

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Sciences

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés- Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement

par

Claudie DHUIQUE-MAYER

le 25 octobre 2007

Titre :

**EVALUATION DE LA QUALITE NUTRITIONNELLE DES JUS D'AGRUMES :
ESTIMATION *IN VITRO* DE LA BIODISPONIBILITE DES CAROTENOÏDES**

JURY

M. Ziya GUNATA, Président

M. Bertrand CAPORICCIO, Directeur de Thèse

Mme Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN, Co-Directeur de Thèse

Mme Christine MORAND, Rapporteur

Mme Inès BIRLOUEZ-ARAGON, Rapporteur

M. Patrick OLLITRAULT, Examineur

AVANT-PROPOS

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont fait l'objet de 5 publications dans des revues internationales :

Dhuique-Mayer C., Caris-Veyrat C., Ollitrault P., Curk F. & Amiot M. J. (2005) Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2140-2145.

Fanciullino A. L., **Dhuique-Mayer C.**, Luro F., Casanova J., Morillon R. & Ollitrault P. (2006) Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4397-4406.

Dhuique-Mayer C., Borel P., Reboul E., Caporiccio B., Besancon P. & Amiot M. J. (2007a) 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.

Dhuique-Mayer C., Tbatou M., Carail M., Caris-Veyrat C., Dornier M. & Amiot M. J. (2007b) Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4209-4216.

Dhuique-Mayer C., During A., Caporiccio B., Tourniaire F. & Amiot M.J Citrus flavanones enhance carotenoids uptake by intestinal Caco-2 cells. *Soumis à Molecular Nutrition and Food Research*.

Trois posters et une communication orale ont fait l'objet de présentation au cours de congrès internationaux :

C. Dhuique-Mayer, C. Caris-Veyrat, P. Ollitrault, F. Curk, and M.J Amiot. Varietal and interspecific influence on carotenoid content in *Citrus* from Mediterranean area. **Poster** lors du "3rd international congress on Pigments in Food", 14-17 juin 2004, Quimper, France.

C. Dhuique-Mayer, P. Ollitrault, P. Borel, and M.J Amiot. Qualité Nutritionnelle des jus d'agrumes – Estimation "in vitro" de la biodisponibilité de la β -cryptoxanthine. **Poster** lors du 2nd congrès de la Société Française de Nutrition, 17-19 novembre 2005, Marseille, France.

C. Dhuique-Mayer, M.Tbatou, M. Dornier, and M.J Amiot. Thermal degradation kinetics of nutrients in *Citrus* juice. **Poster** lors du 13th world congress of food science and technologie, 17-21 septembre, Nantes, France.

C. Dhuique-Mayer, E. Reboul, B. Caporiccio, P. Besancon, M.J. Amiot, and P. Borel. β -cryptoxanthin from citrus juice: assesment of bioavailability using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. Communication orale lors du 4th international congress on Pigments in Food, 9-12 octobre 2006, Stuttgart, Allemagne.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Marie-Jo Amiot de l'INRA/INSERM de Marseille pour avoir accepté de prendre la direction de ces travaux de thèse et pour m'avoir fait confiance. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration, particulièrement le degré d'autonomie que tu m'as accordée, guidée par ta compétence, tes idées, et tes conseils. Merci encore pour tes remarques pertinentes, mais surtout pour la communication de ton dynamisme et de ton énergie.

Je remercie chaleureusement Bertrand Caporiccio de l'Université de MontpellierII, pour toute l'aide apportée et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Merci pour ses précieux conseils et pour m'avoir fait profiter de ses compétences scientifiques lors de nos discussions.

Je remercie Christine Morand de l'INRA de Theix et Ines Birlouez de LASALLEBEAUVAIS pour avoir bien voulu être rapporteur et par conséquent consacré beaucoup de leur temps à juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement Patrick Ollitrault du CIRAD pour avoir guidé dès le départ le travail sur l'aspect variétal des agrumes et pour avoir donné sa vision génétique des choses.

Je remercie Patrick Borel de l'INRA/INSERM de Marseille et Catherine Caris-Veyrat de l'INRA d'Avignon pour leur encadrement respectif chacun dans leurs spécialités : la chimie des caroténoïdes pour Catherine et l'absorption de ces caroténoïdes chez l'homme pour Patrick. Merci à vous deux pour votre expertise dont les apports ont été déterminants dans la réalisation de cette thèse.

Enfin, je remercie Manuel Dornier de l'IRC SupAgro, pour sa contribution dans la partie cinétique de dégradation thermique mais surtout pour ses encouragements au cours de toutes ces années de travaux de thèse.

Je n'oublie pas les doctorantes Emmanuelle Reboul de l'INSERM de Marseille et Anne-Laure Fanciullino de l'INRA/CIRAD, qui chacune à leur manière m'ont aidé : Emmanuelle pour m'avoir initié aux mystérieuses expérimentations d'absorption des caroténoïdes par les célèbres cellules Caco-2 et Anne-Laure pour notre collaboration "génético-nutritionnelle" sur les caroténoïdes des agrumes.

Pour terminer, je remercie Max Reynes du CIRAD et Pierre Besançon de l'Université de MontpellierII pour avoir initié la réalisation de ce travail de thèse sur la thématique de la nutrition, sujet pionnier au CIRAD.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION..... | 8 |
| ETAT DE L'ART..... | 11 |
| 1 Les jus d'agrumes: marché, consommation et composition nutritionnelle | 11 |
| 1.1 Définition des jus de fruits | 11 |
| 1.2 Le marché français des jus de fruits | 12 |
| 1.3 La consommation française des jus de fruits | 12 |
| 1.4 Composition nutritionnelle des jus de fruits | 13 |
| 1.5 Variation des composés nutritionnels des jus en fonction des facteurs technologiques | 17 |
| 1.5.1 Les jus de fruits commerciaux transformés | 17 |
| 1.5.2 Impact des traitements technologiques sur les composés nutritionnels des jus..... | 17 |
| 1.5.2.1 La stabilité des vitamines dans les jus de fruits | 17 |
| 1.5.2.2 Les micronutriments non-essentiels dans les jus de fruits | 19 |
| 2 Effet Santé des jus d'agrumes – rôle des antioxydants. | 21 |
| 2.1 Etudes chez l'homme..... | 21 |
| 2.1.1 Etudes épidémiologiques en relation avec la β -cryptoxanthine | 21 |
| 2.1.2 Etudes épidémiologiques en relation avec les flavanones des agrumes | 24 |
| 2.1.3 Etudes épidémiologiques en relation avec la vitamine C | 25 |
| 2.1.4 Etudes cliniques | 25 |
| 2.2 Etudes chez l'Animal..... | 27 |
| 2.2.1 Cancers | 27 |
| 2.2.2 Autres Pathologies | 27 |
| 2.3 Mécanismes possibles des effets protecteurs des antioxydants | 29 |
| 2.3.1 Les antioxydants alimentaires : une réponse au stress oxydant | 29 |
| 2.3.2 Mécanismes d'action des caroténoïdes | 29 |
| 2.3.3 La β -cryptoxanthine | 31 |
| 2.3.4 Les flavonoïdes | 32 |
| 2.3.4.1 Pouvoir antioxydant et jus d'agrumes..... | 33 |
| 2.3.4.2 Chélation des métaux et jus d'agrumes | 33 |
| 2.3.4.3 Relation structure-activité..... | 34 |
| 2.3.4.4 Autres mécanismes impliquant les flavanones | 34 |
| 3 Biodisponibilité des caroténoïdes | 37 |
| 3.1 Métabolisme des caroténoïdes | 37 |
| 3.1.1 Structure | 37 |
| 3.1.2 Absorption intestinale et transport | 38 |
| 3.1.3 Biodisponibilité chez l'homme | 40 |
| 3.1.3.1 Biodisponibilité suivant le type de caroténoïde | 41 |
| 3.1.3.2 Cas des esters de xanthophylles | 42 |
| 3.1.3.3 Biodisponibilité suivant la matrice | 43 |
| 3.1.3.4 Biodisponibilité des caroténoïdes en fonction de l'apport d'autres nutriments | 44 |
| 3.1.3.5 Biodisponibilité suivant l'individu | 45 |
| 3.1.4 Les modèles "in vivo" et "in vitro" | 46 |
| 3.1.4.1 Les modèles animaux ("in vivo") | 46 |
| 3.1.4.2 Les modèles "in vitro" acellulaires | 46 |
| 3.1.4.3 Le modèle "in vitro" cellulaire de type Caco-2..... | 49 |

| | |
|---|-----------|
| MATERIELS ET METHODES | 53 |
| 1 Matériel végétal | 53 |
| 1.1 <i>Choix des variétés et espèces</i> | 53 |
| 1.2 <i>Taille de l'échantillon</i> | 55 |
| 2 Quantification des caroténoïdes | 55 |
| 2.1 <i>Extraction des caroténoïdes à partir des jus d'agrumes</i> | 55 |
| 2.2 <i>Extraction des caroténoïdes après digestion in vitro des jus d'agrumes</i> | 56 |
| 2.3 <i>Extraction des caroténoïdes provenant des expériences sur cellules Caco-2</i> | 56 |
| 2.4 <i>Conditions chromatographiques (HPLC)</i> | 57 |
| 2.5 <i>Identification des caroténoïdes</i> | 58 |
| 2.6 <i>Isolation des esters de β-cryptoxanthine</i> | 58 |
| 3 Quantification des flavanones glycosides | 58 |
| 3.1 <i>Extraction</i> | 58 |
| 3.2 <i>Dosage des flavanones glycosides</i> | 59 |
| 4 Quantification de la vitamine C | 59 |
| 4.1 <i>Extraction</i> | 59 |
| 4.2 <i>Dosage de la vitamine C</i> | 59 |
| 5 Cinétiques de dégradation thermique | 60 |
| 5.1 <i>Traitements thermiques des jus d'agrumes</i> | 60 |
| 5.2 <i>Equations des cinétiques de dégradation thermique</i> | 60 |
| 6 Modélisation de la digestion in vitro | 61 |
| 6.1 <i>Digestion in vitro d'un jus d'agrumes seul</i> | 61 |
| 6.2 <i>Digestion in vitro d'un jus d'agrumes accompagné d'un repas</i> | 63 |
| 6.3 <i>Préparation des micelles synthétiques</i> | 63 |
| 7 Etudes sur cellules Caco-2 TC7 | 63 |
| 7.1 <i>Culture des cellules</i> | 63 |
| 7.2 <i>Trypsinisation des cellules</i> | 64 |
| 7.3 <i>Utilisation des systèmes de culture sur insert</i> | 65 |
| 7.4 <i>Utilisation des boîtes de culture de 75 cm² pour les expérimentations</i> | 65 |
| 7.5 <i>Dosage des protéines sur cellules</i> | 66 |
| RESULTATS | 67 |
| 1 Qualité nutritionnelle des agrumes en fonction des facteurs génétiques, environnementaux et technologiques. | 67 |
| 1.1 <i>Objectifs</i> | 67 |
| 1.2 <i>Résultats</i> | 68 |
| 1.2.1 <i>Influence variétale et interspécifique sur les microconstituants des jus d'agrumes (Publication 1)</i> | 68 |

| | |
|---|------------|
| 1.2.2 Influence environnementale sur la composition en caroténoïdes des jus d'agrumes (résultats non-publiés) | 70 |
| 1.2.3 Dégradation thermique des microconstituants des jus d'agrumes : cinétiques et composés néoformés (publication2) | 72 |
| 2 Qualité nutritionnelle des agrumes : estimation <i>in vitro</i> de la biodisponibilité des jus d'agrumes | 74 |
| 2.1 Objectifs | 74 |
| 2.2 Résultats | 75 |
| 2.2.1 Digestion et bioaccessibilité (publication 3) | 75 |
| 2.2.2 Digestion d'un jus d'agrumes accompagnée d'un repas (résultats non publiés) | 76 |
| 2.2.3 Absorption entérocytaire | 77 |
| 3 Qualité nutritionnelle des agrumes : Interaction des flavanones sur l'absorption intestinale <i>in vitro</i> des caroténoïdes. | 79 |
| 3.1 Objectifs | 79 |
| 3.2 Résultats | 79 |
| 3.2.1 Effet des flavanones sur l'absorption des caroténoïdes (publication 4 soumise prochainement) | 79 |
| 3.2.2 Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'absorption des caroténoïdes | 80 |
| 3.2.3 Hypothèses | 81 |
| DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 83 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 100 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABC** : ATP (Adénosine Triphosphate) Binding Cassette
- ABCA1** : ATP (Adénosine Triphosphate) Binding Cassette A1
- ANC** : Apport Nutritionnel Conseillé
- BHT** : Butyl Hydroxy Toluene
- CYP** : Monooxygénase à cytochrome P450
- CREDOC** : Centre de Recherche pour l'Etude et l'Observation des Conditions de vie
- DMEM** : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)
- DMSO** : Diméthyl Sulfoxyde
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- GLUT** : "Glucose Transporter"
- HDL** : "High Density Lipoproteins" (lipoprotéine de haute densité)
- INCA** : enquêtes Individuelles et Nationales sur les Consommations Alimentaires
- LDL** : "Low Density Lipoproteins" (lipoprotéine de faible densité)
- PBS** : "Phosphate Buffer Saline" (tampon phosphate salin)
- 8-EPG-PGF 2a** : isoprostane produit par l'interaction des ERO et les acides gras (EpiProstaGlandine-série F)
- MCV** : Maladies Cardio-Vasculaires
- MTBE** : Méthyl Tertio Butyl Ether
- NPC1-L1** : "Niemman-Peak C1 like 1" (transporteur de lipide)
- RBP** : "Retinol Binding Protein"
- SGLT1** : "Sodium Glucose Transporter"
- SR-BI** : Scavenger Receptor Type B class A (transporteur de lipides)
- SVF** : "Fetal Calf Serum" (serum de veau fœtal)
- TEAC** : "Trolox Equivalent Antioxidant Capacity"
- TRL** : lipoprotéines riches en triacylglycérols
- VLDL** : "Very Low Density Lipoproteins" (lipoprotéine de très faible densité)

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

Les nombreuses études épidémiologiques suggèrent fortement que la consommation de fruits et légumes diminue l'incidence de maladies évolutives telles que cancers et maladies cardiovasculaires. Ces effets bénéfiques seraient en partie attribués à des micronutriments antioxydants. Les agrumes sont des fruits particulièrement riches en antioxydants (vitamine C, polyphénols, et caroténoïdes) (Franke *et al.*, 2005 ; Kawai, 2004 ; Aviram *et al.*, 2000). Les effets biologiques de ces molécules sont très diversifiés, mais leur fonction est principalement de contrer les effets toxiques des dérivés activés de l'oxygène et de contribuer au maintien de l'intégrité cellulaire (Nève, 2002). Si les rôles fonctionnels vitaminiques de la vitamine C et du β -carotène (provitamine A) démontrés ont conduit à l'établissement d'Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) pour ces micronutriments, l'essentialité d'autres composés comme les polyphénols n'a pas été établie chez l'homme et aucun ANC n'est actuellement défini. Toutefois, les effets biologiques de ces molécules antioxydantes participeraient très certainement à l'effet protecteur des jus de fruits. Pour pouvoir exercer leurs effets biologiques, ces molécules doivent être absorbées et transportées jusqu'à leur tissu cible, *i.e* être biodisponibles. La biodisponibilité est affectée par de nombreux facteurs tels que la matrice alimentaire, et les interactions pouvant exister avec d'autres microconstituants ou encore des facteurs génétiques liés à l'individu (West & Castenmiller, 1998). L'étude de ces facteurs s'effectue grâce à différents modèles *in vitro* (acellulaire et cellulaire), animaux et humains.

Parmi les jus de fruits, les jus d'agrumes sont les plus consommés dans le monde et le jus d'orange occupe la première place avec un volume de 25 L/personne/an (FAO 2003). Par ailleurs, les agrumes les plus consommés sont les oranges et les mandarines et représentent pour l'année 2002, 22,5 kg/habitant dans les pays développés contre 8 kg/habitant pour les pays en voie de développement (CNUCED 2003). Pour cette raison, il était pertinent de s'intéresser à la qualité nutritionnelle de ces jus, célèbres surtout pour leur richesse en vitamine C. En revanche, leur composition en caroténoïdes assez complexe et en polyphénols (flavonoïdes) est beaucoup moins connue. Par ailleurs, de très nombreuses études existent sur les effets santé des jus d'agrumes en relation avec les molécules antioxydantes tels que les flavonoïdes et d'autres moins nombreuses en relation avec la β - cryptoxanthine. Cependant, il apparaît clairement que la biodisponibilité des polyphénols est très faible avec des

mécanismes encore peu élucidés en raison de la grande diversité des structures (Manach *et al.*, 2006). En revanche, la biodisponibilité des caroténoïdes est plus élevée, bien que les mécanismes d'absorption restent à élucider pour un grand nombre de structures. Le β -carotène a été le caroténoïde le plus largement étudié (Faulks & Southon 2005). Plus récemment, la biodisponibilité du lycopène et de la lutéine a été également étudiée (Reboul *et al.* 2005a ; Reboul *et al.*, 2007). Très peu de données existent sur la biodisponibilité de la β -cryptoxanthine. En effet, la β -cryptoxanthine est le principal caroténoïde provitaminique A des agrumes et à ce titre il convenait d'identifier les facteurs prépondérants associés à sa biodisponibilité.

Par conséquent, l'objectif général de cette étude est d'abord d'évaluer la qualité nutritionnelle des agrumes en fonction de leur teneur en molécules antioxydantes, puis d'estimer la biodisponibilité des caroténoïdes (particulièrement la β -cryptoxanthine) des jus d'agrumes à l'aide de modèles "*in vitro*" acellulaire et cellulaire afin de mieux comprendre les mécanismes associés aux premières étapes de la digestion et d'absorption.

La première partie de ce travail est une introduction bibliographique qui fait l'état de l'art des jus d'agrumes en spécifiant (1) leurs caractéristiques par rapport aux autres jus et (2) en mettant en avant leurs effets santé et les rôles attribués aux antioxydants principaux des jus d'agrumes. Une actualisation des connaissances sur la biodisponibilité des caroténoïdes est rappelée.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à la sélection de jus d'agrumes ayant les plus hautes teneurs en β -cryptoxanthine, tout en gardant des teneurs optimales en polyphénols (hespéridine) et vitamine C en fonction des facteurs génétiques, environnementaux et technologiques (**publication 1**). Par la suite, afin de caractériser la stabilité thermique de ces jus nous avons étudié les cinétiques de dégradation thermique de ces trois types de molécules antioxydantes (**publication 2**).

Dans la troisième partie de cette thèse, la biodisponibilité de la β -cryptoxanthine a été estimée dans un premier temps à l'aide d'un modèle de digestion "*in vitro*" (étude du transfert micellaire) permettant de stimuler l'étape stomacale et duodénale. Ensuite, l'étude du passage entérocytaire des caroténoïdes a été étudiée sur cellules humaines de type Caco-2 (clone TC7) en tenant compte des structures libres ou esters de la β -cryptoxanthine (**publication 3**).

Enfin, dans la dernière partie, nous avons cherché à mettre en évidence les interactions possibles avec d'autres molécules antioxydantes tel que l'héspéridine et la vitamine C pouvant moduler l'absorption des caroténoïdes au niveau des cellules entérocytaires (**publication 4**).

ETAT DE L'ART

ETAT DE L'ART

1 Les jus d'agrumes: marché, consommation et composition nutritionnelle

1.1 Définition des jus de fruits

D'après la définition encyclopédique, le jus de fruits correspond au " Suc naturel des fruits obtenu par pression ou centrifugation".

Suite à cette définition, la réglementation européenne (décret français n° 2003-238 du 1^{er} septembre 2003) a défini 5 types de jus :

- le " **jus de fruits**" obtenu par simple pression des fruits
- le " **jus de fruits obtenu à partir d'un concentré**" produit obtenu en remettant dans le jus de fruits concentré l'eau extraite lors de la concentration.
- le " **jus de fruits concentré**" jus obtenu par élimination d'environ 50 % de l'eau de constitution.
- le " **jus de fruits déshydraté/en poudre**" produit obtenu par élimination de la quasi-totalité de l'eau de constitution.
- le "**nectar de fruits**" produit obtenu en ajoutant de l'eau et des sucres à une purée de fruit.

Le texte complet de ce décret qui reprend la directive européenne 2001/112/CE est donné en annexe 1.

En réalité, les jus commercialisés les plus consommés appartiennent principalement à trois grandes catégories :

- les purs jus de fruits
- les jus à base de concentré
- les nectars

La teneur en fruit des jus appartenant aux deux premières catégories est de 100 % contrairement aux nectars moins consommés et obtenus à partir de jus ou de purée (25 à 50 % selon les fruits) mélangés à de l'eau et du sucre (la quantité de sucre ajoutée peut représenter jusqu'à 20 % du produit fini). Les jus de fruits sont obtenus par pression de fruits frais. Les

jus à base de concentré utilisent comme matière première un jus de fruit pressé auquel environ 80 % de son eau d'origine a été retiré par évaporation. Après transport, le jus est reconstitué avec la même quantité d'eau que le jus d'origine.

En ce qui concerne les appellations, notons qu'en France les étiquetages comportent les mentions "purs jus" ou "100 % purs jus" alors que la réglementation appliquée depuis le 12 juillet 2004 ne reconnaît pas cette appellation. Cette dénomination apparaissait cependant dans l'ancienne réglementation et précisait alors qu'aucune addition n'était autorisée dans ce type de jus. Pour les jus à base de concentré, la mention "100 % teneur en fruits" est tolérée car ces jus se distinguent des nectars dont la teneur en fruit est inférieure mais contribue à entretenir la confusion avec les jus "100 % purs jus".

<http://www.legifrance.gouv.fr/WAspad/UnTexteDeJorf?numjo=ECOC0300070D>

1.2 Le marché français des jus de fruits

Le marché français des jus de fruits occupe la troisième place en Europe après l'Allemagne et le Royaume-Uni avec 1,3 milliards de litres consommés en 2004. L'année 2003, année de la canicule a été une année exceptionnelle et a représenté 1,295 milliards de litres. Les jus de fruits représentaient en 2002 en France 3 % de part de marché sur les boissons, (soit 1,3 milliards de litres consommés en 2004), le chiffre d'affaires a été estimé à 1,16 milliards d'euros en 2006. Parmi les jus de fruits, le jus d'orange se positionne pour 60 % des ventes.

Les purs jus sont le segment principal du marché, ce qui d'ailleurs est une particularité française, et représente 53 % des ventes comparativement aux nectars (16 %) et aux jus à base de concentré (31 %). Les jus d'agrumes (orange et pomelos) sont les plus consommés (49 et 4 % des ventes respectivement) suivis par les jus de pomme et de raisin (9 et 4 %). Les mélanges de jus de fruits ont un réel succès et représente 25 % des ventes. (Données <http://www.unijus.org/juice/site/fo/unijus/marches2.html> et www.strasbourg.CCI.fr).

1.3 La consommation française des jus de fruits

D'après l'INSEE, les jus de fruits font partie des groupes de produits dont la consommation a le plus augmenté (+33%) entre 1992 et 1997 (INSEE, 2000). En France, la

consommation de jus de fruits a augmenté de 2000 à 2006 en passant de 20.5 litres consommés par an et par habitant à 23 litres (<http://www.unijus.org> – conférence de presse du 21 juin 2007). Cette boisson est davantage consommée par les jeunes et les individus dont le niveau de revenu est élevé. Elle est prise essentiellement au petit déjeuner (Guilbert & Pascalon, 2002). La consommation moyenne des jus de fruits et des nectars en France est d'environ un verre par jour. La consommation par catégorie de consommateur est indiquée dans le Tableau 1.

La consommation chez les enfants doit-elle faire l'objet de surveillance ? Plusieurs études controversées existent à ce sujet. Des études américaines datant de 1997 et 1999 relient la consommation excessive de jus de fruits à l'excès de poids observé chez des enfants de 2 à 5 ans (Dennison *et al.*, 1997 ; Dennison *et al.*, 1999).

Tableau 1. Consommation moyenne des jus de fruits et nectars en France

| Catégorie | Consommation moyenne par jour | Taux de consommateurs | Seuls consommateurs |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Enfant (3-14 ans) | 108 ml | 75 % | 144 ml |
| Adolescents (15-20 ans) | 99 ml | 66 % | 151 ml |
| Adulte | 47 ml | 43 % | 110 ml |

Source: CREDOC, enquête INCA 1999.

(<http://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/nutrition/224graphiques.pdf>)

Par ailleurs d'autres travaux plus récents et plus nombreux indiquent que l'apport de jus de fruits n'est pas du tout corrélé avec l'obésité ou autres facteurs liés à la croissance chez les enfants (Skinner & Carruth, 2001 ; Newby *et al.*, 2004 ; O'Connor *et al.*, 2006). Ces dernières références encouragent la consommation de jus de fruits dans des quantités cependant raisonnables. Il convient toutefois de faire la différence entre jus de fruits et nectar, ces derniers contiennent plus de sucre ajouté, proviennent d'une dilution de purée de fruit et ont donc une densité nutritionnelle moins élevée.

1.4 Composition nutritionnelle des jus de fruits

La composition des jus de fruits et du jus d'orange en particulier est identique à celle des fruits dont ils sont issus, une partie des fibres et la cellulose en moins. Les jus sont composés des mêmes glucides, des mêmes minéraux et des mêmes vitamines que les fruits. La référence aux tables de composition existantes (Tableau 2) permet de constater que les jus renferment

de 87 à 89 % d'eau, ce qui confère à l'aliment son rôle hydratant avant tout. Leur faible apport énergétique et leur richesse en minéraux, et particulièrement en potassium, contribuent à leur intérêt nutritionnel. Les jus d'agrumes se distinguent des autres jus par leur faible taux de glucides, leurs teneurs en minéraux et en vitamines supérieures aux autres jus, en particulier la vitamine C et la vitamine B9 (acide folique).

Les glucides contenus dans les jus de fruits sont principalement le fructose (prédominant), le glucose et le saccharose. Pour les agrumes, environ 80 % de la matière sèche hydrosoluble sont représentés par les glucides et 10 % sont constitués par les acides organiques (acide citrique principalement) (Ting, 1980).

Tableau 2. Table de composition de quelques jus de fruits

| Composition pour 100g de jus | Jus de pomme | Jus de raisin | Jus d'ananas | Jus d'abricot | Jus de pomelos | Jus d'orange |
|---------------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| Energie (kcal) | 45 | 61 | 51 | 59 | 37 | 39 |
| Protéines (g) | 0.1 | 0.4 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,7 |
| Lipides (g) | Traces | Traces | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| Glucides (g) | 11 | 15 | 12 | 14 | 8 | 8< |
| Eau (g) | 87 | 83 | 86 | 84 | 90 | 89 |
| Minéraux (mg) | 20,3 | 43,3 | 35,3 | 20,4 | 34,2 | 39,4 |
| P+Na+Ca+Mg+Fe | | | | | | |
| Potassium (mg) | 120 | 140 | 127 | 120 | 144 | 182 |
| Vitamine C (mg) | Traces | Traces | 9 | 3 | 38 | 50 |
| Vitamine B9 (µg) | 1 | 3 | 10 | - | 7-10 | 20-30 |
| β-carotène (provitamine A) (µg) | Traces | 15 | 10-20 | 600 | 4-6 | 42-70 |
| β-cryptoxanthine (µg)* | - | - | - | traces | - | 170 |
| Flavonoïdes (mg)* | 11,3 | 2,1 | - | - | 18 | 14,7 |

(Favier, 1995) ; *USDA ([http:// www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov)) ; (Souci, 2000).

Par ailleurs, les jus de fruits sont une source intéressante qualitativement et quantitativement de vitamines que l'on peut mettre en évidence sur la base des Apports Journaliers Recommandés (AJR) pour un adulte (Tableau 3). Les principales vitamines intéressantes sont la vitamine C, le β-carotène, la vitamine B9 et éventuellement la vitamine E pour quelques jus à base de mangue par exemple.

Tableau 3. Apports journaliers recommandés en vitamines pour 100 g de jus de fruits.

| | Pro-vitamine A (β -carotène) | Vitamine E (α -tocopherol) | Vitamine B9 (Acide folique) | Vitamine C (Acide ascorbique) |
|-----------|--|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| AJR | 3 mg/jour | 12 mg/jour | 200 μ g/jour | 60 mg |
| Pomme | - | 4 % | 3 % | 20 % |
| Raisin | - | - | 3 % | 7 % |
| Ananas | - | - | 1 % | 32 % |
| Abricot | 60 % | 4 % | 2 % | 16 % |
| Tomate | 18 % | - | 7 % | 25 % |
| Mangue | 93 % | 8 % | 18 % | 65 % |
| Mandarine | 8 % | - | - | 53 % |
| Pomelos | - | 2 % | 6 % | 73 % |
| Orange | 2 % | 2 % | 12 % | 83 % |

(Gissinger, 2003)

Au vu de ce tableau, les jus d'agrumes parmi les autres jus seraient les meilleures sources de vitamine C et B9. Pour la vitamine A, mis à part les jus de mandarines qui peuvent entrer dans la composition des jus multivitamines, le jus d'orange par sa faible teneur en β -carotène n'apparaît pas être le jus idéal pour l'apport pro-vitaminique A. Cependant, il convient de rappeler que ce genre de données n'inclut pas les autres caroténoïdes provitaminiques tel que la β -cryptoxanthine. Néanmoins, les jus à base de mangue ou d'abricot généralement consommés sous forme de nectars représentent des sources non négligeables de provitamine A.

