i.e.* solubilisation of carotenoids in mixed micelles during digestion, carotenoid uptake by the intestinal cells and carotenoid accumulation in their main storage tissues. Main results were as follows: bioaccessibility of pure carotenoids (lycopene, lutein,  $\beta$ -carotene and astaxanthin) solubilized in triglycerides and submitted to *in vitro* digestion was inversely related to their hydrophobicity ( $r=-0.96$ ,  $p=0.04$ ). There was no significant correlation between carotenoid physico-chemical properties and absorption efficiency by Caco-2 cells, which was significantly higher for lycopene (23%) than for the other carotenoids that showed similar values (7 to 10 %). Whole bioavailability in rats, *i.e.* sum of carotenoids recovered in plasma+liver+adipose tissue, was as follows: lycopene (3.5 nmol) > lutein and  $\beta$ -carotene (0.8-1 nmol) > astaxanthin (0.3 nmol). Tissue distribution was different for the different carotenoids: lycopene and  $\beta$ -carotene were mainly recovered in liver (87-95%), as compared to 48-53% for lutein and astaxanthin, and lutein was recovered in a higher proportion in the adipose tissue compared to the other carotenoids studied (36% vs 4-7%). We also established that the concentration of carotenoids in the liver is a better marker of whole bioavailability than the concentration of carotenoids in plasma. A side result of this study was that the absorption efficiency into Caco-2 is a valid marker ( $r=0.99$ ,  $p=0.012$ ) of the whole bioavailability of pure carotenoids. On the whole, these data show that carotenoid molecular structure is a key factor that governs their bioavailability and part of tissue distribution.

---

**KEYWORDS:** *nutrition,  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein, astaxanthin, in vitro digestion model, micelles, Caco-2, intestinal bioavailability, rat.*

## INTRODUCTION

Carotenoids are lipophilic micronutrients that are not biosynthesized by humans but are ingested in food [1-3]. About 40 of the 600 carotenoids described in nature, are present in the human diet.  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene and lycopene are the main carotenes (composed of carbon and hydrogen atoms) and lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin and astaxanthin are common xanthophylls with hydroxyl and keto groups as structural elements [4]. Epidemiological studies suggest that the consumption of carotenoid-rich foods play an important role in benefiting human health, highlighting negative correlations between intake or blood concentrations of carotenoids and risk for several diseases like age-related macular degeneration, some cancers, diseases associated with the metabolic syndrome (lipidic tissue inflammation, cardiovascular diseases) [5-9]. Their role on health preservation was initially attributed to their antioxidant activity [10]. However a wide range of other biochemical actions have also been reported: impact on signalling pathways and expression of genes [8, 11], effect on secretion of pro-inflammatory cytokines [12], retinoid-dependent signalling, modulation of carcinogen metabolism, regulation of cell-growth, proliferation and differentiation [9], stimulation of gap functional communication, modulation of DNA repair mechanisms, induction of detoxifying enzymes and filtering of blue light [13].

Potential beneficial health effects of carotenoids are obviously linked to blood and tissue concentrations of these molecules. These concentrations are in turn related to the absorption efficiency of these compounds and to their metabolism within the body. The fraction of dietary carotenoids that is recovered in blood or in a tissue to exert its biologic effects is called bioavailability. Carotenoid bioavailability depends on several critical steps [14]. The first one is the release of carotenoids from the food matrix, generally a fruit or vegetable matrix, and their transfer into mixed micelles during digestion. The percentage of the ingested dose transferred into mixed micelles is called bioaccessibility. Bioaccessibility depends on both inherent (e.g. solubility of carotenoid in micelles) and matrix-related factors (e.g. location of carotenoids within the food matrix, interactions with matrix molecules). The location in the food matrix (*i.e.* vacuoles, peels, flesh) is thought determinant as well as the interactions with fibers or proteins [15]. Besides, the carotenoids' chemical properties are likely to impact their storage form in the food matrix (free or crystalline). Then, uptake into intestinal mucosal cells (calculated as absorption efficiency) is known to be facilitated by intestinal cell membrane proteins [16-19], identified so far as cholesterol transporters and displaying a broad substrate specificity

[20]. After secretion into the lymphatic system in chylomicrons, carotenoids are vehicled by HDL, LDL and VLDL [21] and their distribution between blood and tissues might also be modified by their physico-chemical properties and membrane proteins [22].

The different steps of carotenoid bioavailability are influenced by a complex set of factors: carotenoid molecular structure, molecular linkage (e.g. esterification), amount of carotenoids consumed in a meal, matrix in which the carotenoid is incorporated, effectors of absorption and bioconversion, nutrient status of the host, genetic factors, host-related factors, and mathematical interactions. All these factors can be reminded by the acronym SLAMENGI [23]. Although attempts have been made to quantify the impact of the various factors on carotenoid bioavailability and bioconversion, many of the data available are not strictly comparable [23] and each carotenoid seems to show an individual pattern of absorption, plasma transport, and metabolism [24]. It is not possible to know whether the differences in bioaccessibility, absorption efficiency and bioavailability of different carotenoids reported in the diverse studies are due to the intrinsic physico-chemical properties of the carotenoids or to matrix effect or both.

The aim of this study was to assess the effect of the chemical structure of carotenoids on the key steps involved in their bioavailability. To that aim, we compared the bioaccessibility, absorption efficiency by intestinal cell and tissue distribution of two carotenes ( $\beta$ -carotene and lycopene) and two xanthophylls (lutein and astaxanthin), by using three main complementary models: an *in vitro* digestion procedure, Caco-2 TC-7 cell monolayers and a force-feeding experiment on rats.

## MATERIALS AND METHODS

**Supplies and chemicals.** Foods were purchased from a local supermarket and chosen without antioxidants, acidifiers or preservatives: canned steamed carrot kept with sugar, salt and water (Daucy), canned peeled Roma tomatoes kept with their juice (store brand, Auchan), canned chopped spinach boiled and kept with salt and water (Daucy), Norwegian smoked salmon, salted and kept in vacuum packing (store brand, Auchan). Pure all-*trans*  $\beta$ -carotene, all-*trans* lycopene and all-*trans* lutein (> 95%) were kindly provided by DSM LTD (Basel, Switzerland). All-*trans* astaxanthin (> 98%), salts ( $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), mucin,  $\alpha$ -amylase, pepsin, porcine pancreatin and porcine bile extract, were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). 2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (phosphatidylcholine), 1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lysophosphatidylcholine), mono-olein, free cholesterol, oleic acid, sodium taurocholate, pyrogallol, were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). FBS (foetal bovine serum) was purchased from Biomedix (Issy-les-Moulineaux, France). DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing 4.5 g/l glucose and trypsin/EDTA (500 and 200 mg/l respectively), non-essential amino acids, penicillin/streptomycin, PBS (phosphate buffered saline solution) and PBS containing 0.1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  and 1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  (PBSCM) were from Gibco® BRL (Cergy-Pontoise, France). Apo-8'-carotenal (> 95%), used as internal standard to calculate recovery yield during carotenoid extraction, was from Fluka. Pyrogallol (used as antioxidant preservative) was from Sigma Life science (St-Quentin-Fallavier, France). Hexane, methanol, dichloromethane and methyl-tert-butyl-ether (MTBE) were of HPLC grade and purchased from Carlo Erba Reactifs SDS (Val-de-Reuil, France). The Uptima bicinchoninic acid assay (BC assay) protein quantification small kit was from Interchim (Montluçon, France).

**Preparation of the test meals used in the *in vitro* digestion experiments to measure carotenoid bioaccessibility.** Experiments were made twice for each carotenoid; first using pure molecules in order to measure the intrinsic bioaccessibility of carotenoids (*i.e.* without the effect of the food matrix), then with foods rich in each carotenoid studied. For experiments with pure carotenoids, stock solutions were dispersed in groundnut oil and evaporated to obtain concentrations of about, but precisely, 750  $\mu\text{mol/L}$  in oil. The first digestions were conducted on the oil alone, while for experiments with foods, the food sources of carotenoids were codigested with a standard meal (table 1). Meal composition was chosen in order to be close to the proportions of each macronutrient

(lipids, carbohydrates and proteins) found in regular meals. Potatoes were boiled in tap water, peeled, and hand-pureed. Meat was fried medium in a frying-pan without added fat. Potato puree and fried meat were divided into aliquots and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Food sources of carotenoids were chosen so that they provide high amount of the main carotenoid of interest, *i.e.* carrot purée for  $\beta$ -carotene, tomato pulp for lycopene, chopped spinach for lutein and salmon for astaxanthin (see table 2). They were used immediately after unpacking and cut into pieces of similar sizes, in order to limit the variability due to food preparation.

**Table 1.** Composition of the test meals used in the *in vitro* digestion experiments performed to measure carotenoid bioaccessibility.

Experimental conditions	Components	Amounts * (g)
with pure carotenoids	- groundnut oil (containing about but precisely 40 $\mu\text{g}$ pure carotenoids)	$0.1 \pm 0.02$
	- NaCl 0.9%	$32.0 \pm 0.01$
with carotenoid-rich foods	- potato purée	$6.7 \pm 0.02$
	- beef meat	$1.2 \pm 0.02$
	- olive oil	$0.1 \pm 0.02$
	- carotenoid-rich food	$4.0 \pm 0.02$ **
	- NaCl 0.9%	$32.0 \pm 0.01$

The test meal without the carotenoid-rich food contained 64.5% energy as carbohydrates, 14.5% as fat, and 21.0% as proteins. When, for example, 4 g tomato pulp was added as the lycopene source, the meal contained 66.8% energy as carbohydrates, 13.2% as fat, and 20% as proteins. These proportions are close to US-dietary recommended intake in macronutrients, *i.e.*, 45-65% carbohydrates, 20-35% fat, and 10-35% proteins.

\* Mean  $\pm$  SD of the amounts added in three experiments.

\*\* The detailed carotenoid content of each test-meal is reported in table 2.

**Table 2.** Carotenoid content of the test-meals used in the *in vitro* digestion experiments performed to measure carotenoid bioaccessibility.

Carotenoids tested		Carotenoid sources	Amount of carotenoids added in the <i>in vitro</i> digestion experiments * ( $\mu\text{g}$ )
pure carotenoids	$\beta$ -carotene	all- <i>trans</i> $\beta$ -carotene > 95%, synthetic	$40 \pm 0.1$
	lycopene	all- <i>trans</i> lycopene > 95%, synthetic	$40 \pm 0.1$
	lutein	all- <i>trans</i> lutein > 98%, synthetic	$40 \pm 0.1$
	astaxanthin	all- <i>trans</i> astaxanthin > 98%, synthetic	$40 \pm 0.1$
carotenoids in commercial foods	$\beta$ -carotene	carrot purée	$44.2 \pm 5.8$ **
	lycopene	tomato pulp	$29.9 \pm 5.5$ **
	lutein	chopped spinach	$215.1 \pm 1.0$ **
	astaxanthin	smoked salmon	$35.9 \pm 5.5$ **

\* Mean  $\pm$  SD of three measurements.

\*\* Amounts of only the main carotenoids found in these foods. Nevertheless note that carrots also contain  $\alpha$ -carotene, tomato also contains neurosporene and  $\beta$ -carotene, spinach also contain zeaxanthin and  $\beta$ -carotene, salmon also contains canthaxanthin.

***In vitro* digestion experiments to measure carotenoid bioaccessibility.** We used the *in vitro* digestion model developed by Garrett et al. [25]. The experimental conditions were slightly modified to better take into account physicochemical conditions prevailing in the human gastrointestinal lumen [13, 26] and to reduce the amount of non-hydrolysed triglycerides as much as possible at the end of the digestion experiments. Indeed, we found out in a preliminary experiment that, if digestion duration is too short, remaining non-hydrolysed triglycerides trap a fraction of carotenoids and therefore lead to underestimate carotenoid bioaccessibility (artefact). Since almost all triglycerides are hydrolysed *in vivo* [27], it was important to obtain advanced hydrolysis at the end of the experiment in the *in vitro* digestion model to avoid this artefact. Meal components, or only groundnut oil when the bioaccessibility of carotenoids was studied without the effect of the food matrix (see table 1), were mixed with 32 mL NaCl 0.9% in bidistilled water and homogenised in a shaking water bath at 37°C for 10 minutes. Then, 2.5 mL artificial saliva [28] (62 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 15.1 mmol/L NaCl, 6.4 mmol/L KCl, 3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 6 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.16 g/L mucin, 13 g/L α-amylase) were added and the medium was put under ultraturax (5,000 rpm) for 30 seconds to mimic chewing and incubated at 37°C for 10 more minutes. For incubation at 37°C in gastric conditions, the pH of the medium was adjusted to 4.0 (± 0.02 with about 600 µL of 1 mol/L HCl) and then 2 mL porcine pepsin (40 mg/mL in 0.1 mol/L HCL) were added. The medium was finally incubated at 37°C in duodenal conditions: the pH was raised to 6.0 (± 0.02, by adding around 800 µL 0.9 mol/L sodium bicarbonate pH 6.0) to match the pH measured in the human duodenum during digestion and a mixture of porcine bile extract and pancreatin were added (9 mL containing 2 mg/mL pancreatin and 12 mg/mL bile extract in 100 mmol/L trisodium citrate, pH 6.0 ; and 4 mL porcine bile extract at 0.1 g/mL in 100 mmol/L trisodium citrate, pH 6.0 ). Each experiment with the different carotenoid sources was run in triplicate.

**Isolation of the micellar fraction from digesta.** Micelles were separated from oil droplets and food particles by ultracentrifugation (2,500 g, for 1 h at 10°C in a Jouan GR412-W rotor, (Saint-Herblain, France), followed by filtration (0.8 and then 0.22 µm filter with Millex®-GS membrane, Millipore MF, Cork, Ireland). Aliquots were stored at -80°C under a blanket of nitrogen until either the tests of intestinal cell uptake in Caco-2 cells or the HPLC analysis of carotenoids.

**Preparation of synthetic mixed micelles.** Mixed micelles were prepared as previously described [17] to mimic the lipid composition of the mixed micelles recovered in the human duodenum during digestion [27]. Appropriate volumes of stock solutions of the following compounds were transferred to glass flasks to obtain the following final concentrations: 0.04 mmol/L phosphatidylcholine, 0.16 mmol/L lysophosphatidylcholine, 0.3 mmol/L mono-olein, 0.1 mmol/L free cholesterol, 0.5 mmol/L oleic acid. Carotenoid-rich mixed micelles were prepared with additional pure carotenoids for final concentrations of 5  $\mu\text{mol/L}$ . Stock solution solvents were carefully evaporated under nitrogen. The dried residue was solubilized in bidistilled water containing 0.9% NaCl and 5 mmol/L taurocholate and vigorously mixed by a 5-min homogenisation by magnetic stirring and 5 min sonication at 25 W (Branson 250 W sonifier; Danbury, CT, U.S.A.). The mixtures obtained were filtered through a presterilized 0.22  $\mu\text{m}$  filter (with Millex<sup>®</sup>-GS membrane, Millipore MF, Cork, Ireland). The resultant solutions were optically clear.

**Determination of the intrinsic solubility of carotenoids in mixed micelles.** Because incorporation of carotenoids into mixed micelles during digestion (*i.e.* carotenoid bioaccessibility), depends on an array of factors including matrix, pH, lipase activity or bile lipid concentration [29], experiments were performed to evaluate the intrinsic solubility of carotenoids in mixed micelles (*i.e.* the solubility that depends only on the physico-chemical properties of carotenoids and not on the effect of the food matrix. Two distinct types of experiments were performed).

The first type of experiments aimed to measure the maximal amount of each carotenoid species that can be incorporated in a fixed amount of mixed micelles. To do that an appropriate volume of solvent stock solutions containing 50 nmol pure carotenoids was mixed with appropriate volumes of solvent stock solutions of the lipid components of the micelles (0.4 nmol phosphatidylcholine, 1.6 nmol lysophosphatidylcholine, 3.0 nmol mono-olein, 1.0 nmol free cholesterol and 5.0 nmol oleic acid). The solvent mixture was then evaporated under nitrogen. Dried lipids and carotenoids, were then homogenized in 10 mL of a solution of 0.9% NaCl and 5 mmol/L taurocholate in bidistilled water and mixed micelles were formed by sonication as previously described. The 0.22  $\mu\text{m}$  filtered solutions were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the amount of carotenoid incorporated in mixed micelles was measured as described thereafter.

The second type of experiment aimed to compare the kinetics of transfer of different carotenoid species from their crystalline forms to carotenoid-free mixed micelles already solubilised in water. To do that, 2 mL aqueous solution of carotenoid-free mixed micelles in 0.9% NaCl and 5 mmol/L taurocholate (containing 0.08 nmol

phosphatidylcholine, 0.32 nmol lysophosphatidylcholine, 0.6 nmol mono-olein, 0.2 nmol free cholesterol and 1.0 nmol oleic acid) was formed and then added onto 10 nmol dry carotenoid crystals evaporated in a glass tube. The kinetics of incorporation of the carotenoids in the mixed micelles under moderate stirring (250 rpm) at 37°C and protected from light was followed over 6 hours: every 30 min, a sample of the aqueous medium was collected and filtered through a 0.22 µm filter (with Millex®-GS membrane, Millipore MF, Cork, Ireland). Then, the amount of carotenoids was measured as described thereafter.

**Cell culture.** Caco-2 clone TC-7 cells were a gift from Dr M. Rousset (U178 INSERM, Villejuif, France). Cells, passages 25-80, were grown in 25 cm<sup>2</sup> flasks (Corning Inc., New York, USA) in the presence of DMEM (glutamine medium) supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 1% non-essential amino acid and 1% antibiotics (complete medium). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of air:CO<sub>2</sub> (90:10, v/v) and the medium was changed every 48 h. Monolayers were subcultured with a 4-day passage frequency, when they reached a confluence of approximately 80%, by treatment with 25% trypsin/EDTA. For each experiment, cells were seeded at a density of 25.10<sup>4</sup> cells/well, and grown on transwells (6-well plate, 24-mm diameter, with 1 µm-pore-size polycarbonate inserts, Corning Inc., New York, USA). Apical chamber received 1 mL complete medium and the basolateral chamber received 2 mL complete medium during the first 6 days. For the last 15 days, the complete medium was still used in the basolateral chamber, whereas an FBS-free medium was used in the apical chamber. Media were changed every day for 21 days to obtain confluent differentiated cell monolayers.

***In vitro* carotenoid absorption by Caco-2 cell monolayers.** At the beginning of each experiment, cell monolayers were washed twice with 1 mL PBS. The apical side of the cell monolayers received 1 mL carotenoid-rich mixed micelles (mixed micelles coming from the *in vitro* digestion experiments diluted 1/5 in DMEM, or synthetic mixed micelles diluted 1/2 in DMEM, because high concentrations of bile salts deteriorate the cells), while the basolateral side received 2 mL normal medium. Cell monolayers were incubated at 37°C for 3 hours. The time of incubation was chosen from preliminary experiments to obtain sufficient amounts of absorbed carotenoids for accurate measurements. After the incubation period, media from each side of the membrane were harvested. Cell monolayers were washed twice with 1 mL PBS to eliminate adsorbed carotenoids, scraped, and collected in 500 µL PBS. All the samples were stored at -80°C under nitrogen until carotenoid extraction and HPLC analysis.

**Measurement of carotenoid bioavailability in an animal model.** The animal model to study carotenoid bioavailability was multiple-dose force-feeding over three days in young (6 weeks old) male albino Wistar rats of normal weight (about 200 grams). Experiments were conducted according to animal ethical policies and were approved by the local experimental animal ethic committee. Five groups of eight rats were included in the study: a control group was force-fed with 1 mL groundnut oil without carotenoids and four groups were force-fed with the same amount of oil containing pure carotenoids ( $\beta$ -carotene, lycopene, lutein or astaxanthin).

The protocol was as follows: after one week acclimatising, 8 rats randomly chosen among the 40 were kept without food the night before blood collection. A blood sample (600  $\mu$ L) was collected by intra-cardiac venipuncture. This blood sample permitted to check baseline plasma carotenoid concentrations, which were expected to be null because there were no carotenoids in rat diet. Force-feeding was performed each day over three days with pure carotenoids incorporated in 1 mL groundnut oil. The rats had free access to basic food and water until the evening prior to the last day of force-feeding experiments. The doses of carotenoids incorporated in oil and given to the rats were chosen to bring about 55 nmol carotenoids/rat/day, corresponding to 0.15 mg carotenoid/kg/day (exact amounts of carotenoids given to the rats were measured and are reported in table 3). The third force-feeding experiment was made on empty stomachs (no access to food the night before). Just before this last force-feeding, an intra-cardiac venipuncture was performed on anesthetized rats to evaluate the effect of the two-day force-feeding with carotenoids on fasting plasma carotenoid concentrations. Then, the third force-feeding experiment was performed and the rats were killed exactly 4 hours later (preliminary experiments showed that it is the time when the maximum amount of newly absorbed carotenoids are recovered in blood, likely in chylomicrons). Blood and tissue samples (liver and adipose tissue) were collected to evaluate: *i*) with the blood samples, the effect of a meal rich in carotenoids on the increase of postprandial plasma concentration of carotenoids, which is an estimate of absorption efficiency, and *ii*) the effect of three days force-feeding on carotenoid concentration in their main storage tissues, *i.e.* adipose tissue and liver, which is an estimate of their bioavailability in these tissues. For the adipose tissue, samples were parts of the epididymal adipose tissue, which is easily collected and a good model of the global adipose tissue in rats [30]. All the tissue samples were immediately plunged into liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until carotenoid analysis.

**Table 3.** Total amounts of carotenoids administered to the rats over the three-day force-feeding experiments.

Rat groups	Carotenoids tested	Carotenoid sources	Total amounts of carotenoids administered ** (nmol)
Control	(no carotenoids)	-	-
BC	$\beta$ -carotene	synthetic all- <i>trans</i> 95%	169.4
LY	lycopene	natural* all- <i>trans</i> 90%	168.8
LU	lutein	synthetic all- <i>trans</i> 98%	169.2
AS	astaxanthin	synthetic all- <i>trans</i> 98%	167.5

\* Isolated from tomato oleoresin and given by Conesa (see the material and methods section).

\*\* Rats were each fed three times with about 55 nmol carotenoids suspended in 1 mL groundnut oil administered directly in the esophagus using stainless steel cannula.

**Extraction of carotenoids from the various *in vitro* and *in vivo* samples.** The procedure was adapted to the diverse types of samples (aqueous fractions from the *in vitro* digestion experiments and from caco-2 experiments, or animal tissues containing more or less lipid esters).

*Extractions from digesta, micellar fractions and from Caco-2 experiments fractions.* In a glass tube, 500  $\mu$ L internal standard (apo-8'-carotenal in ethanol) and 2 mL hexane were added to 500  $\mu$ L sample. The mixture was homogenized for 5 min on a vortex blender and then centrifuged (1,200 g, for 5 min at 4°C in a Jouan GR412-W rotor, Saint-Herblain, France). The upper phase was collected and 2 mL dichloromethane were added to the lower phase. After another 5-min homogenization and a 5-min centrifugation, the lower phase was collected, pooled with the previously collected volume and evaporated under nitrogen.

*Extractions from plasma samples.* The diverse blood samples from rats, collected in tubes with heparin, were immediately centrifuged in order to separate the plasma, which was then put into liquid nitrogen and kept at -80°C. Extractions were then conducted as described above for the *in vitro* samples.

*Extractions from liver samples* (adapted from [31]). About 150 mg were mixed with 300  $\mu$ L PBS buffer and crushed with two 3-mm-diameter stainless steel balls in 2 mL Eppendorf tubes using a MM301 ball mill (Retsch, Eragny-sur-Oise, France). A 50  $\mu$ L aliquot was collected for protein assay. Another 250  $\mu$ L aliquot was transferred to a glass tube, mixed with 150  $\mu$ L PBS, 500  $\mu$ L dichloromethane and 1 mL methanol. After a 5-min homogenization on a vortex blender, 500  $\mu$ L dichloromethane and 500  $\mu$ L distilled water were added. The mixture was homogenized for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 10 min / 10°C). The lower phase was collected and evaporated to dryness under nitrogen. Then, 500  $\mu$ L distilled water, 500  $\mu$ L internal standard (apo-8'-carotenal in

ethanol), and 2 mL hexane were added on the dry residue. The mixture was homogenized again for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 5 min / 4°C). The upper phase was collected and 2 mL dichloromethane were added to the lower phase. After another 1-min homogenization and a 10-min centrifugation, the lower phase was collected, pooled with the previously collected volume and evaporated under nitrogen.

*Extractions from adipose tissue samples* [31]. About 150 mg were mixed with 300 µL PBS buffer and crushed with two 3-mm-diameter stainless steel balls in 2 mL Eppendorf tubes using a MM301 ball mill (Retsch, Eragny-sur-Oise, France). A 50 µL aliquot was collected for protein assay. Another 250 µL aliquot was transferred to a glass tube, mixed with 150 µL PBS, 500 µL dichloromethane and 1 mL methanol. After a 5-min homogenization on a vortex blender, 500 µL dichloromethane and 500 µL distilled water were added. The mixture was homogenized for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 10 min / 10°C). The lower phase was collected and evaporated to dryness under nitrogen. Then, 1 mL ethanol-KOH (5.5%, m/v) and 100 µL freshly prepared ethanol-pyrogallol (1.2%, m/v) were added to the dry residue and the mixture was incubated at 37°C under stirring for saponification of the lipid esters from the adipose tissue. After a 90-min incubation, 1 mL distilled water, 250 µL internal standard (apo-8'-carotenal in ethanol) and 3 mL hexane were added. The mixture was homogenized for 1 min on a vortex blender and centrifuged (1,200 g / 10 min / 4°C). The upper phase was collected and rinsed with 1 mL distilled water and 1 mL ethanol. After another 1-min homogenization and a 5-min centrifugation, the upper phase was collected and evaporated under nitrogen.

**HPLC analysis of the carotenoids** (method from [31]). After evaporation to dryness, all dried extracts were dissolved in 200 µL methanol:dichloromethane (65:35, v/v). Carotenoids were quantified by reverse-phase HPLC on a Dionex system (equipped with in line degazor, a P680 pump, a cooled automatic sample injector ASI-100 and a UV/visible diode-array detector UVD340U, Dionex France, Voisins-le-Bretonneux, France). Carotenoids were separated by using a C30 column (250 x 4.6 nm, 5 µm, YMC Separation Technology, Interchim, Montluçon, France). The mobile phase was a gradient of three solvents: A was methanol, B was MTBE and C was bidistilled water. The elution started with 96% A, 2% B and 2% C. Then the gradient was linear until t = 27 min and between 27 and 28 min, the proportions were 80% A, 20% B and 0% C; between 28 and 29 min the gradient was linear back to the initial conditions (96% A, 2% B and 2% C) and it was kept constant to 32 min. Carotenoids were detected at their maximum of absorbance (445 nm for lutein, 455 nm for β-carotene, and 470 nm for lycopene and astaxanthin). They were identified by retention time and spectral analysis (from 300 to 550 nm) in comparison with pure

standards. Quantification was performed using Dionex Chromeleon software (Dionex Chromatography Management system, version 6.80).

**Protein assay on the tissue samples from the *in vivo* study.** Tissue proteins were titrated with bicinchoninic acid protein assay on 96-well microplates. This method is a spectrophotometric assay based on the purple-coloured specific binding between bicinchoninic acid and Cu(I) released by the reduction of Cu(II) by the proteins of the sample. The protocol enables titrations in the range of 5 µg/mL to 250 µg/mL. A standard curve was established with bovine serum albumin. The 50 µL aliquots of liver samples and of adipose tissue samples were diluted respectively to 1/200 and 1/15 in PBS buffer previous to titration, so that the protein concentrations in the samples fall in the range of the standard curve.

**RNA isolation from rat adipose tissue and qPCR.** Total cellular RNA was extracted from rat liver and epididymal fat pads using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase [12]. Real-time quantitative RT-PCR analyses were performed using the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as previously described [32]. For each tissue and each condition (control and force-feeding with the diverse carotenoids in groundnut oil), expression of SR-BI and CD36 membrane transporters was quantified in duplicate, and 18S mRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (CT) method [33]. Data were expressed as relative expression ratio.

**Calculations and Statistics.** All the *in vitro* experiments were run in triplicate. Bioaccessibility was defined as the percentage of carotenoids recovered in the micellar fraction after *in vitro* digestion, in relation to the amount of carotenoids measured in the digestive medium just before addition of artificial saliva. The solubility of the carotenoids in synthetic mixed micelles was defined as the percentage of carotenoids recovered in the micellar fraction, in relation to the total carotenoids present in the medium. Absorption efficiency of the carotenoids was defined as the percentage of carotenoids recovered in scrapped Caco-2 cells, in relation to the amount of carotenoids initially added on the apical sides of the cell monolayers. *In vitro* bioavailability of the carotenoids was defined as the product of bioaccessibility by Caco-2 cell absorption efficiency.

*In vivo* experiments were run with six to eight animals per group. *In vivo* bioavailability in rats was defined as the percentage of total carotenoids recovered in the

plasma plus liver plus adipose tissue, in relation to the total amount of carotenoids administered to the rats over the three-day force-feeding. On the basis of literature data, we determined that the corporal composition of a 200 g Wistar rat is on average: 8.36 mL plasma ( $2.54 + 0.0291 \times$  body mass in grams, [34]), 8.3 g liver ( $0.0415 \times$  body mass in grams, [35]) and about 20 g adipose tissue (10 to 12% of the body mass for rats between 200 and 300 g, [36, 37]). Then, protein assays on liver and adipose tissue samples gave the average protein contents in the liver and in the adipose tissue. Thus, the total amount of carotenoids recovered in whole plasma and in both tissues could be calculated from concentration results.

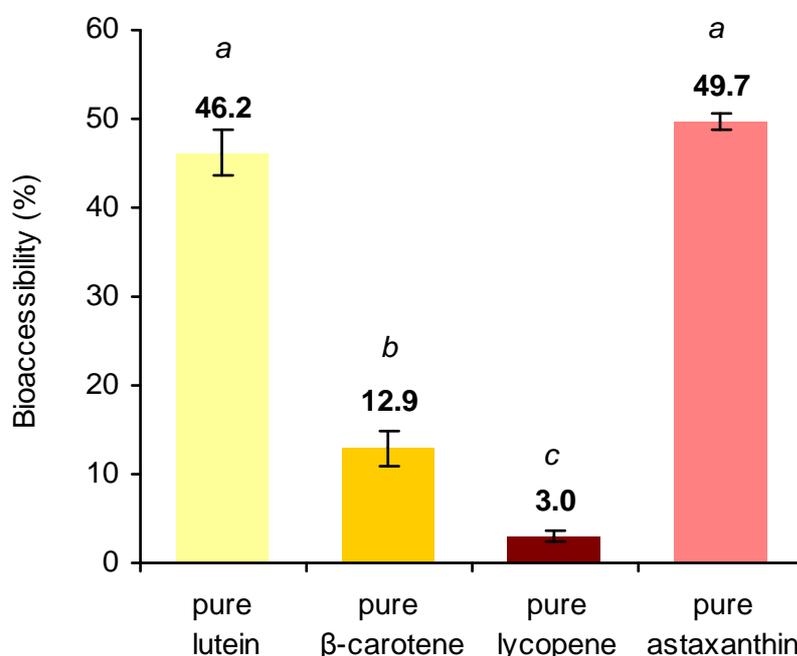
Results were expressed as means and standard deviations. Differences between means were assessed using ANOVA followed by the post-hoc Tukey-Kramer's test for parametric data (*in vitro* results). In the case of non-parametric data (*in vivo* results), they were assessed using the Kruskal-Wallis' test followed by the Mann-Whitney U-test when the Kruskal-Wallis test showed significant differences between groups. P values under 0.05 were considered significant. Statistical comparisons were performed using Statview software version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTS

### Bioaccessibility of pure carotenoids as measured by the *in vitro* digestion model.

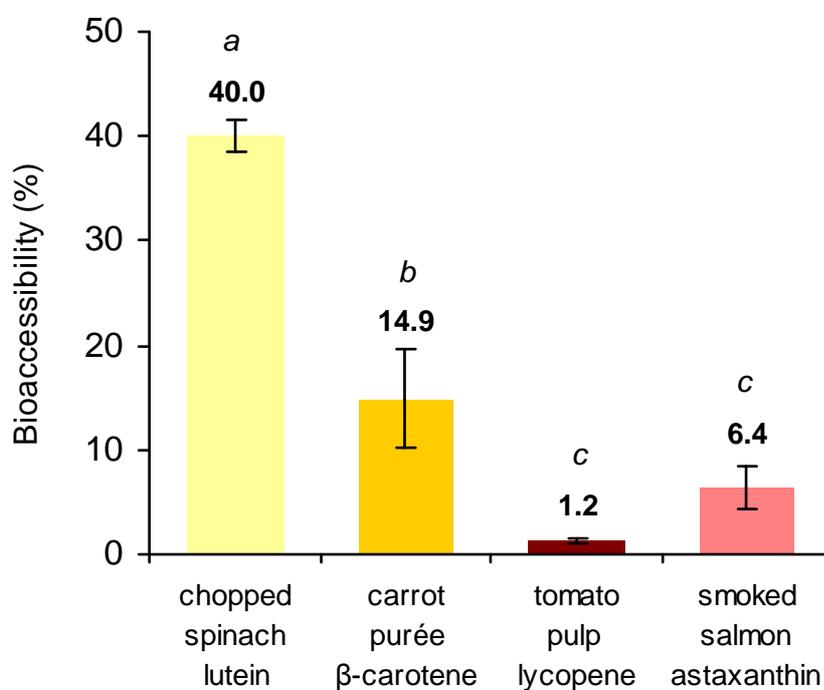
The long duration of the two-step digestion procedure (gastric digestion for 1 hour and duodenal digestion for 2 hours, corresponding to the longest durations reported in previous similar procedures [38]), along with the concentration of oil chosen (100 mg in 50 mL digestion medium) allowed to obtain about 90% lipolysis at the end of the process. Lipolysis efficiency was close to what happens *in vivo*. The two xanthophylls, lutein and astaxanthin, had close bioaccessibility with about 50 % of the initial carotenoid content recovered in the mixed micelle fraction (figure 1). The two carotenes,  $\beta$ -carotene and lycopene, were respectively about 4 and 16 times less bioaccessible than the two xanthophylls.

Besides, the carotenoids were partially degraded during the digestion procedure. Lutein and astaxanthin were the most stable, with  $87.55 \pm 2.00\%$  and  $93.14 \pm 2.61\%$  of the initial content recovered at the end of digestion, respectively. The residual amount of  $\beta$ -carotene was  $69.46 \pm 1.20\%$  and lycopene was the most degraded carotenoid with only  $57.41 \pm 4.35\%$  recovered at the end of the digestion experiment.



**Figure 1.** Bioaccessibility of pure carotenoids measured using the *in vitro* digestion model. Means  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

**Bioaccessibility of food carotenoids as measured by the *in vitro* digestion model.** Spinach lutein was the most bioaccessible carotenoid, followed by carrot purée  $\beta$ -carotene, salmon astaxanthin and tomato purée lycopene (figure 2). Compared to the bioaccessibility of pure carotenoids,  $\beta$ -carotene and lutein from whole vegetables were micellarized in similar proportions. Lycopene was again the least micellarized carotenoid; furthermore its bioaccessibility from tomato pulp was twice lower than when it was digested without the food matrix (figure 1). The result of astaxanthin was the most surprising, indeed smoked salmon astaxanthin was more than seven times less bioaccessible than food matrix free astaxanthin.



**Figure 2.** Bioaccessibility of food carotenoids using the *in vitro* digestion model. Means  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

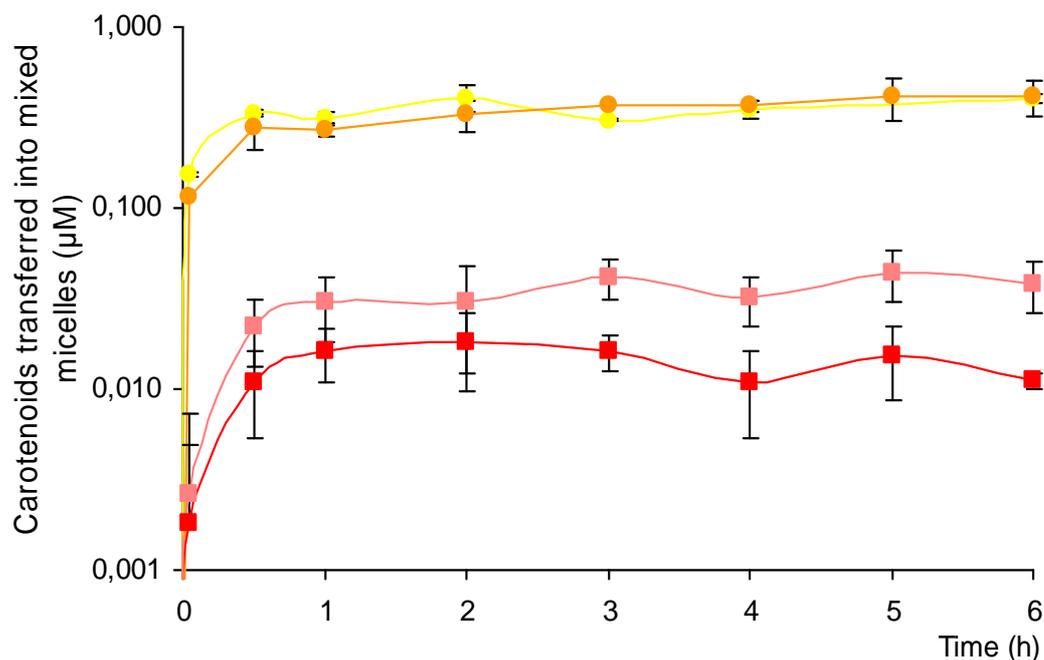
**Incorporation efficiency of pure carotenoids during the preparation of synthetic mixed micelles.** When homogenised with phospholipids, cholesterol and glycerol esters (mixed micelle lipids) before the formation of mixed micelles, incorporation efficiency of  $\beta$ -carotene, lutein and astaxanthin was over 30% (table 4). Lutein showed a particularly high incorporation efficiency (about 89%), followed by  $\beta$ -carotene and astaxanthin. Lycopene was the least efficiently incorporated pigment in synthetic mixed micelles, noticeably far from the other carotenoids.

**Table 4.** Incorporation and transfer efficiencies (% of 5  $\mu\text{mol/L}$ ) of carotenoids in synthetic mixed micelles.

	<b>lutein</b>	<b><math>\beta</math>-carotene</b>	<b>lycopene</b>	<b>astaxanthin</b>
Incorporation efficiency (%) during the preparation of synthetic mixed micelles	89.30 $\pm$ 3.20 (a)	48.60 $\pm$ 3.21 (b)	2.50 $\pm$ 0.66 (c)	37.18 $\pm$ 2.46 (b)
Maximum transfer efficiency (%) in pre-formed mixed micelles during kinetic experiments showed in figure 3	8.12 $\pm$ 1.33 (a)	8.25 $\pm$ 2.16 (a)	0.36 $\pm$ 0.17 (b)	0.88 $\pm$ 0.28 (b)

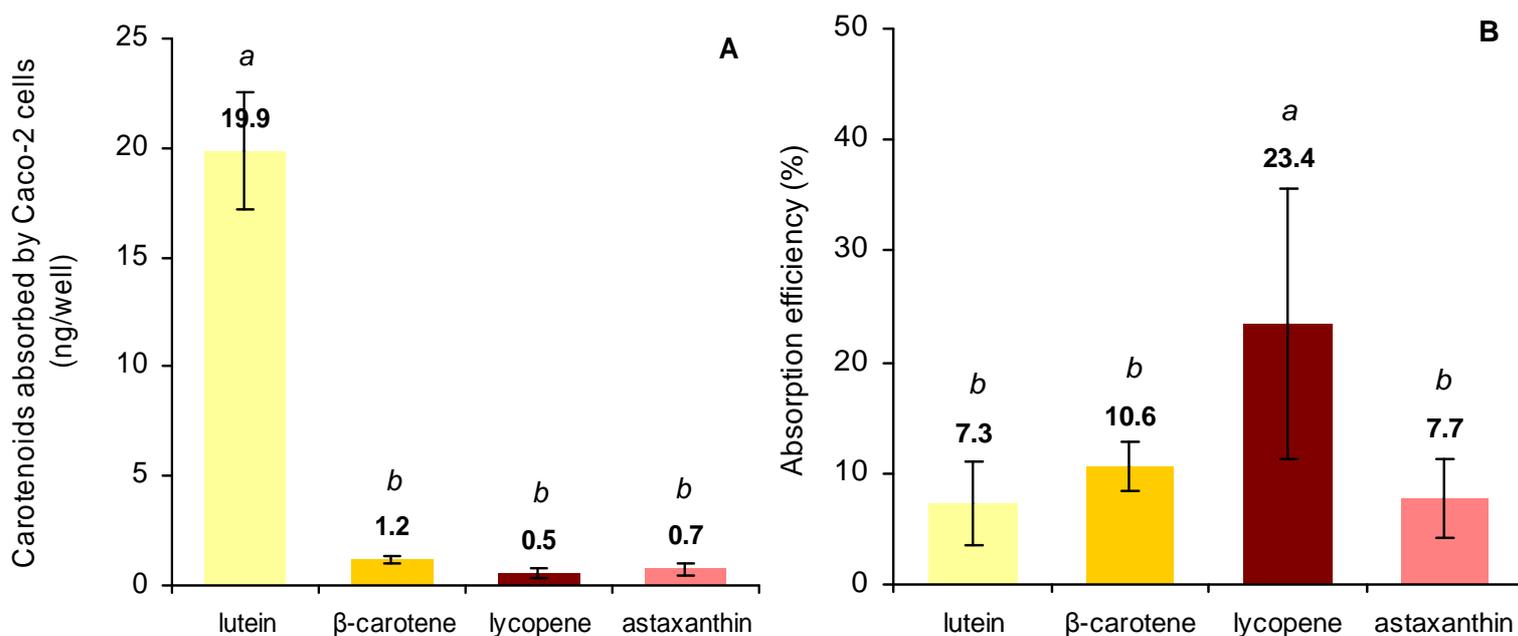
The incorporation efficiency of carotenoids into mixed micelles was evaluated in two different types of experiments. First, by measuring the percentage of incorporation into mixed micelles during their preparation. Secondly, by measuring the percentage of transfer from carotenoid crystals to pre-formed mixed micelles stabilized in water (see material and methods for more details). Values are means  $\pm$  SD of 3 experiments. For each row, different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means as assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney  $U$ -test.

**Kinetic of transfer of pure carotenoids from carotenoid crystals to pre-formed synthetic mixed micelles in water.** In all cases, the maximum solubilisation rates were nearly reached in the first 30 to 60 minutes (figure 3). The maximum transfer of carotenoids measured at the plateau, obtained after 30 min to 1 hour (figure 3), revealed that  $\beta$ -carotene and lutein were significantly more transferred from crystals to mixed micelles (around 8%) than astaxanthin and lycopene (under 1% transfer). Moreover, maximum percentages of carotenoids transferred to mixed micelles were lower than the ones measured in the previous experiment (incorporation during mixed micelles' preparation) (table 4).



**Figure 3.** Kinetics of transfer of pure (●) lutein, (●) β-carotene, (■) lycopene and (■) astaxanthin from carotenoid crystals to synthetic mixed micelles solubilized in water. Means ± SD of three independent experiments. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA and Tukey-Kramer test).

**Uptake of carotenoids by Caco-2 cells.** The intestinal epithelium model was incubated with carotenoid-rich micelles coming from *in vitro* digestions of test-meals containing the food sources of carotenoids and the uptake efficiencies of the four carotenoids were compared. Note that no β-carotene metabolites, e.g. retinol, retinal and retinyl esters, were detected in the cells, showing that the incubation conditions did not allow β-carotene-dioxygenase to cleave β-carotene significantly. All four carotenoids were absorbed (figure 4 A). Lycopene was hardly detected in Caco-2 cells due to its poor bioaccessibility (figure 2) and therefore to its very low concentration in diluted mixed micelles. However, it was apparently the most efficiently absorbed by intestinal cells (figure 4 B), although standard deviation was higher than that observed for the other carotenoids. The three other carotenoids had close absorption efficiencies (between 7% and 11%).



**Figure 4.** Uptake, by Caco-2 cell monolayers, of carotenoids incorporated in mixed micelles that came from *in vitro* digestion experiments. (A) Amounts of carotenoids recovered in cells (in ng/well). (B) Absorption efficiency (% of the carotenoid amount added onto cell monolayers).

*In vitro* bioavailability could then be calculated as the product of previous results. We found  $3.35 \pm 0.53\%$  for pure lutein,  $1.37 \pm 0.35\%$  for pure β-carotene,  $0.70 \pm 0.39\%$  for pure lycopene and  $3.81 \pm 1.77\%$  for pure astaxanthin.

***In vivo* bioavailability of carotenoids in rats.** No carotenoids were detected either in rat plasma before the force-feeding experiments or in plasma and tissues of rats that were force-fed with carotenoid-free oil (data not shown). Concentrations of carotenoids in plasma and tissues of the other groups after either two or three days force-feeding are shown in table 5. Note that retinyl palmitate, the main metabolite produced by β-carotene-dioxygenase from provitamin A carotenoids, was measured in plasma and liver and that no significant difference was observed between the diverse groups of rats, either before or after force-feeding with the carotenoid-enriched oil samples. After two days force-feeding, the amounts of carotenoids in the plasma of rats deprived of food the night before blood withdrawal were around 1-2 nmol/L, except for lutein that was around 16 nmol/L. The levels of carotenoids in plasma were higher after three days force-feeding in the post-prandial period (4 h after the force-feeding) than at fast after the two-day force-feeding period, except in the case of lutein that exhibited similar level. The concentration of lycopene in the liver was clearly higher than that of the other three carotenoids. Lutein had the highest concentration in adipose tissue, while astaxanthin had the lowest concentration.

**Table 5.** Concentrations of carotenoids in plasma, liver and adipose tissues after the force-feeding experiments\*.

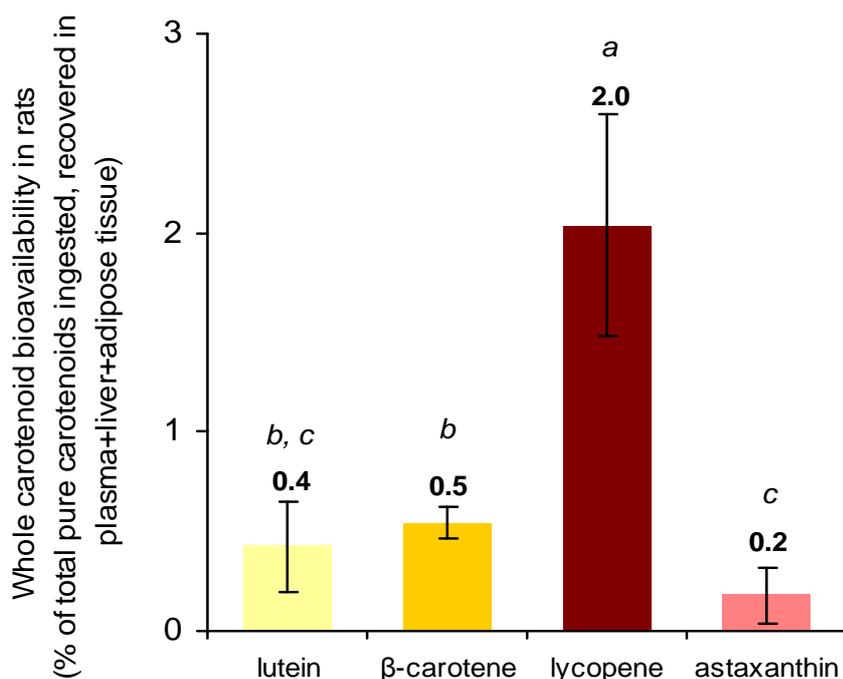
	After 2 days force-feeding **	After 3 days force-feeding ***		
	plasma (nmol/L)	plasma (nmol/L)	liver (nmol/g proteins)	adipose tissue (nmol/g proteins)
<b>lutein</b>	15.76 ± 6.96 (a)	13.61 ± 6.97 (a)	0.26 ± 0.23 (c)	0.94 ± 0.86 (a)
<b>β-carotene</b>	0.72 ± 0.01 (b)	6.68 ± 0.92 (a,b)	0.60 ± 0.08 (a)	0.24 ± 0.27 (a,b)
<b>lycopene</b>	1.98 ± 1.26 (b)	2.92 ± 1.32 (b)	2.47 ± 0.70 (b)	0.48 ± 0.30 (a)
<b>astaxanthin</b>	0.71 ± 0.57 (b)	14.52 ± 7.63 (a)	0.12 ± 0.17 (c)	0.08 ± 0.22 (b)

\* Eight rats per group were force-fed each day with 1 mL groundnut oil containing 55 nmol pure carotenoids (for more details, see material and methods). Values are means ± SD of 6 to 8 rats. In each column, different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means as assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-test.

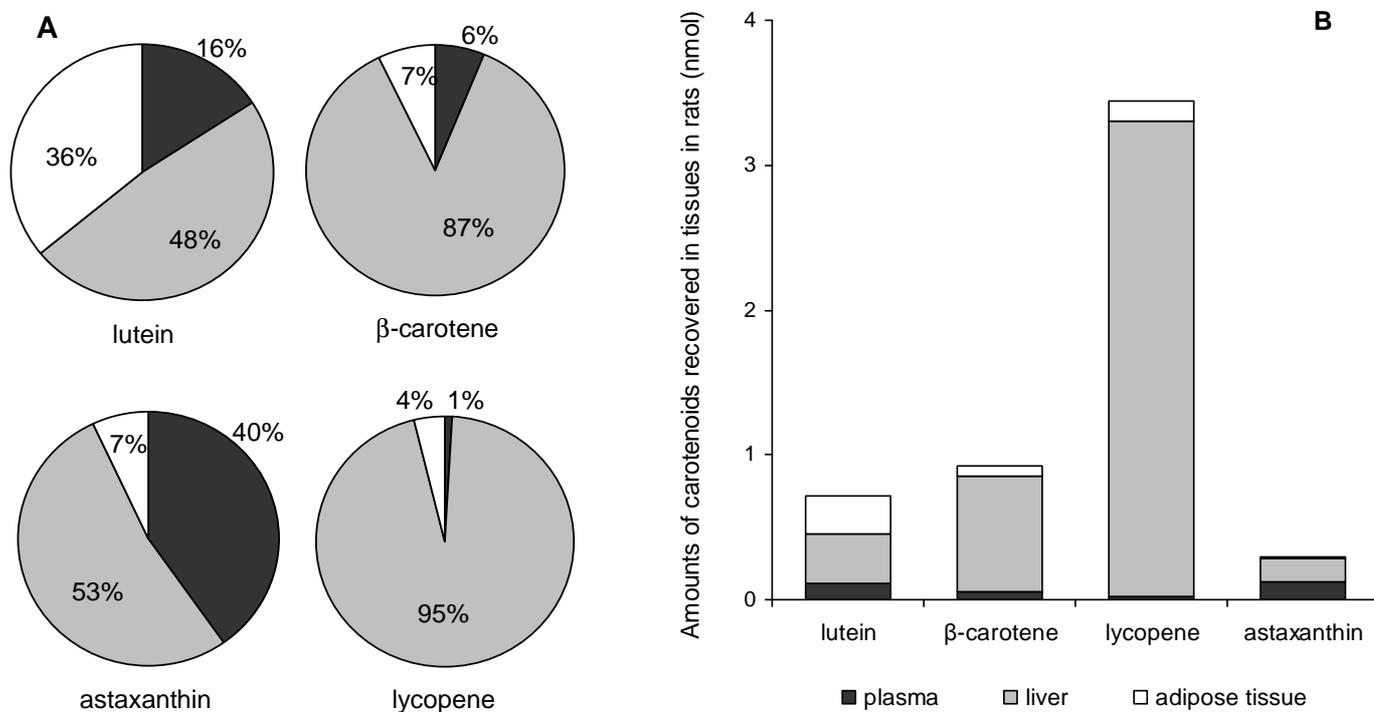
\*\* In rats deprived of food the last night before blood withdrawal.

\*\*\* During the post-prandial period (4 h after the third force-feeding).

Then, protein assays on liver and adipose tissue samples revealed that the rats had on average 1.3 g liver proteins (about 16% of the liver weight, see calculations in the material and methods section) and 0.28 g adipose tissue proteins (about 1.4% of the adipose tissue mass). The total amounts of carotenoids ( $\pm$  SD) recovered in the rat body, assuming that plasma plus liver plus adipose tissue contain most of the body carotenoids [21], were  $0.92 \pm 0.14$  nmol for  $\beta$ -carotene,  $3.44 \pm 0.94$  nmol for lycopene,  $0.72 \pm 0.58$  nmol for lutein and  $0.30 \pm 0.24$  nmol for astaxanthin. The whole bioavailability was then estimated as the percentage of carotenoids recovered in plasma plus liver plus adipose tissue after killing the rats on the third day of the experiment (each animal ingested about 170 nmol carotenoids in total, see table 3). From these calculations, lycopene was the most bioavailable carotenoid followed by  $\beta$ -carotene and lutein (figure 5). Astaxanthin was the least bioavailable carotenoid. Figure 6 A shows the amounts of carotenoids found in each compartment studied. The most exciting observations were the very high amounts of lycopene in the liver and the high amount of lutein in the adipose tissue. Figure 6 B gives a representation of the relative distribution of each carotenoid in plasma and both tissues four hours after the last force-feeding. In all cases except astaxanthin, a minor fraction of the carotenoids was recovered in plasma. The xanthophyll lutein was recovered for about one half in the liver and about one third in the adipose tissue, whereas the two carotenes ( $\beta$ -carotene and lycopene) were found mostly (about 90%) in the liver.