Les tables de composition des aliments, même les plus élaborées, sont nécessairement incomplètes parce que, d'une part, certaines valeurs manquent, faute de résultats d'analyse et que, d'autre part, les données existantes ne peuvent être que des moyennes à interpréter avec prudence (Besançon, 1990). Qu'en est-il des microconstituants tels que les polyphénols et les caroténoïdes ? Très peu de données chiffrées font partie des tables de composition classiques. Seul le β -carotène est mentionné mais il n'est pas précisé s'il s'agit d'un dosage de caroténoïdes totaux exprimé en β -carotène ou un dosage particulier du β -carotène. Il convient de rappeler que les caroténoïdes non-provitaminique A et les polyphénols sont considérés

comme des nutriments non-essentiels car les preuves des effets de la consommation de ces molécules sur la santé humaine n'ont pas été clairement apportées (Nève, 2002 ; Manach *et al.*, 2006). D'autres valeurs extraites des bases de données de l'USDA (United States Department Of Agriculture) sur la composition des jus de fruits en caroténoïdes et flavonoïdes permettent de compléter les données classiques. Toutefois, ces valeurs isolées restent indicatives car les quantités de caroténoïdes ou flavonoïdes sont très variables en fonction des conditions agronomiques (saison, lieu, pratiques culturales). Les polyphénols sont rarement présents dans les tables de composition et pour cause, les tables de composition de ces aliments n'existent pas en France ou sont en cours d'élaboration (Brat *et al.*, 2006). Par ailleurs, les dosages d'estimation globale des teneurs en polyphénols ou caroténoïdes ne rendent pas compte de la composition et de l'identification des molécules. L'effet bénéfique de certaines structures de polyphénol ou caroténoïde commence à être mis en évidence, ce qui doit permettre dans le futur de mieux établir les relations nutriments et santé. Le Tableau 4, réalisé à partir de données dispersées dans une littérature abondante, donne une idée de la quantité de ces microconstituants dans quelques jus de fruits.

Tableau 4. Teneurs en polyphénols et caroténoïdes totaux de quelques jus de fruits

| Polyphénols totaux (mg) | Pour 100 ml de jus | Référence |
|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Orange | 48 à 109 | (Rapisarda <i>et al.</i> , 1999) |
| Pomelo rose | 54 | (Gardner <i>et al.</i> , 2000) |
| Tomate | 28 | (Gahler <i>et al.</i> , 2003) |
| Pomme | 11 à 46 | (Kahle <i>et al.</i> , 2005) |
| Ananas | 36 | (Gardner <i>et al.</i> , 2000) |
| Raisin | 100 | (Mehrlander <i>et al.</i> , 2004) |
| Caroténoïdes totaux (mg) | | |
| Orange | 1,1 (2,4 % β -carotène) | (Lin & Chen, 1995) |
| Orange valencia | 0,8-2,1 (1,6-2,7 % β -carotène) | (Mouly <i>et al.</i> , 1999) |
| Pomelo rose | 0,8 (22 % β -carotène) | (Lee, 2000) |
| Tomate | 17 (dont 1,6 % β -carotène) | (Tonucci <i>et al.</i> , 1995) |

Pour le jus d'orange par exemple, les teneurs en polyphénols totaux varient de 48 à 109 mg/ 100 ml suivant qu'il s'agisse de variété blonde ou sanguine. En effet, les oranges sanguines sont riches en anthocyanes alors que les oranges blondes n'en contiennent pas. Au vu de ce tableau, le jus d'orange et le jus de pomme ont des teneurs très voisines alors que

leurs effets santé, certainement différents, sont liés à certains types de molécules pouvant être très éloignées structurellement. Pour les données concernant les caroténoïdes totaux, la présence du pourcentage de β -carotène indiqué entre parenthèse précise les teneurs réelles en provitamine A. Le jus de pomelo rose est certainement le plus riche en provitamine A comparé aux autres jus y compris le jus d'orange.

1.5 Variation des composés nutritionnels des jus en fonction des facteurs technologiques

1.5.1 Les jus de fruits commerciaux transformés

Le point commun à la fabrication des jus de fruits commerciaux transformés est le traitement thermique qui consiste généralement en une pasteurisation (et une évaporation pour les concentrés). Ce traitement thermique est la méthode la plus utilisée pour la conservation des jus de fruits. Elle vise à inhiber le développement de micro-organismes et à inactiver les enzymes (comme la pectine méthylestérase) qui pourraient altérer le produit ou le rendre impropre à la consommation (Chen, 1993). Ce traitement thermique varie de quelques secondes à quelques minutes pour des températures allant de 70 à 90°C selon qu'il s'agisse d'une flash-pasteurisation ou d'une pasteurisation classique. La technique industrielle de concentration des jus consiste en une série d'évaporations sous pression réduite ou le jus est chauffé de 55 à 96 °C pendant plusieurs minutes (Chen, 1993).

1.5.2 Impact des traitements technologiques sur les composés nutritionnels des jus

La transformation et le stockage des jus sont indispensables pour prolonger la durée de vie de ces aliments. Cependant, ces procédés peuvent être à l'origine de dégradations ou de pertes de composés nutritionnels importants tels que les vitamines, les caroténoïdes ou encore les non-nutriments comme les polyphénols.

1.5.2.1 La stabilité des vitamines dans les jus de fruits

La stabilité des vitamines dans les jus de fruits dépend de plusieurs facteurs : température, pH, oxygène, lumière, acides et la présence d'ions métalliques. Les principales réactions de

dégradation sont l'oxydation, l'hydrolyse ou la réduction. Le Tableau 5 extrait de Belliot (2003), donne une estimation des pertes occasionnées au cours de la fabrication et du stockage des jus de fruits. Les pertes dues au processus de fabrication (incluant la pasteurisation) sont relativement faibles comparativement aux pertes observées au cours du stockage.

Tableau 5. Stabilité des vitamines dans les jus de fruits

| Vitamines | Pertes à la fabrication (%) | Pertes au stockage* (%) |
|---|-----------------------------|-------------------------|
| β -carotène, E, B ₂ | < 10 | 10 à 20 |
| B ₁ , B ₆ , B ₁₂ | 5 à 20 | 10 à 20 |
| B ₅ , B ₉ | 5 à 20 | 40 à 60 |
| C | 5 à 20 | 30 à 60 |

* Stockage température ambiante à l'obscurité (1 an à 20-25°C).
(Belliot, 2003)

En ce qui concerne le β -carotène, et bien qu'il existe une légère controverse à ce sujet, ces données sont confirmées par plusieurs études ayant observé la préservation de ce caroténoïde provitaminique A au cours de la pasteurisation. Les pertes en β -carotène ne sont pas significatives lors de la pasteurisation du jus de goyave, jus de carotte et jus d'orange (Padula & Rodriguez-Amaya, 1987 ; Kim *et al.*, 2003 ; Gama & de Sylos, 2007). Cependant, une étude réalisée par Lessin *et al.* (1997) indique que la pasteurisation provoque une perte relativement significative de 36 % de caroténoïdes provitaminique A dans le jus d'orange. Hormis cette dernière publication, il s'avère d'une manière générale, que les teneurs en β -carotène soient peu affectées par le traitement de pasteurisation.

La vitamine C, réputée pour être typiquement thermosensible, subit cependant de faibles pertes pendant la pasteurisation. Gil-Izquierdo *et al.* (2002) ont mesuré les teneurs en vitamine C d'un jus d'orange avant et après pasteurisation à l'échelle industrielle et n'ont pas observé de pertes après traitement à 95°C pendant 30s. Plus récemment, Sanchez-Moreno *et al.* (2005) rapportent qu'une pasteurisation faible (70°C/30s) n'occasionne pas de pertes en vitamine C et qu'une forte pasteurisation (90°C/1min) entraîne environ 8 % seulement de pertes significatives.

La conservation et donc le stockage, sont bien plus dommageables pour les vitamines que l'effet du traitement thermique lui-même comme la pasteurisation. Dans les milieux liquides

comme les jus de fruits, l'oxygène dissous est le principal facteur responsable de l'oxydation des vitamines ; les autres facteurs sont la température, la lumière et la présence d'ions métalliques (Belliot, 2003). Solomon *et al.* (1995) ont observé que dans les jus d'orange désaérés stockés 30 jours dans des récipients non étanches, la vitamine C avait disparu en même temps que la concentration en oxygène dissous avait augmenté. En revanche si la fermeture du récipient était étanche, la perte en vitamine C n'était que de 27 %.

La teneur en vitamine C de l'orange (48-51 mg/100 ml) varie de 30 à 50 mg/100 ml dans les jus industriels après traitement, et la majorité ne conserve pas plus de 25 mg/100 ml après 6 mois sur les étals, la moitié donc de ce qui était contenu dans l'orange de départ (Birlouez-Aragon, 2004). Une récente étude de Melendez-Martinez *et al.* (2007) dresse un état des lieux de 25 jus d'oranges commerciaux pour les teneurs en caroténoïdes provitaminique A et vitamine C. Les jus à base de concentré, et les jus pasteurisés présentent les mêmes quantités de vitamine C (en moyenne 35 mg/100 ml), lesquelles restent inférieures aux jus congelés (52 mg/100 ml). Par contre, les teneurs en caroténoïdes provitaminiques A sont plus élevées dans les jus pasteurisés comparativement aux jus à base de concentré (47 et 22 µg RAE/L respectivement).

La dégradation des vitamines dans les jus de fruits dépend des précautions prises lors du procédé technologique, en particulier limiter l'incorporation de l'oxygène lors des étapes de fabrication (pressage, agitation et mise en bouteille). Pour les jus à base de concentré, la qualité de l'eau est également importante avec notamment la présence d'ions et d'oxygène dissous. Enfin, la température et la durée de stockage semblent être les facteurs les plus critiques favorisant la dégradation des vitamines.

1.5.2.2 Les micronutriments non-essentiels dans les jus de fruits

Contrairement aux caroténoïdes provitaminiques A, les autres caroténoïdes et en particulier certains xanthophylles sont très sensibles à la température et des pertes importantes sont constatées lors de la pasteurisation. Lee et Coates, (2003) ont observé des pertes de 46 % en violaxanthine et une forte isomérisation de ce caroténoïde (fonction époxyde 5, 6' en 5, 8') lors d'une pasteurisation de 90°C pendant 30 s. Parallèlement d'autres auteurs indiquent 38 % de pertes en violaxanthine, et 20 % en lutéine lors des procédés de pasteurisation et de

concentration. Par ailleurs, la pasteurisation peut parfois augmenter les teneurs de certains caroténoïdes. Dans l'étude récente de Sanchez-Moreno *et al.* (2005), les teneurs en zéaxanthine augmentent de 37 % quand les teneurs en lutéine baisse de 23 % après pasteurisation. Le lycopène des jus ne semble pas affecté par la pasteurisation (Lee & Coates, 1999) mais subit une légère isomérisation dans les jus de tomate (Shi & Le Maguer, 2000). Le lycopène étant plus fragile que le β -carotène, son isomérisation peut se poursuivre pendant le stockage des jus comme l'avait précédemment rapporté Padula & Rodriguez-Amaya (1987) dans les jus de goyave.

Peu de données nous informent sur la stabilité des flavonoïdes dans les jus de fruits. Récemment, Sanchez-Moreno *et al.* (2005) remarquent la stabilité de l'héspéridine par rapport à la narirutine (16 % de pertes) dans des jus d'orange pasteurisés. Auparavant, Gil-Izquierdo *et al.* (2002) avaient observé que si la pasteurisation et la concentration ne modifiaient pas la teneur en flavonoïdes des jus d'orange, la congélation et la décongélation entraînaient par contre des pertes non négligeables de ces composés (39 % en héspéridine). A cause de la précipitation des flavanones dans les fractions troubles des jus au cours de la congélation, les pertes de ces composés se produisent à la décongélation. Par ailleurs, les anthocyanes des jus apparaissent beaucoup plus sensibles aux traitement technologiques. Une étude cinétique de Kirca *et al.* (2003) indique 70 % de pertes d'anthocyanes après 2 h de chauffage à 90°C dans des jus d'orange sanguines. Récemment, la fragilité de ces pigments phénoliques hydrophiles des oranges sanguines a été mise en évidence lors de stockage des jus et la réduction des teneurs en anthocyanes a entraîné la diminution de l'activité antioxydante (Fiore *et al.*, 2005).

2 Effet Santé des jus d'agrumes – rôle des antioxydants.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'importance de la consommation de fruits en général et d'agrumes en particulier dans la prévention des pathologies majeures tels que cancers, maladies cardiovasculaires ou les maladies neurodégénératives. Les nombreuses propriétés biologiques des agrumes ont été également mises en évidence *in vitro*, chez l'animal et chez l'homme lors d'études cliniques. Plusieurs composés antioxydants tels que la vitamine C, les polyphénols et les caroténoïdes pourraient jouer un rôle important dans ces effets.

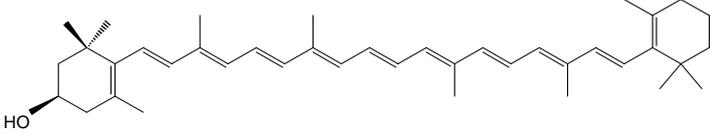
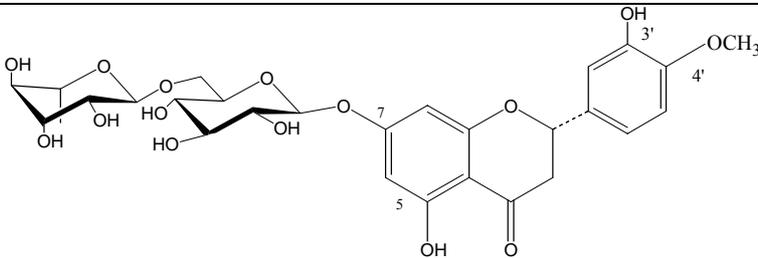
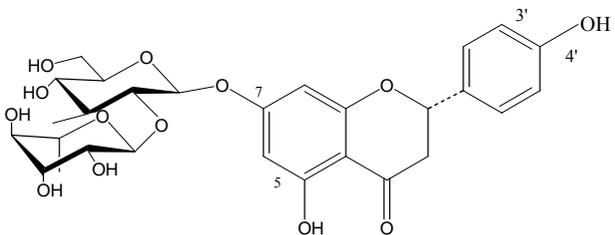
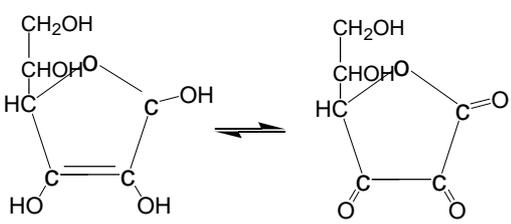
Les jus d'agrumes ont la particularité d'être des aliments riches en micronutriments (vitamines), essentiels au bon fonctionnement de l'organisme au même titre que les oligoéléments, et également en micronutriments non-essentiels (polyphénols et caroténoïdes non-provitaminiques). Ces micronutriments non-essentiels sont des composés qui n'ont pas encore été reconnus comme indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Les structures des principaux micronutriments et microconstituants d'intérêt des jus d'agrumes (vitamine C, flavonoïdes, β -cryptoxanthine) sont présentés dans le Tableau 6. En effet, dans la littérature les nombreuses propriétés biologiques des agrumes sont en grande partie attribuées à la vitamine C et aux flavonoïdes avec néanmoins quelques données sur la β -cryptoxanthine, caroténoïde principalement apporté par les agrumes en Europe (O'Neill *et al.*, 2001).

2.1 Etudes chez l'homme

2.1.1 Etudes épidémiologiques en relation avec la β -cryptoxanthine

Quelques études visent à démontrer la relation entre consommation de fruits riches en β -cryptoxanthine, en l'occurrence les agrumes, et l'incidence de certaines maladies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires (MCV) (Tableau 7). La β -cryptoxanthine, outre son rôle provitaminique A, serait une molécule protectrice vis-à-vis de ces maladies par ces propriétés antioxydantes. L'étude de Jian *et al.* (2005) conclut que les apports de caroténoïdes des fruits d'une manière générale sont inversement corrélés au risque de développer un cancer de la prostate. La β -cryptoxanthine apportée par les agrumes ou le lycopène des tomates semblent avoir les mêmes effets protecteurs.

Tableau 6. Principales molécules antioxydantes étudiées des jus d'agrumes

| FAMILLE | SOUS-FAMILLE | NOM ET STRUCTURE DU COMPOSÉ ÉTUDIÉ | AGRUMES |
|-------------|-----------------------------|---|---|
| Caroténoïde | Xanthophylle |  <p>β-cryptoxanthine</p> | <p>Mandarine^a (10 -17mg/L)</p> <p>Orange^b (1.5-2.4 mg/L)</p> |
| Polyphénols | Flavonoïdes (Flavanones) |  <p>Hesperidine</p> | orange^c (235-407mg/L) |
| | |  <p>Naringine</p> | Pomelo^d (113-481mg/L) |
| Vitamine | Vitamine C |  <p>Acide ascorbique –Acide déhydroascorbique</p> | <p>Orange 500 mg/L)</p> <p>Mandarine^e 420 mg/L)</p> <p>Pomelo 380 mg/L)</p> |

^a(Fanciullino *et al.*, 2006) ; ^b(Sanchez-Moreno *et al.*, 2003); ^{cd} (Tomas-Barberan & Clifford, 2000); ^e(Perez *et al.*, 2005).

Tableau 7. Etudes épidémiologiques sur β -cryptoxanthine et /ou agrumes et maladies (cancers et MCV).

| Maladies | Etude | Type d'étude | Sujets | Lieux et durée | Résultats |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Cancer du poumon | Mannisto <i>et al.</i> , 2004 | Cohorte prospective | 399765 dont 3155 à risque | Amérique du Nord et Europe (7-16 ans) | RR : 0,76 (0.67-0.86) + |
| Cancer du poumon | Yuan <i>et al.</i> , 2003 | Cohorte prospective | 63 et 257 (hommes et femmes) | Singapour (5 ans) | RR : 0,73 (0.54-0.98) + |
| Cancer de la prostate | Jian <i>et al.</i> , 2005 | Etude cas-témoin | 130 malades et 274 témoins sains | Chine du Sud Est (2 ans) | OR : 0,15 (0,06-0,34) + |
| MCV | Dauchet <i>et al.</i> , 2004 | Cohorte prospective | 5982 et 2105 hommes sains | France et Irlande (5ans) | RR : 0,67 (0.44-1.03) + |
| MCV | Howard <i>et al.</i> , 1996 | Cohorte prospective | 171 et 211 (hommes et femmes) | Toulouse et Belfast (4 mois) | R : 0.467 + |

RR : risque relatif ; OR : odd ratio ; R coefficient de corrélation ; + Effet bénéfique significatif.
Cohorte prospective : étude d'observation dans laquelle un groupe de sujets exposés (à des facteurs de risque particulier d'une maladie) est suivi pendant une période déterminée et comparé à un groupe contrôle non exposé. Etude cas-témoin : études d'observation dans laquelle les caractéristiques des malades (cas) sont comparées à celles des sujets sains (témoin).

Pour les deux autres études (Mannisto *et al.*, 2004 ; Yuan *et al.*, 2003) sur le cancer du poumon, les résultats suggèrent que seule la β -cryptoxanthine et non les autres caroténoïdes (apportée par une consommation d'agrumes) exerce un effet protecteur vis-à-vis du cancer du poumon. Il est intéressant de remarquer dans l'étude de Mannisto *et al.* (2004) que les résultats ne changent pas après supplémentation en vitamine C ou folates, ce qui suggère le rôle de la β -cryptoxanthine dans la prévention de ces maladies. Notons par ailleurs, que les concentrations plasmatiques en β -cryptoxanthine sont fortement corrélées aux apports d'agrumes. Ainsi, dans l'étude prospective EPIC (European Prospective Investigation into

Cancer and Nutrition) de Al-Delaimy *et al.* (2005) indique des coefficients de corrélation de 0,9. Les études associant la β -cryptoxanthine et les MCV sont plutôt rares. Mais, Dauchet *et al.* (2004) indiquent que la consommation d'agrumes et non la consommation d'autres fruits est inversement corrélée aux développements de MCV. Enfin, l'étude de Howard *et al.* (1996) compare les populations de Toulouse et Belfast par rapport à l'incidence des MCV et conclut que les toulousains grâce à l'apport plus important de β -cryptoxanthine (agrumes) dans leur alimentation sont moins exposés aux risques de MCV que les habitants de Belfast dont le régime alimentaire est plus faible en apport de β -cryptoxanthine. La corrélation entre la teneur plasmatique en β -cryptoxanthine et l'ingestion d'oranges est de 0,467.

2.1.2 Etudes épidémiologiques en relation avec les flavanones des agrumes

D'après un rapport de l'organisation mondiale de la santé datant de 2003, les études épidémiologiques concernant les flavonoïdes indiquent que la prévention des risques de maladie est considérée comme "possible" pour les MCV et "insuffisant" pour les cancers (Scalbert *et al.*, 2005). Parmi une vingtaine d'études réalisées entre 1995 et 2002 (Arts & Hollman, 2005), un seul auteur (Knekt *et al.*, 2002) s'est intéressé à l'incidence de l'hespéridine et de la naringine sur différentes maladies telles que MCV, cancers, maladies respiratoires, diabète, cataracte et polyarthrite. Les associations positives entre l'apport de flavanones et la baisse du risque de maladies, mises en évidence par la consommation d'orange et de pomelos, sont montrées uniquement pour les MCV et l'asthme. Très récemment, une équipe italienne (Rossi *et al.*, 2007) a montré une corrélation inverse entre l'apport de jus d'agrumes et le risque de développer un cancer de l'œsophage, la synergie entre flavanones et vitamine C étant suggérée. Lors d'une étude d'observation, une plus grande consommation de pomelos était associée à une diminution de l'incidence du cancer du poumon (Le Marchand *et al.*, 2000). Une association similaire a été observée entre consommation de naringine et incidence du cancer du poumon. La difficulté d'interprétation des études épidémiologiques tient au fait que les flavonoïdes d'une manière générale sont faiblement biodisponibles. En effet, seuls les aglycones de quelques molécules sont retrouvés dans le plasma à des concentrations très faibles de l'ordre de 0,3 à 0,75 $\mu\text{mol/L}$ pour la quercétine, catéchine, épicatechine après apport d'oignons, de pommes ou d'autres végétaux. Les concentrations plasmatiques d'hespéridine et de naringénine sont plus élevées (1,3-2,2 $\mu\text{mol/L}$) après ingestion de jus d'agrumes mais cependant moins que les isoflavones de soja

(1,4 à 4 $\mu\text{mol/L}$) (Manach *et al.*, 2006). Par ailleurs, la variabilité inter-individus étant importante au niveau du statut plasmatique, l'excrétion urinaire de ces flavanones comme marqueurs de la diète serait à évaluer également pour les études épidémiologiques (Erlund *et al.*, 2001).

2.1.3 Etudes épidémiologiques en relation avec la vitamine C

De nombreuses études épidémiologiques permettant de dire que la réduction du risque de maladies cardiovasculaires et cancers par l'apport d'une supplémentation en vitamine C est probable, bien que l'effet soit plus convaincant chez des populations présentant un faible statut au départ (Gerber, 2000). Cependant, les études reliant l'apport alimentaire de vitamine C à la consommation d'agrumes sont plus rares. Les travaux de Taylor *et al.* (2000) indiquent que de faibles apports en fruits riches en vitamine C et en particulier en agrumes et jus d'agrumes entraînent des carences en vitamine C. Par ailleurs, il a été démontré que la consommation de pomelos améliorerait le statut plasmatique en vitamine C des personnes atteintes de maladies periodontales (Staudte *et al.*, 2005). Dans l'étude de Lowe *et al.* (2003), la concentration plasmatique en vitamine C suite à l'apport d'agrumes est inversement corrélée aux MCV associés aux paramètres inflammatoires et thrombotiques.

2.1.4 Etudes cliniques

Les études d'intervention chez l'homme les plus nombreuses concernent la vitamine C apportées par les agrumes. Les autres études impliquant les flavanones ou la β -cryptoxanthine sont plus rares et relativement récentes. Toutes ces études sont en relation avec la prévention des maladies cardiovasculaires, aucune étude de prévention de cancer n'ayant été trouvée.

Les dommages oxydatifs des acides nucléiques, des protéines et des lipides sont un facteur déterminant dans l'étiologie de diverses pathologies dégénératives telles que maladies cardiovasculaires et cancers (Grolier *et al.*, 2001).

L'apport d'un supplément de vitamine C comparé à l'ingestion de jus d'orange aurait un effet également significatif sur les indicateurs de la peroxydation lipidique. Les effets protecteurs de la consommation de microconstituants ou micronutriments contre le stress

oxydant se traduisent par une diminution des teneurs en peroxydes lipidiques dans le plasma. Les doses concernées représentent 3 verres de jus ou 70 mg pour un supplément de vitamine C (Johnston *et al.*, 2003). Dans une autre étude similaire, après ingestion de deux verres de jus d'orange, les concentrations plasmatiques de vitamine C ont été inversement corrélées à un indicateur de la peroxydation lipidique (Sanchez-Moreno *et al.*, 2004). L'un des mécanismes expliquant l'étiologie des maladies cardiovasculaires est l'incrustation de la paroi des artères par les lipoprotéines de faible densité (LDL) par opposition aux protéines de fortes densité (HDL). Les LDL oxydées conduisent à la plaque d'athérome. La diminution de 16 % du rapport LDL/HDL ainsi que l'augmentation de la concentration plasmatique en vitamine C a été observée sur des sujets hypercholestérolémiques après ingestion de 3 verres de jus d'orange par jour (Kurowska *et al.*, 2000).

Sur des sujets hypercholestérolémiques, l'apport combiné d'extrait d'agrumes et de vitamine C, mais pas de vitamine C seule, abaisse significativement le taux de triglycérides. Cette étude démontre l'existence d'une synergie entre la vitamine C et certains micronutriments des agrumes, ce qui laisse suggérer l'implication d'autres molécules comme les flavonoïdes apportées par les agrumes (Vinson & Jang, 2001). Contrairement à ces résultats, les travaux récents d'une équipe italienne démontrent que les marqueurs du statut et de la peroxydation lipidique ne semblent pas affectés par la consommation de 3 verres de jus d'orange sanguine après 21 jours. Cependant, les trois classes d'antioxydants (vitamine C, anthocyanes, β -cryptoxanthine) augmentent dans le plasma (valeur à peine détectable pour les anthocyanes) et semblent associés à des marqueurs de stress oxydatif suggérant une légère protection du système de défense antioxydant (Riso *et al.*, 2005). Deux autres études concernent les pomelos : dans la première la consommation de pomelos roses abaisse significativement le niveau de cholestérol LDL et de triglycérides chez des patients souffrant d'athérosclérose (Gorinstein *et al.*, 2006) ; la deuxième met en relation la consommation de pomelos et une amélioration de l'insulinorésistance allié à une perte de poids chez des sujets atteints d'obésité (Fujioka *et al.*, 2006). Enfin, une autre étude japonaise démontre que la consommation de mandarine augmente les concentrations plasmatiques en β -cryptoxanthine, lesquelles sont positivement corrélées aux niveaux de HDL-cholestérol et apo-lipoprotéine A1 (protéines liées au cholestérol HDL) (Sugiura *et al.*, 2004).

2.2 Etudes chez l'Animal

2.2.1 Cancers

De nombreuses études montrent que l'ingestion d'agrumes diminue la cancérogenèse chez les rongeurs. Parmi ces études, effectuées en majorité par des équipes japonaises, quelques unes attribuent cette propriété à la β -cryptoxanthine. Les travaux de Narisawa *et al.* (1999) ont montré que des extraits de mandarine ajoutés au régime pouvaient limiter le développement de tumeurs induites expérimentalement au niveau du colon par exposition à des agents carcinogènes. Ces effets protecteurs sont également observés lorsque des jus de mandarine (riches en β -cryptoxanthine et hespéridine) sont administrés à des rats présentant des tumeurs cancéreuses induites au niveau du colon par l'azoxyméthane (Tanaka *et al.*, 2000). Le même type d'expérience a été répété sur des rats atteints de tumeurs induites au niveau du poumon et 30 % de réduction des lésions ont été observées (Kohno *et al.*, 2001).

L'implication des flavanones d'agrumes dans la prévention de maladies tels que les cancers, a été largement étudiée. L'hespéridine du jus d'orange s'est révélée efficace contre la cancérogenèse intestinale (Tanaka *et al.*, 1997), les tumeurs mammaires (So *et al.*, 1996), la vessie (Yang *et al.*, 1997) et le colon (Miyagi *et al.*, 2000). Plus récemment, la naringine a fait l'objet de plusieurs recherches démontrant un effet thérapeutique en tant qu'agent antiprolifératif sur divers types de cancer incluant le cancer du sein et du colon (Harmon & Patel, 2004 ; Kanno *et al.*, 2005 ; Vanamala *et al.*, 2006).

2.2.2 Autres Pathologies

Des équipes japonaises qui ont beaucoup travaillé sur les effets santé de la β -cryptoxanthine des mandarines Satsuma, ont récemment mis en évidence ce caroténoïde dans la prévention de l'ostéoporose par des mécanismes intervenant dans le métabolisme osseux (Yamaguchi, 2006). L'ingestion de β -cryptoxanthine d'agrumes à des rats considérés comme animaux modèles pour l'étude de l'ostéoporose, a montré un effet préventif sur la perte osseuse (Uchiyama *et al.*, 2004).

De nombreux autres mécanismes biologiques étudiés chez des rats sont attribués aux flavanones des agrumes, l'héspéridine et la naringine. Concernant l'héspéridine (ou son aglycone l'héspéretine), des propriétés diverses (anti-inflammatoires, anti-allergiques, hypolipidémiques, hypotensives et même anti-âge) sont mises en évidence (Guardia *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2003 ; Ohtsuki *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006). La naringine semble impliquée elle aussi dans le métabolisme des lipides : en augmentant le cholestérol HDL chez le lapin (Jeon *et al.*, 2004), ou en diminuant le LDL-cholestérol sanguin sur des rats hypercholestérolémiés (Gorinstein *et al.*, 2005). Dans cette dernière étude, le profil lipidique (taux sanguins de cholestérol et triglycérides) était amélioré après la consommation de jus de pomélos par comparaison à une supplémentation en naringine seule. Il en était de même pour l'activité antioxydante, qui était plus élevée après consommation de jus. Ceci se comprend par l'apport notamment de vitamine C, qui joue un rôle important dans l'activité antioxydante.

La plupart des publications récentes sur la naringine concernent son rôle probable dans l'interaction avec les médicaments. L'existence d'une interaction entre le jus de pomelo et certains médicaments est connue depuis quelques années (Lohezic-Le Devehat *et al.*, 2002 ; Choi & Han, 2005 ; Yeum & Choi, 2006). Les auteurs relèvent l'inhibition par le jus de pomelo du cytochrome P450 CYP3A4, forme prédominante dans l'intestin grêle des animaux étudiés. Les cytochromes sont des enzymes qui participent à la métabolisation des médicaments. Cela conduit à une augmentation de la biodisponibilité de certains médicaments. De plus l'effet des agrumes passerait aussi par l'inhibition de l'activité de la glycoprotéine P, un transporteur qui effluerait des xénobiotiques vers la lumière intestinale. Parmi les composés responsables, la naringine agirait en synergie avec des furanocoumarines. En effet, l'augmentation de la biodisponibilité des médicaments en présence de jus d'agrumes riches en naringine permettrait de diminuer les doses administrées, permettant ainsi d'inhiber l'efflux de médicaments vers la lumière intestinale. Cette interaction jus de fruits-médicaments est un exemple particulier permettant de constater l'influence des microconstituants alimentaires sur notre santé.