**Figure 5.** Whole bioavailability of pure carotenoids in rats, *i.e.* percentage of ingested carotenoid recovered in plasma+liver+adipose tissue, as estimated by using a model of Wistar rats force-fed with 55 nmol carotenoids each day, for 3 successive days. Means  $\pm$  SD of six to eight independent experiments on rats. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-test).



**Figure 6. (A)** Amounts of carotenoids recovered in rat tissues after Wistar rats were force-fed for 3 days with a mixture of groundnut oil and pure carotenoids. **(B)** Relative distribution (%) of the carotenoids between plasma (black section), liver (grey section) and adipose tissue (white section).

**Relative gene expression of SR-BI and CD36 in rat adipose tissue and liver.** The expression of SR-BI and CD36 membrane protein transporters of cholesterol and other lipid micronutrients was measured in rats which were not force-fed with groundnut oil. Results revealed that CD36 is massively expressed in the adipose tissue (40 times as much as in the liver), while SR-BI is mostly expressed in the liver (4.5 times as much as in the adipose tissue) (table 6).

**Table 6.** ARN expression of protein membrane transporters of cholesterol and some other lipid micronutrients in rat liver and adipose tissue.

	CD36	SR-BI
In adipose tissue (%)	100.0* ± 6.3 (a)	2.4 ± 0.3 (c)
In the liver pure (%)	2.3 ± 0.3 (c)	11.1 ± 0.4 (b)

\* All results are given as percentage of the expression of CD36 in the adipose tissue. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between means (ANOVA followed by the Tukey-Kramer test).

## DISCUSSION

The main objective of this study was to assess the effect of the chemical structure of carotenoids on their bioavailability, *i.e.* the percentage of the ingested dose recovered in blood and tissues. To achieve that aim, we used three major complementary models to study the three key steps that govern carotenoid bioavailability: *i)* bioaccessibility, which was measured by using a widely used *in vitro* digestion model [25, 38], *ii)* uptake efficiency by human intestinal cells, which was evaluated by Caco-2 cell monolayers [39-41], *iii)* bioavailability in rats, which was assessed by force-feeding rats for three days with physiological doses of carotenoids and by measuring carotenoid concentrations in plasma, liver and adipose tissue.

The first factor assumed to govern bioavailability of carotenoids is their incorporation in mixed micelles during digestion. Thus the first question that arised was “what is the intrinsic solubility of carotenoids in mixed micelles?” To answer this question we compared the maximal amount of carotenoids that could be incorporated in mixed micelles during their preparation. Our results showed that, although the more hydrophobic carotenoids (*i.e.* lycopene and  $\beta$ -carotene), were less soluble in micelles than the less hydrophobic ones (*i.e.* lutein and astaxanthin), there was no significant relationship between their solubility and their hydrophobicity as measured by their octanol/water partition coefficient (17.64 for lycopene, 17.62 for  $\beta$ -carotene, 14.82 for lutein and 13.27 for astaxanthin [42]). Obvioulsy, during the digestion process dietary carotenoids are not mixed with micelle lipids in an organic solvent, rather they should cross a water environment (*e.g.* from crystals or from cell membranes) to solubilize either in fat present in the boilus, or directly to micelles [29].

The second question that arised was “can carotenoids be transferred directly from their crystal forms to micelles, and does the efficiency of this transfer vary with different carotenoids ?” Results showed that transfer from crystals to micelles do exist, probably by interactions between micelles and carotenoids, but this transfer is not very efficient and, again, not related to carotenoid hydrophobicity. We suggest that this transfer could be related to the crystal structure formed by each carotenoid. Indeed, this crystal structure could affect the easiness of the carotenoid to be extracted by micelles. The current paradigm on carotenoid absorption stipulates that dietary carotenoids are first transferred from their vegetable matrix to the fat phase of the meal in the stomach, than to mixed micelles in the duodenum. Our third experiment was therefore dedicated to measure the

transfer efficiency of pure carotenoids from oil to micelles (*in vitro* digestion experiments). Our results showed that this transfer was significantly more efficient than that from crystals and that its efficiency was inversely related ( $r=-0.96$ ,  $p=0.041$ ) to carotenoid hydrophobicity.

Since carotenoids are not naturally ingested as pure molecules but usually ingested in vegetable matrix, and since it is assumed that this matrix is a key factor affecting carotenoid bioaccessibility [38], we decided to assess the effect of some vegetable matrix on this key step of carotenoid absorption. To that aim, we compared the results obtained with in the *in vitro* digestion experiments when carotenoids were digested either in their natural vegetable matrix (figure 2) or directly incorporated in oil (figure 1). Results showed very similar bioaccessibility values for lutein,  $\beta$ -carotene and lycopene. This shows that the studied cooked vegetable matrices, *i.e.* carrot purée, tomato pulp and chopped spinach, have no significant effect on carotenoid bioaccessibility. Conversely, the very different bioaccessibility values observed for astaxanthin in oil and for astaxanthin in crashed smoked salmon suggested that the salmon flesh had a strong inhibitory effect on astaxanthin bioaccessibility. The most likely explanation is that the additional fat provided by the salmon flesh (4 g of smoked salmon contain around 380 mg lipids) had trapped a fraction of astaxanthin at the end of the *in vitro* digestion experiment. Indeed we observed that a significant amount of oil was still present at the end of the digestion experiment containing salmon flesh as compared to experiments containing vegetable matrices. Nevertheless, considering that the human digestive tract has a huge ability to hydrolyse and absorb triglycerides, we suggest that, *in vivo*, almost all the oil would have been hydrolysed and that the bioaccessibility/bioavailability of salmon astaxanthin is probably close to the result found with pure astaxanthin, *i.e.* around 50%.

Uptake by intestinal cells is the second key step assumed to govern carotenoid bioavailability. After having shown that molecular structure of carotenoids affect carotenoid bioaccessibility, the question that arised was “does the molecular structure of carotenoids affect their uptake efficiency by intestinal cells?” Absorption efficiency values obtained with Caco-2, which were in the range of those reported in previous studies [4, 43, 44], showed that absorption efficiency of lutein,  $\beta$ -carotene and astaxanthin was not significantly different. This shows that the molecular structure of carotenoids is not a key factor affecting their uptake by intestinal cells. A surprising observation in this experiment was the fact that the absorption efficiency of lycopene was significantly higher than that of the other carotenoids. It was surprising because it is assumed that lycopene is one of the least bioavailable carotenoid. In fact, our results in Caco-2 did not disagree with this assumption: the amount of lycopene absorbed by the cells was the lowest of all the carotenoids studied.

However, this low amount absorbed was not due to lycopene absorption efficiency, which, as stated above, was higher than that of the other carotenoids, but rather due to the very poor bioaccessibility of lycopene. Furthermore, we noticed that absorption studies that found a lower absorption efficiency of lycopene as compared to the ones of  $\beta$ -carotene and lutein were performed using artificial micelles [4, 45, 46]. In a complementary absorption experiment carried out with synthetic micelles (data not shown), we found that synthetic micelles do not behave similarly to micelles produced during *in vitro* digestion experiments. The higher absorption efficiency of lycopene could be explained by a preferential affinity of the SR-BI apical membrane transporter of carotenoids for lycopene. Further experiments are required to testify this hypothesis.

After absorption, carotenoids are incorporated in chylomicrons and transported by the blood to the liver. The liver either stores them, or secretes them in VLDLs, which transport carotenoids to other tissues. Liver and adipose tissue are the main storage tissues of carotenoids. Thus, a question that arised was “does the molecular structure of carotenoids affect their blood concentration and tissue distribution?” To answer this question, we performed a force-feeding study in rat in order to compare bioavailability and tissue distribution of pure carotenoids with different molecular structures.

The first observation of this study was the fasting concentrations of carotenoids in plasma measured after two days force-feeding. This classical parameter to evaluate bioavailability suggested that lutein had the highest bioavailability, followed by lycopene, which was more bioavailable than  $\beta$ -carotene and astaxanthin. However, concentrations of carotenoids in plasma measured in the post-prandial period (*i.e.* another classical parameter to evaluate bioavailability) showed very different results: astaxanthin and lutein seemed to be the most bioavailable carotenoids, followed by  $\beta$ -carotene and lycopene. The differences between concentrations in plasma measured after two and three days were probably due to the fact that the measurements after three days were performed in the post-prandial period, leading to measure both carotenoids previously absorbed and transported in VLDL, LDL and HDL, and carotenoids newly absorbed and recovered in plasma chylomicrons. Nevertheless this shows that very different conclusions can be drawn on bioavailability, depending on whether carotenoids in plasma are measured at fast or during the post-prandial period. Interestingly, the ranking of carotenoid concentrations in plasma observed after three days in the post-prandial period correlated well the ones observed in a supplementation study in rainbow trouts [47]. In the trout study experiment, postprandial concentrations of carotenoids were positively related to their polarity (linked to their relative number of hydroxyl and ketone groups).

The second noteworthy observation from the rat study was the very different amount and distribution of the different carotenoids between plasma, liver and adipose tissue. This shows that the molecular structure of carotenoids markedly affects their metabolism. The first likely explanation is that the distribution of carotenoids in tissues is related to their hydrophobicity and to the percentage of fat in the different tissues. In agreement with this hypothesis, we observed that the higher the carotenoid hydrophobicity, the lower its concentration in the aqueous environment of the plasma in the postprandial period ( $r=-0.94$ ,  $p=0.06$ ). Similarly, the percentage of carotenoids recovered in storage organs (liver plus adipose tissue), which contained a high proportion of lipids, was positively related to their hydrophobicity ( $r=0.95$ ,  $p=0.06$ ). Besides, the very high concentrations of lutein in the adipose tissue and of lycopene in the liver, as compared to the concentrations of other carotenoids in these tissues, were noteworthy. This suggests that other factors than carotenoid hydrophobicity are involved in their tissue distribution. We hypothesize that membrane transporters that are involved in cellular uptake of carotenoids [17, 20, 22] also have a role in their tissue distribution. Since we found that CD36 was more expressed in the adipose tissue than in the liver, while it was the opposite for SR-BI, we suggest that lutein has a higher affinity for CD36 than the other carotenoids, leading to a higher accumulation in this tissue. Conversely,  $\beta$ -carotene, and even more lycopene, may have a higher affinity for SR-BI than the xanthophylls and thus accumulate in the liver. These hypotheses required further experiments to be validated.

Assuming that the best way to compare bioavailability was to measure the whole amount of carotenoids recovered in the whole rat body, we summed the carotenoids recovered in their main storage tissues (liver, adipose tissue and blood) to assess the effect of carotenoid molecular structure on their bioavailability. Results showed that, surprisingly but in agreement with the results obtained with the Caco-2 experiments, lycopene was the most bioavailable carotenoid. This was mainly due to its high concentration in the liver. Lutein and  $\beta$ -carotene exhibited a similar bioavailability, while astaxanthin was the least bioavailable carotenoid.

A very important question for scientists working on carotenoid bioavailability is “do the markers commonly used to estimate carotenoid bioavailability are good markers of the true bioavailability of carotenoids, *i.e.* good markers of their variation in target tissues ?” These markers commonly used are 1) carotenoid bioaccessibility measured with *in vitro* digestion models (refs), 2) carotenoid absorption efficiency measured by Caco-2 cells monolayers (refs), 3) variations in fasting concentrations of carotenoids in plasma after carotenoid-rich diets (refs), and 4) variations in postprandial concentrations of carotenoids in plasma after carotenoid-rich meals (refs).

Concerning the first marker, correlation tests showed that bioaccessibility measured with an *in vitro* digestion model significantly correlated ( $r=0.99$ ,  $p=0.006$ ) with postprandial plasma carotenoid concentrations measured after the third force-feeding. Conversely this marker did not correlate with fasting concentrations of carotenoids measured after two days force-feeding, neither with whole bioavailability in rats, nor with the percentages of carotenoids recovered in the liver or in the adipose tissue.

The second commonly used marker to predict carotenoid bioavailability is their absorption efficiency by Caco-2 cells. Interestingly this marker significantly correlated with the whole carotenoid bioavailability in rats ( $r=0.99$ ,  $p=0.012$ ) and with the percentage of carotenoids recovered in the liver ( $r=0.99$ ,  $p=0.003$ ). Conversely, the plasma markers (*i.e.* either the fasting or the postprandial concentrations of carotenoids), were not significantly related to the whole carotenoid bioavailability in rats, nor to the percentage of carotenoids in the liver or in the adipose tissue. In conclusion, it appears that absorption efficiency in Caco-2 cells was the most interesting marker for carotenoid bioavailability.

Because blood is quite easy to obtain in clinical studies, it is interesting to know whether plasma carotenoid levels can predict tissue carotenoid levels. Correlation studies showed that fasting plasma concentration of carotenoids significantly correlated ( $R = 0.985$ ,  $P = 0.0153$ ) with the percentage of carotenoid recovered in the adipose tissue as compared to the total amount of each carotenoid bioavailable in rats (but not with carotenoid concentrations in the adipose tissue). However, the very diverse amounts and distributions of carotenoids between plasma, liver and adipose tissue, and the absence of correlation with whole carotenoid bioavailability in rat show that the concentration of carotenoids in plasma should be used with caution and is not a valid marker to estimate carotenoid bioavailability.

In summary, our experiments show that the molecular structure of carotenoids, which affects their hydrophobicity, is a key factor governing their bioaccessibility and their postprandial concentration in plasma. However carotenoid hydrophobicity neither explain the intrinsic solubility of carotenoid in micelles, nor their transfer efficiency from carotenoid crystals to micelles, nor the relative increase in their concentration in storage tissues. Consequently, other factors linked to the molecular structure of carotenoids also play a key role in carotenoid metabolism. Our data suggest that one of these factors could be the different affinity of carotenoids for their cellular transporters (SR-BI [17] and CD36), although this should be testified by dedicated experiments. Finally our data have suggested that the best marker to predict whole bioavailability of carotenoid, either pure or from vegetable purées, is the measurement of the absorption efficiency of carotenoids into Caco-2 cell monolayers.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the company DSM (Switzerland) for its gift of carotenoids. We also thank Maria-Erica Lopez (head of the laboratory animal house) and Jean-Marc Feuerstein and Mélanie Piednoel for their technical assistance on animal experiments.

## REFERENCES

1. Britton, G., and F. Khachik. 2009. Carotenoids in food Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
2. Khachik, F. 2009. Analysis of carotenoids in nutritional studies Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
3. Mortensen, A. 2009. Supplements Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
4. O'Sullivan, L., L. Ryan, and N. O'Brien. 2007. Comparison of the uptake and secretion of carotene and xanthophyll carotenoids by Caco-2 intestinal cells. *British Journal of Nutrition* 98: 38-44.
5. Krinsky, N. I., and E. J. Johnson. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459-516.
6. Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander. 2009. Carotenoids: Volume 5: Nutrition and health Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
7. Rock, C. L. 2009. Carotenoids and cancer Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
8. Stahl, W., and H. Sies. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740: 101-107.
9. Tapiero, H., D. M. Townsend, and K. D. Tew. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 58: 100-110.
10. Boon, C. S., D. J. McClements, J. Weiss, and E. A. Decker. 2010. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50: 515-532.
11. Palozza, P., S. Serini, M. Ameruso, and S. Verdecchia. 2009. Modulation of intracellular signalling pathways by carotenoids Birkhauser Verlag AG, Basel Switzerland.
12. Gouranton, E., C. Thabuis, C. Riollet, C. Malezet-Desmoulins, C. El Yazidi, M. J. Amiot, P. Borel, and J. F. Landrier. 2011. Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22: 642-648.
13. Rodriguez-Amaya, D. B. 2010. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 726-740.
14. Van Buggenhout, S., M. Almingier, L. Lemmens, I. Colle, G. Knockaert, K. Moelants, A. Van Loey, and M. Hendrickx. 2010. In vitro approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. *Trends in Food Science & Technology* 21: 607-618.
15. Yonekura, L., and A. Nagao. 2009. Soluble fibers inhibit carotenoid micellization in vitro and uptake by caco-2 cells. *Bioscience biotechnology and biochemistry* 73: 196-199.
16. During, A., and E. H. Harrison. 2007. Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* 48: 2283-2294.
17. Reboul, E., L. Abou, C. Mikail, O. Ghiringhelli, M. Andre, H. Portugal, D. Jourdeuil-Rahmani, M. J. Amiot, D. Lairon, and P. Borel. 2005. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochemical Journal* 387: 455-461.

18. Moussa, M., J. F. Landrier, E. Reboul, O. Ghiringhelli, C. Comera, X. Collet, K. Frohlich, V. Bohm, and P. Borel. 2008. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *Journal of Nutrition* 138: 1432-1436.
19. van Bennekum, A., M. Werder, S. T. Thuahnai, C.-H. Han, P. Duong, D. L. Williams, P. Wettstein, G. Schulthess, M. C. Phillips, and H. Hauser. 2005. Class B Scavenger Receptor-Mediated Intestinal Absorption of Dietary  $\beta$ -Carotene and Cholesterol. *Biochemistry* 44: 4517-4525.
20. Reboul, E., and P. Borel. 2011. Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Progress in Lipid Research*.
21. Borel, P. 2005. Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. *Annales de Biologie Clinique* 62: 165-177.
22. Moussa, M., E. Gouranton, B. Gleize, C. El Yazidi, I. Niot, P. Besnard, P. Borel, and J. F. Landrier. 2011. CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and adipose tissue cultures. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 578-584.
23. West, E. C., Castenmiller, and M. J. J. J. 1998. Quantification of the SLAMENGLI factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Hogrefe & Huber, Bern, SUISSE*.
24. Castenmiller, J. J. M., and C. E. West. 1998. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition* 18: 19-38.
25. Garrett, D. A., M. L. Failla, and R. J. Sarama. 1999. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4301-4309.
26. Tyssandier, V., E. Reboul, J. F. Dumas, C. Bougteloup-Demange, M. Armand, J. Marcand, M. Sallas, and P. Borel. 2003. Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 284: G913-G923.
27. Armand, M., P. Borel, B. Pasquier, C. Dubois, M. Senft, M. Andre, J. Peyrot, J. Salducci, and D. Lairon. 1996. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 271: G172-G183.
28. Arvisenet, G. I., L. Billy, P. Poinot, E. Vigneau, D. Bertrand, and C. Prost. 2008. Effect of Apple Particle State on the Release of Volatile Compounds in a New Artificial Mouth Device. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3245-3253.
29. Tyssandier, V., B. Lyan, and P. Borel. 2001. Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1533: 285-292.
30. Cinti, S. 2005. The adipose organ. In *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 9-15.
31. Gleize, B., M. Steib, M. Andre, and E. Reboul. 2011. Simple and fast high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples. Submitted.
32. Landrier, J. F., C. Malezet-Desmoulins, E. Reboul, A.-M. Lorec, M.-J. Amiot, and P. Borel. 2008. Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells. *Free Radical Research* 42: 523-530.
33. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402-408.
34. Bijsterbosch, M. K., A. M. Duursma, J. M. W. Bouma, and M. Gruber. 1981. The plasma-volume of the wistar rat in relation to the body-weight. *Cellular and Molecular Life Sciences* 37: 381-382.
35. Hebel, R., and M. W. Stromberg. 1976. Anatomy of the laboratory rat. In *Anatomy of the laboratory rat*. viii + 173pp.

36. Helies, J. M., A. Diane, A. Langlois, C. Larue-Achagiotis, G. Fromentin, D. Tome, P. Mormede, and N. Marissal-Arvy. 2005. Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes. Res.* 13: 3-10.
37. Lecoq, B., C. Potrel-Burgot, P. Granier, J. P. Sabatier, and C. Marcelli. 2006. Comparison of bone loss induced in female rats by hindlimb unloading, ovariectomy, or both. *Joint Bone Spine* 73: 189-195.
38. Fernández-García, E., I. Carvajal-Lérída, and A. Pérez-Gálvez. 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research* 29: 751-760.
39. Artursson, P., and J. Karlsson. 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175: 880-885.
40. Grès, M.-C., B. Julian, M. Bourrié, V. Meunier, C. Roques, M. Berger, X. Boulenc, Y. Berger, and G. Fabre. 1998. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: Comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharmaceutical Research* 15: 726-733.
41. During, A., G. Albaugh, and J. C. Smith. 1998. Characterization of [beta]-carotene 15,15'-dioxygenase activity in TC7 clone of human intestinal cell line Caco-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249: 467-474.
42. Cooper, D. A., D. R. Webb, and J. C. Peters. 1997. Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *Journal of Nutrition* 127: S1699-S1709.
43. Netzel, M., G. Netzel, D. Zabarás, L. Lundin, L. Day, R. Addepalli, S. A. Osborne, and R. Seymour. 2011. Release and absorption of carotenoids from processed carrots (*Daucus carota*) using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model. *Food Research International* 44: 868-874.
44. Dhuique-Mayer, C., P. Borel, E. Reboul, B. Caporiccio, P. Besancon, and M. J. Amiot. 2007. Beta-cryptoxanthin from citrus juices: Assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *British Journal of Nutrition* 97: 883-890.
45. During, A., M. M. Hussain, D. W. Morel, and E. H. Harrison. 2002. Carotenoid uptake and secretion by Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* 43: 1086-1095.
46. Sugawara, T., M. Kushiro, H. Zhang, E. Nara, H. Ono, and A. Nagao. 2001. Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells. *The Journal of Nutrition* 131: 2921-2927.
47. Tyssandier, V., P. Borel, G. Choubert, P. Grolier, M.-C. Alexandre-Gouabau, and V. Azais-Braesco. 1998. The bioavailability of carotenoids is positively related to their polarity. In AFN-SNDLF Nutrition Symposium, Sciences des Aliments.



## 4. AUTRES RESULTATS

### 4.1. Comparaison de différents modèles de digestion *in vitro*

Une étude préliminaire aux expériences de digestion *in vitro* a été effectuée afin de connaître l'effet de la quantité de lipides introduite dans le système et de la durée des différentes étapes de la digestion, sur l'hydrolyse des lipides et la composition des micelles mixtes. Pour cela, quatre digestions ont été effectuées sur le repas test utilisé lors des tests de bioaccessibilité des caroténoïdes (*i.e.* 1,2 g de viande, 6,7 g de purée de pommes de terre, de l'huile d'olive et 32 mL de solution saline à 0,9 %), dans les conditions suivantes :

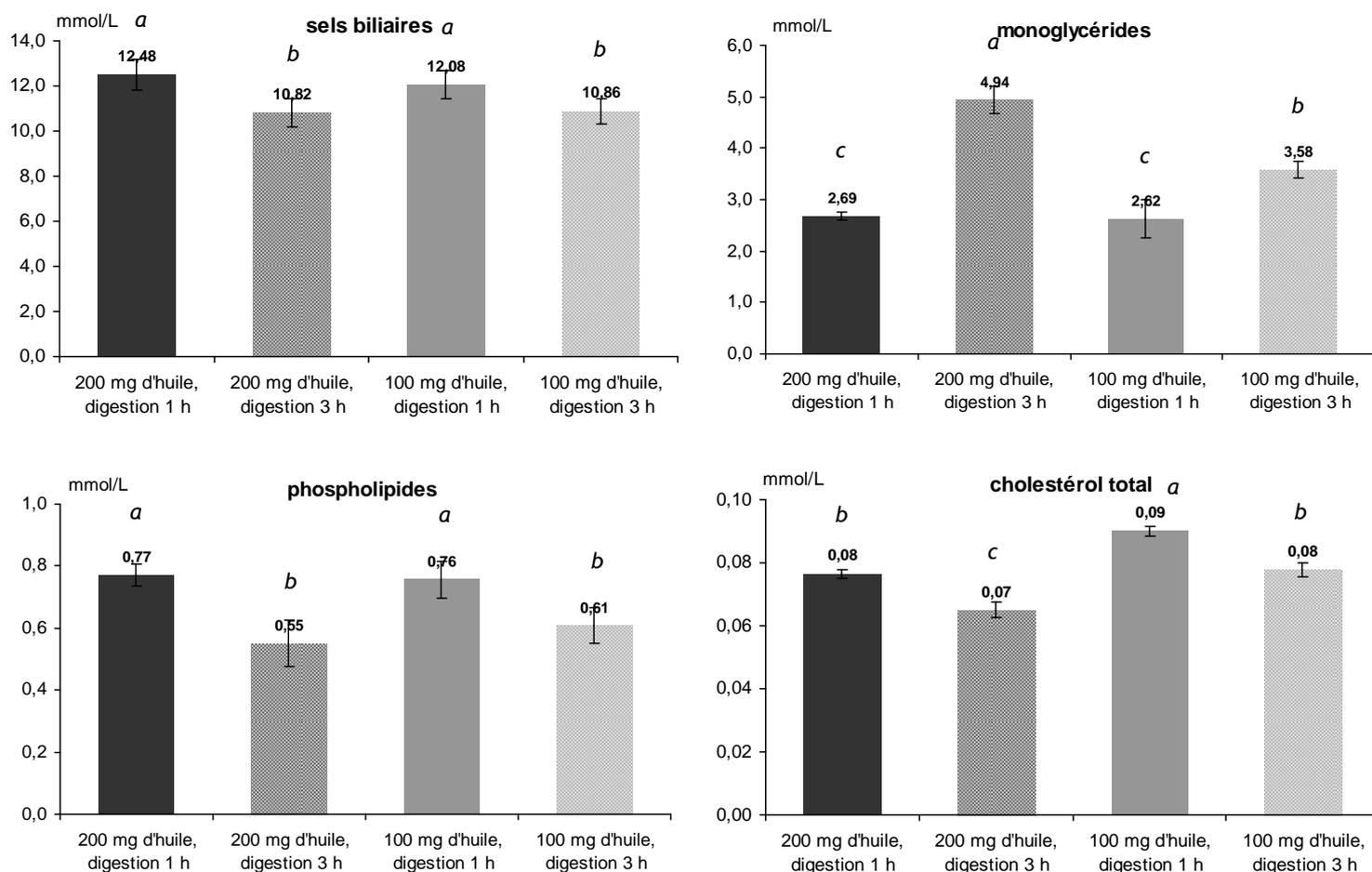
- 1) 200 mg d'huile - digestion gastrique 30 min - digestion duodénale 30 min
- 2) 200 mg d'huile - digestion gastrique 1 h - digestion duodénale 2 h
- 3) 100 mg d'huile - digestion gastrique 30 min - digestion duodénale 30 min
- 4) 100 mg d'huile - digestion gastrique 1 h - digestion duodénale 2 h

A la fin de la digestion *in vitro*, les fractions micellaires ont été isolées par centrifugation et filtration. Puis, sur chaque fraction, quatre dosages ont été effectués : sels biliaires, monoglycérides, phospholipides et lysophospholipides, et cholestérol total.

D'après les résultats de ces dosages (figure C.1), on a noté une concentration légèrement plus élevée en sels biliaires et en phospholipides dans les micelles mixtes formées au cours de digestions de courte durée, alors que la quantité initiale d'huile (200 ou 100 mg) n'a pas eu d'effet significatif sur ces paramètres. À l'inverse, les digestions longues ont induit des teneurs plus importantes de monoglycérides dans les micelles mixtes, en particulier avec une plus grande quantité initiale d'huile. La concentration finale de cholestérol était très faible dans tous les cas, mais augmentait avec de plus faibles quantités d'huile ou des temps de digestion courts.

De plus, après centrifugation, on a pu observer un résidu de lipides non hydrolysés en fin de digestion, flottant sur la phase aqueuse contenant les micelles mixtes. L'hydrolyse était d'environ 40 % avec une quantité initiale d'huile de 200 mg et une digestion courte, alors qu'elle était d'environ 60 % avec 200 mg d'huile et une digestion longue, d'environ 70 % avec 100 mg d'huile et une digestion courte, et qu'elle atteignait environ 90 % avec 100 mg d'huile et une digestion longue. Or, lors des digestions en présence de caroténoïdes, cette huile résiduelle était fortement colorée, indiquant la présence de caroténoïdes solubilisés. Afin de limiter le biais dû à cette solubilisation dans

l'huile non hydrolysée lors des études de bioaccessibilité, il était préférable de travailler avec moins d'huile (100 mg) sur des temps plus longs (3 heures de digestion totale).

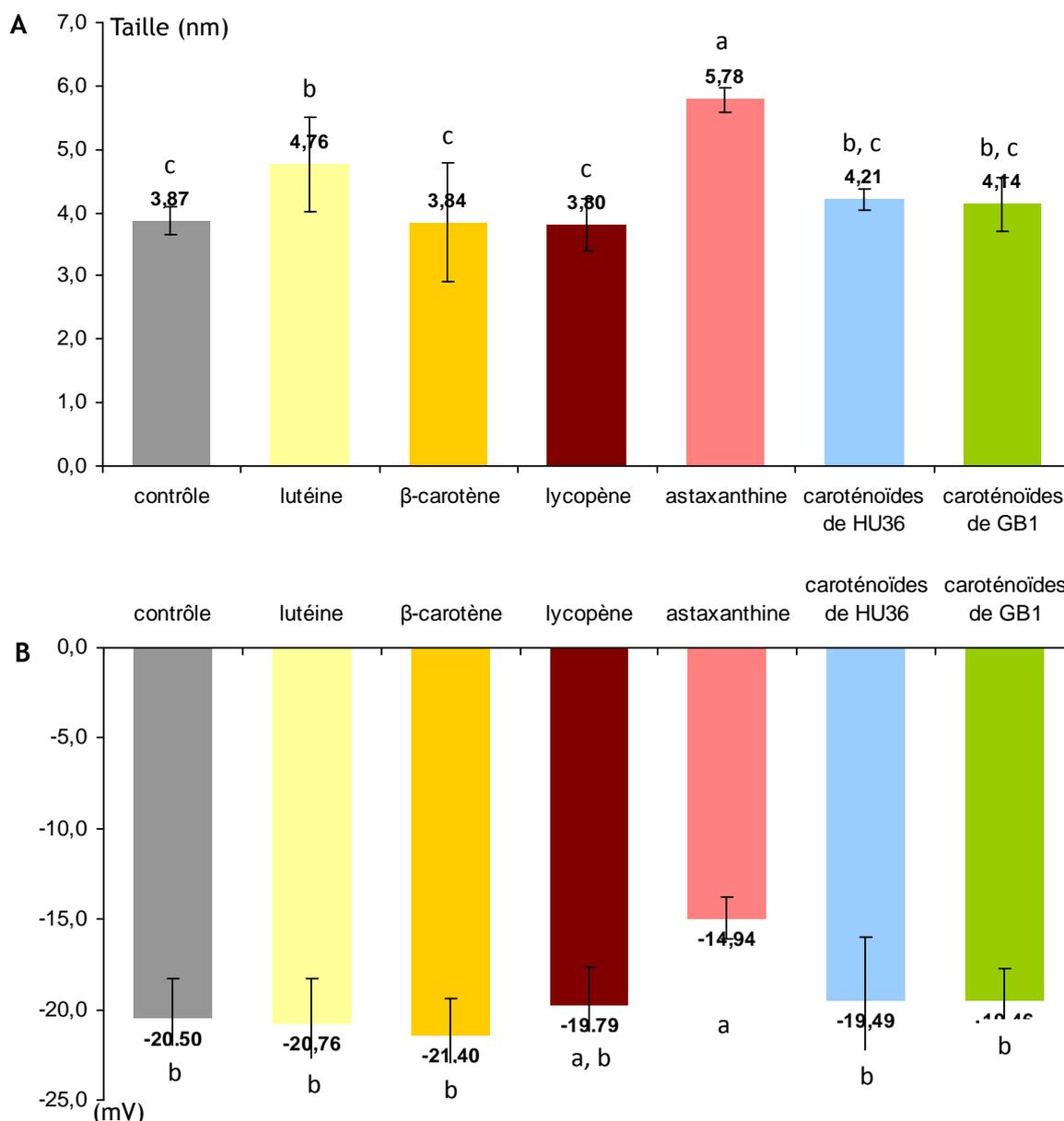


**Figure C.1** : Effet de la variation de la teneur initiale en triglycérides et du temps de digestion sur le contenu en sels biliaires, en monoglycérides, en phospholipides et en cholestérol total dans les micelles mixtes de digestion *in vitro* à partir de repas types. Moyennes sur 3 répétitions  $\pm$  E.T. Les lettres indiquent les résultats significativement différents ( $p < 0,05$ ) d'après le test ANOVA, suivi du test de Tuckey/Kramer.

#### 4.2. Mesures granulométriques sur les micelles mixtes issues de la digestion *in vitro* d'aliments riches en caroténoïdes

Les mesures de granulométrie effectuées sur les fractions micellaires obtenues lors des expériences de digestion *in vitro* à partir de produits riches en caroténoïdes (avec 100 mg d'huile et pendant 3 heures) ont révélé un pic unique dans tous les échantillons, correspondant à une seule population de particules. Les échantillons ne contenaient que des micelles de diamètre compris entre 4 et 6 nm, et pas de liposomes. Aucune différence

significative de taille (figure C.2 A) ou de potentiel zeta (potentiel électrocinétique, indicateur de la stabilité des systèmes colloïdes, figure C.2 B) n'a été observée entre les micelles mixtes contrôles (sans caroténoïdes) et celles contenant du  $\beta$ -carotène de purée de carottes, du lycopène de pulpe de tomates, de la lutéine d'épinards hachés ou des caroténoïdes de HU36 ou de GB1. Seules les micelles mixtes contenant de l'astaxanthine de saumon se sont révélées significativement plus grosses et avaient un potentiel zeta moins faible (différence d'environ 30-40 % par rapport aux autres micelles).



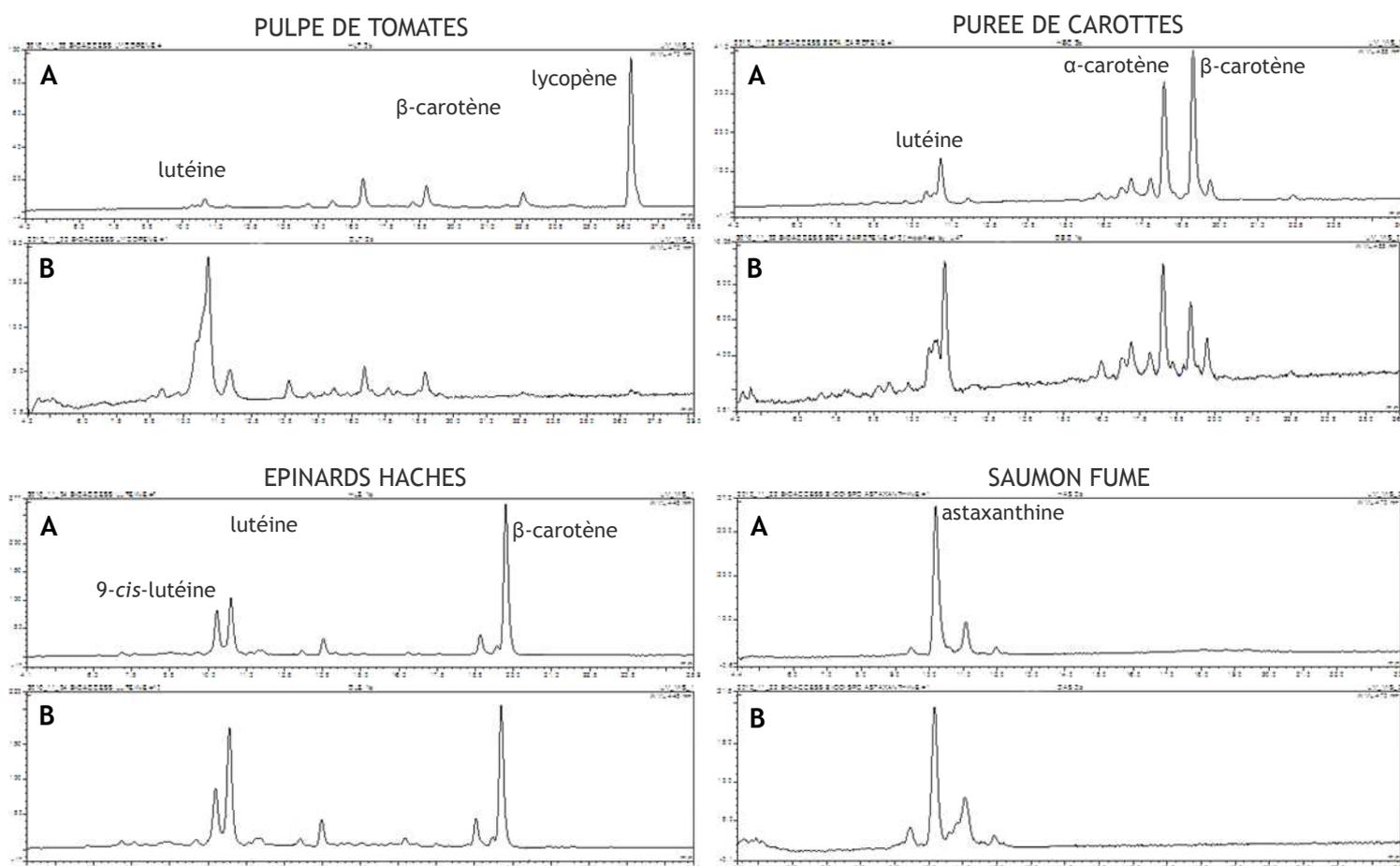
**Figure C.2 :** Comparaison (A) de la taille et (B) des potentiels électrocinétique "zeta", des micelles mixtes obtenues à l'issue de la digestion *in vitro* d'aliments riches en différents caroténoïdes. Moyennes sur 3 répétitions  $\pm$  E.T. Les lettres indiquent les résultats significativement différents ( $p < 0,05$ ) d'après le test ANOVA suivi du test *a posteriori* de Tuckey/Kramer.

La nature des caroténoïdes incorporés dans les micelles ne semble pas avoir eu d'impact sur leurs propriétés (taille et potentiel zeta). Elles étaient toutes de petite taille et le système était légèrement instable (potentiel zeta supérieur à -25 mV). Concernant les micelles riches en astaxanthine, une différence majeure par rapport à celles des autres échantillons est le fait qu'elles contenaient aussi très probablement des acides gras poly-insaturés (de la famille des  $\omega$ -3) issus de la chair de saumon. On peut donc supposer que ce sont ces acides gras poly-insaturés qui ont modifié les propriétés des micelles.

On peut conclure que la nature des caroténoïdes ne modifie pas significativement les caractéristiques physiques des micelles mixtes. En revanche, il semble, mais c'est à vérifier, que les acides gras poly-insaturés à longue chaîne peuvent influencer ces caractéristiques.

### 4.3. Etude des produits de dégradation des caroténoïdes de référence au cours de la digestion *in vitro*

Pour les expériences à partir d'aliments riches en lycopène,  $\beta$ -carotène, lutéine ou astaxanthine, l'étude comparative des chromatogrammes obtenus en début et en fin de digestion n'a révélé la formation d'aucun nouveau produit au cours de la digestion. En effet, plusieurs caroténoïdes étaient présents initialement dans chaque échantillon (figures 65 A) et les mêmes composés ont été retrouvés dans les digestats. De plus, les teneurs relatives des différents caroténoïdes de la carotte, des épinards et du saumon étaient à peu près les mêmes sur la fraction micellaire en fin de digestion (figures 65 B) que dans l'aliment initial. Seul le lycopène a été particulièrement peu micellisé ; mais il a été retrouvé dans la matrice alimentaire non-digérée et sous forme de cristaux dans la phase aqueuse. Les caroténoïdes issus d'aliments semblent donc être protégés de l'oxydation par la matrice alimentaire.



**Figure 65 :** Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC et détection entre 445 et 470 nm, à partir (A) des homogénats d'aliments riches en caroténoïdes avant digestion et (B) des fractions micellaires correspondantes, en fin de digestion.

En revanche, pour les expériences à partir de caroténoïdes purs, plusieurs produits de dégradation ont été mis en évidence à la fin des digestions *in vitro*. La caractérisation de ces composants a été faite d'une part sur la totalité du milieu de digestion (tableau 20), d'autre part uniquement sur la fraction micellaire obtenue après centrifugation et filtration (tableau 21). Tous les produits du lycopène et du  $\beta$ -carotène ont été retrouvés dans les deux types d'échantillons. À l'inverse, quatre produits de la lutéine et le produit majoritaire de l'astaxanthine ne se trouvent pas dans la fraction micellaire .

**Tableau 20** : Caractéristiques spectrales des produits de dégradation des caroténoïdes de référence formés au cours de la digestion *in vitro* d'aliments riches en caroténoïdes et isolés sur la totalité du milieu de digestion.

Caroténoïdes natifs		Produits de dégradation		
Noms	Caractéristiques	Temps de rétention (min)	Données spectrales	Aire relative du pic par rapport à l'absorption totale des caroténoïdes de l'échantillon (%)
Lutéine	Abs = 420, 445, 472 nm Rt = 10,2 min	8,7 *	400, <u>432</u> , 462	1,59
		9,3 *	<i>cis</i> - 420, <u>443</u> , 467	1,92
		9,7 *	404, <u>440</u> , 473	1,31
		11,1	418, <u>452</u> , 472	4,48
		13,6 *	414, <u>443</u> , 472	1,28
$\beta$ -carotène	Abs = 420, 451, 471 nm Rt = 19,2 min	17,1	431, <u>453</u> , 479	2,94
		17,7	<i>cis</i> - 417, <u>446</u> , 470	5,42
		19,7	423, <u>445</u> , 472	1,99
Lycopène	Abs = 446, 471, 502 nm Rt = 26,5 min	15,3	406, <u>432</u> , 462	2,37
		16,6	413, <u>435</u> , 462	7,20
		19,0	435, <u>456</u> , 485	4,24
		21,9	<i>cis</i> - 441, <u>467</u> , 480	1,86
		22,5	<i>cis</i> - 439, <u>464</u> , 494	9,10
		24,3	446, <u>467</u> , 494	2,18
Astaxanthine	Abs = 476 Rt = 9,4 min	8,9	448, <u>458</u> , 485	2,57
		12,2 *	462	19,90

\* Produits qui ne sont pas présents dans la fraction micellaire.

**Tableau 21** : Caractéristiques spectrales des produits de dégradation des caroténoïdes de référence formés au cours de la digestion *in vitro* d'aliments riches en caroténoïdes et isolés uniquement dans la fraction micellaire.

Caroténoïdes natifs		Produits de dégradation		
Noms	Caractéristiques	Temps de rétention (min)	Données spectrales	Aire relative du pic par rapport à l'absorption totale des caroténoïdes de l'échantillon (%)
Lutéine	Abs = 420, 445, 472 nm Rt = 10,7 min	11,6	<i>cis</i> - 420, <u>448</u> , 474	4,87
β-carotène	Abs = 422, 450, 475 nm Rt = 19,2 min	17,1	458	4,57
		17,7	429, <u>449</u> , 475	7,43
		19,8	418, <u>442</u> , 468	2,44
Lycopène	Abs = 444, 471, 502 nm Rt = 27,6 min	15,7	409, <u>433</u> , 460	2,35
		16,9	414, <u>435</u> , 462	8,74
		19,4	432, <u>455</u> , 485	6,35
		22,6	<i>cis</i> - 444, <u>469</u> , 494	2,35
		23,2	<i>cis</i> - 439, <u>464</u> , 495	10,52
		25,3	437, <u>463</u> , 496	2,52
Astaxanthine	Abs = 476 Rt = 10,0 min	9,4	430, <u>455</u> , 474	2,74

#### 4.4. Régulation de l'expression des transporteurs membranaires SR-BI et CD36 dans le foie et le tissu adipeux, chez les rats gavés avec différents caroténoïdes

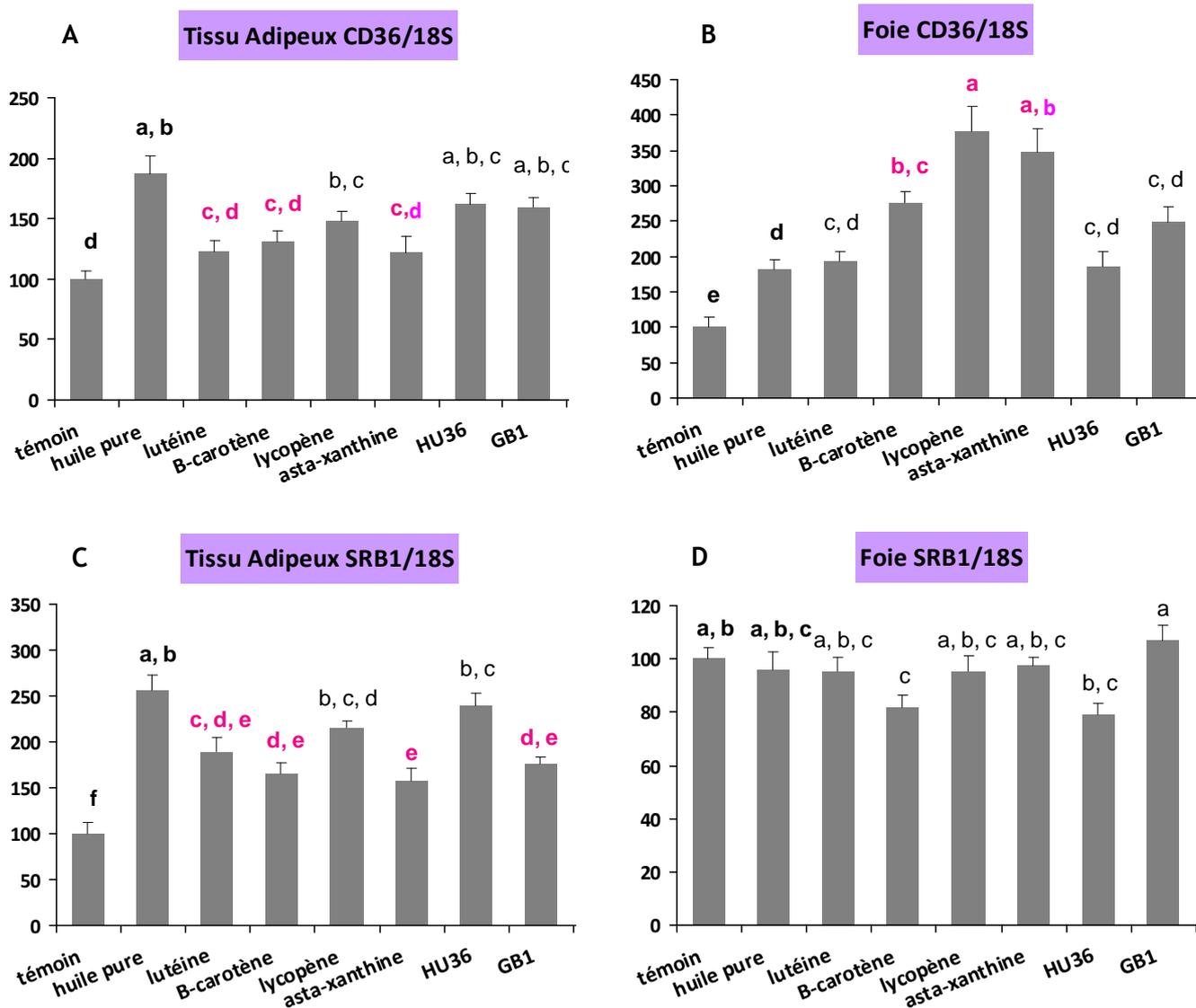
Tout d'abord, l'expression basale des protéines membranaires SR-BI et CD36, qui assurent le transport du cholestérol et de certains autres lipides, a été mesurée sur des rats suivant un régime de base sans huile d'arachide ni caroténoïdes. D'après les résultats de PCR, CD36 est fortement exprimé dans le tissu adipeux (40 fois plus que dans le foie), alors que SR-BI est essentiellement exprimé dans le foie (4,5 fois plus que dans le tissu adipeux).

Puis, l'effet des différents caroténoïdes a été évalué chez les rats gavés pendant trois jours avec de l'huile pure (1 mL/jour) ou enrichie en caroténoïdes (55 nmol/rat/jour).

Dans les deux tissus de réserve, l'ingestion d'huile d'arachide pure par les rats a fait augmenter l'expression de CD36 de façon significative (figure C.3 A et B). L'expression de SR-BI a aussi augmenté dans le tissu adipeux (figure C.3 C), mais pas dans le foie (figure C.3 D).

Chez les rats gavés avec de l'huile enrichie en  $\beta$ -carotène, en lutéine ou en astaxanthine, l'expression de SR-BI et de CD36 dans le tissu adipeux était plus faible que chez les rats gavés avec de l'huile pure (figure C.3 A et C). La différence n'était pas significative avec le lycopène ni avec les caroténoïdes bactériens de HU36. Les caroténoïdes de GB1 n'ont induit un effet significatif que sur SR-BI.

La régulation de l'expression des transporteurs membranaires par ces caroténoïdes s'est révélée différente dans le foie. L'expression de CD36 a significativement augmenté sous l'effet du  $\beta$ -carotène, et encore plus sous l'effet de l'astaxanthine ou du lycopène (figure C.3 B), mais l'ingestion de lutéine ou des caroténoïdes de HU36 ou de GB1 en suspension dans l'huile n'a eu aucun effet différent par rapport à l'huile seule. En revanche, l'expression de SR-BI dans le foie était identique à celle en conditions basales, quel que soit le caroténoïde incorporé dans l'huile (figure C.3 D).



**Figure C.3** : Variation de l'expression de CD36 et de SR-BI dans le foie et dans le tissu adipeux chez le rat, après trois jours de gavage avec des suspensions de caroténoïdes purs dans l'huile d'arachide. Résultats calculés à partir de la différence avec le gène constitutif 18S et exprimés en % par rapport à l'expression basale (témoin = 100 %), dans chaque tissu. Moyennes de 6 à 8 répétitions (selon le nombre de rats par groupe)  $\pm$  E.T. Les lettres indiquent les résultats significativement différents ( $p < 0,05$ ) d'après le test ANOVA suivi d'un test *a posteriori* de Tuckey/Kramer.

#### 4.5. Régulation de l'expression de protéines du tissu adipeux, chez les rats gavés avec différents caroténoïdes

L'effet de l'ingestion de caroténoïdes sur la fonction adipocytaire (métabolisme des lipides, stockage ou mobilisation des acides gras, développement du tissu adipeux..) et sur l'inflammation du tissu adipeux a été étudié en comparant l'expression de plusieurs protéines dans le tissu adipeux, chez les rats ayant ingéré de l'huile d'arachide pure et chez ceux qui ont été gavés pendant trois jours avec de l'huile d'arachide enrichie en caroténoïdes (environ 55  $\mu\text{mol}$  caroténoïdes/rat/jour).

La consommation de lutéine (LU), de lycopène (LY) ou d'astaxanthine (AS) a significativement inhibé PPAR $\gamma$  et la leptine, qui ont des effets contraires sur l'adipogénèse (tableau C.I). Le  $\beta$ -carotène ( $\beta$ -C), quant à lui, n'a inhibé que PPAR $\gamma$ , favorisant ainsi la lipolyse. L'ingestion des caroténoïdes bactériens de HU36 et de GB1 n'a eu aucun effet sur les gènes de ces protéines. En revanche, ils sont les seuls à avoir eu un effet significatif sur l'expression de la lipoprotéine lipase, qu'ils ont stimulée (tableau C.I).

**Tableau C.I :** Effets de l'ingestion de différents caroténoïdes en suspension dans de l'huile d'arachide, sur l'expression de trois gènes caractéristiques de la fonction adipocytaire. "-" : inhibition de l'expression, "+" : stimulation de l'expression, "o" : pas d'effet significatif par rapport au contrôle ( $p > 0.05$ , d'après le test ANOVA suivi d'un test *a posteriori* de Tuckey/Kramer). Résultats obtenus sur 6 à 8 répétitions (selon le nombre de rats par groupe).

Protéines	Fonctions principales dans le tissu adipeux	Régulation de la fonction adipocytaire					
		LU	$\beta$ -C	LY	AS	HU36	GB1
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> Récepteur nucléaire qui lie les lipides et agit comme facteur de transcription des gènes impliqués dans l'adipogénèse	-	-	-	-	o	o
Leptine	Hormone cytokine sécrétée par le tissu adipeux blanc, qui a une fonction de stockage et de mobilisation des acides gras et une activité endocrine régulatrice de l'appétit. Sécrétée en forte quantité, elle induit la lipolyse, inhibe la lipogénèse, et augmente la sensibilité à l'insuline	-	o	-	-	o	o
LPL	Lipoprotéine lipase Enzyme sécrétée par les cellules du parenchyme, qui participe au transport et au métabolisme des lipides par hydrolyse des triglycérides des VLDLs	o	o	o	o	+	+

L'expression de cinq gènes marqueurs de l'inflammation et de la réponse anti-inflammatoire a été mesurée afin de déterminer l'effet des caroténoïdes sur l'inflammation du tissu adipeux. L'expression de TNF $\alpha$  (cytokine sécrétée de façon caractéristique lors de l'inflammation) a significativement diminué lors de l'ingestion des caroténoïdes avec l'huile d'arachide, en particulier avec les quatre caroténoïdes de référence ( $\beta$ -carotène, lutéine, lycopène et astaxanthine). De même, la plupart des caroténoïdes de l'étude ont entraîné une diminution de l'expression de IL1 $\beta$ , de IL6 et de l'adiponectine, trois médiateurs de la réponse anti-inflammatoire (tableau C.II). Au regard de l'expression des différentes protéines, les deux carotènes semblent plus efficaces que les autres caroténoïdes pour limiter l'inflammation du tissu adipeux, bien qu'ils soient retrouvés en plus faibles concentrations que la lutéine dans le tissu adipeux. En particulier, le lycopène présente également un effet positif contre l'expression de MCP1 qui a tendance à propager l'inflammation.