Notons que si de nombreux effets santé sont observés chez l'animal, certaines expérimentations utilisent des suppléments de molécules seules et non des extraits d'agrumes et à des doses ni nutritionnelles ni physiologiques, ce qui rend difficile une extrapolation à l'homme.

2.3 Mécanismes possibles des effets protecteurs des antioxydants

2.3.1 Les antioxydants alimentaires : une réponse au stress oxydant

Dans des conditions physiologiques normales de l'organisme, l'oxygène produit en permanence au niveau mitochondrial des espèces réactives oxygénées (ERO), particulièrement délétères pour l'intégrité cellulaire en particulier lorsque ces défenses ne suffisent plus et que l'équilibre entre oxydants et antioxydants est rompu, la cellule se trouve alors en état de stress oxydant. Ces ERO vont alors oxyder nos biomolécules (lipides, protéines, ADN et glucose). En effet, pour se protéger contre ces effets délétères, la cellule a mis en jeu des systèmes de défenses antioxydants enzymatiques (catalase, système superoxyde dismutase/glutathion peroxydase principalement). Notre alimentation permet aussi d'apporter des substances (vitamines) qui permettent de lutter contre ces ERO et augmenter nos systèmes de défenses. Les ERO peuvent être générées sous l'effet d'oxydants environnementaux (pollution, alcool, tabac, médicaments ou exposition au soleil). Ces situations conduisent à un affaiblissement de nos défenses antioxydantes et à l'apparition de dégâts cellulaires. Une alimentation équilibrée, par son apport en antioxydants naturels, est nécessaire pour contrôler les effets nocifs de l'oxygène (Pincemail, 1999).

2.3.2 Mécanismes d'action des caroténoïdes

Les caroténoïdes font partie des microconstituants qui participent aux défenses de l'organisme contre les ERO, un mécanisme possible de leur action est le piégeage des radicaux libres et de l'oxygène singulet (Grolier *et al.*, 2001). Par cette propriété, ils semblent jouer un rôle de protection contre les cancers et les maladies cardiovasculaires. Un radical libre est défini par tout composé (atomes, molécules) possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Cette espèce est très réactive puisqu'elle cherche à combler son manque d'électron dans son environnement. L'oxygène singulet (1O_2) ne possède pas d'électron non apparié, mais c'est un état excité de l'oxygène. Les caroténoïdes, grâce à leurs longues chaînes polyinsaturées, sont de bons piègeurs de radicaux libres, leur pouvoir réducteur (antioxydant) est par contre beaucoup moins évident puisqu'ils ne portent pas de groupement réducteur et ne sont pas donneurs d'électrons. Le terme d'antioxydant ne paraît donc pas approprié, on

devrait plutôt parler de pouvoir antiradicalaire, ou de pouvoir anti-espèces activées (Faure *et al.*, 1999).

Les mécanismes par lesquels les caroténoïdes protègent les systèmes biologiques des dommages dus aux radicaux libres et à l'oxygène consistent en une série possible de réactions résumées dans la Figure 1 d'après Krinsky & Yeum (2003). L'activité de chaque caroténoïde dépend de la polarité de la molécule, du nombre de doubles liaisons et de la nature des substituants. Les carotènes (lycopène, β -carotène) apolaires sont plus efficaces alors que les hydroxycaroténoïdes (β -cryptoxanthine, lutéine) le sont moins en raison de leur groupement hydroxyle (Miller *et al.*, 1996). Les caroténoïdes tout comme la vitamine E sont des antioxydants présents dans les compartiments lipidiques comme les lipoprotéines. A cet égard, ils contribuent également à la protection de ces particules contre la peroxydation lipidique et ainsi à la réduction du risque cardio-vasculaire (Nève, 2002).

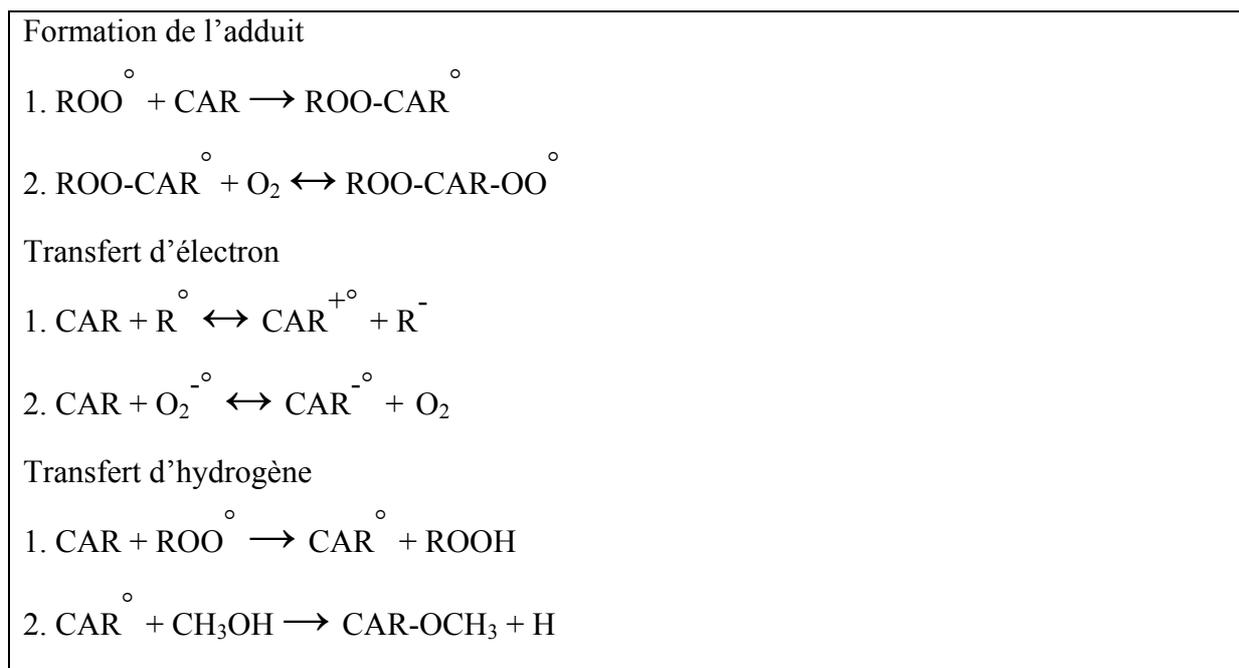


Figure 1. Mécanismes possibles de réaction des caroténoïdes (CAR) avec un radical (R°) (Krinsky et Yeum, 2003).

Outre leurs activités antioxydantes, les caroténoïdes pourraient assurer un rôle protecteur contre le cancer par leur action sur les jonctions intercellulaires (gap junctions). Ces jonctions sont des petits canaux qui permettent l'échange de petites molécules entre cytoplasme de cellules adjacentes. Ce transfert d'information assure un comportement harmonieux des cellules. Une perturbation de ce contrôle laisse des cellules initiées s'engager sur la voie tumorale. Un autre mécanisme de prévention des cancers pourrait s'expliquer par l'action directe ou indirecte des caroténoïdes en tant que modulateurs de l'immunité. Leur action pourrait s'exercer sur le système immunitaire (lymphocytes) ou le système non spécifique (polynucléaires neutrophiles). Enfin, les caroténoïdes auraient une action sur les enzymes impliquées dans la cancérogenèse. Les systèmes complexes impliquant les cytochromes P450 qui métabolisent les xénobiotiques, peuvent avoir leur activité modifiée par les caroténoïdes (Nicol & Maudet, 2000).

2.3.3 La β -cryptoxanthine

Le pouvoir antioxydant de la β -cryptoxanthine a été évalué *in vitro* par Miller *et al.*, (1996) dans une étude utilisant le test TEAC ("Trolox equivalent antioxidant capacity"). Dans ces essais, la β -cryptoxanthine a été le caroténoïde le plus efficace pour piéger les radicaux libres après le lycopène, le β -carotène et les autres xanthophylles ayant montré des activités plus faibles. Parmi les caroténoïdes du jus d'orange, la β -cryptoxanthine a également montré la plus forte activité antioxydante dans les tests utilisant le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Jimenez-Escrig *et al.*, 2000). D'autres auteurs ont estimé que les teneurs en vitamine C et en β -cryptoxanthine du jus d'orange étaient corrélées positivement à l'activité antioxydante des jus (Sanchez-Moreno *et al.*, 2003).

In vivo la β -cryptoxanthine semble exercer un effet protecteur vis-à-vis de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) ; Wolters & Hahn (2004) trouvent un effet protecteur de la β -cryptoxanthine vis-à-vis de l'oxydation des LDL induite par le cuivre. Une étude clinique récente a montré que le faible statut plasmatique de β -cryptoxanthine corrélé aux facteurs de risques cardiovasculaires était dû à des mécanismes impliquant le système immunitaire (Lidebjer *et al.*, 2006). Par ailleurs, la peroxydation lipidique peut être mesurée par la concentration plasmatique ou la concentration de l'urine en 8-epiprostaglandine PGF 2a (8-

EPG) appartenant à la famille des isoprôstanes. Ce produit est formé par la réaction des ERO directement sur les acides gras. Dans l'étude de Haegele *et al.* (2000) les concentrations plasmatiques en β -cryptoxanthine sont inversement corrélées aux taux urinaires de 8-EPG après une diète riche en fruits contenant de la β -cryptoxanthine.

Stahl *et al.* (1997) ont montré que la β -cryptoxanthine comme le β -carotène et la canthaxanthine étaient capable de stimuler les jonctions communicantes de fibroblaste de modèles murins. Les études japonaises chez les rongeurs expliquent les effets positifs de la β -cryptoxanthine apportée par des extraits de mandarine sur le recul des tumeurs induites, par l'implication des mécanismes intervenant via les jonctions communicantes, et, les réponses immunitaires dans l'induction de l'apoptose (Narisawa *et al.*, 1999 ; Kohno *et al.*, 2001).

Les études récentes *in vitro* et *in vivo* chez des rats indiquent que la β -cryptoxanthine jouerait un rôle préventif dans la perte osseuse liée aux maladies telles que l'ostéoporose. L'effet *in vitro* de la β -cryptoxanthine ne serait pas observé avec les autres caroténoïdes (Yamaguchi & Uchiyama, 2004 ; Uchiyama & Yamaguchi, 2005). L'administration de β -cryptoxanthine chez les rats augmente les teneurs en calcium des tissus osseux ainsi que l'activité de la phosphatase alcaline (enzyme participant à la minéralisation osseuse) ; une synergie avec le zinc a été également mise en évidence (Uchiyama *et al.*, 2004 ; Yamaguchi, 2006). Il n'existe actuellement pas d'études évaluant l'impact de la β -cryptoxanthine chez l'homme. Par contre il a été observé que les femmes ayant des statuts élevés en caroténoïdes dans le sang présentaient moins d'incidence d'ostéoporose (Maggio *et al.*, 2006).

2.3.4 Les flavonoïdes

De part leur structure chimique les flavonoïdes des agrumes sont capables de piéger les radicaux libres par leurs propriétés de donneurs d'électrons ou d'atome d'hydrogène. Par ailleurs ils sont également capables de chélater les métaux catalyseurs d'oxydation. Ces propriétés largement démontrées lors de test *in vitro* sont à l'origine de leur réputation de puissants antioxydants alimentaires. En effet, les premières hypothèses avancées pour expliquer l'association entre la moindre incidence de maladies évolutives et une consommation élevée de flavonoïdes, mettaient en avant le rôle antioxydant de ces molécules pour lutter contre les processus oxydatifs délétères dans l'organisme. Cependant, la preuve de

leur efficacité *in vivo* est limitée par certains facteurs comme leur faible biodisponibilité avec une forte métabolisation. Les contradictions entre le fort pouvoir antioxydant *in vitro* des molécules parentes et le fait que celles-ci ne soient pas retrouvées dans les fluides biologiques amènent les recherches les plus récentes à proposer de nouveaux mécanismes d'action, impliquant la signalisation cellulaire, ou leurs effets sur certains facteurs de transcription (Manach *et al.*, 2006).

2.3.4.1 Pouvoir antioxydant et jus d'agrumes

Dans le cas des jus d'agrumes, la capacité antioxydante mesurée lors de test *in vitro* serait attribuée majoritairement à la vitamine C (Sanchez-Moreno *et al.*, 2003 ; Gardner *et al.*, 2000). Selon Gardner *et al.* (2000), la contribution de cette vitamine allant de 65 à 100 % selon les jus d'agrumes. Cependant, dans le cas des oranges sanguines, les polyphénols peuvent représenter une part importante dans le potentiel antioxydant à cause des teneurs élevées en anthocyanes (Rapisarda *et al.*, 1999). Toutefois les flavonoïdes des agrumes et en particulier les flavanones telles que la naringine et l'héspéridine sont reconnus pour leur capacité à piéger les radicaux libres, l'oxygène singulet, et l'anion superoxyde même si leur activité reste plus faible que la quercétine dans ce domaine (Benavente-Garcia *et al.*, 1997).

2.3.4.2 Chélation des métaux et jus d'agrumes

Les flavanones telles que la naringine ou l'héspéridine sont capables de chélater le fer (sous forme Fe³⁺) (Fernandez *et al.*, 2002). Ce mécanisme a été reconnu pour expliquer le rôle protecteur des composés phénoliques dans les effets délétères de l'ADN au niveau cellulaire (Sestili *et al.*, 2002). Par le mécanisme de la chélation, l'effet des jus de fruits sur la biodisponibilité du fer a été étudié (Shah *et al.*, 2003). L'effet inhibiteur des flavonoïdes sur l'absorption du fer n'a été démontré que pour des jus de fruit riches en anthocyanes comme les jus de prune ou de raisin mais pas pour des jus d'agrumes. En effet, pour les jus d'agrumes l'effet chélateur des flavonoïdes sur le fer est contrecarré par l'acide ascorbique qui libère le fer dans le milieu, le rôle promoteur de la vitamine C dans la biodisponibilité du fer étant connu (Boato *et al.*, 2002).

2.3.4.3 Relation structure-activité

D'une manière générale, le pouvoir antioxydant des flavonoïdes résulte d'une combinaison entre la structure des ortho-hydroxyles sur le cycle B, les doubles liaisons conjuguées (entre les positions 2 et 3) avec la fonction cétone en position 4 et la présence de groupes hydroxyles en position 3 et 5 permettant la création de liaison hydrogène avec le groupement cétone en position 4 (Benavente-Garcia *et al.*, 1997). En ce qui concerne les propriétés de chélation, certains auteurs indiquent que le site préférentiel se situerait entre le 5 hydroxyle et le groupe cétone en position 4 (cas de la naringénine) (Fernandez *et al.*, 2002 ; Mira *et al.*, 2002). D'autres auteurs suggèrent que la présence de deux groupes hydroxyles en position ortho sur la molécule est essentielle pour le mécanisme de la chélation du fer (Sestili *et al.*, 2002).

2.3.4.4 Autres mécanismes impliquant les flavanones

Bien que la capacité antioxydante des flavanones d'agrumes soit élevée *in vitro*, cette efficacité est difficilement explicable *in vivo*. En effet, la biodisponibilité de l'hésperétine et de la naringénine est mesurée par les concentrations plasmatiques obtenues après la consommation de jus d'agrumes (les molécules glycosylées n'étant pas retrouvées dans le plasma). Pour l'hésperétine, les concentrations plasmatiques 5 à 7 h après la consommation de jus d'orange étaient de 1,3-2,2 $\mu\text{mol/L}$ pour un apport de 130-220 mg (Erlund *et al.*, 2002 ; Manach *et al.*, 2003). La naringénine du jus de pomele semble mieux absorbée encore, avec un pic plasmatique de 6 $\mu\text{mol/L}$ pour une dose ingérée de 200 mg. Comparativement, les concentrations de vitamine C, reconnue pour être une vitamine antioxydante, sont de l'ordre de 50 $\mu\text{mol/L}$ après ingestion de jus d'orange (Sanchez-Moreno *et al.*, 2003). De plus, les flavanones sont rapidement excrétées ensuite par la bile et l'urine après avoir été largement métabolisées sous formes de conjugués méthylés, glucuronidés ou sulfatés (Manach *et al.*, 2004). Par ailleurs, les études impliquant les flavanones dans l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma après ingestion de jus d'agrumes sont à considérer avec prudence. En effet, Lotito & Frei (2006) indiquent dans une étude critique que l'augmentation du statut antioxydant du plasma après consommation de pommes, fruit riche en flavonoïdes (quercétine), serait dû à l'augmentation des niveaux d'acides uriques, conséquence d'une consommation de fructose des fruits ingérés. Dans le cas des agrumes, la vitamine C et les

caroténoïdes contribuent largement à l'augmentation du statut antioxydant du plasma indépendamment des flavonoïdes (Franke *et al.*, 2005).

Si les flavonoïdes n'agissent probablement pas en tant qu'antioxydants dans l'organisme, de récentes études tendent à expliquer d'autres mécanismes impliquant l'action de ces molécules sur l'expression des gènes des enzymes intervenant dans diverses régulations au niveau cellulaire et qui pourraient intervenir lors de maladies tels que les cancers et les maladies cardiovasculaires (Jung *et al.*, 2004 ; Jung *et al.*, 2006 ; Borradaile *et al.*, 2003). Les flavanones aglycones comme l'hespéretine et la naringénine semblent inhiber l'activité enzymatique de phase I, et la naringine semble stimuler les enzymes de phase II (Figure 2). Ces enzymes interviennent dans la détoxification de nombreux agents cancérigènes (Doostdar *et al.*, 2000). Suivant la théorie de Lotito et Frei (2006), les flavonoïdes seraient considérés par le corps comme des substances étrangères et donc assimilés à des xénobiotiques que l'organisme tend à éliminer. Les effets inhibiteurs de l'hespéretine et naringénine vis-à-vis de la P-glycoprotéine, protéine de transport dont le rôle est de protéger l'organisme contre l'entrée de composés toxiques en les effluant vers la lumière intestinale, viendrait illustrer cette théorie (Mitsunaga *et al.*, 2000 ; Takanaga *et al.*, 1998). Plus récemment Tourniaire *et al.* (2005), ont montré que la P-glycoprotéine était capable de transporter la naringine (forme glycosylée) au niveau de l'entérocyte.

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables des effets bénéfiques rapportés par les polyphénols, de nombreuses études utilisant des modèles *in vitro* sont encore nécessaires notamment celles concernant l'étape intestinale. Notons que l'intestin grêle constitue le site majeur d'absorption de toutes les substances ingérées (nutriments ou xénobiotiques).

Il ressort de cette analyse bibliographique que l'accumulation de données sur les effets santé des agrumes, qu'elles proviennent d'études expérimentales chez l'animal, ou utilisant des modèles cellulaires ou chez l'homme suggère l'intérêt de ces fruits dans la prévention des maladies. Cependant, si le rôle fonctionnel des caroténoïdes et de la vitamine C est reconnu, les mécanismes d'action antioxydants restent à éclaircir. Par ailleurs, d'autres mécanismes impliquant les flavonoïdes sont encore à découvrir car la preuve que les flavonoïdes soient des antioxydants *in vivo* est aujourd'hui peu convaincante. Pour conclure, notons que les

mécanismes régissant la biodisponibilité sont à élucider pour étudier les relations aliments-santé.

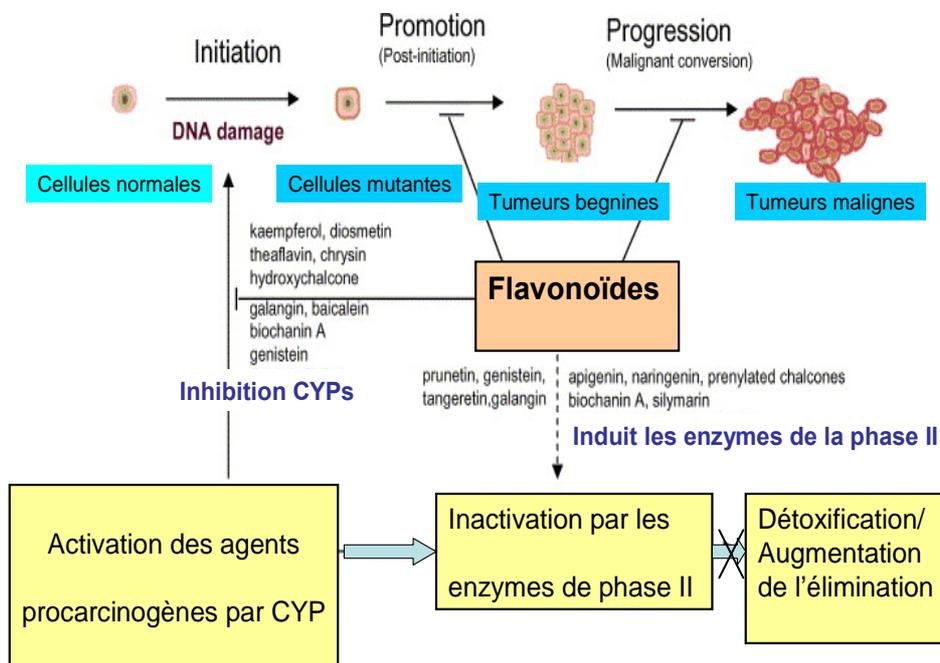


Figure 2. Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogénèse d'après Moon *et al.* (2006). Les flavonoïdes agiraient à deux niveaux (1) en inhibant les enzymes de la phase I (CYPs) qui métabolisent les xénobiotiques en substances plus polaires par hydroxylation et (2) en stimulant les enzymes de la phase II dont le rôle est d'accroître la solubilité des molécules par conjugaison pour faciliter leur élimination.

3 Biodisponibilité des caroténoïdes

La biodisponibilité peut être définie comme l'aptitude d'un micronutriment ingéré dans un aliment à être mis à la disposition des organes et tissus cibles où il doit exercer son action. La biodisponibilité des caroténoïdes va comprendre les étapes métaboliques qui contrôlent dans un premier temps la libération de ces pigments lipophiles de la source alimentaire vers la muqueuse intestinale, leur absorption intestinale, leur transport et leur métabolisme. De nombreux facteurs affectant la biodisponibilité des caroténoïdes ont été recensés sous l'acronyme SLAMENGI défini par de Pee & West (1996), allant de la nature du caroténoïde à la matrice alimentaire sans oublier les facteurs génétiques liés à l'individu. Avant de détailler ces différents facteurs, nous débuterons ce chapitre par les différentes étapes du métabolisme des caroténoïdes ainsi que la description des méthodologies d'évaluation par les études *in vivo* (l'homme, l'animal) et *in vitro* (modèles acellulaires et cellulaires).

3.1 Métabolisme des caroténoïdes

3.1.1 Structure

Les caroténoïdes alimentaires sont apportés en grande majorité par les fruits et légumes, et si on en dénombre une quarantaine dans l'alimentation humaine, seule une vingtaine ont été identifiés dans le sang et les tissus humains (Grolier *et al.*, 2001 ; Khachik *et al.*, 1997). Parmi ceux-ci, les principaux rencontrés dans les tissus humains et dérivés des caroténoïdes sont représentés sur la Figure 3. La structure de base ($C_{40}H_{56}$) avec de nombreuses liaisons conjuguées est le lycopène, tous les autres en dérivent par cyclisation, déshydrogénation et oxydation. Ils sont divisés en deux groupes : les carotènes, strictement hydrocarbonés, et les xanthophylles qui possèdent des groupements oxygénés. Ceux qui sont hydroxylés comme la β -cryptoxanthine sont souvent sous forme estérifiée dans les plantes. Chaque double liaison peut prendre une configuration *cis* ou *trans* mais la configuration *trans* est la plus stable car les contraintes stériques sont moins importantes. La conversion des caroténoïdes provitaminiques tels que le β -carotène et la β -cryptoxanthine par la $\beta\beta$ -carotène 15,15' dioxygénase donne lieu à des métabolites de clivage comme le rétinol et l'acide rétinoïque. De part leur structure apolaire, les caroténoïdes sont hydrophobes et cette propriété conditionne leur répartition dans l'environnement cellulaire. En effet, les caroténoïdes sont

associés aux structures lipidiques et sont transportés dans l'organisme par les lipoprotéines (Faure, 1999).

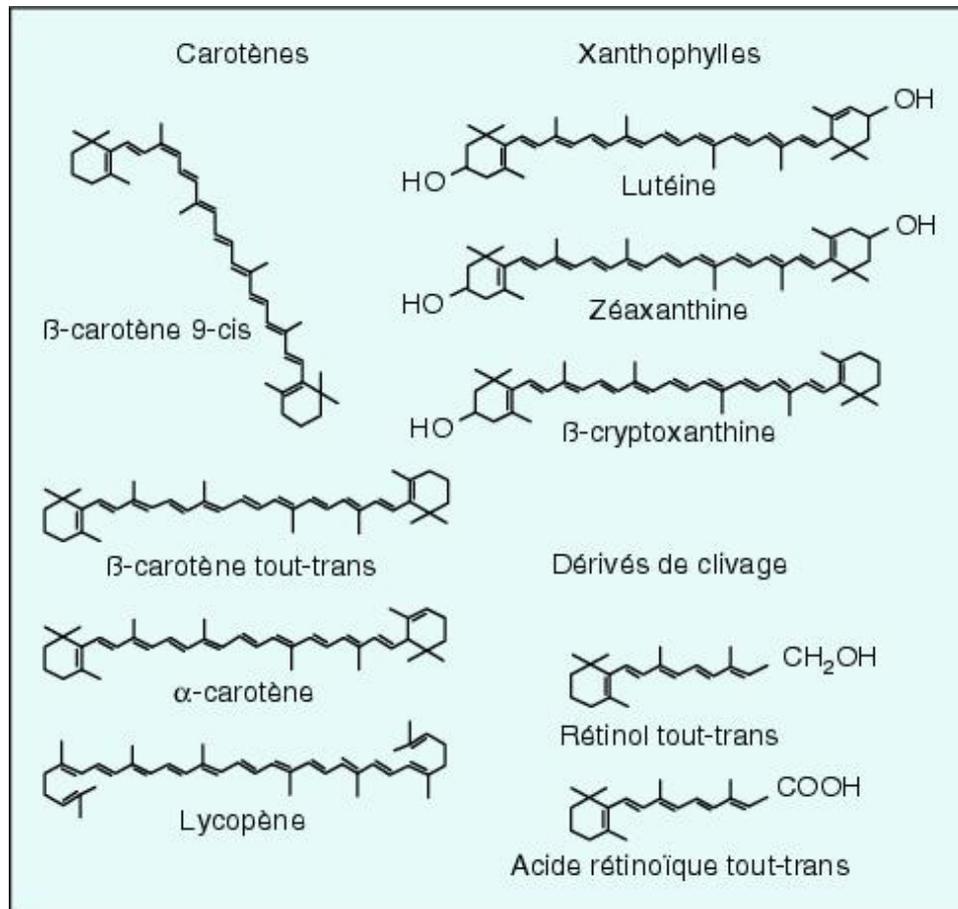


Figure 3. Principaux caroténoïdes rencontrés dans les tissus humains et dérivés des caroténoïdes provitaminiques d'après Borel *et al.* (2005).

3.1.2 Absorption intestinale et transport

Les caroténoïdes sont étroitement liés aux macromolécules dans les aliments (chloroplastes et chromoplastes des végétaux). Aussi, pour pouvoir être absorbés, ils doivent être libérés de leur matrice alimentaire. Sous l'action de la mastication, du brassage stomacal et des différentes enzymes digestives, les caroténoïdes vont pouvoir se dissoudre dans des gouttelettes lipidiques au niveau stomacal puis duodéal (Borel *et al.*, 1996). La sécrétion biliaire déclenchée par un apport lipidique alimentaire et les lipases pancréatiques vont ensuite favoriser la formation de vésicules lipidiques multi-lamellaires qui formeront à leur

tour avec d'autres composants lipidiques des micelles mixtes (Parker, 1996). Ces micelles mixtes sont des structures indispensables pour que l'absorption par l'entérocyte soit possible.

L'absorption des caroténoïdes contenus dans les micelles mixtes a longtemps été considérée comme un mécanisme de diffusion passive (Hollander & Ruble, 1978 ; Parker, 1996). Cependant, des études récentes ont montré que l'absorption entérocytaire des caroténoïdes pouvait également être facilitée par l'implication de transporteurs spécifiques (Reboul *et al.*, 2005b ; van Bennekum *et al.*, 2005).

Après l'absorption par l'entérocyte, les caroténoïdes provitaminiques subissent un clivage sous l'action de la $\beta\beta$ -carotène 15,15' dioxygénase (EC 1.13.11.21) récemment rebaptisée $\beta\beta$ -carotène 15,15' monooxygénase (EC 1.14.99.36). Il résulte de ce clivage deux molécules de rétinol qui se réduisent en rétinol et, par la suite, forment des esters de rétinol (Borel *et al.*, 2005).

La

Figure 4 indique le devenir des caroténoïdes provitaminiques et non provitaminiques à partir de l'absorption des micelles par l'entérocyte. Les caroténoïdes intacts ainsi que les esters de rétinol sont ensuite incorporés dans des chylomicrons sécrétés dans l'espace intercellulaire puis déversés dans le système sanguin périphérique via le système lymphatique. Sous l'action de la lipoprotéine lipase (EC 3.1.1.34), les triglycérides des chylomicrons sont hydrolysés et les chylomicrons résiduels appelés chylomicrons remnants sont rapidement captés par le foie au niveau de la veine porte. Une partie des chylomicrons remnants peut être directement transportée vers les tissus cibles mais cette proportion est inconnue. Le foie sécrète des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) pour transporter les caroténoïdes vers les tissus cibles. Ces VLDL sont réduites en lipoprotéine de taille plus petite, les lipoprotéines de faibles densités (LDL) (Parker, 1996 ; Parker *et al.*, 1999). Ces LDL sont ensuite captées par les tissus périphériques dont les cellules adipeuses constituent 80 % des réserves. D'autres organes comme l'œil contiennent des concentrations importantes de lutéine au niveau de la rétine et la zéaxanthine au niveau de la macula (Bone *et al.*, 1997). La présence de caroténoïdes dans les lipoprotéines de haute densité (HDL) pourrait provenir des tissus extra-hépatiques et une faible proportion serait d'origine intestinale (Faure *et al.*, 1999). La répartition des caroténoïdes dans les lipoprotéines varie selon la nature des caroténoïdes et 58-75 % de l' α -carotène, du β -carotène et du lycopène se trouvent dans les LDL tandis que 53 %

de la lutéine et de la zéaxanthine sont dans les HDL. La β -cryptoxanthine est distribuée de manière égale entre LDL et HDL (Romanchik *et al.*, 1995).

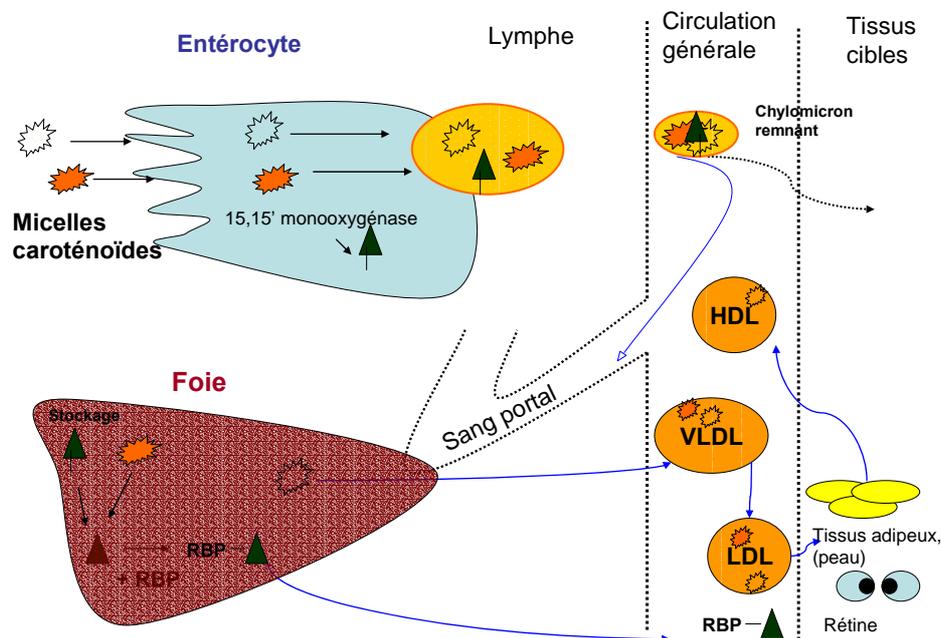


Figure 4. Absorption intestinale et métabolisme des caroténoïdes

Légende:

-  Caroténoïde non-provitaminique
-  Caroténoïde provitaminique
-  Ester de rétinol
-  Rétinol
-  RBP—Rétinol Binding Protein + Rétinol

HDL: High density lipoprotein

VLDL: Very low density lipoprotein

LDL: Low density lipoprotein

Les caroténoïdes provitaminiques qui sont clivés dans le foie, peuvent être stockés dans des gouttelettes lipidiques ainsi que leurs métabolites. Le rétinol est transporté des cellules hépatiques vers la circulation générale par la RBP (*retinol binding protein*) qui assurera sa distribution aux tissus cibles (Blomhoff *et al.*, 1992).

3.1.3 Biodisponibilité chez l'homme

Les nombreux facteurs influençant la biodisponibilité des caroténoïdes rassemblés sous l'acronyme SLAMENGI (de Pee & West, 1996) sont les suivants : S pour *species of*

carotenoids (type de caroténoïde), L pour *molecular Linkage* (esters de caroténoïde), A pour *Amount of carotenoids consumed in the meal* (dose ingérée pendant le repas), M pour *Matrix in which the carotenoid is incorporated* (matrice dans laquelle le caroténoïde est incorporé), E pour *Effectors of absorption and bioconversion* (pour tenir compte des nutriments ou médicaments qui peuvent affecter l'absorption), N pour *Nutrient status of the host* (statut en vitamin A ou caroténoïde de l'individu), G pour *Genetic factors* (qui prend en compte les facteurs génétiques), H pour *Host-related factors* (facteurs liés à l'hôte : âge, sexe, pathologies) et I pour *mathematical Interactions* (Synergie entre les différents facteurs).

Diverses méthodologies peuvent être utilisées pour déterminer la biodisponibilité des caroténoïdes chez l'homme. La plupart des études mesurent la réponse dans le plasma suite à l'ingestion d'une dose connue ou plus précisément dans des différentes fractions plasmatiques comme dans les lipoprotéines riches en triacylglycérols (TRL) (van Vliet *et al.*, 1996) ou les chylomicrons (Faulks & Southon, 2005). Cependant, la mesure de la concentration plasmatique seule ne serait pas le meilleur indicateur du statut en caroténoïde car cette concentration est le reflet de multiples mécanismes que sont l'absorption, le stockage, l'utilisation, la bioconversion et le stockage. En revanche, la mesure dans les chylomicrons ou fraction TRL ne représente pas les caroténoïdes stockés ou re-exportés par le foie (Faulks & Southon, 2005).

3.1.3.1 Biodisponibilité suivant le type de caroténoïde

Suivant le type de caroténoïde, la biodisponibilité peut être différente ; chez l'homme la biodisponibilité des xanthophylles est plus élevée que celle du β -carotène. A partir de suppléments identiques, la lutéine et la zéaxanthine s'incorporeraient mieux dans les chylomicrons que le β et l' α -carotène (Gartner *et al.*, 1996). Après une alimentation riche en légumes, la biodisponibilité de la lutéine représenterait 67 %, alors que celle du β -carotène serait de 14 %, soit environ 5 fois moins élevée (van het Hof *et al.*, 1999). Dans cette dernière étude, pour s'affranchir de l'effet matrice la mesure de la biodisponibilité relative est déterminée en comparant la réponse plasmatique obtenue après ingestion d'aliment et celle obtenue à partir de suppléments. Castenmiller & West (1998) démontrent que la biodisponibilité de la lutéine est supérieure à celle du β -carotène après ingestion d'épinards, et que si la dissolution de la matrice (destruction des parois végétales) augmente la

biodisponibilité du β -carotène, elle n'a aucun effet sur celle de la lutéine qui est toujours trouvée supérieure à celle du β -carotène. La biodisponibilité relatée dans ces différentes études est représentative de plusieurs phénomènes : l'incorporation dans les micelles, le transport entérocytaire et l'inclusion dans les chylomicrons.

Les différentes formes isomériques des caroténoïdes peuvent aussi influencer la biodisponibilité. Les nombreuses études sur le β -carotène sont contradictoires, certaines indiquent que la forme 9-*cis* est mieux absorbée que la forme *trans* (You *et al.*, 1996), d'autres rapportent le contraire (Stahl *et al.*, 1995). Dans la première étude, les auteurs suggèrent qu'il existerait une isomérisation *cis-trans in vivo* car après ingestion d'une forme 9-*cis* marquée isotopiquement, 95 % du β -carotène retrouvé est sous forme *trans*. La même hypothèse est formulée pour le lycopène, après ingestion de tomates où le lycopène est majoritairement sous la forme *trans*, cette forme ne représente plus que 50 % dans le plasma (Stahl *et al.*, 1992). Même si l'isomère *cis* est théoriquement plus soluble dans les lipides et s'incorpore mieux dans les chylomicrons (Boileau *et al.*, 1999), la concentration de formes *cis* dans le plasma ne proviendrait pas uniquement de l'apport alimentaire.

3.1.3.2 Cas des esters de xanthophylles

Les xanthophylles sont sous forme estérifiée dans la plupart des fruits de couleur orange que nous consommons (abricot, papaye, orange, mandarine, pêche) (Breithaupt & Bamedi, 2001). Les agrumes occupent une place spéciale pour leurs teneurs en β -cryptoxanthine estérifiée dans l'alimentation des populations à cause de leur consommation importante en particulier sous forme de jus. La β -cryptoxanthine avec le β et l' α -carotène, le lycopène et la lutéine représentent un taux supérieur à 90 % des caroténoïdes circulant dans le plasma humain (Rock, 1997). Il est généralement admis que les esters sont hydrolysés dans l'estomac avant absorption intestinale. La première étude sur le sujet est celle de Wingerath *et al.* (1995) qui démontre que si la forme libre de la β -cryptoxanthine est largement détectée dans les chylomicrons (avec un pic maximum à $t=6$ h et 9h) et le sérum, les esters, eux, ne sont pas retrouvés dans le plasma après ingestion de jus de mandarine. Une autre étude plus récente compare la biodisponibilité des esters de β -cryptoxanthine à celle des formes libres après consommation de quantités égales d'extrait de papaye (Breithaupt *et al.*, 2003). Les auteurs concluent à une biodisponibilité équivalente pour les deux formes et à l'existence d'un

clivage enzymatique dans la lumière intestinale acceptant les esters de β -cryptoxanthine comme substrats. Le même type d'étude avait été réalisé avec la lutéine et ses esters par Bowen *et al.* (1997) amenant à la même conclusion et suggérant une remarquable efficacité enzymatique de l'hydrolyse des esters. Cependant, une seule étude mentionne la présence d'ester de lutéine dans le plasma humain après supplémentation (Granado *et al.*, 1998). Dû à l'excès de la quantité d'ester de lutéine dans les formes supplémentées, les auteurs suggèrent un effet de saturation du transport des xanthophylles conduisant à une possible ré-estérification *in vivo*. Cette hypothèse a été également proposée suite à l'identification d'esters de xanthophylles dans les tissus de la peau (Wingerath *et al.*, 1998).

Notons par ailleurs, que les esters de xanthophylles sont des composés très liposolubles par rapport aux formes libres, et que leur diffusion des émulsions lipidiques vers les micelles est plus difficile et donc peut affecter la biodisponibilité. Ainsi, il a été démontré que la biodisponibilité des esters de lutéine à partir de supplément (caroténoïde solubilisé dans l'huile) était plus élevée (62 %) que pour la lutéine libre solubilisée dans le même type de supplément (Bowen *et al.*, 2002).

3.1.3.3 Biodisponibilité suivant la matrice

La libération des caroténoïdes de leur matrice alimentaire constitue la première étape de l'absorption des caroténoïdes. L'importance de la matrice a été confirmée dans plusieurs études (Castenmiller *et al.*, 1998; van het Hof *et al.*, 1999 ; Edwards *et al.*, 2002). Le β -carotène présente une biodisponibilité qui varie de 3 à 6 % pour les épinards, 22 à 24 % pour les brocolis et 19 à 34 % pour les carottes (van Het Hof *et al.*, 2000). Le β -carotène et le rétinol seraient davantage biodisponibles à partir de fruits que de légumes verts (de Pee *et al.*, 1998). Ces différences sont dues à la localisation intracellulaire des caroténoïdes. Dans les feuilles, ils sont localisés dans les chloroplastes et fortement liés à des complexes "pigment-protéines" souvent associés aux membranes des thylakoïdes. Dans les fruits, suite à la maturation, les chloroplastes font place aux chromoplastes où les caroténoïdes sont insérés dans des gouttelettes lipidiques. Souvent les xanthophylles sont estérifiées dans les fruits, ce qui les rend plus solubles dans les lipides (Britton, 1998). Dans les carottes, les caroténoïdes sont sous forme cristalline, ce qui implique une dissolution très lente des pigments bien qu'ils ne soient pas liés aux protéines comme dans les légumes-feuille. La faible biodisponibilité des

caroténoïdes des légumes "feuille" comparée aux fruits peut être attribuée au fait que les caroténoïdes des chloroplastes sont moins bien libérés que ceux des chromoplastes lors des étapes pré-absorptives.

3.1.3.4 Biodisponibilité des caroténoïdes en fonction de l'apport d'autres nutriments

La seconde étape qui peut affecter la biodisponibilité des caroténoïdes après la libération de leur matrice végétale est l'incorporation dans les micelles. La formation de ces micelles est dépendante de la présence de lipides. Ces derniers facilitent l'absorption des caroténoïdes, d'une part en stimulant la sécrétion biliaire ce qui augmente ainsi la quantité de micelles pouvant solubiliser les caroténoïdes et d'autre part en participant à la formation des chylomicrons et donc à l'évacuation des caroténoïdes de l'intérieur de l'entérocyte vers la lymphe (Borel *et al.*, 2005). Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer la quantité de graisses alimentaires du repas nécessaire à leur absorption (Brown *et al.*, 2004 ; Hu *et al.*, 2000; Roodenburg *et al.*, 2000). Concernant les carotènes, cette quantité se limiterait à quelques grammes (approximativement 3-5 g) (Ribaya-Mercado, 2002) alors que pour les esters de lutéine cette quantité serait nettement supérieure (Roodenburg *et al.*, 2000). Certains auteurs se sont intéressés à l'influence du type de lipides sur l'absorption du β -carotène (Hu *et al.*, 2000). Les sujets ont consommé du β -carotène avec un repas riche en huile de tournesol (acides gras poly-insaturés) et un repas riche en graisse de bœuf (acides gras saturés). Les résultats montrent que la réponse en β -carotène dans les lipoprotéines riches en triacylglycérols (chylomicrons plus une partie des VLDL) est augmentée avec la graisse de bœuf et diminuée de 38 % avec l'huile de tournesol. Auparavant Borel *et al.* (1998b), avaient montré que la réponse postprandiale en β -carotène est augmentée quand celui-ci est ingéré avec des triglycérides à chaîne longue plutôt qu'avec des triglycérides à chaîne moyenne.

Les fibres alimentaires comme les pectines, guar ou alginate peuvent gêner l'absorption du β -carotène, du lycopène et de la lutéine (Riedl *et al.*, 1999). Elles pourraient agir en affectant la formation de micelles, en inhibant l'activité des lipases digestives et en augmentant le volume du milieu.

Les caroténoïdes peuvent entrer en compétition les uns avec les autres soit au niveau de l'incorporation dans les micelles, soit au niveau de l'absorption dans l'entérocyte ou dans les

chylomicrons. Les carotènes et les xanthophylles semblent interagir les uns avec les autres. Kostic *et al.* (1995) ont étudié les interactions entre la lutéine et le β -carotène durant l'absorption intestinale mais les réponses individuelles varient de façon importante. Par la suite, les travaux de Tyssandier *et al.* (2002) ont confirmé que la lutéine pouvait affecter l'absorption du β -carotène. D'une manière générale, les auteurs concluent qu'ajouter un second caroténoïde lors d'un repas contenant un premier caroténoïde diminuerait la concentration de ce dernier dans les chylomicrons en période postprandiale, sans que cela n'affecte sa concentration plasmatique à moyen terme.

3.1.3.5 Biodisponibilité suivant l'individu

L'absorption des caroténoïdes est probablement liée au statut de l'individu. La génétique, l'âge, le sexe, le statut nutritionnel, ou les pathologies sont des facteurs susceptibles de modifier la biodisponibilité des caroténoïdes. De grandes variabilités inter-individuelles ont été constatées pour la conversion du β -carotène en vitamine A (Lin *et al.*, 2000). Cette variabilité qui qualifie les individus de "répondeurs" et "non répondeurs" suivant s'il y a une réponse plasmatique suite à l'ingestion de β -carotène, serait dû à l'efficacité du captage intestinal et du métabolisme des chylomicrons (Borel *et al.*, 1998a). Par ailleurs, contrairement à ce qui était attendu, une étude plus récente chez l'homme indique qu'une supplémentation en vitamine A, en impliquant une réduction du clivage du β -carotène, aboutit à une augmentation de l'absorption du β -carotène (Lemke *et al.*, 2003).

Le sexe influence également la biodisponibilité sachant que les femmes ont des concentrations plasmatiques en caroténoïdes généralement plus élevées que les hommes. En effet, il est connu depuis longtemps que les hormones féminines affectent le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Berr & Kern, 1984). Par rapport à l'âge, il a été rapporté que l'absorption du lycopène semblait être affectée par l'âge mais aucune différence n'a été constatée pour l' α , le β -carotène ou la lutéine (Cardinault *et al.*, 2003). Enfin notons que les sujets présentant des maladies digestives notamment des malabsorptions lipidiques sont susceptibles de malabsorber les caroténoïdes (Borel, 2003).

3.1.4 Les modèles "in vivo" et "in vitro"

3.1.4.1 Les modèles animaux ("in vivo")

L'homme partage avec le furet, le veau pré-ruminant, et la gerbille la faculté d'absorber les caroténoïdes intacts (Lee *et al.*, 1999). Ces animaux représentent donc des modèles de choix dont le métabolisme de la vitamine A est proche de celui de l'homme contrairement aux rats. Chez les rats les caroténoïdes provitaminiques sont convertis en vitamine A directement pendant l'ingestion. Cependant, ce type de modèle est très utile pour étudier les pathologies de déficience en vitamine A.

Pour des raisons évidentes d'encombrement et surtout du coût qu'ils représentent, l'utilisation des veaux pré ruminants est peu fréquente, celle des furets et des gerbilles par contre est plus courante. La petite taille de ces animaux facilite en outre les perfusions des segments intestinaux *in vivo* (Wang, 1994). De plus, grâce au furet, qui est un animal modèle pour le métabolisme de la vitamine A, une étude récente a permis d'identifier les produits de clivage excentrés tels que l'apo-10'-caroténal et l'apo-10'-lycopénal induits par l'enzyme carotène-9'-10'-monooxygénase (Hu *et al.*, 2006). Des études utilisant les furets et les gerbilles ont permis de montrer l'effet de certains composants des aliments et les différences d'absorption des isomères du β -carotène sur la biodisponibilité de la vitamine A (Deming *et al.*, 2002). Même si ces modèles animaux présentent quelques différences de métabolisme comparé à l'organisme humain, ils sont cependant indispensables pour la recherche de mécanisme de la bioconversion de la vitamine A.

3.1.4.2 Les modèles "in vitro" acellulaires

Le modèle acellulaire est un modèle de digestion *in vitro* qui permet de mimer les conditions gastriques et duodénales lors de l'étape digestive d'un aliment. Ce type de modèle permet de déterminer la bioaccessibilité des caroténoïdes d'un aliment c'est-à-dire la proportion de caroténoïdes transférée de la matrice alimentaire dans laquelle ils sont incorporés, vers les micelles mixtes, formes théoriquement absorbables par l'entérocyte. Le mécanisme de la formation des micelles mixtes est reporté sur la Figure 5.

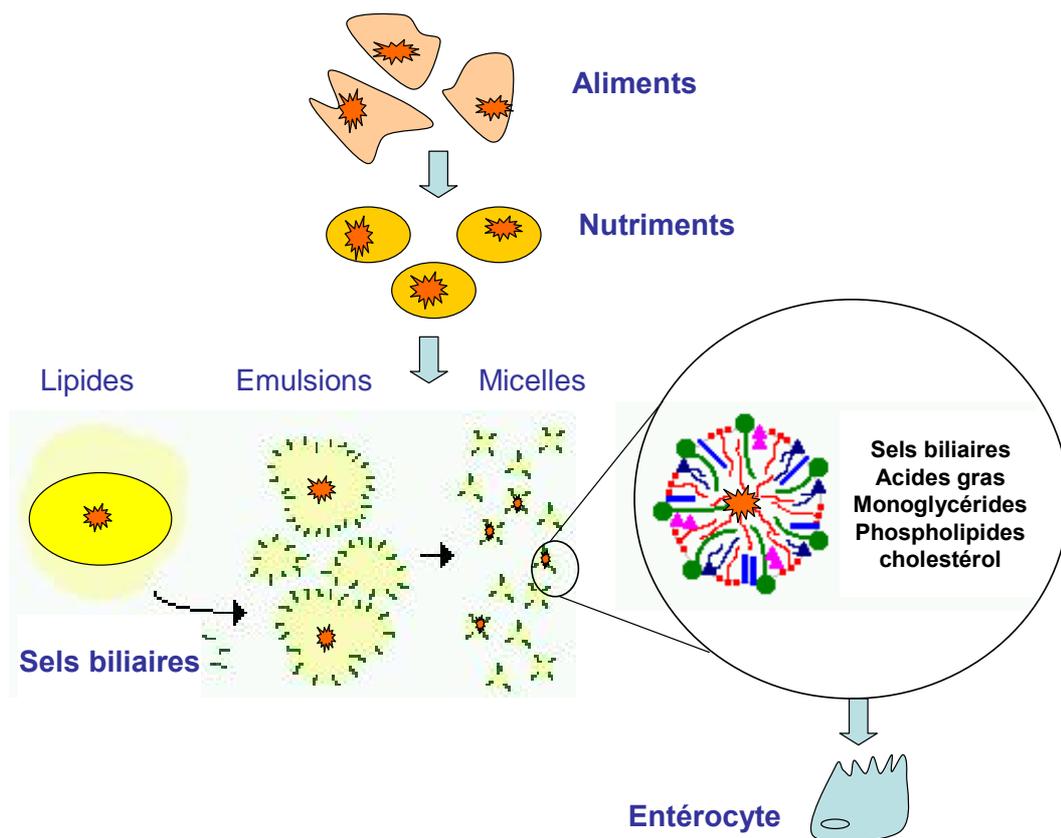


Figure 5. Transfert des caroténoïdes de la matrice alimentaire aux micelles mixtes.

Légende :  Caroténoïde

Depuis l'étude de Garrett en 1999, qui a développé un modèle de digestion *in vitro* pour déterminer la bioaccessibilité des caroténoïdes (transfert micellaire) à partir d'un repas, d'autres études ont suivi sans toutefois vérifier le choix des paramètres physiologiques tels que le pH, la concentration en sels biliaires et les temps d'incubation par rapport au métabolisme humain (Garrett *et al.*, 1999a ; Ferruzzi *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2004 ; Chitchumroonchokchai *et al.*, 2004). Ces études ont cependant permis de mettre en évidence l'importance de la matrice dans la micellarisation des caroténoïdes ainsi que la différence de micellarisation entre les différents types de caroténoïde (particulièrement entre carotènes et xanthophylles). Une étude récente de Reboul *et al.* (2006) rapporte une optimisation des conditions du modèle en se référant aux données physiologiques humaines. D'après les données observées par Tyssandier *et al.* (2001) le pH du milieu gastrique a été ramené à 4 et non à 2 comme dans l'étude initiale de Garrett *et al.* (1999) car après ingestion d'un repas riche en légumes, le pH mesuré est compris entre 3 et 5,8. De même, le pH du milieu

duodéal a été ramené à 6 au lieu de 7,5 toujours en accord avec le pH mesuré au cours de la digestion. La concentration en sels biliaires a été augmentée pour pouvoir micellariser le lycopène. La durée de l'incubation dans les conditions duodénales a été proposée à 30 minutes au lieu de 2h, car ce temps plus court correspond au temps de transit d'une particule alimentaire dans le duodénum humain au cours de la digestion (Bernier *et al.*, 1988). Enfin la composition du repas a été modifiée de façon à apporter des macronutriments en accord avec les apports journaliers.

D'une manière générale la micellarisation des caroténoïdes, qui est l'étape clé de ce modèle, est supérieure (>) pour la lutéine > β -carotène = α carotène > lycopène. Les pourcentages de micellarisation de la lutéine, du β -carotène et du lycopène après digestion *in vitro* d'un repas à base de carottes, épinards et de sauce tomate sont de 30, 16 et 3 % respectivement (Garrett *et al.*, 2000). Ces résultats semblent directement dépendre de l'hydrophobicité des caroténoïdes, les plus polaires étant ceux transférés le plus facilement dans les micelles (Tyssandier *et al.*, 2001). Les carotènes très apolaires seraient préférentiellement localisés au cœur des gouttelettes lipidiques alors que les xanthophylles seraient plutôt localisées à la surface au niveau des phospholipides (Borel *et al.*, 1996). Le transfert des carotènes des émulsions lipidiques aux micelles serait plus difficile que pour les xanthophylles ce qui expliquerait que les carotènes soient en compétition avec d'autres caroténoïdes (Tyssandier *et al.*, 2001). La matrice alimentaire joue un rôle important dans le processus de micellarisation des caroténoïdes. La lutéine incorporée dans des suppléments (capsules huileuses) est mieux micellarisée que la lutéine provenant d'épinards (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2004). Cette efficacité est probablement due à l'absence de facteurs limitant le transfert de la lutéine des chloroplastes vers les émulsions lipidiques.

Par ailleurs, très peu de données concernent la micellarisation des esters de xanthophylles. Une seule étude rapporte qu'après une simulation de digestion, la micellarisation de la zéaxanthine est de 81 % pour la zéaxanthine libre, et de 44, et 11 % pour les monoesters et les diesters de zéaxanthine. Dans ces travaux, les auteurs ont ajouté de la carboxyl ester lipase (cholestérol estérase), une enzyme issue du pancréas, qui permet en hydrolysant les esters d'améliorer le pourcentage de micellarisation (Chitchumroonchokchai & Failla, 2006).

Pour résumer, les résultats de ces expérimentations utilisant des modèles de digestion *in vitro* indiquent que la micellarisation des caroténoïdes, étape clé pour l'absorption de ces

nutriments, est fortement influencée par la matrice des aliments et varie suivant la nature des caroténoïdes. L'efficacité de la micellarisation des caroténoïdes provenant d'aliments va également influencer l'absorption au niveau des cellules intestinales.

3.1.4.3 Le modèle "in vitro" cellulaire de type Caco-2

Les modèles cellulaires de type Caco-2 sont couramment utilisés en couplage avec les modèles de digestion *in vitro* pour évaluer l'absorption ou le transport des caroténoïdes. La lignée cellulaire Caco-2 est issue d'un adénocarcinome humain. Cette lignée cancéreuse colique a la particularité de se différencier, dans des conditions de culture normale, en monocouche cellulaire ressemblant à un épithélium intestinal. Après 20 jours de culture, les cellules se différencient et se polarisent, 10 jours plus tard, elles deviennent cylindriques avec une bordure en brosse au pôle apical formée de microvillosités organisées en plateau strié (Pinto *et al.*, 1983). Ces cellules expriment des activités de type hydrolase caractéristique des entérocytes incluant le complexe sucrase-isomaltase, les lactases, aminopeptidases ou la phosphatase alcaline (Hauri *et al.*, 1985 ; Rousset *et al.*, 1985). De plus, une série de transporteurs a été mise en évidence dans les cellules Caco-2 tels que les transporteurs de glucose (SGLT-1, GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-5), d'acides aminés (PepT1), de lipides (SR-B1, NPC1L1) ou encore les transporteurs ABC. Ces transporteurs ABC regroupés sous le terme de "*Multidrug Resistance Protein*" permettent l'efflux hors des cellules ou le transport intracellulaire de toute une diversité de composés incluant les lipides, protéines, sucres et les xénobiotiques (Baron-Delage *et al.*, 1996 ; Gutmann *et al.*, 1999 ; Behrens *et al.*, 2004 ; Peretti *et al.*, 2007 ; Duval *et al.*, 2006).

Comme cela a été dit précédemment, le transport des caroténoïdes peut être facilité par l'implication de transporteurs. Reboul *et al.*, (2005b) ont montré que le transporteur SR-B1 permettait, en partie, l'absorption de la lutéine par les cellules Caco-2 (clone TC7). La protéine intestinale SR-B1 est impliquée dans le transport des lipides plus particulièrement du cholestérol de même que NPC1L1 ou encore ABCA1 (Werder *et al.*, 2001 ; Altmann *et al.*, 2004). Ces transporteurs sont donc des candidats potentiels pour le transport des micronutriments lipophiles comme les caroténoïdes. A ce sujet, During *et al.* (2005) ont montré une diminution de la vitesse d'absorption des caroténoïdes parallèlement à la baisse du niveau des ARN messagers des transporteurs (SR-B1, NPC1L1, ABCA1). Les auteurs

suggèrent que ces trois transporteurs de cholestérol jouent un rôle dans le transport intestinal des caroténoïdes.

Les cellules Caco-2 sont également capables d'assembler et de sécréter des chylomicrons à condition de les compléter en acide oléique et taurocholate (Luchoomum & Hussain, 1999). De plus, la présence de l'enzyme de clivage du β -carotène dans deux clones (PF11 et TC7) de la lignée parentale permet d'étudier la bioconversion des caroténoïdes provitaminiques en vitamine A (During & Harrison, 2004). L'activité de cette enzyme est stimulée par les sels de fer et inhibée en présence de chélateurs de fer (During *et al.*, 2001).

L'absorption entérocytaire des caroténoïdes par les Caco-2 semble varier suivant le type de caroténoïde. Le β -carotène serait le mieux absorbé, suivi de la lutéine et du lycopène (During *et al.*, 2002 ; Garrett *et al.*, 1999b ; Sugawara *et al.*, 2001). La sélectivité observée entre ces différentes molécules suggère l'existence de mécanismes de captage spécifiques au niveau de l'entérocyte. Le captage préférentiel du β -carotène par rapport à la lutéine a été observé dans des études couplant la digestion *in vitro* aux cellules Caco-2 (Garrett *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2004). Borel *et al.*, (1996) suggèrent que la forme émulsifiée du β -carotène est plus stable, comparativement à un composé plus polaire, et donc plus facilement captée par la bordure en brosse de l'entérocyte. Garrett *et al.* (1999b) propose plutôt une interaction entre caroténoïdes. L'absorption des isomères *cis* du β -carotène a été également étudiée sur cellules Caco-2 mais les résultats sont divergents. During *et al.* (2002) ont montré que l'absorption du *trans*- β -carotène était environ 5 fois supérieure à celles des isomères 9- et 13-*cis*. Par contre, Ferruzzi *et al.*, (2006) indiquent que si l'isomère *cis* du β -carotène est généralement mieux micellarisé que la forme *trans*, son absorption au niveau des cellules Caco-2 serait similaire à la forme *trans*. Ces différences sont probablement dues aux types de micelle utilisés. Dans un cas les micelles artificielles sont préparées avec du Tween 20, qui est un détergent, dans l'autre les micelles physiologiques issues de la digestion *in vitro* requièrent la présence de sels biliaries.