**Tableau C.II :** Effets de l'ingestion de différents caroténoïdes en suspension dans de l'huile d'arachide, sur l'expression de cinq gènes caractéristiques de l'inflammation. "-" : diminution de l'expression, "+" : augmentation de l'expression, "o" : pas d'effet significatif par rapport au contrôle ( $p > 0.05$ , d'après le test ANOVA suivi d'un test *a posteriori* de Tuckey/Kramer). Résultats obtenus sur 6 à 8 répétitions (selon le nombre de rats par groupe).

Protéines	Fonctions principales dans le tissu adipeux	Effet anti-inflammatoire					
		LU	$\beta$ -C	LY	AS	HU36	GB1
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> Glycoprotéine cytokine impliquée dans l'inflammation systémique et dans la réaction de phase aiguë. Elle a un effet régulateur de l'appétit, stimule la phagocytose et augmente la résistance à l'insuline	--	--	--	--	-	-
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleukine cytokine produite par les macrophages, qui est un médiateur de la réponse anti-inflammatoire. Elle est impliquée dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose	-	-	-	-	o	-
<b>IL6</b>	Interleukine sécrétée entre autres par les adipocytes, qui stimule la production des protéines de l'inflammation dont CRP (élimine les cellules en apoptose). A l'inverse, une sécrétion excessive est impliquée dans l'inflammation de type rhumatoïde	o	-	-	o	-	-
<b>Adiponectine</b>	Hormone cytokine sécrétée par le tissu adipeux blanc, impliquée dans la diminution de l'insulinorésistance et dans l'inhibition de l'inflammation du tissu adipeux ou de la formation de la plaque d'athérome, par effet sur d'autres protéines de l'inflammation (TNF $\alpha$ ou CRP)	-	-	-	-	-	o
<b>MCP1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein</i> Cytokine de type chimiokine, impliquée dans l'inflammation par effet d'attraction sur les monocytes, les lymphocytes et les basophiles. Elle favorise l'athérosclérose	o	o	-	o	o	o



## 5. SYNTHÈSE DE LA PROBLÉMATIQUE C

Dans ce troisième chapitre, l'objectif était d'étudier la biodisponibilité des caroténoïdes bactériens issus de HU36 et de GB1 et de caroténoïdes de référence ( $\beta$ -carotène, lycopène, lutéine et astaxanthine) et d'évaluer l'effet de deux facteurs déterminants (structure chimique et matrice alimentaire) sur les étapes clés impliquées dans la biodisponibilité des caroténoïdes aux différents stades de la digestion et du métabolisme des lipides (bioaccessibilité, absorption par l'entérocyte, distribution tissulaire). Pour cela quatre modèles *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés.

Dans un premier temps, le modèle de digestion *in vitro* développé par Garrett et al. et déjà amélioré au laboratoire ([Reboul, Richelle et al. 2006](#)) a été adapté et appliqué. Ce modèle comporte trois étapes pour mimer la digestion (une étape mimant la mastication avec salive artificielle, une étape mimant la digestion gastrique avec pepsine à pH 4 et une étape mimant la digestion duodénale avec sels biliaires et pancréatine à pH 5,8). Il nécessite des adaptations en fonction des molécules et des paramètres à étudier. La principale mise au point effectuée sur ce modèle a consisté à définir une teneur initiale en huile (100 mg dans 32 mL) et des temps de digestion optimum (1 heure en phase gastrique et 2 heures en phase duodénale). L'objectif était à la fois de rester proche des conditions physiologiques, d'apporter suffisamment d'huile pour que la quantité de micelles formées ne soit pas un facteur limitant de la bioaccessibilité, et d'obtenir une lipolyse la plus poussée possible afin de limiter les biais liés à la rétention des caroténoïdes dans la phase lipidique en fin de digestion. Dans un deuxième temps, le modèle de micelles artificielles qui a été développé au cours de ce travail de thèse, a été utilisé pour suivre la micellarisation des caroténoïdes. Des modèles comparables ont déjà été utilisés, mais surtout pour des tests d'absorption intestinale sur monocouches de Caco-2 et beaucoup plus rarement pour des études de solubilité et transfert. Le troisième modèle qui a été utilisé est la culture cellulaire de Caco-2, qui est, quant à elle, un modèle communément utilisé pour les mesures d'efficacité d'absorption. Le quatrième modèle utilisé, qui consistait à gaver quotidiennement des rats avec des solutions huileuses enrichies en caroténoïdes et à mesurer l'accumulation de caroténoïdes dans le sang et dans les tissus de stockage, a été mis au point spécifiquement pour cette étude. L'ensemble de ces modèles a permis de comparer les résultats de biodisponibilité obtenus *in vitro* et *in vivo* et d'étudier la distribution de caroténoïdes de structures différentes entre les principaux tissus de stockage des caroténoïdes de l'organisme.

A chaque étape, les concentrations de caroténoïdes stables et/ou incorporés ont été déterminées grâce à une méthode d'analyse par HPLC en phase reverse sur colonne greffée en C30, développée au laboratoire et qui a été validée pour l'élution de l'ensemble des caroténoïdes utilisés dans cette étude (y compris pour la séparation des caroténoïdes contenus dans les extraits bactériens).

Les résultats de bioaccessibilité, de solubilité/transfert dans les micelles mixtes, d'efficacité d'absorption et de distribution tissulaire obtenus avec les quatre modèles décrits précédemment ont permis de mettre en évidence les principales conclusions suivantes :

- la structure chimique des caroténoïdes modifie leur solubilité et leur efficacité d'incorporation dans les micelles mixtes. En particulier, la bioaccessibilité des caroténoïdes est négativement corrélée à leur hydrophobicité (bioaccessibilité : caroténoïdes de GB1 et HU36 > lutéine > astaxanthine >  $\beta$ -carotène > lycopène). Toutefois, aux taux auxquels ils sont incorporés, ils n'ont aucun effet significatif sur la taille ou le potentiel électrocinétique des micelles mixtes ;
- digérés sous forme de molécules pures, les caroténoïdes subissent une dégradation modérée mais variable selon leur structure (dégradation : astaxanthine < lutéine <  $\beta$ -carotène = caroténoïdes de HU36 < caroténoïdes de GB1 < lycopène) ;
- dans le cas de légumes cuits, en purée ou sous forme de pulpe, la matrice alimentaire a peu d'influence sur la bioaccessibilité, malgré un effet protecteur contre la dégradation des caroténoïdes, par rapport à des molécules pures ;
- dans le cas où les caroténoïdes bactériens sont inclus dans le matériel bactérien lyophilisé, les cellules végétatives se dégradent pendant toute la phase de digestion gastrique, permettant la libération des caroténoïdes et donc leur micellarisation pendant la digestion duodénale ;
- l'incorporation des caroténoïdes dans les micelles mixtes artificielles est facilitée par une pré-homogénéisation dans les lipides, seule une petite proportion de caroténoïdes peut être transférée directement de la forme cristalline aux micelles mixtes et ce taux varie selon les caroténoïdes (lycopène = astaxanthine <<  $\beta$ -carotène = lutéine << caroténoïdes de HU36 = caroténoïdes de GB1) ;

- malgré une teneur minimale en huile nécessaire dans les aliments afin d'assurer la formation des micelles mixtes indispensables à l'assimilation des caroténoïdes, cette huile peut limiter la bioaccessibilité des caroténoïdes de ceux-ci, lorsqu'elle n'est pas hydrolysée au cours de la digestion ;
- les différences d'efficacité d'absorption des caroténoïdes au niveau de la barrière intestinale sont faibles. En particulier, l'absorption des divers caroténoïdes de HU36 ou de GB1 est non-sélective (tous les caroténoïdes d'une même souche sont absorbés dans les mêmes proportions). Néanmoins, l'absorption du lycopène s'est révélée légèrement plus efficace que celle des autres caroténoïdes, probablement grâce à l'action de transporteurs membranaires (sa faible biodisponibilité est donc essentiellement liée à sa bioaccessibilité, peut-être à cause d'une propension importante à la cristallisation, mais pas à son absorption) ;
- le lycopène s'est révélé le caroténoïde le plus biodisponible *in vivo* parmi les caroténoïdes de référence. On suggère que ce résultat pourrait être lié à son affinité supérieure pour les récepteurs membranaires SR-BI, fortement exprimés dans les cellules intestinales et hépatiques ;
- la polarité des caroténoïdes (qui dépend de leur structure) est corrélée à leur biodisponibilité relative dans le plasma en post-prandial (teneurs plasmatiques : lycopène <  $\beta$ -carotène < astaxanthine < lutéine < caroténoïdes de GB1 < caroténoïdes de HU36) ;
- les caroténoïdes très apolaires ( $\beta$ -carotène et lycopène) ont été retrouvés à 90 % dans le foie, alors que les caroténoïdes moins apolaires (lutéine, astaxanthine et caroténoïdes de HU36 et GB1) ont été retrouvés à 60 % dans le foie et 30 % dans le tissu adipeux ;
- l'ingestion des caroténoïdes de HU36 et GB1 inclus dans le matériel bactérien lyophilisé modifie leur répartition tissulaire et les concentre dans le foie, par un mécanisme encore inexpliqué.

De plus, la comparaison des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* a permis d'évaluer la validité des modèles *in vitro* pour la biodisponibilité *in vivo* :

- les micelles artificielles ne miment pas suffisamment bien la structure des micelles mixtes produites lors des digestions *in vitro* pour obtenir des résultats équivalents lors des tests d'absorption sur Caco-2 ;

- chez l'animal, la biodisponibilité totale après trois jours de gavage est essentiellement expliquée par la concentration de caroténoïdes dans le foie et le tissu adipeux (accumulation dans les tissus de réserve), alors que le sang contient proportionnellement très peu de caroténoïdes. Les teneurs plasmatiques en caroténoïdes en post-prandial ne sont pas corrélées à la biodisponibilité totale et ne sont donc pas un marqueur fiable de celle-ci ;
- les teneurs plasmatiques à jeun, après 2 jours de gavage, sont corrélées avec la part des caroténoïdes biodisponibles totaux retrouvés dans le tissu adipeux ;
- la biodisponibilité relative des caroténoïdes donnée par le modèle *in vitro* (produit de la bioaccessibilité et de l'efficacité d'absorption) est un bon marqueur de la biodisponibilité dans le plasma en post-prandial après 3 jours de gavage ;
- l'efficacité relative d'absorption des caroténoïdes par les Caco-2 est un bon marqueur de leur biodisponibilité totale (plasma, foie et tissu adipeux) *in vivo*.

Par ailleurs, lorsque les caroténoïdes atteignent les tissus de réserve (foie et tissu adipeux), certains ont un effet de contrôle sur l'expression des récepteurs protéiques membranaires spécifiques du cholestérol et d'autres micronutriments lipidiques (dont le lycopène, pour SR-BI). En particulier, la lutéine, le  $\beta$ -carotène et l'astaxanthine limitent l'expression de CD36 et de SR-BI dans le tissu adipeux (elle est au contraire augmentée par l'ingestion d'acides gras) ; et le  $\beta$ -carotène, le lycopène et l'astaxanthine augmentent l'expression de CD36 dans le foie (où il est très peu exprimé en conditions basales).

Il semblerait également que les caroténoïdes étudiés ici aient un effet direct sur la physiologie du tissu adipeux, d'une part en régulant l'expression de gènes déterminant l'activité des adipocytes, d'autre part en exerçant un effet anti-inflammatoire au niveau des adipocytes. L'activité des caroténoïdes bactériens au niveau des adipocytes se distingue légèrement de celles des caroténoïdes de référence. En effet, HU36 et GB1 régulent l'activité des LPL mais n'ont pas d'effet direct sur le stockage et la mobilisation des acides gras dans les adipocytes. Pour ce qui est de l'inflammation du tissu adipeux, la diminution de la sécrétion des cytokines indique qu'ils ont un effet protecteur significatif. Toutefois, malgré leur biodisponibilité importante dans le tissu adipeux, ils restent moins anti-inflammatoires que les autres caroténoïdes et en particulier que le lycopène qui agit également sur MCP1.

---

# **DISCUSSION GENERALE**

---



De nombreuses études épidémiologiques suggèrent régulièrement que la consommation de fruits et légumes diminue les risques de certaines maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, certains cancers et des maladies oculaires et neurodégénératives. Grâce à leur pouvoir antioxydant, les caroténoïdes pourraient faire partie des composants présents dans les fruits et légumes qui exercent un rôle protecteur contre les espèces réactives de l'oxygène. Les études les plus récentes ont également mis en évidence l'effet de certains caroténoïdes (en particulier le lycopène) sur la régulation de gènes potentiellement impliqués dans le syndrome métabolique. En écho à ces observations, des produits contenant des caroténoïdes sont de plus en plus nombreux sur le marché des compléments alimentaires. L'objectif de ces produits est, entre autres, de réduire les effets néfastes du stress oxydant chez des populations à risque, notamment les personnes âgées, ou en surpoids, ou ayant un apport alimentaire en végétaux insuffisant.

Les caroténoïdes bactériens pourraient présenter des perspectives intéressantes pour le marché des compléments alimentaires en raison de leurs structures différentes de celles des caroténoïdes que l'on trouve habituellement dans les végétaux. En effet, en plus de certains caroténoïdes usuels ( $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine, canthaxanthine ...), les bactéries synthétisent des molécules ayant des structures tout-à-fait originales. Celles-ci ont des squelettes à 30 ou 40 carbones, peuvent être linéaires ou cycliques et porter des fonctions oxygénées variées (notamment hydroxyle, carbonyle, carboxyle), certaines pouvant être associées à des sucres (glycosylesters, O-glycosides) et à des acides gras. C'est par exemple le cas des caroténoïdes étudiés au cours de cette thèse, qui sont produits par deux souches de bactéries marines *Bacillus*, formatrices de spores, HU36 et GB1. Ils pourraient agir à divers niveaux : dans le compartiment gastro-intestinal où ils pourraient exercer une activité antioxydante, car c'est dans cet organe que les concentrations de caroténoïdes sont les plus élevées ; dans le sang et les divers tissus de l'organisme dans lesquels ils pourraient exercer des effets antioxydants et anti-inflammatoires.

La structure des caroténoïdes de HU36 a été décrite ([Duc, Fraser et al. 2006](#); [Perez-Fons, Steiger et al. 2010](#)). Les extraits se composent de deux groupes de pigments, qui sont des esters d'acides gras et de glycosides du 8'-apolycopène (pigments jaunes) ou du 8'-apolycopénoate de méthyle (pigments orange). En milieu micellaire ou émulsionné, ces pigments sont susceptibles d'adopter une conformation repliée, avec les deux chaînes hydrocarbonées au sein de la phase lipidique et l'extrémité polaire (groupement glycosyle) au contact de la phase aqueuse. Notons que les pigments orange présentent un groupement carboxyle électro-attracteur et conjugué avec la chaîne polyénique, ce qui

accroît la délocalisation électronique. La composition de l'extrait de caroténoïdes de GB1 est moins bien connue. Elle comporte entre autres un pigment de type diglycosylester de l'acide 4,4'-apolycopène-dioïque. Ce pigment présente deux extrémités polaires et porteuses de groupements carboxyles électro-attracteurs et conjugués avec la chaîne polyénique rigide à 11 doubles liaisons carbone-carbone.

Certaines des propriétés de ces caroténoïdes bactériens (stabilité, pouvoir antioxydant, biodisponibilité) ont été étudiées à l'aide de plusieurs modèles permettant de mimer les différentes étapes de la digestion. Le principe de cette étude a consisté à complexifier progressivement les modèles afin de comprendre certains mécanismes d'action des caroténoïdes en fonction de leur structure et de leur environnement dans le tractus digestif (extraits purs ou incorporés dans des matrices alimentaires, homogénéité du milieu réactionnel *i.e.* solution micellaire ou émulsion, présence d'initiateurs de l'oxydation, présence de lipides polyinsaturés oxydables). Les effets de la structure chimique des caroténoïdes ont été explorés en comparant les résultats obtenus avec ces caroténoïdes bactériens à ceux obtenus avec des caroténoïdes de référence :  $\beta$ -carotène et lycopène (carotènes), astaxanthine et lutéine (xanthophylles), mais aussi en comparant les résultats obtenus avec les différents caroténoïdes de référence.

Le modèle micellaire utilisé pour étudier la stabilité des caroténoïdes en présence de fer alimentaire est un milieu simple, ne contenant qu'un tensioactif (Brij<sup>®</sup>35) et le tampon acétate ou phosphate, qui ont été choisis pour n'interagir que faiblement avec les caroténoïdes et les initiateurs d'oxydation utilisés. Ce modèle a donc permis d'étudier de façon spécifique les réactions entre les différents caroténoïdes et chaque initiateur d'oxydation ajouté dans le milieu.

Quelle que soit la forme de fer utilisée pour initier l'oxydation des caroténoïdes, celle-ci induit la formation d'isomères (Z), d'époxydes et de diépoxydes, de produits de coupure (aldéhydes et cétones), de composés plus courts de type acides et de produits volatils. Les produits de dégradation du  $\beta$ -carotène ont été identifiés précisément. En revanche, ceux des autres caroténoïdes ont été beaucoup plus difficiles à isoler et n'ont été que partiellement caractérisés. Toutefois, il est probable que des produits similaires soient libérés quel que soit le caroténoïde.

En présence de fer seul (fer libre ou fer hémique), on a observé que la structure des caroténoïdes influence nettement les cinétiques de réaction. D'une part, la stabilité des caroténoïdes dépend de :

- leur capacité à réagir par transfert d'électron avec  $Fe^{III}$  ([Wei, Gao et al. 1997](#)) ([Gao and Kispert 2003](#)) ou avec  $HmFe^{III}$ , et donc du potentiel redox du couple  $Car/Car^{*+}$ . Cette réaction est défavorisée dans le cas des caroténoïdes porteurs de groupements électro-attracteurs (astaxanthine et encore plus les caroténoïdes de HU36 et de GB1) ;
- leur capacité à réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) issues de l'autoxydation de l'ion ferreux (espèces ferryles  $Fe^{III}-O^*$  et perferryles  $Fe^{III}-OO^*$ ) ou du fer hémique ( $HmFe^{IV}=O$ , radical  $HOO^*$ ), avec formation d'époxydes puis de produits de coupure. Les réactions avec les ERO sont favorisées par la longueur et la planéité de la chaîne de doubles liaisons conjuguées (ex : lycopène >  $\beta$ -carotène, ou GB1 > HU36) et défavorisées par la présence de groupements terminaux électro-attracteurs conjugués avec la chaîne polyénique (astaxanthine, caroténoïdes de HU36 et de GB1). Notons cependant que le rôle de ces groupements électro-attracteurs dans la capture de radicaux par les caroténoïdes n'est pas clair : certains auteurs prétendent qu'ils augmentent l'énergie d'activation des intermédiaires radicalaires produits par addition des ERO sur la chaîne polyénique ([Mortensen and Skibsted 1997 b](#)), d'autres suggèrent qu'ils favorisent la délocalisation de l'électron non-apparié le long de cette chaîne ([Perez-Galvez and Minguez-Mosquera 2001](#)) ;
- le caractère pro-oxydant des adduits caroténoïde-radical. Dans le cas du  $\beta$ -carotène et du lycopène et à forte pression partielle de dioxygène, il a été montré que ces radicaux réagissent avec  $O_2$  pour conduire à des radicaux peroxy non-stabilisés et très réactifs ([Young and Lowe 2001](#)). Or, le milieu utilisé était en permanence agité, de sorte que  $O_2$  n'était pas limitant.

De plus, il a été établi que, dans notre modèle micellaire, la réactivité des groupements fonctionnels des caroténoïdes ne peut pas, à elle seule, expliquer les différences de sensibilité à l'autoxydation mesurées. D'autres paramètres doivent donc être considérés.

En particulier, la polarité des caroténoïdes influence leur localisation et leur orientation dans les micelles, et par conséquent leur réactivité avec le fer. Les carotènes très apolaires sont situés au coeur des micelles, alors que l'astaxanthine et les

caroténoïdes de GB1, avec leurs deux têtes polaires, sont probablement proches de l'interface. On peut imaginer une orientation quasi-perpendiculaire aux molécules de tensioactif pour permettre la solvataion des deux têtes polaires. Avec leur unique tête polaire, les caroténoïdes de HU36 pourraient être insérés dans les micelles parallèlement aux molécules de tensioactif. La répartition des différents caroténoïdes dans le milieu réactionnel pourrait en partie compenser les différences de potentiel redox  $\text{Car}/\text{Car}^{*+}$  ([Burke, Edge et al. 2001](#)).

Cette étude a également montré que la réactivité des formes du fer utilisées pour initier l'oxydation est très variable et a un impact majeur sur la cinétique des réactions. En effet, il était déjà établi que la métalloprotéine  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  se dénature et relargue son cofacteur hématine  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  à pH 4. Ces deux formes de fer héminique sont susceptibles d'être impliquées dans un cycle redox de type  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{IV}}$  ([Baron and Andersen 2002](#); [Carlsen, Møller et al. 2005](#); [Goupy, Vulcain et al. 2007](#)). Le suivi des formes redox du fer libre dans le milieu micellaire à pH 4 a par ailleurs montré que  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est stable et que  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est rapidement oxydé en  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , formant probablement des intermédiaires ferryles et perferryles ([Welch, Davis et al. 2002](#)). La vitesse de la conversion  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  qui se met en place dans le milieu réactionnel en l'absence de caroténoïdes varie selon le ratio fer/caroténoïde présent dans le milieu. Le dosage des formes redox du fer s'est révélé un outil efficace et nécessaire pour analyser l'autoxydation du  $\beta$ -carotène en milieu micellaire et proposer un mécanisme réactionnel en l'absence d'acides gras. En particulier, l'élément essentiel à la compréhension de la sensibilité du  $\beta$ -carotène à l'autoxydation induite par  $\text{Fe}^{\text{II}}$  a été la mise en évidence de la réaction très rapide du  $\beta$ -carotène avec les intermédiaires réactifs produits par réaction de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  avec  $\text{O}_2$ . En outre, l'inhibition de la réaction en présence d'un excès de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , que l'on explique par la formation de dimères  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OFe}^{\text{III}}$  stables, est particulièrement intéressante et n'avait pas été décrite auparavant. Par ailleurs, la réduction lente de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  constitue un verrou cinétique dans le processus global d'autoxydation des caroténoïdes induite par  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Lors des études cinétiques, il a été déterminé que les caroténoïdes de GB1 et HU36 sont remarquablement stables en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par rapport aux caroténoïdes de référence. La vitesse de consommation initiale est indépendante de la concentration de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et les caroténoïdes sont globalement peu oxydés. Il est probable que les caroténoïdes bactériens ne forment pas d'adduits radicalaires stables avec les intermédiaires oxydants de l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Au contraire, la vitesse de consommation initiale de l'astaxanthine, du  $\beta$ -carotène et du lycopène augmente avec la concentration de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et leur autoxydation est beaucoup plus importante.

Contrairement aux caroténoïdes de référence, les caroténoïdes de GB1 et de HU36, tout en restant plus stables, sont plus sensibles à l'autoxydation induite par  $\text{Fe}^{\text{III}}$  qu'à l'autoxydation induite par  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Il est possible que leur localisation à la périphérie des micelles, voire une certaine affinité pour  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , facilite le transfert d'électron de la chaîne polyénique vers  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . En revanche, les caroténoïdes bactériens restent remarquablement stables en présence de fer hémique, ce qui indique que la réduction de  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  en  $\text{HmFe}^{\text{II}}$  n'est pas favorable dans ce cas.

En présence de fer et d'acides gras, la réactivité des caroténoïdes dépend toujours des paramètres précédents, auxquels s'ajoutent d'autres critères liés à la peroxydation lipidique :

- $\text{MbFe}^{\text{III}}$  et  $\text{HmFe}^{\text{III}}$  réagissent avec les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) et libèrent des radicaux  $\text{LO}^{\bullet}$  et les espèces hypervalentes  $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$  ou  $\text{HmFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ , qui à leur tour peuvent réagir avec LOOH ou avec les lipides eux-mêmes et libérer des radicaux  $\text{LOO}^{\bullet}$  propagateurs de l'oxydation (et régénérer  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  ou  $\text{HmFe}^{\text{III}}$ ) ;
- $\text{Fe}^{\text{II}}$  réagit avec LOOH et libère des radicaux  $\text{LO}^{\bullet}$  qui amorcent l'oxydation des lipides (et  $\text{Fe}^{\text{II}}$  toujours avec  $\text{O}_2$  en milieu acide, libérant  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dont les intermédiaires sont des radicaux perferryles  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^{\bullet}$ ).

Le dosage des formes redox du fer, effectué lors de l'inhibition de l'oxydation lipidique par le lycopène, a permis de mieux comprendre les cinétiques des réactions d'oxydation entre le fer, les peroxydes lipidiques et les caroténoïdes. En particulier, ce dosage a montré que le maintien de fer à l'état  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par les caroténoïdes est beaucoup moins marqué en présence de lipides qu'en présence de fer seul. Ce phénomène, qui serait d'ailleurs pro-oxydant en milieu lipidique, est en effet limité par une réactivité plus forte des caroténoïdes avec les radicaux peroxydes lipidiques (intermédiaires clef de l'autoxydation des lipides) qu'avec les radicaux ferryles et perferryles (intermédiaires clef de l'autoxydation des caroténoïdes), ce que confirme la consommation plus rapide des caroténoïdes en présence de lipides. La différence est particulièrement marquée dans le cas des caroténoïdes bactériens, qui sont très stables en présence de metmyoglobine dans un milieu sans lipides, mais rapidement dégradés en présence d'un acide gras polyinsaturé. Il serait intéressant de répéter cette démarche de dosage du fer avec les autres caroténoïdes et/ou leurs produits d'oxydation, car on a pu constater des comportements très différents selon la nature des caroténoïdes utilisés et le stade de la peroxydation lipidique (avant ou après l'oxydation des caroténoïdes natifs).