Une seule étude donne une estimation de l'absorption des esters de xanthophylles par les cellules Caco-2. D'après Chitchumroonchokchai *et al.* (2006), les monoesters de zéaxanthine sont captés par les cellules Caco-2 mais cependant moins que la forme libre, laquelle est prédominante. Ces monoesters représentent 6 % de la quantité initiale du milieu. Cependant, suivant le type de micelle, qu'elles proviennent de digestion *in vitro* (micelles physiologiques)

ou de composés purs (micelles synthétiques), les quantités de caroténoïdes absorbées peuvent être différentes (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2004). Ces différences sont certainement dues à la structure ou à la composition des micelles. La composition de la micelle peut également influencer l'absorption du caroténoïde par la cellule. Les micelles contenant de la lysophosphatidylcholine augmentent l'absorption du β -carotène et de la lutéine comparativement avec celle des micelles contenant de la phosphatidylcholine (Sugawara *et al.*, 2001).

Le transfert des caroténoïdes du pôle apical au pôle basolatéral caractérise le mécanisme de sécrétion et de transport des caroténoïdes. Après être absorbés dans l'entérocyte, les caroténoïdes sont incorporés dans les chylomicrons. Cette incorporation dépend de la spécificité des caroténoïdes dont l'ordre est le suivant β -carotène > xanthophylle > lycopène (During *et al.*, 2002). Chitchumroonchokchai *et al.* (2004) ont montré qu'après absorption de lutéine par les cellules Caco-2, 7 % de la lutéine retrouvée dans le compartiment basolatéral était sécrété dans les chylomicrons dont la fraction lipoprotéique riche en triacylglycérol contenait 98 % de la lutéine. Les mêmes auteurs ont étudié l'absorption par les Caco-2 d'un mélange de zéaxanthine libre et estérifiée ; ils ont montré que seule la forme libre est détectée dans le pôle basolatéral et que 4 % sont transférés dans la fraction riche en triacylglycérol (Chitchumroonchokchai et Failla, 2006). Les auteurs suggèrent que les Caco-2 ne sont pas capable d'hydrolyser les esters de zéaxanthine. Dans cette étude, la faible quantité de zéaxanthine transférée dans les chylomicrons est en accord avec l'estimation de l'absorption de 3,3 % pour 5 mg de zéaxanthine administrés à des sujets humains (Breithaupt *et al.*, 2004).

De plus, les cellules Caco-2 sont également capables de synthétiser des esters de rétinol (Nayak *et al.*, 2001). Cet auteur a montré que la sécrétion d'esters de rétinol par les cellules est spécifiquement régulée par l'assemblage des chylomicrons dans des conditions post-prandiales. Après incorporation de rétinol radioactif à des micelles synthétiques contenant de l'acide oléique et du taurocholate, la présence d'esters de rétinol a été confirmée dans la fraction riche en triacylglycérol du milieu basolatéral (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2004). D'autres études *in vitro* seraient nécessaires pour compléter l'estimation de la biodisponibilité des caroténoïdes provitaminiques chez l'homme car de nombreux mécanismes sont encore inconnus.

D'une manière générale, les études sur la biodisponibilité des caroténoïdes par des modèles *in vitro* sont peu nombreuses. De plus, les méthodologies utilisées sont la plupart du temps différentes ce qui rend difficile toute comparaison. Pour exposer les cellules Caco-2 à

des caroténoïdes, 4 types de micelles ont été répertoriés. Les micelles dites synthétiques sont fabriquées à partir de Tween 40, à partir de DMSO (Liu *et al.*, 2004), ou encore à partir d'une composition lipidique (phospholipides, acide gras, cholestérol, taurocholate) ce qui se rapproche le plus des conditions physiologiques. A ce type de micelles se rajoutent les micelles dites physiologiques issus de la digestion *in vitro* faites à partir de sels biliaires. La structure moléculaire, la taille et le nombre de micelles sont des facteurs qui doivent contribuer aux différences d'absorption des caroténoïdes rapportées dans différentes études.

Les modèles *in vitro* acellulaires ont permis d'expliquer les mécanismes régulant la micellarisation des caroténoïdes suivant différents facteurs. Ces modèles ont pu être complétés par des modèles cellulaires pour comprendre les phénomènes d'absorption et de transport des caroténoïdes au niveau de l'entérocyte. Cependant, d'autres données concernant l'absorption et le transport seraient nécessaires pour approfondir les connaissances dans ce domaine. Bien que les modèles *in vitro* soient limités, car ils ne tiennent pas compte de la dynamique observée *in vivo*, ils restent indispensables pour élucider certaines étapes du métabolisme humain.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1 Matériel végétal

1.1 Choix des variétés et espèces

Les agrumes proviennent de la Station de Recherche Agronomique (SRA) de l'INRA de San Giuliano située sur la côte orientale de la Corse (latitude 42°27', longitude 9°32'). Cette région est caractérisée par un climat méditerranéen (moyenne des précipitations : 840 mm par an, température de 15,2°C) et un sol acide (pH 5 environ) constitué d'alluvions.

Les variétés choisies appartiennent au genre *Citrus* et font partie de différents groupes (orangers, mandariniers, clémentiniers, et citronniers). Le Tableau 8 décrit les génotypes et les porte-greffes utilisés.

Les fruits ont été récoltés à maturité, durant les saisons 2002-2003 ; 2003-2004 ; 2004-2005. L'indice de maturité est le paramètre couramment utilisé qui correspond au rapport du degré brix (% des sucres solubles) sur l'acidité titrable (% d'acide citrique des jus). Ce rapport se situe entre 7 et 10 pour les oranges et entre 10 et 14 pour les mandarines et clémentines. Pour le citron Meyer, l'indice de maturité n'est pas un bon indicateur car la teneur en sucres augmente peu et l'acidité diminue peu au cours de la maturation. Une acidité titrable de 5g/100 ml d'acide citrique est retenue comme indicateur de maturité. Les mandarines Wilowleaf (d'origine méditerranéenne) et les clémentines communes représentent la principale production de "petits agrumes" en Corse. Les variétés d'orange ont été choisies car ce sont les cultivars les plus utilisés pour la fabrication des jus dans le monde (Salustiana pour l'Espagne ; Hamlin pour la Floride ; Shamouti pour l'Israël ; Pera pour le Brésil et Valencia que l'on retrouve dans tous les pays producteurs). La variété Cara-Cara appartient au groupe des oranges Navel. Egalement appelée "Red Navel", c'est la seule et unique orange contenant du lycopène.

Le citron Meyer, a une origine particulière, c'est probablement un hybride entre un citron et une mandarine, ce qui lui donne une couleur de pulpe jaune-orangé. Ce citron a la

particularité de contenir du β -carotène et de la β -cryptoxanthine, caroténoïdes généralement absents du groupe des citronniers.

Tableau 8. Génotypes des agrumes étudiés

| Nom vulgaire | Nom taxonomique | N° SRA | Porte-greffe ^a | Origine/lieu de production |
|--------------------------|---|---------|---------------------------|----------------------------|
| Groupe des orangers | | | | |
| Orange Salustiana | <i>Citrus sinensis</i> (L.) | SRA 508 | PP | Espagne |
| Orange Hamlin | <i>Osbeck</i> | SRA 41 | PP | Brésil-Floride |
| Orange Shamouti | " | SRA 538 | PP | Israël |
| Orange Pera | " | SRA 399 | PP | Brésil |
| Orange Valencia | " | SRA 246 | PP | Espagne |
| Orange Maltaise | " | SRA 560 | PP | Tunisie |
| Orange Sanguinelli | " | SRA 243 | PP | Italie |
| Orange Cara-Cara Navel | " | SRA 666 | PP | Espagne |
| Groupe des mandariniers | | | | |
| Mandarine Wilowleaf | <i>Citrus deliciosa</i> Ten. | SRA 133 | PP | Méditerranée |
| Mandarine Hansen | <i>Citrus Reticulata blanco</i> | SRA 356 | PP | " |
| Groupe des clémentiniers | | | | |
| Clémentine Commune | <i>Citrus clementina</i> Hort. Ex Tan. | SRA 85 | CC | Méditerranée |
| Groupe des citronniers | | | | |
| Citron Meyer | <i>Citrus meyeri</i> Yu. Tanaka | SRA 549 | Big | N. Zélande |

^aPP : *Poncirus trifoliata* Pomeroy ; CC : Citrange Carrizo ; Big : Bigaradier

Les agrumes tropicaux correspondant à la collection SRA proviennent de Nouvelle Calédonie (Station de Pocquereux-Institut Agronomique néo-Calédonien) et de Tahiti (collection de Papuakeikaha île de UA HUAKA Marquises). Les variétés d'oranges choisies sont Valencia et Sanguinelli (SRA 246 et SRA 243), les mandarines et clémentines sont les

variétés dites communes (SRA 133 et SRA 85). D'autres oranges tel que Valencia et Pera proviennent des marchés locaux du Costa-Rica et du Brésil.

1.2 Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon a été déterminée en analysant la variabilité intra-lot sur 10 oranges. Le lycopène de la variété *Cara-cara* a été dosé dans 10 fruits. La moyenne des concentrations en lycopène obtenue est de $1,83 \pm 0,41$ mg/L et le coefficient de variation de 22,30 %. D'après la revue statistique de l'ITCF (Philippeau, 1979) : pour une différence choisie de 0,45 par rapport à la moyenne $\Delta = 0,45/1,83 = 24,59$ %

$$\Delta/CV = 24,59/22,30 = 1,10$$

La valeur d'abscisse 1,10 est reportée sur une abaque avec un risque α de 0,05 et une valeur de β de 0,20, la valeur correspondante de l'ordonnée nous donne la taille n de l'échantillon qui est égale à 15 oranges. Les mandraines représentant des fruits plus petits que les oranges, la taille d'échantillon a été extrapolée à 30 fruits.

Les lots de 15 fruits de calibre homogène proviennent de trois arbres. La récolte se fait tout autour de l'arbre, extérieure à la frondaison suivant les quatre points cardinaux. Après réception, les fruits sont immédiatement pressés avec un presse agrume à main, filtrés sur un tamis (maille 1 mm), et stockés sous azote à -20°C dans des flacons ambrés de 15 ml.

2 Quantification des caroténoïdes

2.1 Extraction des caroténoïdes à partir des jus d'agrumes

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée suivant la méthode de Taungbodhitham *et al.* (1998) adaptée pour le jus d'agrumes. 20g de jus d'agrumes sont homogénéisés sur agitateur magnétique avec 120 mg de MgCO_3 et 35 ml du mélange de solvant (éthanol/hexane, 4 :3 v/v, contenant 0,1 % de BHT) pendant 5 minutes. Une quantité de solution étalon de lycopène (correspondant à 90 μg) ou de β -apo-8'-caroténal (correspondant à 12 μg) est ajoutée en tant qu'étalon interne suivant que l'on saponifie ou pas l'échantillon. Le résidu est séparé de la phase liquide par filtration au moyen d'un entonnoir en verre fritté de porosité 2 et ré-extrait par 35 ml du mélange de solvant précédent. 30 ml d'éthanol suivi de 30 ml d'hexane sont utilisés pour laver le résidu. La phase liquide est transférée dans une ampoule à décanter,

puis lavée avec 50 ml de NaCl (10 %) et 2 fois 50 ml d'eau distillée. La phase aqueuse est éliminée, alors que la phase organique est séchée avec du sulfate de sodium anhydre avant d'être évaporée à sec au moyen d'un évaporateur rotatif à 40°C. Les extraits sont repris dans 500 µl de dichlorométhane et 500 µl de mélange (80/20 v/v ; MTBE et méthanol). Les solutions sont diluées 6 fois avant d'être analysées par HPLC.

Pour la saponification, les extraits secs évaporés sont redissous avec 20 ml d'hexane dans un flacon de 50 ml auquel sont ajoutés 20 ml de solution de KOH méthanolique à 10 %. La saponification a lieu dans des flacons bouchés sous azote à température ambiante et sous agitation magnétique, pendant 16 h à l'abri de la lumière. Le mélange saponifié est versé dans une ampoule à décanter avec 50 ml d'eau distillée ajoutés pour le déphasage. Les phases hexaniques sont lavées à neutralité. Les phases méthanoliques sont extraites 3 fois avec 15 ml de dichlorométhane. Les extraits purifiés par le dichlorométhane sont rassemblés, puis lavés à neutralité, séchés, évaporés et dilués comme précédemment.

2.2 Extraction des caroténoïdes après digestion *in vitro* des jus d'agrumes

Une quantité de 10 ml de jus digéré est extraite avec 3 fois 10 ml d'hexane (contenant 0,1 % de BHT) et 5 ml d'éthanol (contenant 100 µl de lycopène étalon, équivalent à 12 µg). La phase organique récupérée est séchée, et évaporée à sec grâce à un évaporateur rotatif à 40°C. Sans saponification, les extraits sont évaporés et dissous dans 250 µl de dichlorométhane et 250 µl du mélange (80/20 v/v ; MTBE et méthanol). Avec saponification, les extraits hexaniques sont évaporés et redissous dans 4 ml d'hexane dans un flacon de 15 ml auquel sont ajoutés 4 ml de KOH méthanolique à 10 %. La saponification a lieu dans les flacons bouchés sous azote, à température ambiante et sous agitation magnétique, pendant 16 h à l'abri de la lumière. La phase hexanique est séparée de la phase méthanolique par ajout de 8 ml d'eau distillée. La phase hydroalcoolique est extraite 3 fois avec 10 ml d'hexane et 5 ml d'éthanol. Les extraits sont rassemblés, lavés à neutralité, séchés et dissouts comme pour les extraits non saponifiés.

2.3 Extraction des caroténoïdes provenant des expériences sur cellules Caco-2

Après décongélation, 0,5 ml de suspension cellulaire sont extraits avec 2 ml d'hexane et 0,5 ml d'éthanol contenant une quantité d'étalon interne (cantaxanthine 2 mg/L). Le mélange

est agité au vortex pendant 30 secondes. La phase hexanique est prélevée puis la phase aqueuse est à nouveau extraite. Les phases hexaniques obtenues après séparation par centrifugation (2000 rpm, 5 minutes, température ambiante) sont rassemblées et évaporées sous azote. Le résidu est repris dans 100 µl d'un mélange dichlorométhane/méthanol (50/50 ; v/v).

2.4 Conditions chromatographiques (HPLC)

Les analyses HPLC ont été réalisées avec un système Agilent 1100 équipé d'un détecteur à barrette de diodes et d'un passeur d'échantillon. La colonne utilisée est une colonne C₃₀ YMC (250 x 4.6 mm ; 5 µm) (YMCEurope GmbH, Allemagne). Les phases mobiles sont l'eau pour l'éluant A, le méthanol pour l'éluant B et le MTBE pour l'éluant C. Le débit est de 1 ml/min et la température d'analyse est de 25°C. Différents gradients ont été utilisés pour la séparation des caroténoïdes extraits à partir des jus d'agrumes et la séparation des caroténoïdes issus des fractions du modèle cellulaire Caco-2 (Tableau 9).

Le détecteur est utilisé aux longueurs d'ondes de 290, 350, 450 et 470 nm. La quantification des caroténoïdes est réalisée en comparant l'aire des pics avec les courbes de calibration de référence (β-carotène, β-cryptoxanthine et lycopène), après correction grâce à l'étalon interne.

Tableau 9. Différents gradients utilisés pour la séparation des caroténoïdes en HPLC.

| | Séparation des caroténoïdes des jus | Séparation des caroténoïdes de la fraction cellulaire |
|--------------------|---|---|
| | Gradient 1 | Gradient 2 |
| Phase mobile | T=0 : 60 % méthanol, 40 % d'eau T= 5 : 80 % méthanol, 20 % d'eau T= 10 : 81 % méthanol, 4 % d'eau, 15 % MTBE T= 60 : 11 % méthanol, 4 % d'eau, 85 % MTBE T= 71 : 100 % méthanol T=72 : 60 % méthanol, 40 % d'eau | T=0 : 96 % méthanol, 2 % d'eau, 2 % MTBE T= 27 : 18 % méthanol, 2 % d'eau, 80 % MTBE T= 31 : 81 % méthanol, 2 % d'eau, 80 % MTBE T= 35 : 11 % méthanol, 4 % d'eau, 85 % MTBE |
| Volume d'injection | 20 µl | 60 µl |

2.5 Identification des caroténoïdes

Les analyses ont été réalisées grâce à un appareil (HPLC-DAD-MS) Hewlett-Packard (HP) modèle 1050 équipé d'une pompe quaternaire délivrant les solvants et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) couplé à une plateforme masse LCZ 4000. La spectrométrie de masse est réalisée en électrospray mode positif et les masses scannées vont de 0 à 700 m/z . Les spectres d'absorption sont collectés entre 220 et 600 nm. La colonne utilisée est une C₃₀ (YMC Inc., Wilmington, NC) 250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m, équipée d'une précolonne 20 x 4,6 mm, 5 μ m. La température d'analyse est de 27°C et le débit de 1ml/min. Le gradient utilisé est le suivant : Solvant A (eau, acétate d'ammonium 25 mM) ; solvant B (méthanol, acétate d'ammonium 25 mM) et solvant C (MTBE) ; 0-2 min, % A- % B- % C, 40-60-0 ; 5 min, 20-80-0 ; 10 min 4-81-15 ; 60 min, 4-11-85 ; 80 min, 4-11-85 ; 80 min 0-100-0. Les données sont traitées par le logiciel Masslynx version 3.4.

2.6 Isolation des esters de β -cryptoxanthine

Des extraits bruts de caroténoïdes de jus de mandarine sont injectés en HPLC muni d'une boucle d'échantillonnage Rhéodyne 7725i de 200 μ l. Les esters sont récupérés à 44 et 46 minutes, correspondant aux temps de rétention respectifs des esters de β -cryptoxanthine (laurate et myristate). Les fractions collectées sont évaporées à sec sous azote. Le résidu est repris par 500 μ l de dichlorométhane et 500 μ l de mélange MTBE/méthanol, (80/20 ; v/v).

3 Quantification des flavanones glycosides

3.1 Extraction

Le protocole d'extraction et de dosage de l'héspéridine et de la narirutine est proche de celui décrit par Mouly *et al.* (1999). Une prise d'essai de 5 ml de jus filtré, est placée dans un flacon à vis bouché hermétiquement et agitée avec 10 ml de diméthylformamide et 10 ml d'oxalate d'ammonium à 0,05 M. Le flacon est chauffé dans un bain d'huile thermostaté à 90°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, le volume est complété à 50 ml dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée. La solution est centrifugée à 10000 tr/min pendant 3 min. Le surnageant est prélevé et filtré sur filtre Millipore 0,45 μ m avant d'être injecté.

3.2 Dosage des flavanones glycosides

Les analyses HPLC ont été réalisées avec un système Agilent 1100 équipé d'un détecteur à barrette de diodes. La séparation est effectuée sur une colonne RP18e Licrospher 100, (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm ; Merck KgaA). La phase mobile est constituée d'un mélange eau/acétonitrile/THF/acide acétique (80/16/3/1 ; v/v/v/v). Le débit est de 1 ml/min et les échantillons sont injectés via une vanne Rhéodyne équipée d'une boucle de 20 µl. Les concentrations en glycosides de flavanones sont déterminées en utilisant les coefficients de réponse obtenus par calibration externe à la longueur d'onde de 280 nm. Les solutions de calibration d'héspéridine et de narirutine sont obtenues par dissolution des étalons dans un mélange diméthylformamide/eau (2/1 ; v/v) à 102 et 79 mg/L respectivement.

4 Quantification de la vitamine C

4.1 Extraction

La vitamine C (acide ascorbique + acide déshydroascorbique) est déterminée par HPLC suivant la méthode de Cortes Sanchez-Mata *et al.* (2000). Le principe de ce protocole est la réduction de l'acide déshydroascorbique en acide ascorbique par le DL-dithiothréitol (DDT) en tant qu'agent réducteur. Une quantité de 1 ml de jus d'agrumes est homogénéisé avec 9 ml de solution d'extraction (acide métaphosphorique à 4,5 % dans l'eau). Le mélange est centrifugé puis le surnageant prélevé est filtré sur filtre Millipore 0,45 µm avant d'être injecté en HPLC. Une partie du surnageant est prélevé parallèlement pour doser la vitamine C. Le surnageant (1 ml) est agité avec 0,2 ml d'une solution de DTT à 20 mg/ml pendant 2h avant d'être injecté en HPLC via une vanne Rhéodyne équipée d'une boucle de 20 µl.

4.2 Dosage de la vitamine C

Les analyses HPLC ont été réalisées avec un système Agilent 1100 équipé d'un détecteur à barrette de diodes. La séparation est effectuée sur une colonne RP18e Licrospher 100, (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm ; Merck KgaA). Le système de solvant isocratique est constitué d'une phase mobile (solution d'eau distillée à 0,01 % d'acide sulfurique) ajustée pH 2,5. La longueur d'onde d'analyse est fixée à 245 nm. Le débit est de 1 ml/min et les échantillons sont injectés via une vanne Rhéodyne, équipée d'une boucle de 20 µl. Les courbes de

calibration externe comportent 4 concentrations (de 30 mg/L à 100 mg/L) en acide ascorbique.

5 Cinétiques de dégradation thermique

5.1 Traitements thermiques des jus d'agrumes

Le traitement thermique des jus est étudié pour des températures de 75, 80, 90, 95 et 100°C pour les caroténoïdes ; de 50, 70, 80, 90 et 100°C pour l'acide ascorbique et de 70 et 90°C pour l'héspéridine. Des tubes pyrex avec bouchons à vis (longueur 10 cm, diamètre intérieur 16 mm, épaisseur 2 mm) sont remplis avec 15 ml de jus d'agrumes, bouchés hermétiquement et immergés dans un bain d'huile thermostaté (AM 3001K, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Une sonde de température relié au bain est plongée dans un des tubes rempli de jus afin de contrôler la température en permanence durant le traitement thermique avec une précision de $\pm 1^\circ\text{C}$. Le traitement thermique est considéré isotherme car le temps pour le jus d'atteindre la température de consigne et le temps de refroidissement sont inférieurs à 4 minutes. Les tubes sont prélevés à intervalle régulier et refroidis dans un bain de glace. Pour chaque couple temps/température, 2 tubes sont analysés pour les caroténoïdes et trois tubes pour l'acide ascorbique.

5.2 Equations des cinétiques de dégradation thermique

Considérant que la dégradation des micronutriments est de premier ordre, c'est-à-dire que la vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration en micronutriments, deux modèles ont été choisis. Rappelons que les études cinétiques de dégradation thermique des micronutriments ont été faites dans le but de mettre au point des modèles de dégradation et ainsi de prévoir la durée de vie des produits. Le premier modèle est basé sur l'approche classique où l'effet de la température sur la constante de vitesse de la réaction est décrit par la loi d'Arrhénius. Le deuxième modèle est décrit par les paramètres de résistance thermique D et z fréquemment utilisés dans le domaine alimentaire. Le Tableau 10 résume les équations utilisées pour les calculs avec t pour le temps, T pour la température et C_0 pour la concentration en micronutriments au temps $t=0$.

Tableau 10. Equations utilisées pour la description des deux modèles

| | Modèle cinétique Classique | Modèle D/z |
|------------------------------|---|--|
| Basiques | | |
| Conditions isothermes | $C = C_0 e^{-kt}$ | $C = C_0 10^{-\frac{t}{D}}$ |
| Effet de la Température | $k = k_\infty e^{-\frac{Ea}{RT}}$ | $D = D_0 10^{-\frac{T}{z}}$ |
| Paramètres | <ul style="list-style-type: none"> - k = constante de vitesse de la réaction T (s⁻¹) - T exprimée in K - k_∞ = facteur pre-exponentiel = k valeur extrapolée at T = ∞ (s⁻¹) - Ea = energie d'activation (J.mol⁻¹) - R = constante des gaz parfaits = 8.32 J.mol⁻¹.K⁻¹ | <ul style="list-style-type: none"> - D = temps de reduction décimale à T (s) - T exprimée d in °C - D₀ = D valeur extrapolée à T = 0 °C(s) - z facteur (°C) |
| Expression des pertes | $Ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k_\infty \int e^{-\frac{Ea}{RT}} dt$ | $\log_{10}\left(\frac{C}{C_0}\right) = -\frac{1}{D_0} \int 10^{\frac{T}{z}} dt$ |

6 Modélisation de la digestion *in vitro*

6.1 Digestion in vitro d'un jus d'agrumes seul

Un volume de 30 ml de jus d'agrumes ou (une quantité de 20 g de jus concentré à 60° Brix) est mélangé à 32 ml d'une solution saline (NaCl 0,9 %) contenant 12,6 mg/ml de pyrogallol en tant qu'antioxydant (plus soluble dans la phase aqueuse que le BHT). Le mélange est homogénéisé durant 10 minutes dans un bain-marie à 37°C sous agitation. Pour simuler la phase gastrique, le pH est ajusté à 4 ± 0,02 avec une solution d'HCl 1M ou de NaOH 1M suivant les types de jus. Un volume de 2 ml de pepsine (40 mg/ml dans une solution d' HCL 0,1 M) est ensuite ajouté. L'homogénat est à nouveau incubé à 37°C sous agitation durant 30 minutes. Pour simuler la phase intestinale, le pH du jus partiellement digéré est ajusté à 6 en ajoutant 20 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 0,45M. Un mélange d'extrait de bile et de pancréatine (9 ml contenant 2 mg/ml de pancréatine et 12 mg/ml de bile dans un tampon citrate 0,1M, pH = 6) et 4 ml d'extrait de bile à 0,1 g/ml est

ajouté. Les échantillons sont incubés à nouveau à 37°C sous agitation pour terminer le processus de digestion. Après centrifugation (20 000 rpm, 18h à 10°C- Beckman L755 TST 41-14 SW rotor), les micelles sont séparés de la fraction aqueuse par filtration sur filtre Millipore à 0,22 µm. Les fractions aliquotes sont stockées sous azote à -20°C jusqu'à leur analyse. Dans le cas des micelles préparées pour être incubées sur les Caco-2, les digestats filtrés sont dilués au tiers. La Figure 6 indique le schéma expérimental du modèle de digestion *in vitro* du jus d'agrumes couplé au modèle cellulaire Caco-2.

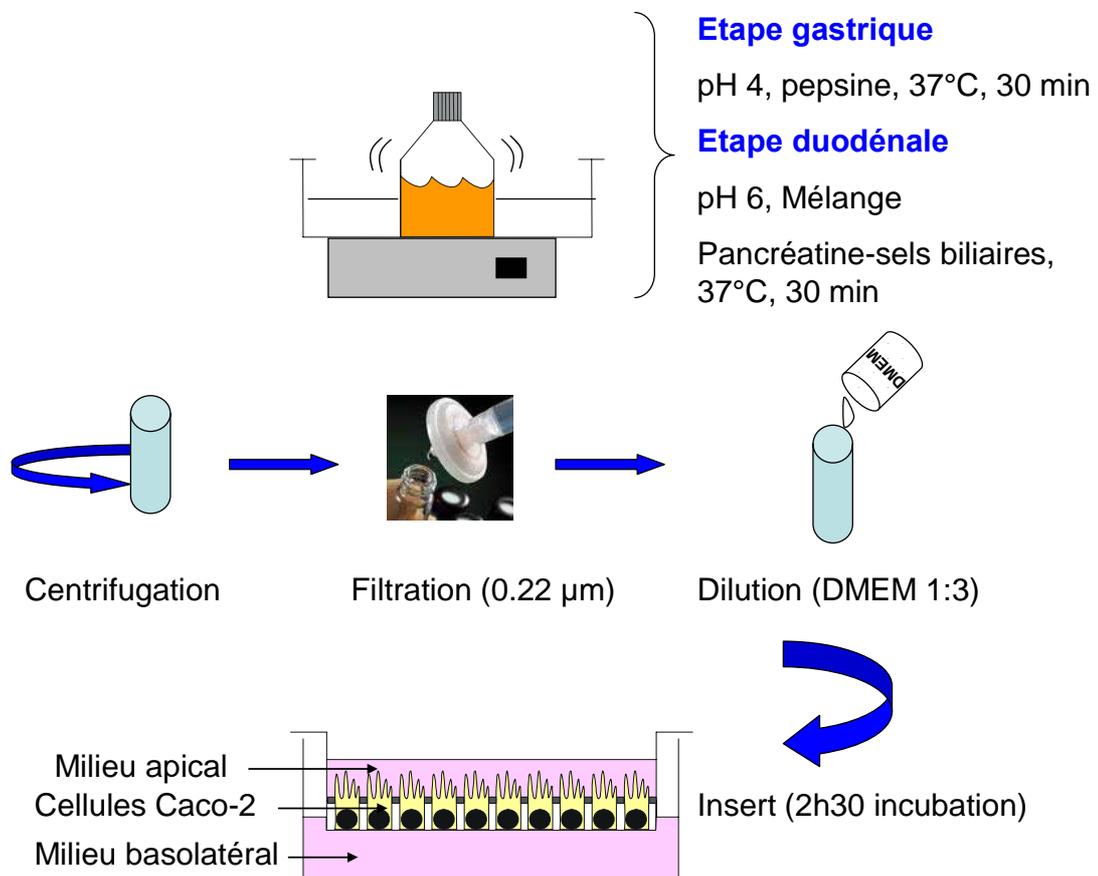


Figure 6. Modèle de digestion *in vitro* couplé aux cellules Caco-2

6.2 Digestion *in vitro* d'un jus d'agrumes accompagné d'un repas

Dans ce cas, le jus d'agrumes est digéré avec un repas représentant les quantités de macronutriments recommandés (15 % de protéines, 55 % de glucides et 30 % de lipides). La composition du repas est la suivante : 6,7g de pommes de terre bouillies sont mixés, 1,2g de viande hachée à 10 % de matières grasses et 0,2 g d'huile d'olive. Ce repas est ajouté au 30 ml de jus d'agrumes et au 32 ml de solution saline et la procédure suivie est la même que celle décrite précédemment pour la digestion du jus d'agrumes seul. Après la centrifugation finale, les gouttelettes d'huile sont séparées de la fraction aqueuse.