En effet, au regard des cinétiques de peroxydation lipidique inhibée par les différents caroténoïdes, l'efficacité antioxydante des caroténoïdes bactériens de HU36 et de GB1 est très différente de celles du  $\beta$ -carotène, du lycopène et de l'astaxanthine. L'effet antioxydant des produits de dégradation de ces caroténoïdes diffère également de celui des caroténoïdes natifs. Enfin, l'effet des caroténoïdes change avec la constitution du milieu réactionnel (solution micellaire ou émulsion) et avec l'initiateur de l'oxydation. Le mécanisme antioxydant général est toutefois le même pour tous les caroténoïdes natifs : ce sont des briseurs de chaîne radicalaire et ils agissent par formation d'adduits avec les radicaux lipidiques, conformément à l'allongement de la phase de latence observée. Après dégradation totale des caroténoïdes natifs, les cinétiques laissent penser que certains produits d'oxydation, lorsqu'ils ont une activité antioxydante (si la peroxydation reste ralentie par rapport au contrôle sans inhibiteur), agissent en inhibant les initiateurs de l'oxydation. Les phénomènes suivants ont été observés :

- les caroténoïdes bactériens natifs inhibent fortement la peroxydation initiée par  $MbFe^{III}$  en milieu micellaire et en émulsion (mais pas la peroxydation initiée par  $Fe^{II}$ ),
- les caroténoïdes de référence natifs inhibent la peroxydation initiée par  $MbFe^{III}$  ou par  $Fe^{II}$  dans les micelles (mais pas en émulsion),
- les produits d'oxydation des caroténoïdes bactériens (formés *in situ*), qui sont probablement plus hydrophiles en raison de leurs chaînes plus courtes et de leurs groupements polaires, inhibent la peroxydation initiée par  $MbFe^{III}$  et  $Fe^{II}$  dans les micelles (mais pas en émulsion),
- les produits d'oxydation des caroténoïdes de référence, qui sont également plus polaires, inhibent la peroxydation initiée par  $MbFe^{III}$  en milieu micellaire et en émulsion (mais pas la peroxydation initiée par  $Fe^{II}$ ).

En ce qui concerne les formes natives des caroténoïdes, les bonnes performances des caroténoïdes bactériens dans l'inhibition de la peroxydation initiée par  $MbFe^{III}$  sont en accord avec leur stabilité en présence de  $MbFe^{III}$  et avec une localisation favorable proche de l'interface. En revanche, l'absence d'inhibition par ces mêmes caroténoïdes de la peroxydation lipidique induite par  $Fe^{II}$  est difficile à expliquer. La faible efficacité des caroténoïdes de référence en émulsion, quant à elle, peut être due à la séquestration de ces caroténoïdes dans la phase lipidique, loin de l'interface, un phénomène probablement beaucoup plus marqué qu'en milieu micellaire. Concernant les produits d'oxydation des caroténoïdes, la saturation de la peroxydation induite par les produits des caroténoïdes bactériens (probablement plus polaires et à chaîne courte), est particulièrement marquée et suggère qu'en milieu micellaire ces derniers maintiennent le fer sous la forme  $Fe^{III}$

inactive. Leur faible efficacité en émulsion reste inexpiquée. Parmi les produits d'oxydation des caroténoïdes de référence, on peut penser que ce sont les apocaroténals à longue chaîne qui réagissent avec MbFe<sup>III</sup> pour inhiber l'oxydation. En effet, l'efficacité du 6'-apolycopénel a été démontrée en conditions similaires dans des travaux précédents ([Goupy, Reynaud et al. 2011](#)).

La complémentarité des mécanismes observés assure une réduction de la peroxydation lipidique à divers stades de la réaction. De plus, les essais d'inhibition avec des couples d'antioxydants ont montré qu'il est possible d'améliorer l'efficacité des caroténoïdes en leur associant un autre antioxydant agissant par un mécanisme différent. En particulier, la combinaison des caroténoïdes bactériens avec l'acide chlorogénique, qui ralentit l'oxydation par réduction de la ferrylmyoglobine (MbFe<sup>IV</sup>=O), entraîne un effet de synergie spectaculaire en milieu micellaire. Des travaux précédents, dont le but était d'étudier des combinaisons d' $\alpha$ -tocophérol et de  $\beta$ -carotène ([Mortensen, Skibsted et al. 2001](#); [Zhang and Omaye 2001](#)), ou d' $\alpha$ -tocophérol et de quercétine ([Goupy, Vulcain et al. 2007](#)) avaient expliqué des effets similaires par une régénération du  $\beta$ -carotène ou de la quercétine par l' $\alpha$ -tocophérol. Dans le cas présent, la consommation des caroténoïdes n'est pas ralentie en présence d'acide chlorogénique. La synergie pourrait traduire la prolongation de l'action antioxydante du polyphénol par les caroténoïdes (il est possible que les caroténoïdes exercent un effet stabilisateur sur l'acide chlorogénique en bloquant l'hème, mais sans pour autant être suffisamment réducteur pour régénérer la forme MbFe<sup>III</sup>). Des mesures cinétiques par chromatographie, de l'oxydation simultanée des polyphénols, seraient nécessaires pour éclaircir ce point.

Dans le modèle plus complexe de la digestion *in vitro*, les caroténoïdes sous forme pure ont subi une dégradation modérée mais plus importante que dans le milieu micellaire en l'absence d'initiateurs de l'oxydation. Ce modèle biologique contient en effet des sels biliaires et des enzymes dans les extraits de bile et de pancréatine, lesquels peuvent favoriser la dégradation des caroténoïdes. En particulier, les caroténoïdes bactériens de HU36 portent des chaînes secondaires d'acides gras qui peuvent être hydrolysées au cours de la digestion. Il a été démontré que la lipase gastrique porcine n'est pas efficace pour l'hydrolyse des esters de lutéine ou de  $\beta$ -cryptoxanthine ([Breithaupt, Bamedi et al. 2002](#)), mais la cholestérol estérase, présente dans le suc pancréatique, pourrait être active sur les esters de caroténoïdes. En effet, une hydrolyse de la zéaxanthine par cette enzyme a déjà été démontrée ([Chureeporn and Failla 2006](#)). La cinétique de dégradation des caroténoïdes n'a cependant pas été suivie dans nos expérimentations de digestion *in vitro*, ce qui ne permet donc pas de dire précisément si la dégradation est plus importante

pendant la digestion gastrique ou duodénale. En outre, dans ce modèle comme dans le modèle chimique, parmi les caroténoïdes produits par HU36, les pigments jaunes ont été plus dégradés que les pigments orange qui sont porteurs d'un groupement terminal méthylester susceptible de protéger partiellement les doubles liaisons de la chaîne conjuguée. Digérés au sein de matrices alimentaires, ces mêmes caroténoïdes ont été moins dégradés que sous forme pure, sans que cela influe sur la bioaccessibilité des caroténoïdes dans notre cas. Ce second résultat de stabilité est conforme à des travaux précédents ([Yeum, Lee-Kim et al. 1995](#)), notamment chez l'homme ([Tyssandier, Reboul et al. 2003](#)), qui avaient montré que seuls quelques isomères étaient formés au cours de la digestion de purées de légumes. Il serait toutefois intéressant de savoir si la dégradation augmenterait avec un repas test contenant une quantité importante d'initiateurs d'oxydation, par exemple de la viande rouge.

En conditions peu oxydantes la dégradation des caroténoïdes n'est par conséquent pas une limite importante à leur biodisponibilité. En revanche, cette étude a mis en évidence l'effet déterminant de la structure chimique des caroténoïdes sur la quantité retrouvée dans le sang et les principaux tissus de stockage de ces micronutriments lipidiques, c'est-à-dire le foie et le tissu adipeux. La structure chimique des caroténoïdes fait partie des facteurs clef qui sont supposés moduler leur biodisponibilité et qui sont résumés par le mnémogramme SLAMENGI ([van Het Hof, West et al. 2000](#)). Néanmoins, son impact relatif sur la biodisponibilité, par rapport aux autres facteurs proposés ([West, C et al. 1998](#)), n'avait pas été précisément estimé jusque-là.

Des tests de corrélation ont tout d'abord permis d'établir que, dans le cas où la matrice alimentaire n'est pas un facteur limitant de la bioaccessibilité (comme cela a été le cas avec nos purées de légumes) et où les quantités de sels biliaires et de lipides sont suffisantes ([Tyssandier, Lyan et al. 2001](#)), l'incorporation des caroténoïdes dans les micelles mixtes lors de digestions *in vitro* est inversement corrélée à leur hydrophobicité. En particulier, la micellisation des caroténoïdes de HU36 et de GB1 est particulièrement facilitée par leur forte polarité liée à leurs fonctions glycosyle. De plus, les tests effectués à l'aide de micelles artificielles ont démontré que ce sont les seuls caroténoïdes de cette étude à être aussi bien transférés dans des micelles pré-formées, qu'incorporés dans des micelles en formation. On peut supposer que ces caroténoïdes, grâce à leurs groupements polaires, sont partiellement solubles en milieux aqueux, contrairement au lycopène qui cristallise très vite et qui est de ce fait très peu bioaccessible.

L'effet important de la polarité des caroténoïdes a ensuite été démontré au niveau de leur concentration plasmatique post-prandiale. En effet, les caroténoïdes bactériens

ont été retrouvés à des teneurs plus élevées que la lutéine, elle-même en concentrations plus fortes que l'astaxanthine, le  $\beta$ -carotène et le lycopène.

Enfin, la polarité des caroténoïdes semble aussi influencer leur répartition entre le foie et le tissu adipeux. En effet, à peu près un tiers des caroténoïdes bactériens et des xanthophylles (lutéine et astaxanthine) ont été retrouvés dans le foie, alors qu'environ 90 % des carotènes étudiés ( $\beta$ -carotène et lycopène) ont été retrouvés dans cet organe.

Toutefois, l'hydrophobicité des caroténoïdes n'explique ni leur absorption intestinale, ni leur biodisponibilité totale chez le rat.

Tout d'abord, cette étude a montré que le lycopène, qui est le caroténoïde le moins biodisponible selon plusieurs études ([Reboul, Richelle et al. 2006](#); [O'Sullivan, Ryan et al. 2007](#)), et dont la solubilité dans les micelles mixtes est particulièrement faible (probablement à cause de la formation de cristaux facilitée par sa structure linéaire) est pourtant transféré des micelles de digestion aux entérocytes avec le plus fort taux (23 %). Au contraire, les caroténoïdes bactériens, beaucoup plus concentrés dans les micelles mixtes et plus solubles ont été nettement moins efficacement absorbés par les entérocytes (6 à 10 %). Un autre facteur indépendant de l'hydrophobicité a été suggéré pour expliquer ces différences : il s'agit de l'affinité relative des différents caroténoïdes vis-à-vis des récepteurs membranaires, notamment SR-BI ([Moussa, Landrier et al. 2008](#)) et CD36 ([Moussa, Gouranton et al. 2011](#)). Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus chez le rat, montrant une plus forte concentration de lycopène que des autres caroténoïdes dans le foie. Or, des mesures de l'expression relative de ces deux transporteurs au niveau du foie ont démontré que SR-BI y est plus exprimé que CD36. L'affinité très importante du lycopène vis-à-vis de SR-BI pourrait donc expliquer sa remarquable efficacité d'absorption ainsi que son accumulation exceptionnelle dans le foie. Néanmoins, cela reste à démontrer par des expériences dédiées.

Finalement, il n'y a aucun lien direct entre le taux de micellisation des caroténoïdes et leur taux d'absorption. Ces deux aspects peuvent tout-à-fait se compenser pour un caroténoïde donné. Ainsi, la forte biodisponibilité des caroténoïdes bactériens est essentiellement due à leur très grande solubilité dans les micelles mixtes, alors que leur taux d'absorption par la cellule intestinale est relativement faible. Par ailleurs, le suivi des différents caroténoïdes de HU36 et de GB1 aux différentes étapes de leur métabolisme a suggéré que tous les caroténoïdes bactériens d'un mélange donné sont transférés avec la même efficacité dans les micelles mixtes puis dans les entérocytes (pas d'effet de la longueur des chaînes secondaires d'acides gras saturés, par exemple). De plus, au niveau

cellulaire, les effets des caroténoïdes de HU36 et de GB1 sur la régulation de la fonction adipocytaire et la réduction de l'inflammation, bien qu'avérés, sont moins importants que ceux des autres caroténoïdes ingérés en quantités égales. Par conséquent, nous émettrons l'hypothèse que leurs bénéfices santé seront probablement davantage attendus avant l'absorption intestinale.

Par ailleurs, la bioaccessibilité a diminué d'à peu près un tiers lors de la digestion *in vitro* des caroténoïdes bactériens sous forme de bactéries lyophilisées (probiotiques), mais aucune différence de biodisponibilité n'a été observée chez le rat, seule la répartition des caroténoïdes entre le foie et le tissu adipeux a changé, pour des raisons qui n'ont pas été déterminées. En outre, les dénombrements de cellules et de spores au cours de la digestion ont montré que les cellules sont dénaturées essentiellement pendant la digestion gastrique, ce qui permet la libération d'une quantité suffisante de caroténoïdes pour qu'ils soient micellisés au cours de la digestion duodénale. Il est donc possible d'envisager l'ingestion des caroténoïdes bactériens sous forme de probiotiques, ce qui pourrait permettre de combiner l'effet des molécules de caroténoïdes et les propriétés éventuelles des spores sur le système immunitaire.

---

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---



## 1. BILAN DE L'ETUDE

Cette thèse présente une étude comparative axée sur les propriétés fonctionnelles de plusieurs caroténoïdes au cours de la digestion et du métabolisme des lipides, menée grâce à des systèmes expérimentaux modèles. Elle a l'originalité de prendre en compte à la fois la réactivité chimique des caroténoïdes en fonction de leur structure, et les effets biologiques qui en découlent.

Deux objectifs majeurs ont été atteints : mieux comprendre les mécanismes réactionnels impliquant des caroténoïdes dans le compartiment gastrique (stabilité, réactivité antioxydante) et explorer l'effet de la structure chimique des caroténoïdes sur leur réactivité et sur leur répartition dans leurs deux principaux organes de stockage dans l'organisme. L'enjeu était de déterminer le potentiel nutritionnel relatif de caroténoïdes ayant des structures variées en considérant deux facteurs limitants majeurs : la stabilité et la biodisponibilité ; ainsi qu'une propriété importante au niveau du tractus digestif : le pouvoir antioxydant ; et enfin une propriété au niveau cellulaire : l'effet sur la régulation de gènes liés au syndrome métabolique. Pour cela, divers modèles chimiques et biologiques ont été utilisés au cours de cette étude : un système chimique micellaire, une émulsion d'huile dans l'eau, un modèle de digestion *in vitro* au niveau gastrique et duodénal, un modèle cellulaire de Caco-2 et un modèle *in vivo*, le rat.

En l'absence de sources d'oxydation fortes dans l'estomac (ex : fer), il a été démontré que les caroténoïdes, quelle que soit leur structure, sont relativement stables en milieu micellaire. Cette observation a pu être corroborée par des mesures au cours de la digestion *in vitro* dans un milieu plus biomimétique : le modèle biologique du compartiment gastrique. Or, la stabilité des caroténoïdes est un critère clef de leur biodisponibilité, ainsi que de leur capacité à libérer des métabolites essentiels (ex : vitamine A), ou encore de leur effet sur l'expression de gènes (ex : inflammation ([Gouranton, Thabuis et al. 2011](#)), activité cellulaire). Cependant, la forme native des caroténoïdes n'est pas forcément la plus intéressante d'un point de vue biologique. Ainsi, le principal rôle du  $\beta$ -carotène *in vivo* est d'être pro-vitaminique A et il doit être absorbé par les entérocytes pour libérer cette vitamine ([During, Albaugh et al. 1998](#); [Deming, Baker et al. 2002](#)). Si pour les autres caroténoïdes des effets de métabolites n'ont pas été démontrés *in vivo*, des études *in vitro* ont démontré que certains métabolites du lycopène, par exemple, exercent un effet plus important que celui du caroténoïde natif contre l'oxydation lipidique ([Goupy, Reynaud et al. 2011](#)). Rien n'est connu aujourd'hui sur la

structure des métabolites des caroténoïdes bactériens de HU36 et de GB1. Leurs produits d'oxydation semblent toutefois présenter des effets complémentaires de ceux des caroténoïdes natifs contre l'oxydation lipidique. De plus, la combinaison de plusieurs caroténoïdes au sein d'un même mélange améliore leur stabilité en présence de sources alimentaires d'initiateurs d'oxydation (ex : le fer, sous forme libre ou hémique). L'effet protecteur des caroténoïdes contre l'oxydation lipidique dans l'estomac dépend donc d'un ensemble de paramètres à considérer les uns par rapport aux autres : leur vitesse de dégradation en présence d'initiateurs d'oxydation ; leur réactivité avec les radicaux libres ou les radicaux lipidiques ; la réactivité des produits d'oxydation de ces caroténoïdes. En outre, le fort pouvoir antioxydant des caroténoïdes dans le tractus gastro-intestinal pourrait présenter un réel intérêt nutritionnel dans le cadre de la diminution de l'oxydation des lipides alimentaires et par conséquent de l'oxydation des lipides circulants et des LDL ([Staprans, Rapp et al. 1994](#)). Les caroténoïdes bactériens sont de plus présents dans le sang, le foie et le tissu adipeux lorsqu'ils sont ingérés avec l'alimentation, que ce soit sous forme extraite ou au sein des cellules bactériennes, ce qui a un effet significatif sur l'expression de la lipoprotéine lipase et sur la diminution de l'inflammation post-prandiale du tissu adipeux.

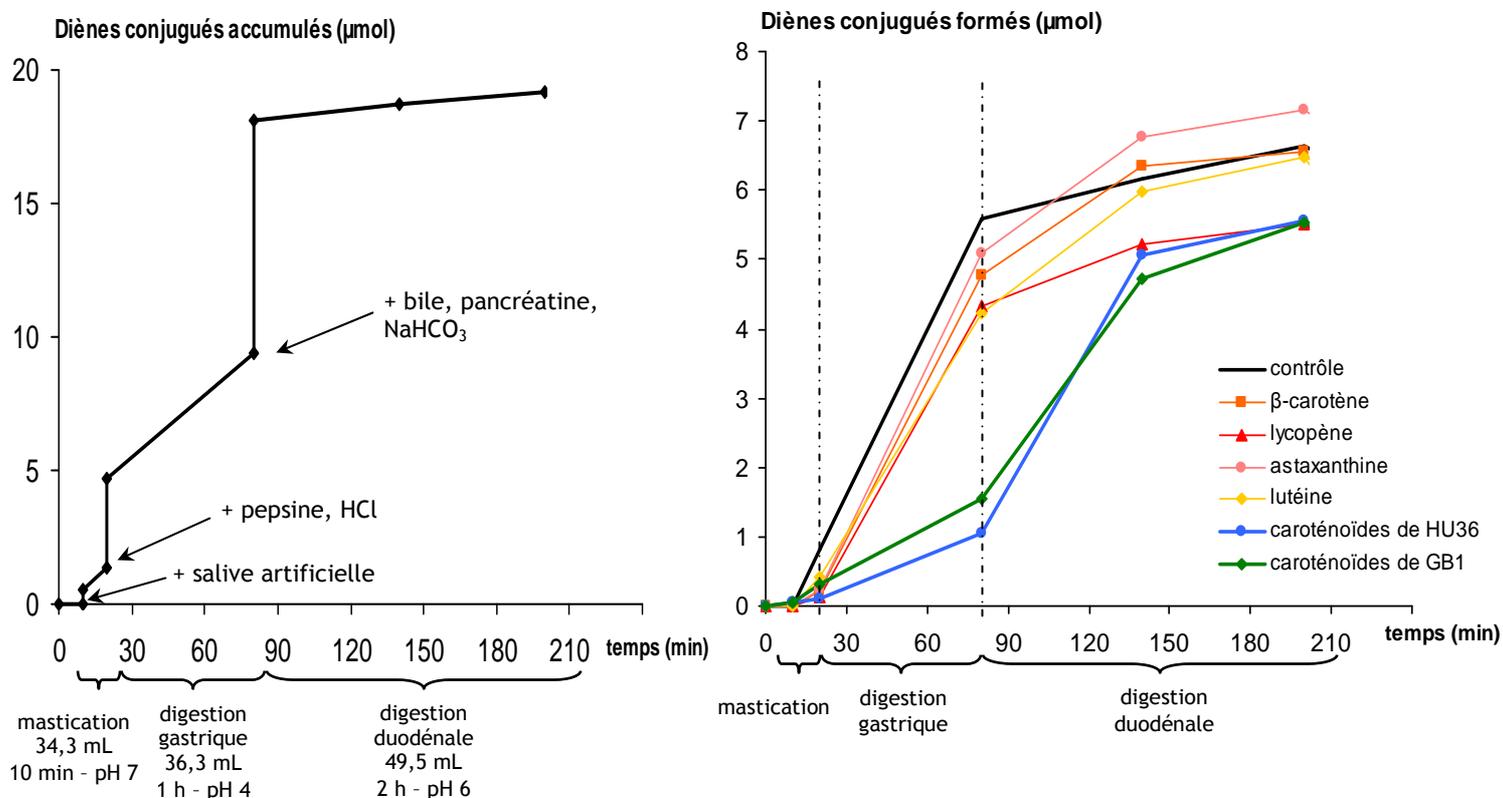
L'ensemble de ces résultats pourrait laisser entrevoir une application de HU36 et GB1 et de leurs caroténoïdes dans l'alimentation, pour leurs effets nutritionnels. Une limite se pose toutefois : à l'heure actuelle, les mécanismes de réaction des caroténoïdes sont de mieux en mieux connus *in vitro* ; cependant, aussi efficaces soient-ils pour comparer les propriétés des caroténoïdes et explorer leurs modes d'action, les modèles du système gastro-intestinal ne permettent pas de prendre en compte l'ensemble des interactions qui ont lieu au cours du métabolisme des caroténoïdes. Il est important de retenir que les modes d'action des caroténoïdes sont multiples et que leurs effets peuvent être positifs ou négatifs en fonction des métabolites formés, de leur quantité et de leur lieu d'action. Le manque de connaissances sur le pouvoir antioxydant des métabolites des caroténoïdes bactériens et sur l'ensemble de leurs effets biologiques est, à ce jour, une limite importante pour recommander la complémentation chez l'homme. En particulier, les effets dose-réponse sont encore trop peu explorés, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

## 2. PERSPECTIVES : COMPLEXIFICATION DES MODELES ET POURSUITE DE L'ETUDE

### 2.1. Etude quantitative de la stabilité et du pouvoir antioxydant des caroténoïdes dans des modèles plus biomimétiques

Alors que certains mécanismes de l'autoxydation des caroténoïdes et de leur réactivité en présence de fer, source d'oxydation au cours de la digestion, ont été mieux compris, une étude axée sur une évaluation quantitative peut être envisagée à l'aide de modèles plus complexes. En particulier, on peut suggérer de répéter les tests de peroxydation lipidique et d'oxydation des caroténoïdes dans le modèle semi-dynamique de digestion *in vitro*. Tel qu'il a été utilisé au cours de cette thèse, le modèle contient déjà des sources d'oxydation (ex : l'extrait de bile ([Terao, Ingemansson et al. 1995](#))) et il est aussi possible d'y suivre la cinétique d'accumulation des diènes conjugués. Un essai complémentaire à cette thèse a été effectué afin de doser les peroxydes progressivement formés au cours de la digestion *in vitro*. La démarche a été similaire à celle adoptée dans le modèle d'émulsion huile/eau : préparation d'un milieu contenant de l'huile (arachide), prélèvements réguliers, précipitation des protéines dans l'isopropanol, dilution au 1/10<sup>ème</sup> et dosage des peroxydes par lecture d'absorbance (figure A). Il faut en plus prendre en compte les changements de volume et la quantité de peroxydes exogènes apportés au début de chaque étape de la digestion : un dosage a donc été effectué avant et après chaque nouvel ajout dans le milieu de digestion et les peroxydes exogènes ont été retranchés (figure B). Les résultats confirment tout d'abord qu'une peroxydation a lieu dans le milieu de digestion, en particulier lors de la phase de digestion gastrique à pH 4. La quantité de peroxydes formés est beaucoup plus faible que dans l'émulsion où l'oxydation avait été initiée par la metmyoglobine. De plus, l'ajout de certains caroténoïdes dissous dans l'huile d'arachide a induit une diminution de la peroxydation. En particulier, la production de peroxydes a été réduite lors de la phase de digestion gastrique, légèrement en présence de lycopène et très fortement en présence de caroténoïdes bactériens (ils semblent cependant avoir ensuite un effet pro-oxydant non-expliqué pendant la première heure de digestion duodénale). Enfin, la mesure des concentrations finales de caroténoïdes a révélé une dégradation relativement modérée : environ 30 % pour le  $\beta$ -carotène, 42 % pour le lycopène, 7 % pour l'astaxanthine, 12 % pour la lutéine, 30 % pour les caroténoïdes de HU36 et 39 % pour les caroténoïdes de GB1). Ce premier test confirme le fort pouvoir antioxydant observé précédemment pour les caroténoïdes issus de HU36 et de GB1. Leur meilleure solubilité contribue aussi certainement à cette propriété. Enfin, ce test permet d'envisager de comparer l'oxydation en présence de différents acides gras

(types ou quantités d'huile, ...), ou en présence de fer alimentaire ; et d'évaluer l'effet antioxydant et la dégradation des caroténoïdes dans ce milieu plus biomimétique.



**Figure :** Augmentation de la quantité de peroxydes lipidiques (diènes conjugués) (A) présents dans le milieu de digestion *in vitro* contenant 100 mg d'huile d'arachide, et (B) formés par oxydation en absence ou en présence de différents caroténoïdes.

## 2.2. Etude de propriétés nutritionnelles des caroténoïdes bactériens chez l'homme grâce à des études cliniques.

Un des objectifs du projet Colorspore, auquel cette thèse est associée, était d'évaluer le potentiel nutritionnel de caroténoïdes bactériens en vue de les utiliser comme additifs fonctionnels en alimentation humaine. Les résultats obtenus à l'aide des modèles chimiques, des modèles biologiques *in vitro* et de l'étude chez le rat sont prometteurs, mais ils doivent être confirmés par des études chez l'homme avant de pouvoir affirmer un quelconque effet sur la santé.