6.3 Préparation des micelles synthétiques

Les micelles mixtes sont préparées à partir d'une solution étalon de caroténoïde ou à partir d'extrait de caroténoïdes d'agrumes. Les concentrations en caroténoïdes vont de 5 à 30 μM . Les constituants lipophiles (phosphatidylcholine, 0,04 mM ; lysophosphatidylcholine 0,16 mM ; monooléine 0,3 mM ; acide oléique 0,5 mM ; cholestérol libre 0,1 mM) sont ajoutés aux caroténoïdes après avoir été solubilisés dans un solvant chloroforme/méthanol (2/1, v/v). Les solvants sont évaporés sous azote jusqu'à l'obtention d'un film lipidique. Ce film est ensuite solubilisé dans du DMEM contenant du taurocholate de sodium (5 mM). L'ensemble est soniqué 3 minutes avec une microsonde à 25 Watts (Branson 250 W Sonifier, Osi). La solution obtenue ainsi est laissée toute la nuit sous agitation à 37°C. Enfin, le mélange est filtré sur filtre Millipore à 0,22 μm en condition stérile pour obtenir une solution optiquement claire qui est stockée à -20°C jusqu'à l'expérimentation

7 Etudes sur cellules Caco-2 TC7

7.1 Culture des cellules

Les cellules Caco-2 TC7 ont été généreusement fournies par Monique Roussey (U178 INSERM, Villejuif, France). Les cellules utilisées aux passages 50-80 sont cultivées dans des boîtes de 25 cm^2 ou 75 cm^2 (Falcon) en présence de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) à 4,5 g/L de glucose, supplémenté de 2 % de L-glutamine, 1 % d'acides aminés non essentiels, 1 % de pénicilline/streptomycine et avec 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (30 minutes à 56°C permet la dénaturation des protéines, celles-ci pouvant lyser les cellules). Le milieu est stérilisé par filtration à 0,22 μm . Les cellules sont incubées à

37°C en atmosphère humidifié air : CO₂ (95/5 ; v/v) et le milieu est changé toutes les 48h. Lorsque les cellules forment une monocouche et ont atteint la confluence, au bout de 5 à 6 jours, elles sont réensemencées après un traitement à la trypsine-EDTA dans de nouveaux flacons, chaque repiquage définissant un passage.

7.2 Trypsinisation des cellules

Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées 2 fois avec du tampon phosphate salin (PBS), préchauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées avec 5 ml de trypsine-EDTA (pour des boîtes de culture de 25 cm²) pendant 20 minutes jusqu'au détachement des cellules. Les cellules sont mises en suspension dans un tube à centrifuger Falcon de 50 ml avec 10 ml de milieu de culture pour arrêter l'action de la trypsine (le SVF, présent dans le milieu contient une protéine anti-trypsine). La suspension cellulaire est alors centrifugée à 1250 tr/min pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension avec 5 ml de milieu, puis centrifugées à nouveau. Le culot est ensuite repris par 2 ml de milieu et les cellules sont dénombrées sur lame de Neubauer après addition de bleu trypan permettant de visualiser les cellules mortes et d'apprécier la viabilité de la culture. Les cellules sont ensuite réensemencées dans 15 ml de milieu dans un nouveau flacon.

7.3 Utilisation des systèmes de culture sur insert

Dans le cas des études de transport et de sécrétion, les cellules sont mises en culture sur insert. Le but étant de reproduire la monocouche épithéliale et de séparer par l'intermédiaire de cette monocouche le compartiment apical correspondant à la lumière intestinale et le compartiment basal simulant le milieu intérieur (sang). De plus, les cellules sont d'avantage polarisées sur ce support que dans un flacon de culture. Les plaques de culture utilisées dans cette étude comportent 6 puits (diamètre 24 mm, porosité 1 μm). Pour chaque expérience les cellules sontensemencées à une densité de 250 000 cellules par puits. Les chambres apicale et basolatérale de chaque puits reçoivent 1 ml et 2 ml de milieu. Le milieu utilisé peut être du milieu complet pendant 21 jours ou du milieu complet pour les 14 premiers jours de culture, puis du milieu sans sérum pour les 7 derniers jours suivants. Les milieux sont changés tous les jours pendant 21 jours afin d'obtenir une monocouche de cellules différenciées et confluentes. Avant chaque expérience, l'intégrité des monocouches de cellules est testée en mesurant la résistance trans-épithéliale grâce à un voltmètre équipé d'une électrode adaptée (Millicell ERS, Millipore, S^t Quentin-en-Yvelines, France). Au début de chaque expérimentation, au terme du 21^e jour, les cellules sont rincées 2 fois au tampon phosphate (PBS). Le pôle apical reçoit ensuite 1 ml de micelles et le pôle basolatéral 2 ml de milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C suivant les temps d'incubation (30, 60, 50 minutes) ou 5, 24 ou 48 h suivant le cas. A la fin de l'incubation, le milieu apical (1 ml) et le milieu basolatéral (2 ml) sont prélevés. Les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS contenant 5 mM de taurocholate. Les cellules reçoivent à nouveau 1 ml de PBS-taurocholate puis elles sont grattées et prélevées dans des cryotubes Greiner (Dutcher) contenant du pyrogallol à 0,5 % avant d'être stockées à - 80°C jusqu'au jour du dosage.

7.4 Utilisation des boites de culture de 75 cm² pour les expérimentations

Après 21 jours de culture, les cellules poussant en boites de 75 cm² sont rincées 2 fois avec 15 ml de PBS, puis reçoivent 15 ml de micelles avant d'être incubées pendant 24 ou 48 h. Le milieu apical est prélevé, et les cellules sont grattées et récupérées dans 2 ml de PBS-taurocholate avant d'être stockées à - 80°C comme précédemment.

7.5 Dosage des protéines sur cellules

Des fractions aliquotes d'échantillon cellulaire sont récupérées pour doser les protéines totales à l'aide du kit BCA (Bicinchoninic Acid ; BCA kit, Montluçon, France). Les ions Cu^{2+} sont réduits en ions Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines. L'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^+ et forme un complexe coloré absorbant fortement à 562 nm. Les échantillons cellulaires sont soniqués, dilués au 1/10^e et incubés avec 2 ml de réactif BCA pendant 30 minutes à 37°C. L'absorbance mesurée ensuite est proportionnelle à la teneur en protéines.

NB : Plus de détails sur les expérimentations sont disponibles dans les articles correspondants.

RESULTATS

RESULTATS

1 Qualité nutritionnelle des agrumes en fonction des facteurs génétiques, environnementaux et technologiques.

1.1 Objectifs

La première partie de ce travail de thèse sur la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes a consisté à étudier l'influence du facteur variétal sur les teneurs en microconstituants des oranges et à comparer ces teneurs avec celles d'autres espèces de *Citrus* comme les mandarines. La sélection de jus d'agrumes ayant les plus hautes teneurs en caroténoïdes (β -cryptoxanthine), polyphénols (hespéridine) et en vitamine C a été indispensable afin de choisir le matériel végétal nécessaire à l'étude de la biodisponibilité des caroténoïdes de ces jus d'agrumes. Cette première étape a permis de sélectionner d'après un critère de qualité nutritionnelle des agrumes génétiquement différents et provenant d'un même environnement. (**Publication 1**).

Les diverses variétés d'agrumes choisies proviennent de la collection variétale de l'INRA de Corse et représentent un matériel végétal homogène, de même origine géographique. La comparaison avec des agrumes d'origine tropicale a été ensuite examinée sur les variétés sélectionnées (**résultats non publiés**). En effet, comparativement à la littérature, nos premiers résultats indiquaient que les agrumes cultivés sous un climat méditerranéen seraient plus riches en caroténoïdes que les agrumes d'origine tropicale. Les conditions climatiques de la Corse, en particulier la différence entre les températures du jour et de la nuit peuvent provoquer un stress à l'origine d'une accumulation plus élevée de caroténoïdes dans les fruits. Ce phénomène connu depuis longtemps a surtout été observé sur la peau des agrumes (Young & Erickson, 1961). Aussi, pour vérifier de telles hypothèses par rapport à la pulpe il était nécessaire d'analyser les mêmes variétés sous climat tropical ou méditerranéen et, avec un matériel végétal parfaitement identifié génétiquement.

Améliorer les connaissances sur le comportement des microconstituants lors de traitements thermiques fait partie des objectifs d'une troisième partie de l'étude (**Publication 2**). Une bonne compréhension des cinétiques réactionnelles permet d'optimiser la qualité des produits alimentaires tels que les jus d'agrumes. Cependant, la complexité des réactions

intervenant au sein d'un milieu comme le jus d'agrumes pendant le traitement et le peu d'informations des paramètres cinétiques existant sur ces réactions limitent l'usage de cette approche dans le cadre des industries alimentaires. Ce constat nous amène à proposer des modèles simplifiés afin de prévoir la dégradation des molécules. Cette étude a pour but de mieux appréhender les pertes en caroténoïdes et d'identifier l'apparition de composés indésirables nuisant à la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes.

1.2 Résultats

1.2.1 Influence variétale et interspécifique sur les microconstituants des jus d'agrumes (Publication 1)

Les huit variétés d'orange appartenant botaniquement au groupe *Citrus sinensis* comparées aux espèces *Citrus reticulata* et *déliciosa* ont des profils en caroténoïdes qualitativement et quantitativement très différents illustrant la diversité intra et interspécifique. Parmi les huit variétés d'orange analysées, Sanguinelli, Pera et Shamouti sont les trois variétés qui ont les teneurs les plus élevées en caroténoïdes provitaminiques A (principalement dû à leurs teneurs en β -cryptoxanthine allant de 2,76 à 3,88 mg/L). Sachant que les mandarines et les clémentines sont des agrumes qui contiennent 3 à 4 fois plus de β -cryptoxanthine que les oranges (10,7 et 8,6 mg/L), ces agrumes sont de loin les espèces nutritionnellement les plus intéressantes pour leur potentiel provitaminique A. Par ailleurs, il a été remarquable de constater que ces agrumes riches en β -cryptoxanthine l'étaient également en hespéridine.

Les analyses en composantes principales (ACP) basées sur les teneurs de cinq caroténoïdes principaux (violaxanthine, lutéine, zéaxanthine, β -cryptoxanthine, β -carotène) et des deux caroténoïdes précurseurs présent au début de la chaîne de biosynthèse (le phytoène et le phytofluène) ont permis de classer trois groupes d'agrumes. Le groupe mandarine-clémentine est clairement différencié des deux autres, et est hautement corrélé avec les teneurs en β -cryptoxanthine et en β -carotène. Le second groupe est constitué par trois variétés d'orange (Pera, Sanguinelli et Shamouti) lesquelles sont caractérisées par leur teneurs élevées en caroténoïdes provitaminique A et en xanthophylles. Enfin, le dernier groupe représente les oranges à faible teneur en caroténoïdes et particulièrement en β -cryptoxanthine et β -carotène.

Les analyses statistiques ont révélé de fortes corrélations entre β -cryptoxanthine et β -carotène (0,98) et par ailleurs ce qui est plus surprenant entre hespéridine et β -cryptoxanthine (0,92) car leur voies de biosynthèse sont différentes. Par contre, aucune corrélation n'a été observée entre la vitamine C et les deux autres types de microconstituants.

Nous avons également montré que la classification des agrumes orange/mandarine en fonction des teneurs en caroténoïdes et glycosides de flavanones a révélé que la clémentine, hybride entre la mandarine méditerranéenne et l'orange douce, était plus proche de son parent mandarine. Ce résultat tend à confirmer que la mandarine exercerait une forte dominance sur l'expression de ses métabolites secondaires. Cette étude démontre donc une diversité génétique entre oranges et mandarines au sein du genre *Citrus*.

Varietal and Interspecific Influence on Micronutrient Contents in Citrus from the Mediterranean Area

CLAUDIE DHUIQUE-MAYER,^{*,†} CATHERINE CARIS-VEYRAT,[§]
PATRICK OLLITRAULT,[†] FRANCK CURK,[#] AND MARIE-JOSEPHE AMIOT[⊥]

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),
Département FLHOR, TA50/04, 34398 Montpellier Cedex 5, France; Laboratoire des antioxydants
naturels, INRA, UMR A408 84914 Avignon Cedex 9, France; Station de Recherches Agronomiques
(INRA-CIRAD), F-20230 San Giuliano, France; and Vitamines et microconstituants lipophiles,
INSERM, Unité A 476, 13385 Marseille Cedex 5, France

To specify the genotypic variation of Mediterranean *Citrus* juices, the contents of carotenoids, flavonoids, and vitamin C were determined by high-performance liquid chromatography. A selection of orange varieties and Mandarin species from the Mediterranean area (*Citrus sinensis*, *Citrus deliciosa* Ten, and *Citrus clementina* Hort. ex Tan) was evaluated using carotenoid profiles and flavanones contents. Among the eight varieties of orange (Salustiana, Hamlin, Shamouti, Pera, Valencia, Maltaise, Sanguinelli, and Cara-cara) and two Mandarin species, only three cultivars (Pera, Sanguinelli, and Shamouti) and the two Mandarin species displayed a high content of vitamin A (374, 381, and 272 ER L⁻¹ for the three orange cultivars and 1156 and 960 retinol equivalent (RE) L⁻¹ for the Mandarins) due to a high content of β -cryptoxanthin. These same *Citrus* were also rich in hesperidin (502, 537, 552, 767, and 754 mg L⁻¹, respectively). Principal component analysis allowed the Mediterranean orange varieties and Mandarin species to be differentiated on the basis of nutritional criteria. Strong correlations were observed between β -cryptoxanthin and hesperidin ($r = 0.92$) and between β -cryptoxanthin and β -carotene ($r = 0.98$). In contrast, vitamin C content was not correlated with carotenoids and flavanone glycosides. The Mandarin and orange group was quite distinct. The orange varieties could be divided in two groups. In addition, a diversity tree allowed a genetic approach to differentiating *Citrus* cultivars on the basis of Euclidian distances. This representation showed that the hybrid Clementine was nearer to its parent Mandarin than to its parent orange, suggesting that β -cryptoxanthin was a dominant genetic factor. With regard to vitamin A, Mandarin and its hybrid Clementine appeared to be the best *Citrus* species.

KEYWORDS: *Citrus sinensis*; *Citrus reticulata*; Mediterranean *Citrus*; micronutrients; carotenoid; hesperidin; vitamin C; β -cryptoxanthin; orange juice, varietal selection

INTRODUCTION

Consumption of citrus fruits has been associated with reduced risks of certain cancers and cardiovascular diseases (1–3). Citrus juices, especially orange juice, are considered to be rich sources of antioxidants including vitamin C, phenolic compounds and carotenoids, all of them contributing to the beneficial health effects of citrus fruits and citrus-derived products (4, 5). Among these phytochemicals, some authors have stressed the main role of hesperidin in the total antioxidant capacity of orange juices (6). Moreover, studies on the bioavailability of hesperetin in humans have shown high plasmatic concentrations of hesperetin

after the ingestion of citrus juices; thus, beneficial health effects could be achieved by regular consumption (7, 8). Although the antioxidant capacity of citrus juices has been mainly associated with the hydrosoluble fraction containing polyphenols and vitamin C, the more apolar fraction including carotenoids could also contribute to the antioxidant capacity of the juices, leading to their protective effects against degenerative diseases. Among carotenoids present in *Citrus*, some of them have been detected in human plasmas: α - and β -carotene, lycopene, β -cryptoxanthin, lutein, and zeaxanthin. Besides α - and β -carotene, β -cryptoxanthin, which contributes in large part to the bright orange color of juice (9) and is the main precursor of provitamin A in citrus juices, has been described as the major carotenoid in Mandarin with relatively high concentrations being reported in certain orange cultivars (10). Furthermore, Miller et al. (11) reported that β -cryptoxanthin was the most efficient radical scavenger after lycopene. Recently, bioavailability studies in

* Author to whom correspondence should be addressed [telephone +33-(0)467614482; fax +33(0)467614433; e-mail claudie.dhuique-mayer@cirad.fr].

† CIRAD.

§ INRA.

INRA-CIRAD.

⊥ INSERM.

humans have reported β -cryptoxanthin as a biomarker of Mandarin consumption (12, 13).

In this work, we compared the varietal influence at inter- and intraspecific levels on the micronutrient contents of different citrus juices from fruit harvested in Corsica. Whereas the literature usually reported the content of only one class of phytochemicals (6, 14, 15), when we consider the nutritional value of fruit, it appears pertinent to evaluate the content of different microconstituents at the same time. In addition, these microconstituents could have synergistic effects as was previously shown (4, 5). In this paper, we report the influence of variety and species on the content of the main antioxidant microconstituents present in *Citrus*, flavanones, carotenoids, and vitamin C.

MATERIALS AND METHODS

Citrus Fruits. Different varieties of oranges (*Citrus sinensis*) from Agronomic Research Station (SRA) selections in Corsica were chosen: cv. Salustiana SRA 508; cv. Hamlin SRA 41; cv. Shamouti (Jaffa) SRA 538; cv. Pera; SRA 399; cv. Valencia SRA 246; cv. Maltaise SRA 560; cv. Sanguinelli SRA 243; and Cara-cara SRA 666. The other species used were Mandarin SRA 133 (*Citrus deliciosa* Ten) and Clementine SRA 85 (*Citrus clementina* Hort. ex Tan) following the Tanaka classification. Rootstocks were *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Pomeroy. All fruits were harvested during the 2002–2003 season between December and April. The annual average temperature in Corsica in 2002 was 16 °C, the average maximum temperature being 21 °C and the average minimum temperature being 11 °C. Rainfall in 2002 was 602 mm, so only 225 mm of irrigation was necessary. Representative samples (15 fruits/cultivar) were collected from three trees. First, variability was determined between fruits to calculate an appropriate sample size. A sample size of 15 fruits per cultivar was determined using a statistic bilateral test (with a first risk, $\alpha = 0.05$, and a second risk, $\beta = 0.20$). Citrus fruits were received at maturity stage (maturity index: soluble solids/titrable acidity = 7) were immediately hand-squeezed and then filtered through a stainless steel sieve (1 mm). The juices were placed in sealed amber vials (15 mL) under nitrogen and kept frozen at -20 °C until analyzed; storage time did not exceed 1 month.

Reagents. Extraction solvents were RPE grade hexane, ethanol, and dichloromethane from Carlo-Erba (Val de Reuil, France). Analytic solvents were HPLC grade methanol, acetonitrile, and tetrahydrofuran (THF), also from Carlo-Erba, and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Reagents for analyses were pure grade *N,N*-dimethylformamide (DMF), sodium chloride, sodium sulfate, ammonium oxalate, and metaphosphoric acid from Carlo-Erba. L-(+)-Ascorbic acid, dehydroascorbic acid, and dl-dithiothreitol were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Standards used were purchased from Extrasynthese (Genay, France): β -carotene, β -cryptoxanthin, zeaxanthin, lutein, lycopene, β -apo-8'-carotenal, narirutin (NAT), hesperidin (HES). (The purities of standards were verified by HPLC and photodiode array detection).

Carotenoid Extraction. Carotenoid extraction was carried out according to the method of Taungbodhitham et al. (16). An aliquot (20 g) of orange juice was homogenized by magnetic stirrer with 120 mg of $MgCO_3$ and 35 mL of extraction solvent (ethanol/hexane, 4:3 v/v, containing 0.1% of BHT as antioxidant) for 5 min. Lycopene (750 μ L of solution, equivalent to 90 μ g) was added as an internal standard for all *Citrus* except for the red Cara-cara variety, in which lycopene was detected, where 150 μ L of β -apo-8'-carotenal, equivalent to 40 μ g, was used. The residue was separated from the liquid phase by filtration with a filter funnel (porosity no. 2) and re-extracted with 35 mL of ethanol/hexane as previously. Ethanol (30 mL) and hexane (30 mL) were successively used to wash the residue. Organic phases were transferred to a separatory funnel and washed with 2×50 mL of 10% sodium chloride and 3×50 mL of distilled water. The aqueous layer was removed. The hexanic phase was dried using anhydrous sodium sulfate and filtered before evaporation to dryness under vacuum at 40 °C. Carotenoid extracts were dissolved in 500 μ L of dichloromethane

and 500 μ L of an 80:20 (v/v) mixture of MTBE and methanol. This solution was diluted 6-fold in the MTBE/methanol mixture and stored in amber vials before HPLC analysis.

Saponification. The hexanic extract was evaporated to dryness with a rotary evaporator, redissolved with 20 mL of hexane, and placed in a 50 mL amber vial to which was added 20 mL of 10% methanolic KOH. Saponification was carried out overnight in the dark at room temperature. The sample was shaken under nitrogen in the sealed vial. The sample was transferred to a separatory funnel to which 50 mL of distilled water was added to separate the layers. The hexanic layer was rinsed until free of alkali. The methanolic KOH layer was extracted with 3×15 mL of dichloromethane. The extracts were pooled and washed to remove alkali. Aqueous traces from organic extracts were removed with anhydrous sodium sulfate; then the extracts were filtered and evaporated to dryness under vacuum. Carotenoid extracts were dissolved as described above. Analyses were conducted under red light to avoid carotenoid degradation during extraction and saponification. The coefficient of variation for extraction–saponification was <5%.

HPLC Analysis of Carotenoids. Carotenoids were analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography using an Agilent 1100 system (Massy, France) according to the previously published method of Caris et al. (17). Carotenoids were separated along a C₃₀ column (250 \times 4.6 mm i.d., 5 μ m YMC (EUROP GmbH); the mobile phases were H₂O as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL min⁻¹, column temperature was set at 25 °C, and injection volume was 20 μ L. A gradient program was performed: the initial condition was 40% A/60% B; 0–5 min, 20% A/80% B; 5–10 min, 4% A/81% B/15% C; 10–60 min, 4% A/11% B/85% C; 60–71 min, 100% B; 71–72 min, back to the initial condition for reequilibration. Absorbance was followed at 290, 350, 450, and 470 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV–visible spectra were collected, stored, and integrated using an Agilent Chemstation plus software. Quantification of carotenoids was achieved using calibration curves with β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, lycopene, and β -apo-8'-carotenal with five concentrations. Correlation coefficients ranged from 0.994 to 0.998. Recoveries were determined by adding internal standard (lycopene or β -apo-8'-carotenal) before the extraction of each sample analyzed and used to correct carotenoids content after HPLC analysis. To verify the losses of carotenoids during extraction and saponification, carotenoid standards (β -cryptoxanthin and lycopene) were extracted and saponified. Mean losses were ~20%. Mean recovery in juice was 84% for β -cryptoxanthin. In addition, to minimize losses during HPLC analysis, each extract was immediately injected after its preparation. In fact, losses in lycopene (alone) were evaluated as close to 10% after 12 h at low temperatures (5–6 °C).

Preparation of Standards. The concentrations of external standard solutions were determined using molar extinction coefficient (ϵ_{mol}) in appropriate solvent checked by spectrophotometry according to the method of Britton et al. (18). Internal standards were diluted in dichloromethane.

Vitamin A Value. The vitamin A value was calculated as retinol equivalent (RE), using the following conversion:

$$RE = (\mu\text{g of } \beta\text{-carotene}/6) + (\mu\text{g of other provitamin A } [\beta\text{-cryptoxanthin}] \text{ carotenoid}/12)$$

(In our case only β -carotene and β -cryptoxanthin contribute to vitamin A activity.)

Extraction and Quantification of Flavanone Glycosides (FG). The extraction method was the same as the procedure described by Mouly et al. (19). The HPLC analytical system was an Agilent 1100 model (Massy, France). Separation of flavanones was performed by HPLC using an RP 18e Licrospher 100 (5 μ m) column (250 mm \times 4.6 mm i.d.) (Merck KgaA). The isocratic solvent system was water/acetonitrile/THF/acetic acid (80:16:3:1, v/v/v/v). Quantification was carried out at 280 nm. Separation was performed at room temperature. Flow rate was fixed at 1 mL min⁻¹. Spectral data were obtained with a photodiode array detector. All data were treated with an Agilent Chemstation and related software. The FG concentrations were determined using an external calibration method. Hesperidin (HES) and narirutin (NAT)

Table 1. Carotenoids Content (Milligrams per Milliliter) of Citrus Juices^a

| Citrus species and varieties | phytoene | phytofluene | violaxanthin | lutein | zeaxanthin | β -cryptoxanthin | β -carotene | lycopene | vitamin A value ^b |
|------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-----------------|------------------------------|
| Salustiana | 0.28a \pm 0.03 | 0.17a \pm 0.01 | 4.76a \pm 0.51 | 0.60ab \pm 0.05 | 1.2a \pm 0.05 | 1.50ab \pm 0.11 | 0.11a \pm 0.01 | nd ^c | 141 \pm 11 |
| Hamlin | 0.26a \pm 0.03 | 0.25ab \pm 0.02 | 5.90b \pm 0.82 | 0.86b \pm 0.08 | 1.51a \pm 0.09 | 1.35b \pm 0.07 | 0.12a \pm 0.01 | nd | 132 \pm 7.0 |
| Maltaise | 0.37b \pm 0.02 | 0.31b \pm 0.02 | 5.83b \pm 0.70 | 0.72b \pm 0.05 | 1.87ae \pm 0.11 | 1.80a \pm 0.30 | 0.14a \pm 0.01 | nd | 173 \pm 23 |
| Shamouti | 0.8d \pm 0.06 | 0.76d \pm 0.06 | 5.81b \pm 0.56 | 0.50a \pm 0.02 | 1.34a \pm 0.08 | 2.76c \pm 0.15 | 0.25b \pm 0.04 | nd | 272 \pm 20 |
| Sanguinelli | 0.85d \pm 0.06 | 0.87d \pm 0.07 | 6.97b \pm 0.60 | 1.58c \pm 0.14 | 3.61b \pm 0.15 | 3.88d \pm 0.24 | 0.36c \pm 0.03 | nd | 381 \pm 25 |
| Valencia | 0.33b \pm 0.02 | 0.35b \pm 0.02 | 5.18a \pm 0.61 | 1.08c \pm 0.12 | 2.34c \pm 0.09 | 1.65a \pm 0.07 | 0.30c \pm 0.02 | nd | 188 \pm 6.0 |
| Pera | 0.68cd \pm 0.05 | 0.59c \pm 0.04 | 4.67a \pm 0.35 | 0.87b \pm 0.17 | 2.46c \pm 0.14 | 3.67d \pm 0.30 | 0.45dc \pm 0.04 | nd | 374 \pm 29 |
| Cara-cara | 4.04e \pm 0.31 | 11.43 \pm 0.71 | 4.65a \pm 0.20 | 0.96b \pm 0.09 | 1.62ae \pm 0.12 | 1.51ab \pm 0.15 | 0.96e \pm 0.12 | 1.83 \pm 0.09 | 283 \pm 29 |
| Mandarin | 0.47bc \pm 0.03 | 0.58c \pm 0.04 | 1.39c \pm 0.07 | 0.41d \pm 0.01 | 0.77f \pm 0.04 | 10.7e \pm 0.45 | 1.60f \pm 0.15 | nd | 1154 \pm 49 |
| Clementine | 0.59c \pm 0.04 | 0.56c \pm 0.04 | 2.79d \pm 0.16 | 0.31d \pm 0.01 | 1.03g \pm 0.06 | 8.63f \pm 0.35 | 1.45f \pm 0.08 | nd | 960 \pm 19 |

^a Values are the mean of four independent determinations plus/minus standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences for β -cryptoxanthin content ($\alpha = 0.05\%$). ^b Expressed as retinol equivalents L⁻¹. ^c Not detected.

standards were diluted in DMF/water (2:1, v/v) to give 102 and 79 mg L⁻¹, respectively.

Determination of Vitamin C. Ascorbic acid and total vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) were determined by HPLC. The procedure used was the reduction of dehydroascorbic acid to ascorbic acid, using DL-dithiothreitol (DTT) as reducing reagent, according to a similar procedure described by Cortes Sanchez-Mata et al. (20). Orange juice (1 mL) was homogenized with 9 mL of extraction solution (4.5% metaphosphoric acid solution in distilled water). The resulting mixture was centrifuged, the supernatant was filtered through a 0.45 μ m membrane, and duplicates of 20 μ L of each extract were analyzed by HPLC. The filtrate (1 mL) was added to 0.2 mL of a solution of DTT (20 mg mL⁻¹) for 2 h at room temperature in darkness; duplicates of 20 μ L of each extract were analyzed by HPLC. Results were expressed as milligrams per liter of ascorbic acid. Separation of ascorbic acid was performed by HPLC (Agilent model 1100 system) using an RP 18e Licrospher 100 (5 μ m) column (250 mm \times 4.6 mm i.d.) (Merck KgaA). The solvent system used was an isocratic gradient of a 0.01% solution of H₂SO₄ adjusted to pH 2.5 (21). The flow rate was fixed at 1 mL min⁻¹. The UV-visible photodiode array detector was set at 245 nm. Quantification of ascorbic acid was performed at 245 nm by external standard calibration. Calibration curves were performed with four concentrations of ascorbic acid (100 to 30 mg L⁻¹). Straight-line equations and their coefficients of correlation were calculated ($r = 0.999$).

RESULTS

Carotenoid Content. The main nutritional carotenoids characterized in the saponified extracts from orange, Mandarin, and Clementine juices were lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, β -carotene, and lycopene (for only the Cara-cara variety). Besides these compounds, the major carotenoid of these citrus juices was violaxanthin, a yellow xanthophyll. The two precursors phytoene and phytofluene absorbing at 290 and 350 nm were also determined. Results are reported in **Table 1**. In most varieties, β -cryptoxanthin was the most abundant nutritional carotenoid. The range for orange juice was from 1.35 mg L⁻¹ in cv. Hamlin to 3.88 mg L⁻¹ in cv. Pera. Mandarin and Clementine juices were especially rich in β -cryptoxanthin compared to orange juice, with 10.7 and 8.63 mg L⁻¹, respectively. The carotenoid content of Mandarin was in agreement with that of several authors from Asiatic countries, where β -cryptoxanthin was the main provitamin A carotenoid because of the frequency of Mandarin consumption (10, 22, 23). Among the orange varieties, Pera, Sanguinelli, and Shamouti displayed the highest contents of β -cryptoxanthin (3.67, 3.88, and 2.76 mg L⁻¹, respectively). Cv. Sanguinelli, which is a typical Mediterranean variety with hydrosoluble red anthocyanin pigments (24), had the highest content of β -cryptoxanthin. In Mandarin and Clementine, β -cryptoxanthin represents the major carotenoid, with 10.7 and 8.63 mg L⁻¹, respectively. In addition,

Table 2. Flavanone Glycoside Content (Milligrams per Liter) of Citrus Juices^a

| Citrus species and varieties | hesperidin | narirutin | ratio hesperidin/narirutin |
|------------------------------|-------------|----------------|----------------------------|
| Salustiana | 373 \pm 1 | 53.3 \pm 0.3 | 7.0 |
| Hamlin | 317 \pm 5 | 56.0 \pm 0.3 | 5.6 |
| Maltaise | 400 \pm 1 | 96.0 \pm 0.8 | 4.2 |
| Shamouti | 552 \pm 3 | 94.2 \pm 0.2 | 5.8 |
| Sanguinelli | 537 \pm 6 | 75.3 \pm 0.6 | 7.1 |
| Valencia | 257 \pm 3 | 51.4 \pm 0.4 | 5.0 |
| Pera | 502 \pm 3 | 86.2 \pm 1.0 | 5.8 |
| Cara-cara | 363 \pm 4 | 98.4 \pm 0.3 | 3.7 |
| Mandarin | 767 \pm 9 | 37.2 \pm 2.2 | 20.6 |
| Clementine | 754 \pm 1 | 46.4 \pm 1.6 | 16.2 |

^a Mean of three extractions \pm standard deviation.