Le pouvoir antioxydant des caroténoïdes de HU36 et de GB1, qui semble se manifester au niveau de l'estomac, pourrait induire une diminution de la quantité de lipides oxydés sécrétés dans les chylomicrons puis retrouvés dans les LDL circulantes. Une

étude clinique d'intervention consistant à compléter l'alimentation de base avec les caroténoïdes extraits de HU36 ou de GB1 et à mesurer l'oxydation des LDL dans le sang pourrait permettre de déterminer s'ils ont un effet antioxydant significatif chez l'homme. Par ailleurs, le prélèvement de tissu adipeux (par biopsies) serait un outil intéressant pour évaluer à la fois la biodisponibilité et l'effet de ces caroténoïdes sur l'expression de gènes adipocytaires impliqués dans la sécrétion de cytokines inflammatoires. Enfin, la formulation d'aliments contenant directement les spores bactériennes a également été envisagée dans ce projet. Or, plusieurs souches bactériennes sont déjà utilisées comme probiotiques à l'heure actuelle. Les éventuels effets de HU36 ou de GB1 sur le système immunitaire pourraient aussi être étudiés.

En outre, les études cliniques sont indispensables pour obtenir les allégations nutritionnelles permettant d'utiliser et de communiquer sur les effets santé de ces caroténoïdes bactériens.

Ces considérations plus appliquées devraient permettre d'enrichir l'approche fondamentale et de compléter l'étude des propriétés des caroténoïdes axée sur leurs mécanismes d'action.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aasen, J. A., G. W. Francis, et al. (1969). "The carotenoids of two yellow halophilic cocci, including a new glycosidic methyl apo-lycopenoate." *Acta Chemica Scandinavica* **23**: 2605-2615.
- Agnew, M., D., S. Koval, F., et al. (1995). "Isolation and characterization of novel alkaliphiles from bauxite-processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp. nov., a new oblique alkaliphile." *Systematic and applied Microbiology* **18**(2): 221-230.
- Aherne, S. A., T. Daly, et al. (2010). "Bioavailability of [beta]-carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model." *Food Research International* **43**(5): 1449-1454.
- Amar, I., A. Aserin, et al. (2003). "Solubilization patterns of lutein and lutein esters in food grade nonionic microemulsions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4775-4781.
- Amengual, J., G. P. Lobo, et al. (2010). "A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress." *The FASEB Journal* **25**(3): 948-959.
- Armand, M., P. Borel, et al. (1994). "Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach." *American Journal of Physiology* **266**(3): G372-G381.
- Artursson, P. and J. Karlsson (1991). "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **175**(3): 880-885.
- Arvisenet, G. I., L. Billy, et al. (2008). "Effect of apple particle state on the release of volatile compounds in a new artificial mouth device." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(9): 3245-3253.
- Bachmann, H., A. Desbarat, et al. (2002). "Feedback regulation of beta,beta-carotene-15,15'-monogénase by retinoic acid in rats and chickens." *Journal of Nutrition* **132**: 3616-3622.
- Baron, C. P. and H. J. Andersen (2002). "Myoglobin-induced lipid oxidation. A review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(14): 3887-3897.
- Barreto, J. C., G. S. Smith, et al. (1992). "A model micellar system for the study of lipid-peroxidation, The reaction of superoxide with the conjugated lipid, B-carotene." *Faseb Journal* **6**(4): A1057-A1057.
- Baskaran, V., T. Sugawara, et al. (2003). "Phospholipids affect the intestinal absorption of carotenoids in mice." *Lipids* **38**(7): 705-711.
- Bast, A., G. R. Haenen, et al. (1998). "Antioxidant effects of carotenoids." *Int J Vitam Nutr Res* **68**(6): 399-403.
- Baudin, B. (2006). "Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires." *mt cardio* **2**(1): 43-52.
- Benevides, C. M. d. J., M. C. d. C. Veloso, et al. (2011). "A chemical study of beta-carotene oxidation by ozone in an organic model system and the identification of the resulting products." *Food Chemistry* **126**(3): 927-934.
- Berger, M. M. (2006). "Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances." *Nutrition Clinique et Métabolisme* **20**(48).
- Berry, A., W. Bretzel, et al. (2003). Isoprenoid production. *Patent Application Publication*. United States. **US 2003/0148416 A1**.
- Beyer, P., S. Al-Babili, et al. (2002). "Golden Rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency." *Journal of Nutrition* **132**: 506S-510S.
- Blount, J. D. and K. J. McGraw (2008). Signal functions of carotenoid colouration. *Carotenoids. Volume 4: natural functions*. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 213-236.
- Böhm, F., R. Edge, et al. (1997). "Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency." *Journal of the American Chemical Society* **119**(3): 621-622.
- Bone, R. A., J. T. Landrum, et al. (2000). "Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects." *Experimental Eye Research* **71**: 239-245.
- Boon, C. S., D. J. McClements, et al. (2009). "Role of Iron and hydroperoxides in the degradation of lycopene in oil-in-water emulsions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Boon, C. S., D. J. McClements, et al. (2010). "Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **50**(6): 515-532.

- Borel, P. (2005). "Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes." Annales de Biologie Clinique **62**(2): 165-177.
- Borel, P. (2011). "Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status." Molecular Nutrition and Food Research **55**: 1-13.
- Borel, P., P. Grolier, et al. (1996). "Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets." Journal of Lipid Research **37**(2): 250-261.
- Borel, P., V. Tyssandier, et al. (1998). "Chylomicron-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides." The Journal of Nutrition **128**(8): 1361-1367.
- Bowen, P. E., S. M. Herbst-Espinosa, et al. (2002). "Esterification does not impair lutein bioavailability in humans." Journal of Nutrition **132**: 3668-3673.
- Bradbury, J. (2001). "Lutein may help reduce atherosclerosis." Lancet **357**(9273): 2030.
- Breithaupt, D. E., A. Bamedi, et al. (2002). "Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes?" Comp. Biochem. Physiol., B **132**: 721-728.
- Britton, G. (2008 a). Functions of intact carotenoids. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 189-212.
- Britton, G. (2008 b). Functions of carotenoid metabolites and breakdown products. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 309-340.
- Britton, G. and J. Helliwell (2008). Carotenoid-protein interactions. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 99-118.
- Britton, G. and F. Khachik (2009). Distribution of carotenoids in vegetables and fruits. Carotenoids: Volume 5: Nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 45-66.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, et al. (1994). Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, et al. (2008 a). Carotenoids. Volume 4: Natural functions. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, et al. (2008 b). Special molecules, special properties. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 1-6.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, et al. (2009). Carotenoids: Volume 5: Nutrition and health. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG.
- Bub, A., B. Waltz, et al. (2000). "Moderate intervention with carotenoid-rich vegetables products reduces lipid peroxidation in men." Journal of Nutrition **130**(9): 2200-2206.
- Burke, M., R. Edge, et al. (2001). "One-electron reduction potentials of dietary carotenoid radical cations in aqueous micellar environments." FEBS Letters **500**(3): 132-136.
- Burke, M., R. Edge, et al. (2001). "Characterisation of carotenoid radical cations in liposomal environments: interaction with vitamin C." Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology **60**(1): 1-6.
- Burton, D. D., H. J. Kim, et al. (2005). "Relationship of gastric emptying and volume changes after a solid meal in humans." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **289**(2): G261-G266.
- Calbet, J. A. L. and J. J. Holst (2004). "Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans." European Journal of Nutrition **43**(3): 127-139.
- Campbell, N. A. (1993). La photosynthèse. Biologie. D. Université: 199-220.
- Canene-Adams, K. and J. W. Erdman Jr (2009). Absorption, transport, distribution in tissues and bioavailability. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 115-148.
- Cao-Hoang, L., R. Fougère, et al. (2011). "Increase in stability and change in supramolecular structure of beta-carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles." Food Chemistry **124**(1): 42-49.
- Cardinault, N., V. Tyssandier, et al. (2003). "Comparison of the postprandial chylomicron carotenoid responses in young and older subjects." European Journal of Nutrition **42**(6): 315-325.
- Careri, M., L. Elviri, et al. (1999). "Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of beta-carotene and xanthophylls. Validation of the analytical method." J Chromatogr A **854**(1-2): 233-44.

- Carey, M. C., D. M. Small, et al. (1983). "Lipid digestion and absorption." Annual Review of Physiology **45**: 651-677.
- Caris-Veyrat, C., M. J. Amiot, et al. (2001). "Mild oxidative cleavage of beta,beta-carotene by dioxygen induced by a ruthenium porphyrin catalyst: characterization of products and of some possible intermediates." New Journal of Chemistry **25**(2): 203-206.
- Caris-Veyrat, C., A. Schmid, et al. (2003). "cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanisms of formation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**: 7318-7325.
- Carlsen, C. U., J. K. S. Møller, et al. (2005). "Heme-iron in lipid oxidation." Coordination Chemistry Reviews **249**(3-4): 485-498.
- Castenmiller, J. J. M. and C. E. West (1998). "Bioavailability and bioconversion of carotenoids." Annual Review of Nutrition **18**(1): 19-38.
- Chen, G. and Z. Djuric (2001). "Carotenoids are degraded by free radicals but do not affect lipid peroxidation in unilamellar liposomes under different oxygen tensions." FEBS Lett **505**(1): 151-154.
- Choe, E. and D. B. Min (2006). "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **46**(1): 1-22.
- Chureeporn, C. and M. L. Failla (2006). "Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells." Journal of Nutrition **136**(3): 588-594.
- Chureeporn, C., S. J. Schwartz, et al. (2004). "Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells." Journal of Nutrition: **134** (9) 2280-2286 **134**(9): 2280-2286.
- Cillard, J. and P. Cillard (2006). "Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations." OCL **13**(1): 24-29.
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. **73**: 9-15.
- Clavel, T., F. Carlin, et al. (2007). "Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media." Journal of Applied Microbiology **103**: 1568-1575.
- Clevidence, B. A. and J. G. Bieri (1993). "Association of carotenoids with human plasma lipoproteins" Methods of Enzymology **214**: 33-46.
- Cutting, S. M. (2008). Colorspore: new sources of naturel, gastric stable, food additives, colorants and novel functional foods. Small collaborative project. **Technical Annex: proposal n°207948:1-84.**
- Cuttriss, A. J., C. I. Cazzonelli, et al. (2011). Carotenoids. Advances in Botanical Research. R. Fabrice and D. Roland, Academic Press. **Volume 58**: 1-36.
- Das, A., J. Hhugenholtz, et al. (1989). "Structure and Function of a Menaquinone Involved in Electron Transport in Membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*." Journal of bacteriology **171**: 5823-5829.
- Das, B. S., D. I. Thurnham, et al. (1996). "Plasma alpha-tocopherol, retinol, and carotenoids in children with falciparum malaria." Am. J. Clin. Nutr. **64**: 94-100.
- Deming, D. M., D. H. Baker, et al. (2002). "The Relative Vitamin A Value of 9-cis  $\beta$ -Carotene Is Less and That of 13-cis  $\beta$ -Carotene May Be Greater than the Accepted 50% That of All-trans  $\beta$ -Carotene in Gerbils." The Journal of Nutrition **132**(9): 2709-2712.
- Dessaux, Y., C. Elmerich, et al. (2004). "La violacéine : une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chromobacterium violaceum*." La Revue de Médecine Interne **25**(9): 659-662.
- Devasagayam, T. P. A., J. C. Tilac, et al. (2004). "Free radicals and antioxidants in human health : current status and future prospects." Journal of Association of Physicians of India **52**(796).
- Devcich, D. A., I. K. Pedersen, et al. (2007). "You eat what you are: modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods." Appetite **48**(3): 333-337.
- Dhuique-Mayer, C., P. Borel, et al. (2007). "Beta-cryptoxanthin from citrus juices: assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model." British Journal of Nutrition **97**(5): 883-890.
- Duc, L. H., P. D. Fraser, et al. (2006). "Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers." Fems Microbiology Letters **255**(2): 215-224.
- Dufossé, L. (2009). Microbial and microalgal carotenoids as colourants and supplements. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. G. Britton, S. Liaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 83-98.

- Dufour, C. and M. Loonis (2005). "Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI-mass spectrometry and NMR of the oxidation products." Chemistry and Physics of Lipids **138**(1-2): 60-68.
- During, A., G. Albaugh, et al. (1998). "Characterization of beta-Carotene 15,15'-Dioxygenase Activity in TC7 Clone of Human Intestinal Cell Line Caco-2." Biochemical and Biophysical Research Communications **249**(2): 467-474.
- During, A. and E. H. Harrison (2007). "Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells." Journal of Lipid Research **48**(10): 2283-2294.
- During, A., M. M. Hussain, et al. (2002). "Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells." Journal of Lipid Research **43**(7): 1086-1095.
- Edholm, O., P. Nordlander, et al. (2000). "The Effect of Water on the Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> Reduction Potential of Heme." Biochemical and Biophysical Research Communications **268**(3): 683-687.
- EFSA (2005). Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in feed/food and the production of feed/food additives. The EFSA Journal. **226**: 1-12.
- El-Abassy, R. M., P. Donfack, et al. (2010). "Assessment of conventional and microwave heating induced degradation of carotenoids in olive oil by VIS Raman spectroscopy and classical methods." Food Research International **43**(3): 694-700.
- El-Agamey, A. and D. J. McGarvey (2008). Carotenoid radicals and radical ions. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 119-154.
- El-Tinay, A. H. and C. O. Chichester (1970). "Oxidation of beta-carotene, Site of initial attack." J Org Chem **35**(7): 2290-2293.
- El Hajji, H., E. Nkhili, et al. (2006). "Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation." Free Radical Research **40**(3): 303-320.
- Evans, M. D. and M. S. Cooke (2004). "Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids." Bioessays **26**(5): 533-542.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London/Ontario, Food and Agriculture Organization / World Health Organization.
- Fassett, R. G. and J. S. Coombes (2009). "Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease." Future Cardiology **5**(4): 333-342.
- Faure, H. (2006). Les vitamines. Cahiers de formation Biologie Médicale, Bioforma. **38**: 29-39.
- Faure, H., V. Fayol, et al. (1999). "Les caroténoïdes: 1. Métabolisme et physiologie." Annales de Biologie Clinique **57**(2): 169-183.
- Faustman, C., Q. Sun, et al. (2010). "Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control." Meat Science **86**(1): 86-94.
- Fernandes, A. S., M. M. Pereira, et al. (2002). "Purification and Characterization of the Complex I from the Respiratory Chain of *Rhodothermus marinus*." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **34**(6): 413-421.
- Fernández-García, E., I. Carvajal-Lérida, et al. (2009). "In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency." Nutrition Research **29**(11): 751-760.
- Ferruzzi, M. G., J. L. Lumpkin, et al. (2006). "Digestive stability, micellarization, and uptake of beta-carotene isomers by Caco-2 human intestinal cells." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(7): 2780-2785.
- Finkelshtein, E. I. and I. S. Krasnokutskaya (1996). "Reactivity of retinoids and carotenoids in autoxidation." Journal of Physical Organic Chemistry **9**(6): 411-418.
- Fleischmann, P. and H. Zorn (2008). Enzymic pathways for formation of carotenoid cleavage products. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 341-366.
- Fukuzawa, K., Y. Inokami, et al. (1998). "Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and alpha-tocopherol in liposomes." Lipids **33**(8): 751-6.
- Gao, G. Q., Y. Deng, et al. (1997). "Photoactivated ferric chloride oxidation of carotenoids by near-UV to visible light." Journal of Physical Chemistry B **101**(39): 7844-7849.
- Gao, Y. L. and L. D. Kispert (2003). "Reaction of carotenoids and ferric chloride: equilibria, isomerization, and products." Journal of Physical Chemistry B **107**(22): 5333-5338.
- Garcia, M. N., C. Martinez-Torres, et al. (1996). "Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: Iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions." The Journal of Nutritional Biochemistry **7**(1): 49-54.

- Garrett, D. A., M. L. Failla, et al. (1999). "Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(10): 4301-4309.
- Garrett, D. A., M. L. Failla, et al. (1999). "Accumulation and retention of micellar beta-carotene and lutein by Caco-2 human intestinal cells." Journal of Nutritional Biochemistry **10**(10): 573-581.
- Gaziano, J. M., E. J. Johnson, et al. (1995). "Discrimination in absorption or transport of beta-carotene isomers after oral supplementation with either all-trans or 9-cis-beta-carotene." American Journal of Clinical Nutrition **61**: 1248-1252.
- Gerber, M., M.-C. Boutron-Ruault, et al. (2002). "Actualités en cancérologie : fruits, légumes et cancers. Une synthèse du réseau Nacre." Bulletin du Cancer **89**(3): 293-312.
- Gessler, N. N., S. B. Gomboeva, et al. (2001). "Free radical lipid peroxidation inhibits enzymatic conversion of beta-carotene into vitamin A." Bull Exp Biol Med **5**: 451-453.
- Gleize, B., M. Steib, et al. (2011). "Simple and fast high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples." Submitted.
- Gorelik, S., T. Lapidot, et al. (2005). "Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: Health implications." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(9): 3397-3402.
- Goupy, P., E. Reynaud, et al. (2011). "Antioxydant activity of (all-E)-lycopene and synthetic apolycopeneoids in a chemical model of oxidative stress in the gastro intestinal tract." New Journal of Chemistry in press.
- Goupy, P., E. Vulcain, et al. (2007). "Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism." Free Radical Biology and Medicine **43**(6): 933-946.
- Gouranton, E., C. Thabuis, et al. (2011). "Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue." Journal of Nutritional Biochemistry **22**(7): 642-648.
- Granado-Lorenzo, F., B. Olmedilla-Alonso, et al. (2007). "Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(15): 6387-6394.
- Graulet, B., B. Chauveau-Duriot, et al. (2006). "Teneur et composition en caroténoïdes des contenus digestifs et du plasma chez la vache au pâturage." Renc. Rech. Ruminants **13**.
- Grès, M.-C., B. Julian, et al. (1998). "Correlation Between Oral Drug Absorption in Humans, and Apparent Drug Permeability in TC-7 Cells, A Human Epithelial Intestinal Cell Line: Comparison with the Parental Caco-2 Cell Line." Pharmaceutical Research **15**(5): 726-733.
- Group, T. a.-T. B.-C. C. P. S. (1994). "The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers." N Engl J Med **330** 1029-1035
- Haila, K. M., S. M. Lievonon, et al. (1996). "Effects of lutein, lycopene, annatto, and gamma-tocopherol on autoxidation of triglycerides." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(8): 2096-2100.
- Haila, K. M., B. R. Nielsen, et al. (1997). "Carotenoid reaction with free radicals in acetone and toluene at different oxygen partial pressures." Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology **204**(2): 81-87.
- Halliwell, B., K. C. Zhao, et al. (2000). "The gastro-intestinal tract: A major site of anti-oxidant action?." Free Radical Research **33**: 819-830.
- Handelman, G. J., F. Vankuijk, et al. (1991). "Characterization of products formed during the autoxidation of beta-carotene." Free Radical Biology and Medicine **10**(6): 427-437.
- Hara, M., H. Yuan, et al. (1999). "Stabilization of liposomal membranes by thermostaxanthins: carotenoid-glucoside esters." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1461**(1): 147-154.
- Hengartner, U., K. Bernhard, et al. (1992). Synthesis, isolation and NMR-spectroscopic characterization of fourteen Z-isomers of lycopene and of acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. Helvetica Chimica Acta. **75**: 1848-1865.
- Henry, L. K., N. L. Puspitasari-Nienaber, et al. (2000). "Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(10): 5008-5013.
- Herron, K. L., M. M. McGrane, et al. (2006). "The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs." Journal of Nutrition **136**: 1161-1165.

- Hillman, K., A. L. Whyte, et al. (1993). "Dissolved oxygen in the porcine gastrointestinal tract." Letters in Applied Microbiology **16**: 299-302.
- Hoebler, C., G. Lecannu, et al. (2002). "Development of an in vitro system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food." International Journal of Food Sciences and Nutrition **53**(5): 389-402.
- Hoffman, J., J. Liinseisen, et al. (1999). "Dietary fiber reduces the antioxidant effect of a carotenoid and alpha-tocopherol mixture on LDL oxidation ex vivo in humans." European Journal of Nutrition **38**: 278-285.
- Hollander, D. (1981). "Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K." The Journal of Laboratory and Clinical Medicine **97**(4): 449-462.
- Hollander, D. and P. E. Ruble (1978). "beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport." American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism **235**(6): E686-E691.
- Hong, H. A., L. H. Duc, et al. (2005). "The use of bacterial spore formers as probiotics." FEMS Microbiology Letters **29**: 813-835.
- Iannone, A., C. Rota, et al. (1998). "Antioxidant activity of carotenoids: an electron-spin resonance study on beta-carotene and lutein interaction with free radicals generated in a chemical system." J Biochem Mol Toxicol **12**(5): 299-304.
- Igene, J. O., J. A. King, et al. (1979). "Influence of heme pigments, nitrite, and nonheme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat." Journal of Agricultural and Food Chemistry **27**(4): 838-842.
- Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." Annual Review of Microbiology **57**: 395-418.
- Inamura, I., M. Isshiki, et al. (1989). "Solubilization of Beta-Carotene in Water by Water-Soluble Linear Macromolecules." Bulletin of the Chemical Society of Japan **62**(5): 1671-1673.
- Jayarajan, P., V. Reddy, et al. (1980). "Effect of dietary fat on absorption of beta-carotene from green leafy vegetables in children." Indian Journal of Medical Research **71**: 53-56.
- Johnson, E. J. (2002). "The Role of Carotenoids in Human Health." Nutrition in Clinical Care **5**(2): 56-65.
- Johnson, E. J., B. R. Hammond, et al. (2000). "Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density." American Journal of Clinical Nutrition **71**: 1555-1562.
- Jomova, K. (2011). "Advances in metal-induced oxidative stress and human stress in human disease." Toxicology **283**(2-3): 65-87.
- Jomová, K., O. Kysel, et al. (2009). "Electron transfer from all-trans beta-carotene to the t-butyl peroxy radical at low oxygen pressure (an EPR spectroscopy and computational study)." Chemical Physics Letters In Press, Corrected Proof.
- Kanasawud, P. and J. C. Crouzet (1990). "Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. I. beta-carotene degradation." Journal of Agricultural and Food Chemistry: **38** (1) 237-243 **38**(1): 237-243.
- Kanner, J. and T. Lapidot (2001). "The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants." Free Radical Biology and Medicine **31**(11): 1388-1395.
- Kaplan, L. A., J. M. Lau, et al. (1990). "Carotenoid composition, concentration, and relationships in various human organs." Clinical and Physiological Biochemistry **8**: 1-10.
- Karabulut, I. (2010). "Effects of alpha-tocopherol, beta-carotene and ascorbyl palmitate on oxidative stability of butter oil triacylglycerols." Food Chemistry **123**: 622-627.
- Khachik, F. (2009). Analysis of carotenoids in nutritional studies. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 7-44.
- Khaneja, R., L. Perez-Fons, et al. (2010). "Carotenoids found in Bacillus." Journal of Applied Microbiology **108**(6): 1889-1902.
- Kim, S. J. (2004). "Cleavage products formed through autoxidation of zeta-carotene in liposomal suspension." Food Science and Biotechnology **13**(2): 202-207.
- Kim, S. J., E. Nara, et al. (2001). "Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene." Lipids **36**(2): 191-199.
- Kiokias, S., C. Dimakou, et al. (2009). "Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions." Food Chemistry **114**(4): 1278-1284.
- Klebanov, G. I., A. B. Kapitanov, et al. (1998). "The antioxidant properties of lycopene." Membr Cell Biol **12**(2): 287-300.