Table 3. Vitamin C Content of Citrus Juice (Milligrams per 100 mL)^a

| Citrus species and varieties | ascorbic acid | total vitamin C |
|------------------------------|----------------|-----------------|
| Salustiana | 56.5 \pm 1.2 | 56.8 \pm 1.1 |
| Hamlin | 62.0 \pm 1.3 | 62.7 \pm 1.4 |
| Maltaise | 57.5 \pm 1.3 | 58.2 \pm 1.0 |
| Shamouti | 45.8 \pm 0.9 | 46.2 \pm 0.6 |
| Sanguinelli | 53.5 \pm 0.9 | 53.9 \pm 1.1 |
| Valencia | 55.1 \pm 0.8 | 55.4 \pm 1.0 |
| Pera | 58.8 \pm 1.0 | 59.9 \pm 1.2 |
| Cara-cara | 48.8 \pm 0.9 | 49.1 \pm 0.8 |
| Mandarin | 40.0 \pm 0.8 | 41.3 \pm 1.0 |
| Clementine | 52.8 \pm 0.9 | 53.1 \pm 0.9 |

^a Mean of three extractions \pm standard deviation.

it was shown that the hybrid between Mandarin and orange (Clementine) displayed a high content of β -cryptoxanthin, similar to the Mandarin parent as described by Goodner et al. (25).

Flavanone Glycoside Content. There are several flavanone glycosides specific to *Citrus*. Flavanones in orange juices were previously used as markers to differentiate citrus varieties (26, 27). The main flavanone glycosides identified in orange juices and in Mandarin species were hesperidin and narirutin. Concentrations of these flavanone glycosides for all of the varieties and species are reported in **Table 2**. Hesperidin and narirutin contents for orange varieties vary from 397 to 552 mg L⁻¹ and from 51.4 to 98.4 mg L⁻¹, respectively. Mandarin and Clementine displayed the highest concentrations in hesperidin (767 and 754 mg L⁻¹, respectively). Among the orange varieties, Shamouti, Sanguinelli, and Pera had the highest hesperidin contents (552, 537, 502 mg L⁻¹, respectively) and Valencia the lowest (257 mg L⁻¹). Lower hesperidin contents were observed in previous studies (28, 29) for Pera and Valencia varieties. This

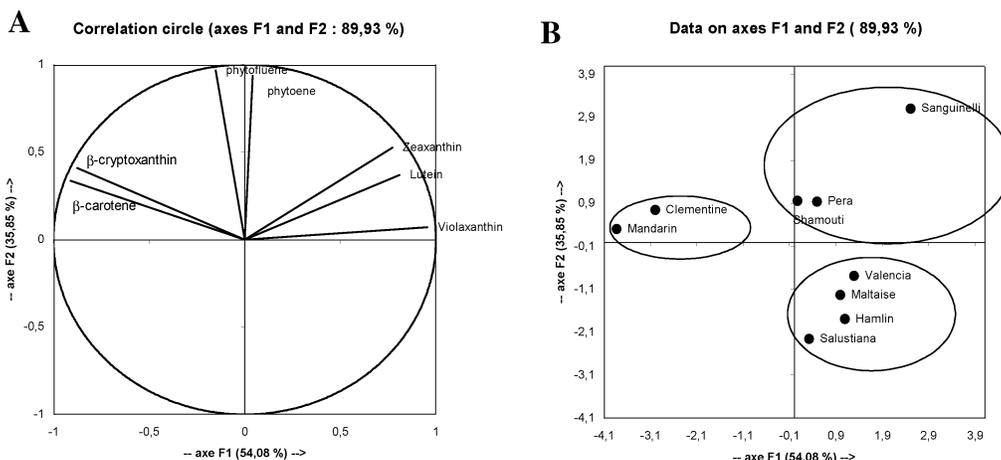


Figure 1. (A) Results of applying PCA to the data and (B) differentiation using PCA of citrus varieties.

Table 4. Correlation Matrix in PCA

| | violaxanthin | lutein | zeaxanthin | β -cryptoxanthin | β -carotene | phytofluene | phytoene |
|------------------------|--------------|--------|------------|------------------------|-------------------|-------------|----------|
| violaxanthin | 1 | 0.705 | 0.686 | -0.847 | -0.884 | -0.028 | 0.163 |
| lutein | 0.705 | 1 | 0.946 | -0.452 | -0.516 | 0.161 | 0.228 |
| zeaxanthin | 0.686 | 0.946 | 1 | -0.394 | -0.459 | 0.324 | 0.424 |
| β -cryptoxanthin | -0.847 | -0.452 | -0.394 | 1 | 0.986 | 0.487 | 0.265 |
| β -carotene | -0.884 | -0.516 | -0.459 | 0.986 | 1 | 0.429 | 0.194 |
| phytofluene | -0.028 | 0.161 | 0.324 | 0.487 | 0.429 | 1 | 0.952 |
| phytoene | 0.163 | 0.228 | 0.424 | 0.265 | 0.194 | 0.952 | 1 |

could be due either to the origin of fruits (tropical or subtropical) or to analytical and extraction procedures.

Vitamin C Content. Citrus are well-known to be a nutrient source of vitamin C in dietary intake. Data reported in Table 3 give both ascorbic acid and total vitamin C values. No significant differences were found between ascorbic acid and total vitamin C. Dehydroascorbic acid concentrations were quite low and were at the limit of detection in our study. The range for ascorbic acid content was from 40 to 62 mg 100 mL⁻¹ for all of the citrus juices. The Mandarin/Clementine group had slightly lower values (40 and 52.8 mg 100 mL⁻¹, respectively), whereas the orange group had a mean of 54.7 mg 100 mL⁻¹.

Principal component analysis (PCA) was used to analyze the relationships between the concentrations of five carotenoids (violaxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, and β -carotene) and the two colorless precursors (phytoene and phytofluene) among the nine cultivars analyzed (Cara-cara was excluded because of its very particular composition). Results are reported in Figure 1 and Table 4. Three strong correlations were obtained between β -cryptoxanthin and β -carotene ($r = 0.98$), between phytoene and phytofluene ($r = 0.95$), and between zeaxanthin and lutein ($r = 0.94$). The first correlation can be explained by the biosynthetic pathway, where β -cryptoxanthin is formed by the hydroxylation of β -carotene. These two carotenoids were very particularly linked in citrus varieties in which β -cryptoxanthin was present at a high level. It is known that in orange and Mandarin, the principal event occurring during carotenogenesis is the increase of β -cryptoxanthin with maturity (30, 31). The other correlations reflect the biosynthesis pathways of carotenoids.

The same multivariate analysis (Figure 1B) allowed the nine citrus cultivars to be classified (Salustiana, Hamlin, Maltaise, Shamouti/Jaffa, Sanguinelli, Valencia, Pera, Mandarin, and Clementine) into different categories based on nutritional criteria, especially the carotenoid content. The Mandarin/Clementine group was clearly differentiated from sweet oranges, and this

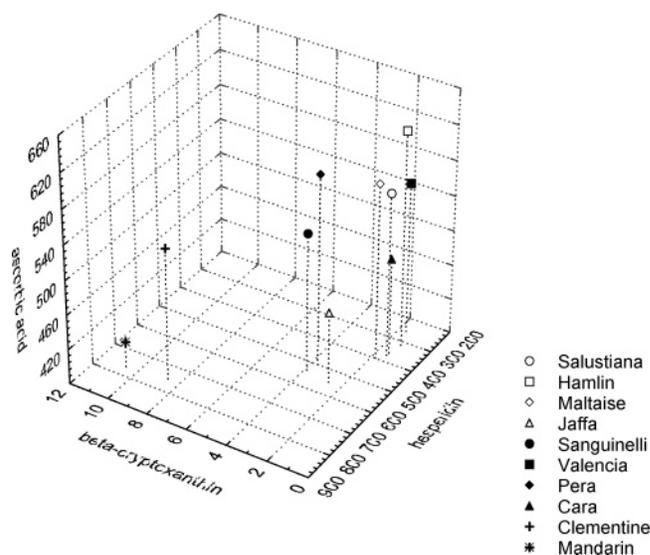


Figure 2. Differentiation of citrus varieties and species from Mediterranean origin based on three principal micronutrients: β -cryptoxanthin (mg L⁻¹), hesperidin (mg L⁻¹), and ascorbic acid (mg L⁻¹). Representation was made with Statistica software.

group was highly correlated with β -cryptoxanthin and β -carotene contents. A second group consisted of four varieties of orange juices that had low contents of β -cryptoxanthin and β -carotene; this group was more correlated with lutein and zeaxanthin contents. The last three varieties of orange could be distinguished by their higher contents of β -cryptoxanthin and β -carotene.

DISCUSSION

β -Cryptoxanthin, mainly present as fatty acid esters, was shown to be the major provitamin A carotenoid in *Citrus*. Its content was found to be particularly high in Mandarin and Clementine. To get the classification of Mediterranean *Citrus*

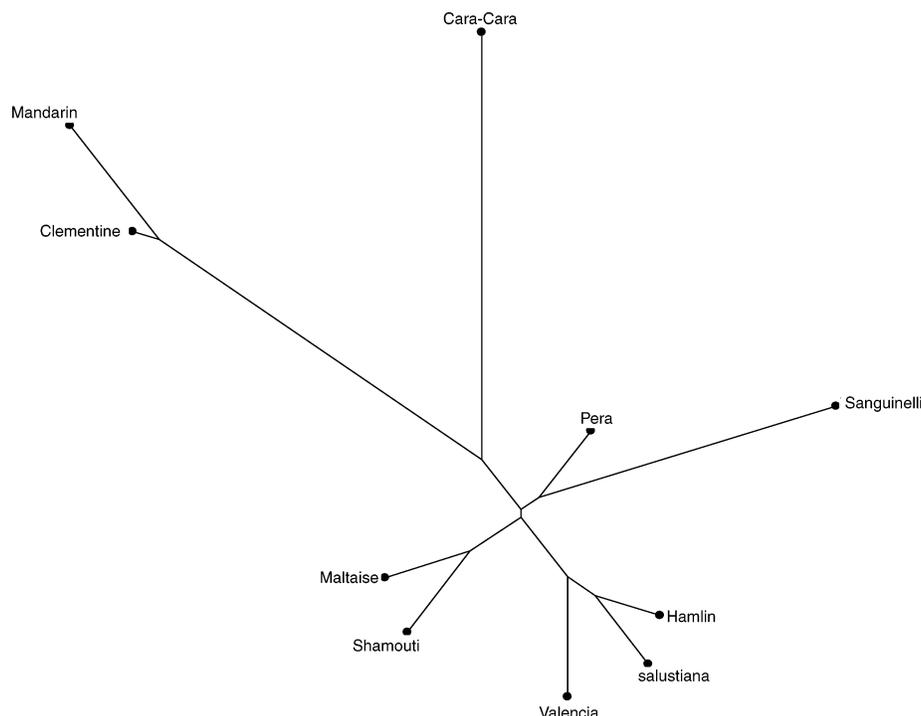


Figure 3. Classification of sweet oranges, Clementine, and Commune Mandarin on the basis of nutritional components. Neighbor-joining analysis on Euclidian distances from carotenoids and flavonoids contents was performed.

cultivars based on nutritional criteria, correlations between β -cryptoxanthin and other antioxidants, hesperidin and vitamin C, were examined. A strong correlation was observed between β -cryptoxanthin and hesperidin ($r = 0.927$), which stressed that some cultivars have high contents of both of these antioxidants. Such a correlation between these two antioxidants was surprising, because of their independent biosynthetic pathways. Even though these two antioxidants (β -cryptoxanthin and hesperidin) were biosynthetically independent, it may be possible that their accumulation was governed by the same factors during fruit ripening. A three-dimensional representation of the results (Figure 2) clearly showed the most interesting cultivars with regard to their nutritional qualities. The Mandarin/Clementine group was the most interesting with respect to their hesperidin and β -cryptoxanthin contents. It is quite remarkable to note that Clementine, which is known to be a hybrid between the Mediterranean Mandarin (*Citrus deliciosa*) and a sweet orange, is very close to its Mandarin parent with regard to its nutritional characteristics (Figure 3). These results confirm that “Mediterranean Mandarin” exerts a strong dominance for the expression of secondary metabolites as has previously been observed for aromatic compounds of somatic hybrids by Gancel et al. (32). With regard to its high nutritional value and genetic dominance, Mediterranean Mandarin appeared as a very interesting parent for citrus breeding with a nutritional objective.

Among the sweet oranges, Shamouti, Sanguinelli, and Pera displayed the best combination of hesperidin and β -cryptoxanthin, with a good level of vitamin C for the last two cultivars. Salustiana, Hamlin, Maltaise, and Valencia sweet oranges appeared to be less interesting from a nutritional point of view. Among the most interesting sweet oranges, cv. Pera is especially produced in Brazil and widely distributed over the world. Compared to the well-known Valencia variety that is widely processed into juices, the Pera variety had better nutritional characteristics, particularly in vitamin A (374 RE) and hesperidin contents. Cv. Sanguinelli, which is mostly cultivated in Italy, also possessed strong nutritional qualities, with the highest

provitamin A value as well as high contents of hesperidin and vitamin C. This suggests that this cultivar should be promoted for both the fresh market and juice processing.

Concerning cv. Cara-Cara, this unique red navel orange was shown to contain the red lipophilic pigment lycopene as in red grapefruit (1.83 mg L^{-1}), as well as a high content of β -carotene (2 to 9 times more than other sweet oranges). Besides the provitamin A activity provided by β -carotene and β -cryptoxanthin, lycopene could contribute to the high antioxidant capacity of cv. Cara-cara. Indeed, lycopene has been shown to possess a high antioxidant function among carotenoids because of its highly conjugated structure (33).

Finally, this study confirmed the high contents of carotenoids in citrus varieties cultivated under the Mediterranean climate. Indeed, climatic conditions in Corsica during the 2002 season were similar to the those of the past 20 years, with low average temperatures ($15 \text{ }^\circ\text{C}$). Under these more stressful conditions, the citrus skin and pulp color appeared to be more pronounced than those in citrus fruits produced under tropical or subtropical climates, reflecting a higher content of carotenoids in Mediterranean citrus fruits. To confirm the higher content in antioxidants of citrus growing under the Mediterranean climate, studies are currently being carried out for the same varieties cultivated under both Mediterranean and tropical climates.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Agronomic Research Station (SRA) INRA/CIRAD of San Giuliano (Corsica) for the kind gift of citrus fruits. We also thank Xavier Perrier for help in sampling procedures and Guy Self for assistance in English text corrections.

LITERATURE CITED

- Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Marin, F. R.; Ortuno, A.; Del Rio, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4505–4515.

- (2) Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from *Citrus* juice. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 128–135.
- (3) Yano, M. Cancer prevention by citrus. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **2002**, *49*, 139–144.
- (4) Garner, P. T.; White, T. A. C.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. The relative contributions of vitamin C, Carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* **2000**, *68*, 471–474.
- (5) Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 430–439.
- (6) Rapisarda, P.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Bonina, F.; De Pasquale, A.; Saija, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4718–4723.
- (7) Erlund, I.; Meririnne, E.; Alftan, G.; Aro, A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 235–241.
- (8) Manach, C.; Morand, C.; Gil-Iquiedo, A.; Bouteloup-Demange, C.; Rémésy, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**, *57*, 235–242.
- (9) Nagy, S.; Chen, C. S.; Shaw, P. E. *Fruit Juice Processing Technology*; Agscience: Auburndale, FL, 1993.
- (10) Lin, S. D.; Chen, A. O.; Major carotenoids in juices of ponkan mandarin and Liucheng orange. *J. Food Biochem.* **1995**, *18*, 273–283.
- (11) 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.
- (12) Sugiura, M.; Kato, M.; Matsumoto, H.; Nagao, A.; Yano, M. Serum concentration of β -cryptoxanthin in Japan reflects the frequency of satsuma mandarin (*Citrus unshiu*, Marc.) consumption. *J. Health Sci.* **2002**, *48*, 350–353.
- (13) Irwig, M. S.; El-Soheily, A.; Baylin, A.; Rifai, N.; Campos, H. Frequent intake of tropical fruits that are rich in β -cryptoxanthin is associated with higher plasma β -cryptoxanthin concentrations in Costa Rican adolescents. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3161–3167.
- (14) Gil-Izquierdo, A.; Gil, I. M.; Ferreres, F. Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5107–5114.
- (15) Pupin, A. M.; Dennis, M. J.; Toledo, M. C. F. HPLC Analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chem.* **1999**, *64*, 269–275. Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Faure, R.; Estienne, M. Blood orange juice authentication using cinnamic acid derivatives. Variety differentiations associated with flavanone glycoside content. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 373–377.
- (16) Taugbodhitham, A. K.; Jones, G. P.; Walhlqvist, M. L.; Briggs, D. R. Evaluation of method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chem.* **1998**, *63*, 577–584.
- (17) Caris-Veyrat, C.; Schmid, A.; Carail, M.; Böhm, V. Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanisms of formation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7318–7325.
- (18) Britton, G.; Lianen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids*. Vol. 1B: *Spectroscopy*; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 1995.
- (19) Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Faure, R.; Estienne, M. Blood orange juice authentication using cinnamic acid derivatives. Variety differentiations associated with flavanone glycoside content. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 373–377.
- (20) Cortes Sanchez-Mata, M.; Camara-Hurtando, M.; Diez-Marques, C.; Esperanza Torija-Isasa, M. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *210*, 220–225.
- (21) Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, P. Vitamin C, provitamin A, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 647–653.
- (22) Sumida, T.; Hamada, S.; Azuma, Y.; Ogawa, H.; Tada, M. Change of total carotenoid and β -cryptoxanthin contents of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) juice caused by heating, illumination and storage. *Nippon Shokulin Kagaku Gakkaishi* **1999**, *6*, 106–110.
- (23) Kiong-Cheol Ko; Chan-Shick Kim; Nam Ho Lee; Sam-Pin Lee; Doo-Khil Moon. Determination of β -cryptoxanthin in peel and flesh of citrus fruits produced in Cheju Island. *Food Sci. Biotechnol.* **2000**, *9*, 288–291.
- (24) Saunt, J. *Citrus Varieties of the World*; Sinclair International: Norwich, U.K., 2000.
- (25) Goodner, K. L.; Rouseff, R. L.; Hofsommer, H. J. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1146–1150.
- (26) Mouly, P. P.; Arzouyan, C. R.; Gaydou, E. M.; Estienne, J. M. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 70–79.
- (27) Ooghe, W. C.; Ooghe, S. J.; Detavernier, C. M.; Huyghebaert, A.; Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2183–2190.
- (28) Rouseff, R. L.; Martin, S. F.; Youtsey, C. O. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in *Citrus*. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 1027–1030.
- (29) Pupin, A. M.; Dennis, M. J.; Toledo, M. C. F. Flavanones glycosides in brazilian orange juice. *Food Chem.* **1998**, *61*, 275–280.
- (30) Gross, J. Carotenoid changes in the juice of the ripening Dancy tangerine (*Citrus reticulata*). *Lebensm.-Wiss - Technol.* **1982**, *15*, 36–38.
- (31) Lee, H. S.; Castle, W. S. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood Orange juices. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 877–882.
- (32) Gancel, A. L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J. M. Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parents. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6006–6013.
- (33) Di Mascio, P.; Murphy, M. C.; Sies, H. Antioxidant defense systems, the role of carotenoid, tocopherol and thiols. *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.* **1991**, *53*, 194–200.

Received for review June 23, 2004. Revised manuscript received December 23, 2004. Accepted December 28, 2004.

JF0402983

1.2.2 Influence environnementale sur la composition en caroténoïdes des jus d'agrumes (résultats non-publiés)

L'influence environnementale sur la composition en caroténoïdes a été étudiée sur des oranges et mandarines en provenance des collections de Nouvelle Calédonie et de Tahiti correspondant aux variétés choisies et de même origine que celles de la collection de Corse (N° SRA identique). La figure 7 représente les résultats des ACP permettant de différencier les agrumes d'origine méditerranéenne ou tropicale. Le groupe des agrumes tropicaux est parfaitement différencié des agrumes méditerranéens. Suivant les espèces, orange ou mandarine, la différenciation des origines géographiques se déplace sur des axes verticaux ou horizontaux. En effet, les oranges méditerranéennes riches en caroténoïdes provitaminiques A se retrouvent sur la partie haute de l'axe vertical, alors que les oranges tropicales dont les teneurs en caroténoïdes sont faibles, sont sur la partie basse de l'axe et légèrement à gauche. Les mandarines méditerranéennes ou tropicales qui contiennent peu de xanthophylles, se déplacent sur l'axe horizontal. La mandarine méditerranéenne plus riche en β -cryptoxanthine et β -carotène se positionne complètement à droite sur l'axe horizontal alors que la mandarine tropicale rejoint le groupe des agrumes ayant des teneurs faibles en caroténoïdes. La clémentine méditerranéenne, par son caractère hybride, occupe une position proche de son homologue tropical.

Le cercle des corrélations est formé de deux groupes de vecteurs opposés, démontrant les corrélations qui lient d'un côté les xanthophylles et de l'autre les caroténoïdes provitaminiques A et leurs précurseurs. Les plus fortes corrélations sont observées entre les caroténoïdes provitaminiques A et les précurseurs phytoène et phytofluène, qui soulignent l'importance des premières étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ($R=0,97$ entre le β -carotène et le phytofluène, $R=0,96$ entre le β -carotène et le phytoène; $R=0,88$ entre la β -cryptoxanthine et le phytofluène).

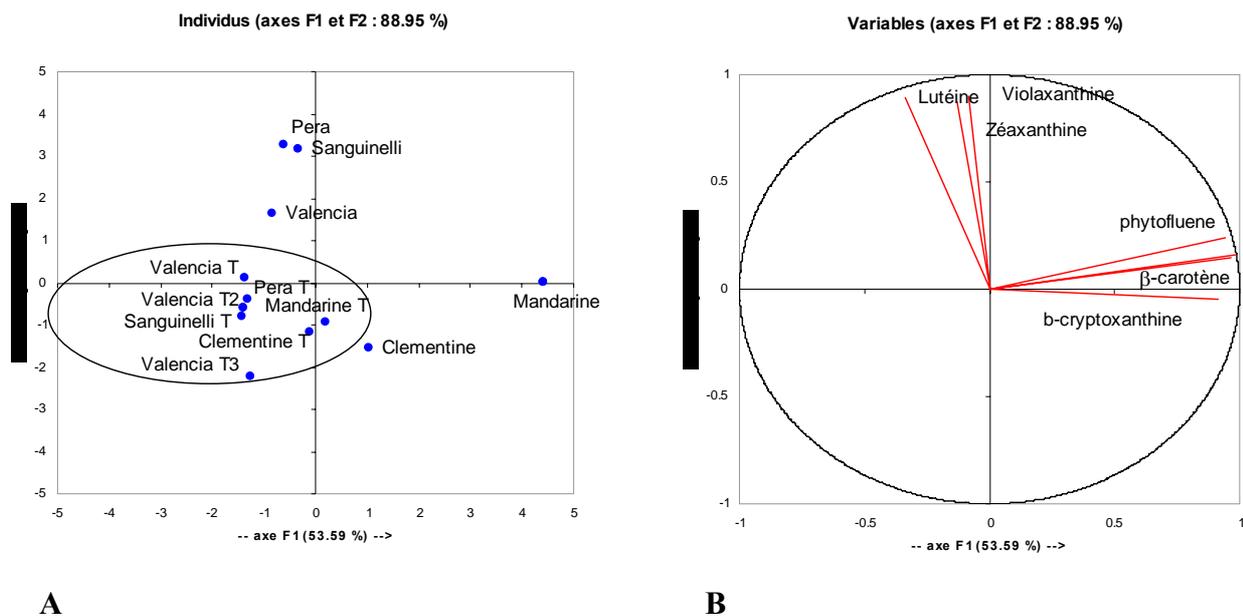


Figure 7. A Classification des agrumes en fonction des origines géographiques (ACP basée sur les teneurs en caroténoïdes). Origines : Corse ; Nouvelle-Calédonie et Tahiti (T) ; Costa-Rica (T2) ; Brésil (T3). B Cercle des corrélations.

Ces derniers résultats mettent en évidence que la teneur en caroténoïdes des agrumes pour une même variété dépend fortement de l'origine géographique. Quel rôle le climat peut-il avoir sur le métabolisme des caroténoïdes ? Si la dégradation des chlorophylles et la biosynthèse des caroténoïdes, phénomènes entraînés par le froid, ont été observés sur la peau des agrumes tempérés, les mécanismes physiologiques n'ont pas été élucidés. Cette étude est préliminaire et les comparaisons avec d'autres origines géographiques comme l'Espagne ou la Floride seraient nécessaires pour mieux apprécier les variations inter-climat ainsi que les différents facteurs intervenant dans la régulation de la biosynthèse des caroténoïdes.

Si les jus d'agrumes tropicaux ont des teneurs plus faibles en caroténoïdes que les jus d'agrumes méditerranéens, on peut s'interroger sur la valeur provitaminique des jus commerciaux et de leur teneur en caroténoïde d'une manière générale. En effet, la majorité des jus commerciaux sont fabriqués à partir d'orange provenant du Brésil ou de Floride. Les principaux traitements thermiques que sont la pasteurisation et la concentration ont-ils des effets négatifs sur la valeur provitaminique A des jus d'agrumes ou sur d'autres vitamines ? Pour cette raison, l'objectif de l'étude suivante a été de déterminer l'impact des traitements thermiques sur les microconstituants des jus d'agrumes en étudiant les cinétiques de dégradation thermique des caroténoïdes et de la vitamine C.

1.2.3 Dégradation thermique des microconstituants des jus d'agrumes : cinétiques et composés néoformés (publication2)

La dégradation thermique des caroténoïdes à 55°C nous révèle une différence de comportement entre les principaux caroténoïdes provitaminiques A et les autres xanthophylles. Aucune perte significative n'est observée pour la β -cryptoxanthine et le β -carotène à cette température après 15 minutes de traitement. Par contre, ce traitement entraîne des pertes de 18 à 60 % pour tous les autres caroténoïdes dans les mêmes conditions. Parmi les xanthophylles, la zéaxanthine et la lutéine sont les caroténoïdes les plus stables. Par conséquent, les cinétiques de dégradation thermique conduites entre 75 et 100°C ne sont applicables que pour la β -cryptoxanthine, son isomère et le β -carotène.

L'analyse des données issues des cinétiques suggère que les trois caroténoïdes (β -cryptoxanthine, son isomère et le β -carotène) suivent une réaction d'ordre 1. En effet, le logarithme des concentrations est proportionnel au temps de traitement et les coefficients se situent entre 0,88 et 0,98. Les constantes de vitesse déterminées par la pente des droites de régression pour les trois caroténoïdes étudiés sont relativement faibles compte tenu des températures choisies. L'influence de la température sur les constantes de vitesse est décrite par la loi d'Arrhenius et les paramètres cinétiques E_A et K_0 sont déterminés graphiquement. L'augmentation de température nécessaire pour multiplier par 10 la vitesse de réaction (valeur z) est également déterminée graphiquement. Les énergies d'activation des trois caroténoïdes indiquent que la β -cryptoxanthine et son isomère sont plus affectés par une augmentation de température que le β -carotène.

Les cinétiques de dégradation thermique de la vitamine C révèlent des constantes de vitesse assez faibles pour les températures étudiées (de 50 à 100°C). L'énergie d'activation est comprise dans les gammes de valeurs trouvées dans la littérature. La dégradation de l'acide ascorbique dépend de la concentration en oxygène dissous. Cette dégradation est 10 fois plus faible quand la concentration en oxygène dissous est de 0,2 mg/L par rapport à la concentration en oxygène de 2,5 mg/L correspondant à un jus naturel. Ce résultat suggère que la dégradation thermique de l'acide ascorbique passe par un mécanisme oxydatif.

Aucune perte significative n'est observée à 90°C pour l'héspéridine après 4 heures de traitement thermique. La thermostabilité de ce composé phénolique apparaît être très élevée. La stabilité de ce composé a déjà été testée lors d'une pasteurisation et aucune perte n'a été constatée (Sanchez-Moreno *et al.*, 2005).

Pour valider les modèles prédictifs, les pertes expérimentales sont comparées aux valeurs calculées à l'aide des deux modèles. Les valeurs similaires obtenues valident l'exactitude des modèles dans des conditions isothermes. Ces modèles peuvent ensuite être utilisés pour prévoir les pertes au cours des traitements thermiques. Les courbes obtenues indiquent que lors d'une pasteurisation classique de jus d'agrumes, les pertes se situent autour de 2 % pour l'acide ascorbique et le β -carotène.

L'analyse et l'identification des produits de dégradation après 5h de traitement thermique des jus à 95°C montrent principalement des isomérisations des fonctions époxydes 5,6 en fonctions furanoxydes 5,8 qui peuvent se produire communément avec plusieurs xanthophylles surtout en condition acide. La disparition de la violaxanthine dans le jus chauffé et l'apparition de l'auroxanthine en sont l'illustration. L'auroxanthine identifiée après 5 heures de chauffage est déjà présente après 15 minutes de traitement à 95°C. Par ailleurs, des isomérisations *cis* apparaissent pour la zeinoxanthine et le ζ -carotène. Les diverses isomérisations et conversions observées lors de ces traitements thermiques conduisent à une perte visuelle de couleur.

En résumé, cette troisième étude a montré que les antioxydants (vitamine C, caroténoïdes provitaminiques A, héspéridine) présents dans les jus d'agrumes sont relativement thermorésistants. En conséquence, les traitements thermiques classiques comme la pasteurisation n'affecte pas les microconstituants étudiés des agrumes. D'autres études sur la dégradation des xanthophylles restent à faire car ces composés se sont révélés être beaucoup plus sensibles à la chaleur et sont susceptibles de se transformer.