- Köcher, S., J. Breitenbach, et al. (2009). "Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*." Archives of Microbiology **191**: 95-104.
- Köhn, S., H. Kolbe, et al. (2008). Aggregation and interface behaviour of carotenoids. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 53-98.
- Krinsky (1989). "Antioxidant functions of carotenoids." Free Radical Biology and Medicine **7**: 617-635.
- Krinsky, N. and K.-J. Yeum (2003). "Carotenoid-radical interactions." Biochemical and Biophysical Research Communications **305**: 754-760.
- Krinsky, N. I. and E. J. Johnson (2005). "Carotenoid actions and their relation to health and disease." Molecular Aspects of Medicine **26**(6): 459-516.
- Krystallis, A., G. Maglaras, et al. (2008). "Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods." Food Quality and Preference **22**(6): 525-538.
- Laguerre, M., L. J. Lopez-Giraldo, et al. (2007). "Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité oxydante." OCL **14**.
- Lakshman, M. R. and N. R. Manjunath (1999). "Purification and characterization of cellular carotenoid-binding protein from mammalian liver." Methods of Enzymology **299**: 441-456.
- Lakshminarayana, R., M. Raju, et al. (2009). "Phospholipid, oleic acid micelles and dietary olive oil influence the lutein absorption and activity of antioxidant enzymes in rats." Lipids **44**(9): 799-806.
- Lakshminarayana, R., M. Raju, et al. (2006). "Enhanced lutein bioavailability by lysophosphatidylcholine in rats." Molecular and Cellular Biochemistry **281**(1): 103-110.
- Landrier, J. F., C. Malezet-Desmoulins, et al. (2008). "Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells. ." Free Radical Research **42**: 523-530.
- Lapidot, T., R. Granit, et al. (2005). "Lipid peroxidation by "free" iron ions and myoglobin as affected by dietary antioxidants in simulated gastric fluids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 3390-3393.
- Lee, C. M., A. C. Boileau, et al. (1999). "Review of animal models in carotenoid research." Journal of Nutrition **129**(12): 2271-2277.
- Léger, C. L. (2006). "Antioxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action antioxydante, interactions." OCL **13**(1): 59-69.
- Lemke, S. L., S. R. Dueker, et al. (2003). "Absorption and retinol equivalence of beta-carotene in humans is influenced by dietary vitamin A intake." Journal of Lipid Research **44**: 315-322.
- Lewis, S. M. and W. A. Corpe (1964). "Prodigiousin-producing bacteria from Marine sources." Applied Microbiology **12**: 13-17.
- Li, Z., Y. Kawamura, et al. (2002). "*Bacillus okuhidensis* sp. nov., isolated from the Okuhida spa area of Japan." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**: 1205-1209.
- Liaaen-Jensen, S. (2008). Structure and chirality. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 7-14.
- Liaaen-Jensen, S. and B. F. Lutnoes (2008). E/Z isomers and isomerisation. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 15-36.
- Liang, J., Y.-X. Tian, et al. (2009). "Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge." Food Chemistry **115**(4): 1437-1442.
- Liebler, D. C. and T. D. McClure (1996). "Antioxidant reactions of beta-carotene: identification of carotenoid-radical adducts." Chemical Research in Toxicology **9**: 8-11.
- Limbo, S., L. Torri, et al. (2007). "Light-induced changes in an aqueous beta-carotene system stored under halogen and fluorescent lamps, affected by two oxygen partial pressures." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(13): 5238-5245.
- Liu, C. S., R. P. Glahn, et al. (2004). "Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an *in vitro* digestion." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(13): 4330-4337.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. ." Methods **25**: 402-408.
- Lorrain, B. (2008). Modélisation chimique du pouvoir antioxydant des polyphénols dans le compartiment gastrique - Inhibition de l'oxydation lipidique initiée par la metmyoglobine

- dans des émulsions stabilisées par la sérum albumine ou les phospholipides. Chimie. Avignon, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse.
- Lorrain, B., O. Dangles, et al. (2010). "Chemical Modeling of Heme-Induced Lipid Oxidation in Gastric Conditions and Inhibition by Dietary Polyphenols." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(1): 676-683.
- Lutnaes, B. F., A. Oren, et al. (2002). "New C40-Carotenoid Acyl Glycoside as Principal Carotenoid in *Salinibacter ruber*, an Extremely Halophilic Eubacterium." Journal of Natural Products **65**(9): 1340-1343.
- Mamatha, B. S. and V. Baskaran (2011). "Effect of micellar lipids, dietary fiber and beta-carotene on lutein bioavailability in aged rats with lutein deficiency." Nutrition In Press, Corrected Proof.
- Mancuso, J. R., D. J. McClements, et al. (1999). "Ability of iron to promote surfactant peroxide decomposition and oxidize alpha-tocopherol." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(10): 4146-4149.
- Mancuso, J. R., D. J. McClements, et al. (1999). "The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(10): 4112-4116.
- Marisiddaiah, R. and V. Baskaran (2009). "Bioefficacy of [beta]-carotene is improved in rats after solubilized as equimolar dose of [beta]-carotene and lutein in phospholipid-mixed micelles." Nutrition Research **29**(8): 588-595.
- Marshall, J. R. and G. J. Wilmoth (1981). "Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids." Journal of Bacteriology **147**(3): 900-913.
- Martin, H. D., C. Ruck, et al. (1999). "Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions." Pure and Applied Chemistry **71**(12): 2253-2262.
- Matos, H. R., P. Di Mascio, et al. (2000). "Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture." Arch Biochem Biophys **383**(1): 56-9.
- Matos, H. R., S. A. Marques, et al. (2006). "Lycopene and beta-carotene protect in vivo iron-induced oxidative stress damage in rat prostate." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **39**(2): 203-210.
- McDermott, J. C. B., A. Ben-Aziz, et al. (1973). "Recent studies of carotenoid biosynthesis in bacteria." Pure and Applied Chemistry **35**: 29-45.
- McNulty, H., R. F. Jacob, et al. (2008). "Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane Physicochemical Interactions." The American Journal of Cardiology **101**(10, Supplement 1): S20-S29.
- Mei, L., E. A. Decker, et al. (1998). "Evidence of Iron Association with Emulsion Droplets and Its Impact on Lipid Oxidation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(12): 5072-5077.
- Mercadante, A. Z., C. D. Capitani, et al. (2010). "Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration." Meat Science **84**(4): 718-726.
- Michel, F., D. Bonnefont-Rousselot, et al. (2008). "Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques." Annales de Biologie Clinique **66**(6): 605-620.
- Mikkelsen, A. (1995). "Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobine: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH." Lebensmittel Untersuchung und Forschung **200**: 171-177.
- Miller, D. M., G. R. Buettner, et al. (1990). "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions." Free Radical Biology and Medicine **8**(1): 95-108.
- Miller, N. J., J. Sampson, et al. (1996). "Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls." FEBS Lett. **384**: 240-242.
- Min, B. and D. U. Ahn (2005). "Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products. A review." Food Science and Biotechnology **14**(1): 152-163.
- Minguez-Mosquera, M. I. and M. Jarengalan (1995). "Kinetics of the decolouring of carotenoid-pigments." Journal of the Science of Food and Agriculture **67**(2): 153-161.
- Mitchell, C., S. Iyer, et al. (1986). "Red pigment in *Bacillus megaterium* spores." Appl. Environ. Microbiol. **52**(1): 64-67.
- Moeller, R., G. Horneck, et al. (2005). "Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation." Fems Microbiology Letters **51**: 231-236.
- Moore, T. (1930). "Vitamin A and carotene." Biochemistry Journal **24**: 692-700.
- Mordi, R. C. (1993). "Mechanism of beta-carotene degradation." Biochemical Journal **292**: 310-312.
- Mordi, R. C., J. C. Walton, et al. (1993). "Oxidative-degradation of beta-carotene and beta-apo-8'-carotenal." Tetrahedron **49**(4): 911-928.

- Morin-Savy, S. (2007). Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques : Des carotènes aux xanthophylles. Ecole doctorale Science de la matière, de l'information et de la santé, Microbiologie, Université de Bretagne Occidentale.
- Mortensen, A. (2009). Supplements. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 67-82.
- Mortensen, A. and L. H. Skibsted (1996). "Kinetics of photobleaching of beta-carotene in chloroform and formation of transient carotenoid species absorbing in the near infrared. ." Free Radical Research **25**: 355-368.
- Mortensen, A. and L. H. Skibsted (1997 a). "Free radical transients in photobleaching of xanthophylls and carotenes." Free Radical Research **26**(6): 549-563.
- Mortensen, A. and L. H. Skibsted (1997 b). "Importance of Carotenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(8): 2970-2977.
- Mortensen, A., L. H. Skibsted, et al. (2001). "The interaction of dietary carotenoids with radical species." Arch. Biochem. Biophys. **385**(1): 13-9.
- Moussa, M., E. Gouranton, et al. (2011). "CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and adipose tissue cultures." Molecular Nutrition and Food Research **55**: 578-584.
- Moussa, M., J. F. Landrier, et al. (2008). "Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1." Journal of Nutrition **138**(8): 1432-1436.
- Nagler, L. G., V. Z. Lankin, et al. (2003). "Rate of free-radical oxidation C-18 diene and triene fatty acids in aqueous micellar solutions and effectiveness of beta-carotene as an inhibitor of their oxidation." Biochemistry-Moscow **68**(2): 203-208.
- Nakamura, L. K. (1989). "Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **39**(3): 295-300.
- Netzel, M., G. Netzel, et al. (2011). "Release and absorption of carotenes from processed carrots (*Daucus carota*) using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model." Food Research International **44**(4): 868-874.
- Nicholson, W., N. Munakata, et al. (2000). "Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments." Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**(3): 548-572.
- Nielsen, P., D. Fritze, et al. (1995). "Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species." Microbiology **141**: 1745-1761.
- Niki, E., Y. Yoshida, et al. (2005). "Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects." Biochemical and Biophysical Research Communications **338**: 668-676.
- NIST (29/5/2000). Bibliography on atomic energy levels and spectra.
- Niva, M. (2007). "All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns." Appetite **48**(3): 384-393.
- O'Sullivan, L., K. Galvin, et al. (2010). "Effects of cooking on the profile and micellarization of 9-cis-, 13-cis- and all-trans-[beta]-carotene in green vegetables." Food Research International **43**(4): 1130-1135.
- O'Sullivan, L., L. Ryan, et al. (2007). "Comparison of the uptake and secretion of carotene and xanthophyll carotenoids by Caco-2 intestinal cells." British Journal of Nutrition **98**(1): 38-44.
- Onyewu, P. N., C. T. Ho, et al. (1986). "Characterization of beta-carotene thermal degradation products in a model food system." Journal of the American Oil Chemists' Society: **63** (11) 1437-1441 **63**(11): 1437-1441.
- Paiva, S. A. and R. M. Russell (1999). "Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants." Journal of the American college of Nutrition **18**(5): 426-33.
- Palozza, P. (1998). "Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems." Nutr Rev **56**(9): 257-65.
- Palozza, P., S. Serini, et al. (2009). Modulation of intracellular signalling pathways by carotenoids. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 211-234.
- Pane, L., L. Radin, et al. (1996). "The carotenoid pigments of a marine *Bacillus firmus* strain." Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale **72**(11-12): 303-308.
- Perez-Fons, L., S. Steiger, et al. (2010). "Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1811**(3): 177-185.
- Perez-Galvez, A. and M. I. Minguez-Mosquera (2001). "Structure-reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annum* L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(10): 4864-4869.

- Peto, R., R. Doll, et al. (1981). "Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates." *Nature* **290**(5803): 201-208.
- Pfander, H. (1976). "Carotenoid glycosides." *Pure and Applied Chemistry* **47**: 121-128.
- Pintea, A., H. A. Diehl, et al. (2005). "Incorporation of carotenoid esters into liposomes." *Biophysical Chemistry* **118**(1): 7-14.
- Polyakov, N. E., A. I. Kruppa, et al. (2001). "Carotenoids as antioxidants: Spin trapping EPR and optical study." *Free Radical Biology and Medicine* **31**(1): 43-52.
- Polyakov, N. E., T. V. Leshina, et al. (2001). "Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants?" *Free Radic Biol Med* **31**(3): 398-404.
- Prokhorova, L. I. and A. A. Revina (2001). "The role of labile complexes with oxygen in antioxidant activity of carotenoids." *Radiats Biol Radioecol* **41**(1): 24-32.
- Pryor, W. A., D. G. Prier, et al. (1980). *Autoxidation in food and biological systems*.
- Pryor, W. A. C., J.A.; Devall, L.J.; Tait, B.; Trivedi, B.K.; Witiak, D.T.; Wu, M. (1993). "A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants." *J. Org. Chem.* 1993, **58**, 3521-3532. **58**: 3521-3532.
- Pulido, R., L. Bravo, et al. (2000). "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay." *J Agric Food Chem* **48**(8): 3396-402.
- Pullakhandam, R. and M. L. Failla (2007). "Micellarization and intestinal cell uptake of delta-carotene and lutein from drumstick (*Moringa oleifera*) leaves." *Journal of Medicinal Food* **10**(2): 252-257.
- Qian, S. Y. and G. R. Buettner (1999). "Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(11-12): 1447-1456.
- Raju, M., R. Lakshminarayana, et al. (2006). "Micellar oleic and eicosapentaenoic acid but not linoleic acid influences the  $\beta$ -carotene uptake and its cleavage into retinol in rats." *Molecular and Cellular Biochemistry* **288**(1): 7-15.
- Ramakrishnan, T. V. (1974). "Autoxidation of carotenoids, their esters and protein-complexes." *Dissertation Abstracts International, B*: 34 (8) 3840: Order no. 74-3789 **34**(8).
- Re, R., N. Pellegrini, et al. (1998). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(9-10): 1231-7.
- Reboul, E., L. Abou, et al. (2005). "Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI)." *Biochemical Journal* **387**: 455-461.
- Reboul, E. and P. Borel (2011). "Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes." *Progress in Lipid Research* in press.
- Reboul, E., M. Richelle, et al. (2006). "Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(23): 8749-8755.
- Rice-Evans, C. A. and V. Gopinathan (1995). "Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease : biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates." *Essays Biochemistry* **29**: 39-63.
- Rich, G. T., A. Fillerey-Travis, et al. (1998). "Low pH enhances the transfer of carotene from carrot juice to olive oil." *Lipids* **33**: 985-992.
- Richelle, M., K. Bortlik, et al. (2002). "A Food-Based Formulation Provides Lycopene with the Same Bioavailability to Humans as That from Tomato Paste." *The Journal of Nutrition* **132**(3): 404-408.
- Rock, C. L. (2009). *Carotenoids and cancer*. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG.
- Rock, C. L. and M. E. Swendseid (1992). "Plasma beta-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin." *American Journal of Clinical Nutrition* **55**: 96-99.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). "Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids: A review." *Journal of Food Composition and Analysis* **23**(7): 726-740.
- Rodriguez, D. B., T.-C. Lee, et al. (1975). "Comparative study of the carotenoid composition of the seed of ripening *Momordica charantia* and tomatoes." *Plant Physiology* **56**: 626-629.
- Rodriguez, E. B. and D. B. Rodriguez-Amaya (2007). "Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from beta-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods." *Food Chemistry* **101**(2): 563-572.
- Roginsky, V. and E. Lissi (2005). "Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food." *Food Chemistry* **92**: 235-254.

- Roy, J. L. (1999). Characterisation of iron-promoted lipid oxidation in emulsions. Food science, University of Massachusetts Amherst: 146.
- Rüger, H.-J. and J. A. C. Koploy (1980). "DNA base compositions of halophilic and nonhalophilic *Bacillus firmus* strains of marine origin." Microbial Ecology **6**: 141-146.
- Sanders, M. E. (2003). "Probiotics: considerations for human health." Nutritional Review **61**(3): 91-99.
- Sandmann, G. (1993). "Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants." European Journal of Biochemistry **223**: 7-24.
- SCAN (2003). On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production European Commission. Health and consumer Protection Directorate-General. Scientific Committee on Animal Nutrition.
- Schalch, W., J. T. Landrum, et al. (2009). The eye. Carotenoids: Volume 5: Nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 301-334.
- Scita, G. (1992). "The stability of beta-carotene under different laboratory conditions." Journal of Nutritional Biochemistry **3**(3): 124-128.
- Siems, W. G., O. Sommerburg, et al. (1999). "Lycopene and beta-carotene decompose more rapidly than lutein and zeaxanthin upon exposure to various pro-oxidants in vitro." Biofactors **10**(2-3): 105-113.
- Silva, H. D., M. A. Cerqueira, et al. (2011). "Nanoemulsions of beta-carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique." Journal of Food Engineering **102**(2): 130-135.
- Simpson, K. L. (1983). "Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. ." Food Science and Nutrition **42**: 7-17.
- Södergren, E., J. Nourooz-Zadeh, et al. (1998). "Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **37**(3): 137-146.
- Soffers, A. E., M. J. van Haandel, et al. (1999). "Antioxidant activities of carotenoids: quantitative relationships between theoretical calculations and experimental literature data." Free Radical Res **30**(3): 233-40.
- Sohal, R. S. (2002). "Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process." Free Radical Biology and Medicine **33**(1): 37-44.
- Sommerburg, O., C.-D. Langhans, et al. (2003). "[beta]-Carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid--a model for neutrophil-derived degradation." Free Radical Biology and Medicine **35**(11): 1480-1490.
- Spence, J. T. (2006). "Challenges related to the composition of functional foods." Journal of Food Composition and Analysis **19**(S4-S6).
- Spiteller, G. (1998). "Linoleic acid peroxidation - The dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein - And its relationship to chronic diseases." Chem. Phys. Lipids **95**: 105-162.
- Stahl, W., W. Schwartz, et al. (1993). "Human serum concentrations of all-trans beta- and alpha-carotene but not 9-cis beta-carotene increase upon digestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (betatene)." Journal of Nutrition **123**: 847-851.
- Stahl, W., W. Schwartz, et al. (1992). "Cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues." Archives of Biochemistry and Biophysics **294**: 173-177.
- Stahl, W. and H. Sies (2003). "Antioxidant activity of carotenoids." Molecular Aspects of Medicine **24**(6): 345-351.
- Stahl, W. and H. Sies (2005). "Bioactivity and protective effects of natural carotenoids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1740**(2): 101-107.
- Staprans, I., X. M. Pan, et al. (1998). "Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits." Arterioscler. Throm. Vasc. Biol. **18**: 977-983.
- Staprans, I., J. H. Rapp, et al. (1994). "Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum." Arterioscler. Throm. **14**: 1900-1905.
- Stratton, S. P., W. H. Schaefer, et al. (1993). "Isolation and identification of singlet oxygen oxidation-products of beta-carotene." Chemical Research in Toxicology **6**(4): 542-547.
- Stringham, J. M., E. R. Bovier, et al. (2010). "The Influence of Dietary Lutein and Zeaxanthin on Visual Performance." Journal of Food Science **75**(1): R24-R29.
- Subagio, A. and N. Morita (2001). "No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein." Food Research International **34**(4): 315-320.

- Sugawara, T., M. Kushiro, et al. (2001). "Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells." The Journal of Nutrition **131**(11): 2921-2927.
- Sun, Y., G. Ma, et al. (2010). "Stability of all-trans- $\beta$ -carotene under ultrasound treatment in a model system: effects of different factors, kinetics and newly formed compounds." Ultrasonics Sonochemistry.
- Suresh, K., S. R. Prabakaran, et al. (2004). "*Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**: 1369-1375.
- Takahashi, A., N. Shibasaki-Kitakawa, et al. (1999). "Kinetic model for autoxidation of beta-carotene in organic solutions." Journal of the American Oil Chemists Society **76**(8): 897-903.
- Takahashi, A., N. Shibasaki-Kitakawa, et al. (2003). "A rigorous kinetic model for beta-carotene oxidation in the presence of an antioxidant, alpha-tocopherol." Journal of the American Oil Chemists Society **80**(12): 1241-1247.
- Tang, G. W. and R. M. Russell (2009). Carotenoids as provitamin A. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG.
- Tapiero, H., D. M. Townsend, et al. (2004). "The role of carotenoids in the prevention of human pathologies." Biomedicine and Pharmacotherapy **58**: 100-110.
- Telfer, A., A. Pascal, et al. (2008). Carotenoids in photosynthesis. Carotenoids. Volume 4: natural functions. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, W. G. Siems and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 265-308.
- Terao, J., T. Ingemansson, et al. (1995). "Effects of rat bile-pancreatic juice on Fe<sup>2+</sup>-induced peroxidation of phospholipids." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **59**: 55-58.
- Terao, J., A. Nagao, et al. (1992). "Lipid Hydroperoxide assay for antioxidant activity of carotenoids." Methods In Enzymology **213**(43): 455-460.
- Tyssandier, V., P. Borel, et al. (1998). The bioavailability of carotenoids is positively related to their polarity. AFN-SNDLF Nutrition Symposium. **18**: 324.
- Tyssandier, V., N. Cardinault, et al. (2002). "Vegetable-borne lutein, lycopene, and  $\beta$ -carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans." The American Journal of Clinical Nutrition **75**(3): 526-534.
- Tyssandier, V., B. Lyan, et al. (2001). "Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1533**(3): 285-292.
- Tyssandier, V., E. Reboul, et al. (2003). "Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **284**(6): G913-G923.
- Urala, N. and L. Lähteenmäki (2007). "Consumers' changing attitudes towards functional foods." Food Quality and Preference **18**(1): 1-12.
- Ursini, F., A. Zamburlini, et al. (1998). "Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis." Free Radical Biology and Medicine **25**: 250-252.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference. A. R. Service., <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metal toxicity and oxidative stress." Current Medical Chemistry **12**(10): 1161-1208.
- van Bennekum, A., M. Werder, et al. (2005). "Class B Scavenger Receptor-Mediated Intestinal Absorption of Dietary  $\beta$ -Carotene and Cholesterol." Biochemistry **44**(11): 4517-4525.
- Van Buggenhout, S., M. Alminger, et al. (2010). "In vitro approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes." Trends in Food Science & Technology **21**(12): 607-618.
- Van Het Hof, K. H., I. A. Brouwer, et al. (1999). "Bioavailability of lutein from vegetable is five times higher than that of beta-carotene." American Journal of Clinical Nutrition **70**: 261-268.
- van Het Hof, K. H., C. E. West, et al. (2000). "Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids." Journal of Nutrition **130**: 503-506.
- Vo, L., H. P. Simonian, et al. (2005). "The effect of rabeprazole on regional gastric acidity and the postprandial cardia/gastro-oesophageal junction acid layer in normal subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." Alimentary Pharmacology & Therapeutics **21**(11): 1321-1330.

- Volk, J., S. Gorelik, et al. (2009). "The dual function of nitrite under stomach conditions is modulated by reducing compounds." Free Radical Biology and Medicine *In Press, Accepted Manuscript*.
- Vulcain, E. (2005). Propriétés antioxydantes de microconstituants - inhibition de la peroxydation lipidique initiée par des métalloprotéines. Chimie bioorganique. Avignon, Université d'Avignon e des Pays du Vaucluse.
- Vulcain, E., P. Goupy, et al. (2005). "Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase." Free Radical Research **39**(5): 547-563.
- Wackerbarth, H., T. Stoll, et al. (2009). "Carotenoid-protein interaction as an approach for the formulation of functional food emulsions." Food Research International **42**(9): 1254-1258.
- Wang, X. D. (2009). Biological activities of carotenoid metabolites. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 383-408.
- Wei, C. C., G. Q. Gao, et al. (1997). "Selected cis/trans isomers of carotenoids formed by bulk electrolysis and iron(III) chloride oxidation." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2(4): 783-786.
- Welch, K. D., T. Z. Davis, et al. (2002). "Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffer, ligands and chelators." Archives of Biochemistru and Biophysics **397**: 360-369.
- Wenk, S.-O., D. Schneider, et al. (2005). "Functional implications of pigments bound to cyanobacterial cytochrome b6f complex." FEBS J. **272**(2): 582-592.
- West, E. C, et al. (1998). Quantification of the SLAMENGI factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. Bern, SUISSE, Hogrefe & Huber.
- Woodall, A. A., L. S. Wai-Ming, et al. (1997). "Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity." Biochemica et Biophysica Acta **1336**: 33-42.  
[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com). "primer design."
- Yeum, K. J., G. Aldini, et al. (2009). Antioxidant/pro-oxidant actions of carotenoids. Carotenoids, Volume 5: nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 235-268.
- Yeum, K. J., Y. C. Lee-Kim, et al. (1995). "Similar metabolites formed from beta-carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase or linoleic hydroperoxide." Arch Biochem Biophys **321**: 167-174.
- Yeum, K. J. and R. M. Russell (2002). "Carotenoid bioavailability and bioconversion." Annual Review of Nutrition **22**: 483-504.
- Yi, J., M. L. Andersen, et al. (2011). "Interactions between tocopherols, tocotrienol and caroténoids during autoxidation of mixed palm olein and fish oil." Food chemistry.
- Yin, L.-J., B.-S. Chu, et al. (2009). "Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of [beta]-carotene nanodispersions." Food Hydrocolloids **23**(6): 1617-1622.
- Yonekura, L. and A. Nagao (2009). "Soluble fibers inhibit carotenoid micellization in vitro and uptake by caco-2 cells." Bioscience biotechnology and biochemistry **73**(1): 196-199.
- Yoon, J.-H., S.-S. Kang, et al. (2001). "*Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**: 1087-1092.
- Yoon, J.-H., C.-H. Lee, et al. (2005). "Bacillus cibi sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**: 733-736.
- Yoshida, K., S. Ueda, et al. (2009). "Carotenoid production in *Bacillus subtilis* achieved by metabolic engineering." Biotechnology Letters **31**(11): 1789-1793.
- Yoshida, Y., N. Ito, et al. (2003). "Susceptibility of plasma lipids to peroxydation." Biochemical and Biophysical Research Communications **305**: 747-753.
- You, C. S., R. S. Parker, et al. (1996). "Evidence of cis-trans isomeration of 9-cis-beta-carotene during absorption in humans." American Journal of Clinical Nutrition **64**: 177-183.
- Young, A. J. and G. M. Lowe (2001). "Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids." Arch. Biochem. Biophys. **385**(1): 20-7.
- Yu, W. L., Y. P. Zhao, et al. (2001). "The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste." Journal of the American Oil Chemists Society **78**(7): 697-701.
- Zeb, A. and M. Murkovic (2011). "Determination of thermal oxidation and oxidation products of beta-carotene in corn oil triacylglycérol." Food Research International.

- Zhang, H., E. Kotake-Nara, et al. (2003). "A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells." Free Radical Biology and Medicine **35**(12): 1653-1663.
- Zhang, P. and S. T. Omaye (2001). "Beta-carotene: interactions with alpha-tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation." Journal of Nutritional Biochemistry **12**: 38-45.
- Zsila, F., M. Simonyi, et al. (2003). "Interaction of the disodium disuccinate derivative of meso-astaxanthine with human serum albumin: from chiral complexation to self-assembly." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **13**: 4093-4100.
- Zurcher, M. and H. Pfander (1999). "Oxidation of carotenoids: ozonides as products of the oxidation of canthaxanthin." Tetrahedron **55**(8): 2307-2310.

## COMMUNICATIONS

### **Congrès de la Société Francophone Vitamines et Biofacteurs (SFVB)**

26-27/03/2009 - Institut Albert Bonniot, Grenoble

Présentation d'un poster : « *PROJET COLORSPORE, Nouvelles sources d'additifs alimentaires, de colorants et d'ingrédients fonctionnels naturels et stables à l'acidité gastrique* »

### **3<sup>ème</sup> Colloque international Fruits, Légumes et Santé - FAVHealth**

18-21/10/2009 - Centre des congrès du Palais des Papes, Avignon

Présentation d'un poster : « *COLORSPORE EUROPEAN PROJECT, New Sources of Natural and Gastric Stable Food Additives, Colorants and Novel Functional Foods* »

### **Congrès "Carotenoids" de l'organisme "Gordon Research Conferences"**

17-22/01/2010 - Ventura, CA, USA

Présentation d'un poster : « *NOVEL BACTERIAL CAROTENOIDS, Stability towards Dietary Iron and Antioxidant Activity* »

### **6<sup>th</sup> International Congress on Pigments in Food : Chemical, Biological and Technological Aspects**

20-24/06/2010 - Hungarian Chemical Society, Food Chemistry Division, Budapest

Communication orale : « *Stability towards Dietary Iron and Antioxidant Activity of  $\beta$ -carotene, Lycopene and Astaxanthin* »

### **Euro-Mediterranean Symposium for Fruit & Vegetable Processing**

18-21/01/2011 - Centre INRA d'Avignon

Communication orale : « *Physico-chemical and nutritional evaluation of novel bacterial carotenoids for their potential as natural additives and functional ingredients in processed food* »





# RÉSUMÉ

Ce travail de thèse est intégré dans le projet européen COLORSPORE et participe à évaluer le potentiel nutritionnel de nouveaux caroténoïdes issus de microorganismes marins. Deux souches bactériennes, *Bacillus* HU36 et GB1 produisent des caroténoïdes originaux, glycosylés, potentiellement plus stables que les principaux caroténoïdes alimentaires vis-à-vis des conditions de stress oxydant de l'estomac lors de la digestion. La résistance des caroténoïdes de HU36 et de GB1 à l'autoxydation induite par le fer et leur pouvoir antioxydant (inhibition de la peroxydation lipidique) ont été étudiés grâce à des modèles chimiques du compartiment gastrique. Ils s'avèrent plus stables que le  $\beta$ -carotène, le lycopène et l'astaxanthine et allongent significativement la phase d'induction de l'oxydation lipidique en présence de metmyoglobine. En outre, leurs extrémités polaires sont déterminantes pour leur localisation en solutions micellaires ou dans les gouttelettes lipidiques des émulsions, et pour leur réactivité avec les espèces oxydantes et radicalaires. Les effets des caroténoïdes au-delà de la barrière intestinale dépendent largement de leur biodisponibilité, qui a été évaluée avec un modèle *in vitro* combinant digestion artificielle et efficacité d'absorption sur monocouches de cellules Caco-2 en culture. Les caroténoïdes bactériens sont bioaccessibles et ont une biodisponibilité comparable à celle des caroténoïdes les mieux absorbés, comme la lutéine. Une étude *in vivo* chez le rat a confirmé ces résultats et a montré que la structure physico-chimique des caroténoïdes est un facteur clef de leur incorporation dans les micelles intestinales et contribue à leur répartition tissulaire.

---