Thermal Degradation of Antioxidant Micronutrients in *Citrus* Juice: Kinetics and Newly Formed Compounds

CLAUDIE DHUIQUE-MAYER,^{*,†} MANAL TBATOU,[†] MICHEL CARAIL,[‡]
 CATHERINE CARIS-VEYRAT,[‡] MANUEL DORNIER,[§] AND MARIE JOSEPHE AMIOT^{||}

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),
 Département PERSYST UMR 95 Tropical Food Quality, TA B-95/16, 73 Av. J.F Breton 34398,
 Montpellier Cedex 5, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale UMR A408 INRA,
 84914 Avignon Cedex 9, Montpellier SupAgro, IRC, UMR 95, CS 24501, F-34093 Montpellier
 Cedex 5, and Vitamines et Microconstituants Lipophiles, INSERM,
 Unité A 476/1260 INRA 13385 Marseille Cedex 5, France

The thermal degradation kinetics of vitamin C, two carotenoids (β -carotene and β -cryptoxanthin), and hesperidin, as a function of temperature, were determined for *Citrus* juice [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Citrus clementina* Hort. ex Tan]. The influence of dissolved oxygen on the rate of ascorbic acid degradation was also assessed. Analysis of kinetic data suggested a first-order reaction for the degradation of vitamin C and carotenoids. The kinetics parameters D_0 , z , and E_a have been calculated. Following the Arrhenius relationship, the activation energy of ascorbic acid was 35.9 kJ mol⁻¹ and agreed with the range of literature reported value. The results on vitamin C and carotenoids from citrus juice made it possible to validate the predicting model. Thermal degradation of carotenoids revealed differences in stability among the main provitamin A carotenoids and between these and other carotenoids belonging to the xanthophyll family. The activation energies for the two provitamin A carotenoids were 110 and 156 kJ mol⁻¹ for β -carotene and β -cryptoxanthin, respectively. On the other hand, no degradation of hesperidin was observed during thermal treatment. Finally, the vitamin C in citrus juice was not as heat sensitive as expected and the main provitamin A carotenoids present in citrus juice displayed a relative heat stability. The high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry analysis of degradation products showed that the isomerization of the epoxide function in position 5,6 into a furanoxide function in position 5,8 was a common reaction for several xanthophylls. These findings will help determine optimal processing conditions for minimizing the degradation of important quality factors such as vitamin C and carotenoid in citrus juice.

KEYWORDS: *Citrus* juice; vitamin C; β -carotene; β -cryptoxanthin; HPLC-DAD-MS; thermal degradation kinetics

INTRODUCTION

The consumption of citrus juices, especially orange juice, was reported to be beneficial for the prevention of degenerative diseases (1–3). Health benefits of citrus could be attributed to the richness in various antioxidants, vitamin C, polyphenols, and carotenoids, which are able to counteract oxidative stress, a key step in the development of degenerative diseases (4). Moreover, citrus juices represent a dietary source of provitamin A carotenoid with β -cryptoxanthin and β -carotene (5). However, processing, especially thermal treatments, could cause undesir-

able reactions such as nonenzymatic browning and nutrient losses (6–8). Vitamin C (L-ascorbic acid) is a typical heat sensitive micronutrient, and its degradation plays a major role in nonenzymatic browning reactions (9). Because HMF is one of the decomposition compounds of ascorbic acid degradation, it is used to evaluate the severity of heating applied to fruit juice during processing (10). That is, the oxidation of carotenoids generates losses of color and provitamin A levels as well as the development of off-flavors (11). In a food system, the mechanisms involved in the nutrient degradation are complex. The various interactions between the different solutes in citrus juices could modulate nutrient degradation. Likewise, degradation rates depend on environmental conditions such as pH, dissolved oxygen content, metal catalysis, and UV exposure (12, 13).

To predict nutrient damage during thermal treatments, the knowledge of the kinetics behavior of these compounds,

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33(0)467614482. Fax: +33(0)467614433. E-mail: claudie.dhuique-mayer@cirad.fr.

[†] Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

[‡] Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale UMR A408 INRA.

[§] Montpellier SupAgro.

^{||} Vitamines et Microconstituants Lipophiles, INSERM.

including the reaction rate as a function of temperature, is required. The degradation kinetics of vitamin C have been extensively studied for food storage at low temperatures and in model systems (7, 12, 14–16). Few data are available for thermal degradation of ascorbic acid in real situations like fruit juices at temperatures as high as 50 °C (17–19); it seems to depend on the content of dissolved oxygen (7).

Recently, the degradation kinetics of total carotenoids were studied by measuring the absorption at 450 nm (20). Other studies focused on the degradation of carotenoids in dehydrated or model food systems (21–26). Kinetic parameters were strongly modulated by the nature of the pigments, the experimental conditions used, and the product's moisture content. In aqueous media, the stability of carotenoids is increased and follows a first-order reaction kinetics, whereas in anhydrous media, decoloring of carotenoids seems to follow zero-order kinetics (23, 24). Nevertheless, the effects of thermal treatment on carotenoids pigments in fruit juices remain unclear because of the lack of data available in the literature, particularly on thermal processing, which induces isomerization and degradation products.

The objective of our study was to understand the impact of thermal treatment on micronutrients and to improve the knowledge of their thermal resistance. To better characterize the decrease of nutritional quality of a citrus juice undergoing conventional thermal treatments such as pasteurization or concentration, kinetic studies were carried out. The influence of temperature (between 50 and 100 °C) on the degradation kinetics of the main antioxidant micronutrient (carotenoids, vitamin C, and hesperidin) of citrus juice was studied to predict the impact of thermal processing on these antioxidants. Experimental data were treated using kinetic models. In addition, several degradation products of carotenoids from heated citrus juice were identified.

MATERIALS AND METHODS

Citrus Juices. Four citrus fruits from the Agronomic Research Station selections (San Guiliano, Corsica, France) were used as follows: oranges [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Valencia SRA 246, cv. Pera SRA 399, Sanguinelli SRA 243, and clementine SRA 85 (*Citrus clementina* Hort.ex Tan) in Tanaka classification. All fruits were harvested between December 2002 and April 2003. Fruits were received at maturity stage (total soluble solids/titrable acidity = 7 for orange and 14 for clementine) and were immediately hand-squeezed, then filtered through a stainless steel sieve (1 mm), and after placed in amber sealed vials (125 mL) under nitrogen and kept frozen (−20 °C) until analyzed. For our study, a juice was chosen for its high contents in provitamin A carotenoids and other xanthophylls. The mix ratio was 1/1/1 (v/v/v) for Valencia, Pera, Sanguinelli, and Clementine, respectively. Two lots were prepared as follows: Juice 1 was used for studying the degradation kinetics of carotenoids at 55 °C, and juice 2 was used for all of the other trials (Table 1). The dissolved oxygen content was 2.5 mg L^{−1} ± 0.03 for all of the treated juices (oxygen meter Cellox325 multilinedP3, WTW, Germany).

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Carotenoids from Juice. Extraction, saponification, and analysis were carried out according to Dhuique-Mayer et al. (5). First, 10 g of citrus juice was extracted with ethanol/hexane 4/3 v/v. Lycopene was added as the internal standard. Saponification with 10% methanolic KOH was carried out overnight in the dark at room temperature (25 °C). Carotenoids were analyzed by reverse-phase HPLC using an Agilent 1100 system (Massy, France). Carotenoids were separated along a C₃₀ column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm YMC) (EUROP GMBH, Germany), and the mobile phases were H₂O as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE (methyl-*tert*-butyl-ether) as eluent C. The flow rate was fixed at 1 mL min^{−1}, the column temperature was set at 25 °C, and the injection volume was 20 μL. A gradient program was

Table 1. Characterization of Citrus Juices Used for Kinetic Experiments

| | juice 1 | juice 2 |
|--|-----------------------------------|-------------|
| TSS (g kg ^{−1}) ^a | 120 ± 2 | 116 ± 2 |
| TA (g L ^{−1}) ^b | 8 ± 0.1 | 9 ± 0.2 |
| pH | 3.7 ± 0.05 | 3.6 ± 0.06 |
| | carotenoids (mg L ^{−1}) | |
| β-carotene | 0.76 ± 0.04 | 0.75 ± 0.05 |
| β-cryptoxanthin | 4.70 ± 0.30 | 2.43 ± 0.20 |
| zeinoxanthin | 0.68 ± 0.05 | 0.55 ± 0.04 |
| violaxanthin | 1.80 ± 0.15 | 3.70 ± 0.25 |
| zeaxanthin | 0.71 ± 0.09 | 1.12 ± 0.10 |
| lutein | 0.76 ± 0.05 | 0.90 ± 0.09 |
| phytofluene | 1.40 ± 0.20 | 0.71 ± 0.09 |
| phytoene | 1.04 ± 0.09 | 0.57 ± 0.06 |
| ascorbic acid (mg L ^{−1}) | 413 ± 0.5 | 406 ± 0.6 |
| hesperidin (mg L ^{−1}) | 384 ± 1.2 | 460 ± 2.1 |

^a TSS, titrable soluble solid. ^b TA, titrable acidity expressed as g L^{−1} of citric acid. Values are the means of three determinations ± standard deviations.

performed as follows: the initial conditions were 40 % A/60% B; 0–5 min, 20% A/80% B; 5–10 min, 4 % A/81% B/ 15% C; 10–60 min, 4% A/11% B/ 85% C; 60–71 min, 100% B 71–72 min, and back to the initial conditions for reequilibration. Absorbance was then assessed at 290, 350, 450, and 470 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV–visible spectra were treated using the Agilent Chemstation Plus software. Quantification of carotenoids was achieved using calibration curves with β-carotene and β-cryptoxanthin with five concentration levels from 3 to 15 mg L^{−1} (standards from Extrasynthese, Genay, France).

Determination of Vitamin C. Ascorbic acid was determined by HPLC (5). Orange juice (1 mL) was homogenized with 9 mL of a 4.5% metaphosphoric acid solution. Extractions were carried out in triplicate. After centrifugation, the supernatant was filtered through a 0.45 μm membrane and analyzed by HPLC in duplicate using an Agilent model 1100 system equipped with a RP 18e Licrospher 100 (5 μm) column (250 mm × 4.6 mm id) (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). The isocratic solvent system was a 0.01% solution of H₂SO₄, the flow rate was 1 mL min^{−1}, and detection was set at 245 nm. Quantification of ascorbic acid was carried out by external standard method (calibration curve between 20 and 100 mg L^{−1}).

Determination of Hesperidin. Hesperidin was determined by HPLC according to Dhuique-Mayer et al. (5). The HPLC system was Agilent 1100 model using a RP 18e Licrospher 100 (5 μm) column (250 mm × 4.6 mm id) (Merck KgaA). The isocratic solvent system was water/acetonitrile/THF/acetic acid (80:16:3:1;v/v/v/v). Quantification was carried out at 280 nm. The flow rate was fixed at 1 mL min^{−1}. Hesperidin concentrations were determined using an external calibration method. Standards HES was diluted in DMF/water (2:1, v/v) to give 102 mg L^{−1}.

Thermal Treatment. The thermal degradation of citrus juice was studied at temperatures of 75, 80, 90, 95, and 100 °C for carotenoids; 50, 70, 80, 90, and 100 °C for ascorbic acid; and 70 and 90 °C for hesperidin. Juice (15 mL) was heated in sealed pyrex tubes (100 mm length, 16 mm i.d.) to ensure isothermal heating. The tubes were immersed in an oil bath with a temperature control (AM 3001K, Fisher-Bioblock Scientific, Illkirch, France). A digital temperature probe (Heidolph EKT 3001 ± 1°C) fitted to a sealed pyrex tube was used to measure the juice temperature during the thermal experiments. The time for juice to reach the temperature set up was below 4 min, and the cooling time was about 1 min. Then, the thermal transient could be negligible and the treatment could be considered isothermal. The tubes were taken out of the oil bath (for each time/temperature, two tubes were analyzed for carotenoids and three tubes were analyzed for ascorbic acid) at different times (from 15 to 300 min) and immediately cooled down in an iced water bath. Each juice was stored in amber sealed vials (20 mL) under nitrogen and kept frozen (−20 °C) until analyzed.

Degradation Kinetics Modeling. Assuming a first-order reaction for micronutrient degradation, that is, the reaction rate is proportional

Table 2. Degradation Kinetics of Carotenoids from Citrus Juice at 55 °C: Group I, Thermostable Compounds; Group II, Heat Sensitive Compounds

| Group I (mg L ⁻¹) ^a | | | | | |
|---|------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| time (min) | β -cryptoxanthin | β -carotene | phytoene | phytofluene | zeinoxanthin |
| 0 | 4.76 a \pm 0.26 | 0.76 a \pm 0.02 | 1.04 a \pm 0.03 | 1.4 a \pm 0.04 | 0.6 a \pm 0.03 |
| 15 | 4.75 a \pm 0.25 | 0.74 a \pm 0.02 | 0.93 a \pm 0.02 | 1.23 a \pm 0.02 | 0.57 a \pm 0.02 |
| 60 | 4.75 a \pm 0.26 | 0.71 a \pm 0.03 | 0.92 a \pm 0.03 | 1.22 a \pm 0.02 | 0.53 a \pm 0.03 |
| 120 | 4.67 a \pm 0.23 | 0.65 a \pm 0.02 | 0.81 ab \pm 0.02 | 1.15 b \pm 0.02 | 0.54 a \pm 0.03 |
| 240 | 4.57 \pm 0.24 | 0.68 a \pm 0.03 | 0.79 b \pm 0.02 | 1.12 b \pm 0.03 | 0.55 a \pm 0.02 |
| 300 | 4.54 a \pm 0.22 | 0.70 a \pm 0.03 | 0.77 b \pm 0.03 | 1.16 b \pm 0.03 | 0.58 a \pm 0.03 |
| Group II (mg L ⁻¹) ^a | | | | | |
| time (min) | violaxanthin | neoxanthin | zeaxanthin | lutein | |
| 0 | 1.76 a \pm 0.04 | 0.37 a \pm 0.04 | 0.71 a \pm 0.03 | 0.76 a \pm 0.04 | |
| 15 | 0.74 b \pm 0.03 | 0.16 b \pm 0.03 | 0.36 b \pm 0.02 | 0.42 b \pm 0.03 | |
| 60 | 0.5 c \pm 0.04 | 0.14 b \pm 0.04 | 0.38 b \pm 0.02 | 0.48 b \pm 0.04 | |
| 120 | 0.22 d \pm 0.03 | ND | 0.32 bc \pm 0.04 | 0.43 b \pm 0.03 | |
| 240 | ND | ND | 0.32 bc \pm 0.04 | 0.46 b \pm 0.03 | |
| 300 | ND | ND | 0.24 c \pm 0.03 | 0.34 c \pm 0.03 | |

^a Values are the mean of three independent determinations \pm standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences for carotenoid content ($\alpha = 0.05\%$). ND, not detected.

to the concentration under isothermal conditions, two models were chosen. The first model is based on the classic approach used for chemical reactions (eq 1), which defines a reaction rate constant (k) that depends on temperature according to an Arrhenius law (eq 2).

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$k = k_\infty e^{-(E_a/RT)} \quad (2)$$

with k_∞ as the pre-exponential factor (s⁻¹), E_a as the activation energy (J mol⁻¹), and R as the gas constant (8.32 J mol⁻¹ K⁻¹).

The second model follows the approach commonly used in food processing (eq 3). It defines a decimal reduction time (eq 4), which is related to temperature via a z factor (eq 5).

$$C = C_0 10^{-(t/d)} \quad (3)$$

$$D = \text{Ln}\left(\frac{10}{k}\right) \quad (4)$$

$$D = D_0 10^{-(T/z)} \quad (5)$$

with D as the decimal reduction time at temperature T (s), D_0 as the D extrapolated value at 0 °C (s), and z expressed in °C.

The model's parameters were identified, using linear regressions on the logarithmic curves of experimental data. Even if the z value could be estimated from E_a using the relationship $z = \text{Ln}(10)RT^2/E_a$ in a narrow range of temperature (using an average temperature), we have chosen to determine the z value graphically. The micronutrient losses during a thermal treatment were calculated from the general expressions of the micronutrient concentration vs time and temperature (eqs 6 and 7)

$$\text{model 1: } \text{Ln}\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k_\infty \int e^{-(E_a/RT)} dt \quad (6)$$

$$\text{model 2: } \log_{10}\left(\frac{C}{C_0}\right) = -\frac{1}{D_0} \int 10^{(T/z)} dt \quad (7)$$

HPLC-Diode Array Detection (DAD)-MS Analysis of Degradation Products from Heated Juice. Citrus juice was heated at 95 °C for 5 h for this experiment. HPLC analyses were carried out with a Hewlett-Packard (HP) model 1050 equipped with a quaternary pump solvent delivery and a DAD switched in line with a Micromass Platform LCZ 4000. The column used was a 250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m, YMC Pack C30 (YMC Inc., Wilmington, NC) equipped with a 20 mm \times 4.6 mm, 5 μ m precolumn. The column was kept at 27 °C. Absorption

spectra were recorded between 220 and 600 nm. Acquisition of the mass data between m/z 100 and 700 was performed in the positive electrospray mode. The program used for data analyses was Masslynx version 3.4. Parameters, and especially cone voltage (15 V), were optimized to avoid fragmentation. The following gradient system was used with H₂O containing 25 mM NH₄OAc (solvent A), methanol containing 25 mM NH₄OAc (solvent B), and MTBE (solvent C): 0–2 min, %A–%B–%C, 40–60–0; 5 min, %A–%B–%C, 20–80–0; 10 min, %A–%B–%C, 4–81–15; 60 min, %A–%B–%C, 4–11–85; 80 min, %A–%B–%C, 4–11–85; 80.01 min, %A–%B–%C, 0–100–0. The flow was 1 mL min⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

Carotenoids Degradation. To evaluate the degradation behavior of the main carotenoids from citrus juice, a treatment was first performed at 55 °C. Carotenoids could be classified in two groups in terms of their heat sensitivity. The first group (**Table 2**) including provitamin A carotenoids (β -carotene and β -cryptoxanthin), zeinoxanthin (isomer of β -cryptoxanthin), and two colorless precursors (phytoene and phytofluene) revealed a higher heat stability, with losses ranging from 1 to 18% after 15 min of treatment. The second group (**Table 2**) comprised highly oxygenated xanthophylls, which degraded faster, with losses between 30 and 60% after 15 min. Among these xanthophylls, zeaxanthin and lutein were the least damaged by heating. These results are in accordance with previous studies (27, 28) and indicate smaller losses for provitamin A carotenoids than for the other xanthophylls during thermal pasteurization of orange juice. Similar observations were reported by Cortes et al. (29) showing that the thermal conservation treatment affects more xanthophylls than provitamin A carotenoids.

To complete kinetic characterization, we selected β -carotene, β -cryptoxanthin, and its isomer zeinoxanthin. The experimental procedure used in this work was not adapted for the second group of carotenoids because of their high rates of degradation at temperatures above 75 °C. As expected, between 75 and 100 °C, degradation kinetics during isothermal treatment fitted the first-order reaction. For the three selected carotenoids, the logarithm of concentration was proportional to treatment time (0.88 < regression coefficient R^2 < 0.98). Examples of β -carotene and β -cryptoxanthin are presented in **Figure 1A,B**. Kinetic parameters, k and D , can be calculated according to the two models at each temperature (**Table 3**). Similar values were obtained for the three carotenoids. In the temperature range

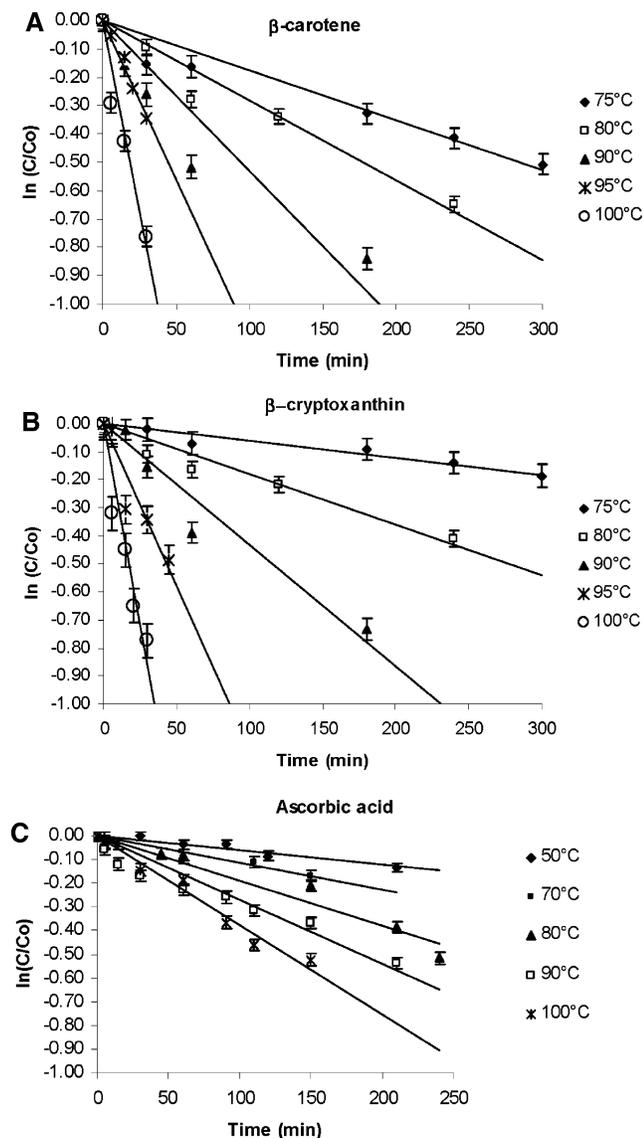


Figure 1. Thermal degradation kinetics of nutrients vs temperature in citrus juice. (A) β -Carotene, (B) β -cryptoxanthin (mean of two thermal treatments conducted in duplicate $2 \times 2n$), and (C) ascorbic acid (mean of three thermal treatments conducted in triplicate $3 \times 3n$).

studied, the degradation rates were low for citrus juice. During conventional thermal processing of fruit juice, the main provitamin A carotenoids were not significantly affected. These results agree with those previously reported (27–31), where losses of β -carotene or β -cryptoxanthin were very low during pasteurization or thermal concentration of different citrus juices.

The Arrhenius law and the z factor fit well the temperature dependence of k and D , respectively ($0.92 < \text{regression coefficient } R^2 < 0.98$) (Figure 2). The activation energies ranged between 110 and 156 kJ mol^{-1} , and the z factor ranged between 16 and 23 $^{\circ}\text{C}$ (Table 4). A higher activation energy of β -cryptoxanthin as compared to β -carotene implies that a smaller temperature change is needed to degrade β -cryptoxanthin more rapidly. For cryptoxanthin isomers, the β form was more affected by a temperature increase than zeinoxanthin. Nevertheless, the E_a and z values showed that thermal sensitivity of the three carotenoids was analogous. These results agree with findings by Hallström et al. (32), who obtained 140 kJ mol^{-1} and 19 $^{\circ}\text{C}$ for carotenoids in paprika. However, Rios and al. (22) reported a E_a value of 154 kJ mol^{-1} for the thermal degradation of bixin in an aqueous model system under

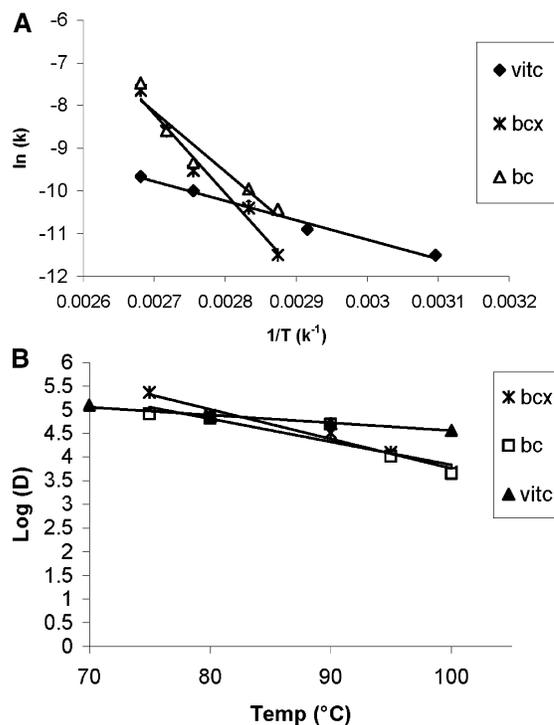


Figure 2. (A) Arrhenius plot for the temperature dependence of the rate constant k for ascorbic acid (vitC), β -cryptoxanthin (bcx) associated with the first order and (B) decimal logarithm of D value vs temperature for β -cryptoxanthin (bcx), β -carotene (bc), and ascorbic acid (vitC).

Table 3. Isothermal Kinetic Parameters k and D vs Temperature for the Thermal Degradation of the Nutrients in Citrus Juice

| | $T(^{\circ}\text{C})$ | $k \times 10^{-5} (\text{s}^{-1})$ | $D \times 10^4 (\text{s})$ |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|
| β -carotene | 75 | 2.951 | 7.802 |
| | 80 | 4.705 | 4.894 |
| | 90 | 8.837 | 2.606 |
| | 95 | 18.717 | 1.230 |
| | 100 | 44.507 | 0.517 |
| β -cryptoxanthin | 75 | 1.011 | 22.773 |
| | 80 | 3.007 | 7.658 |
| | 90 | 7.210 | 3.194 |
| | 95 | 19.365 | 1.189 |
| | 100 | 47.950 | 0.480 |
| Zeinoxanthin ^a | 75 | 2.055 | 11.203 |
| | 80 | 3.870 | 5.950 |
| | 90 | 6.491 | 3.548 |
| | 95 | 20.388 | 1.129 |
| | 100 | 40.492 | 0.569 |
| Ascorbic acid ^b | 50 | 1.042 ± 0.02 | 22.094 ± 0.33 |
| | 70 | 1.924 ± 0.04 | 11.968 ± 0.28 |
| | 80 | 3.140 ± 0.05 | 7.334 ± 0.20 |
| | 90 | 4.043 ± 0.08 | 5.696 ± 0.18 |
| | 100 | 6.319 ± 0.08 | 3.644 ± 0.15 |

^a Structural cryptoxanthin isomer. ^b Kinetic experiments were conducted in triplicate ($3 \times 3n$). For carotenoids, results are the means of two thermal treatments ($2 \times 2n$).

temperatures ranging from 70 to 125 $^{\circ}\text{C}$. Other studies using color as an indicator for carotenoids concentration reported lower E_a values (around 20 kJ mol^{-1}) as compared to our data (19, 20). This difference may have been a result of the product matrix but also of the indirect measurement of carotenoids, which does not permit ready discrimination between carotenoids and other pigments.

Ascorbic Acid Degradation. As shown by numerous studies on citrus juices (17–19, 34, 35), the thermal degradation of

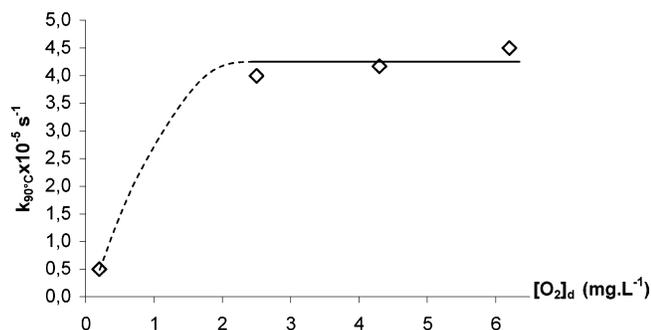


Figure 3. Reaction rate constant of ascorbic acid degradation at 90 °C vs dissolved oxygen concentration in citrus juice.

Table 4. Values of the Parameters of the Models Used to Represent the Degradation Kinetics of the Nutrients in Citrus Juice

| | T range (°C) | Ln k_{∞} ($k_{\infty} s^{-1}$) | E_a (kJ mol ⁻¹) | log D_0 ($D_0 s$) | z (°C) |
|----------------------------|-----------------|--|----------------------------------|--------------------------|------------|
| β -carotene | 75–100 | 27.415 | 110.0 | 8.267 | 22.5 |
| β -cryptoxanthin | 75–100 | 42.410 | 156.0 | 10.028 | 15.9 |
| zeinoxanthin ^a | 75–100 | 31.519 | 122.8 | 8.737 | 20.2 |
| ascorbic acid ^b | 50–100 | 1.81 ± 0.04 | 35.9 ± 0.5 | 6.14 ± 0.2 | 64.0 ± 0.6 |

^a Structural cryptoxanthin isomer. ^b Kinetic experiments were conducted in triplicate (3 × 3n). For carotenoids, results are the means of two thermal treatments (2 × 2n).

ascorbic acid followed a first-order reaction (**Figure 1C**). Regression coefficients obtained on logarithmic curves were above 0.925. The k and D values are presented in **Table 3**. Evaluated in triplicate, the reproducibility of the procedure was good with a standard deviation around 2%. For all of the temperatures tested, the degradation rates were surprisingly very low. At these temperatures, we noticed that the ascorbic acid in the citrus juice studied was not as sensitive as expected. As for carotenoids, the effect of temperature on reaction rate can be accurately represented using the models (**Figure 2**). The E_a and z factor were 36 kJ mol⁻¹ and 64 °C. These results fall within the ranges usually reported in the literature for ascorbic acid degradation in various citrus juices at similar temperatures (20–96 °C): 21–53 kJ mol⁻¹ for E_a and 36–118 °C for z (19, 34, 35). Factors that could contribute to the wide distribution of these kinetic parameters include of course intrinsic characteristics of the product such as variety and maturity, pH, and probably dissolved oxygen level.

The concentration of dissolved oxygen in citrus juice decreased after all thermal treatments, dropping from 2.5 to 1.6 mg L⁻¹. This decrease reveals oxygen consumption via oxidative reactions. Because of the highly reducing property of ascorbic acid, the degradation reaction in citrus juice may depend on oxygen level (36, 19). Alwazeer et al. (37) demonstrated that gassing a juice with N₂ after thermal treatment increased the ascorbic acid stability. To evaluate the hypothesis, degradation kinetics were studied at 90 °C, varying the initial dissolved O₂ concentration in the juice (by N₂ stripping or aerating the standard juice at 2.5 mg L⁻¹). The reaction rate was strongly affected by O₂ concentration (**Figure 3**). Degradation of ascorbic acid is around 10 times slower at 0.2 mg L⁻¹ of dissolved oxygen than at 2.5 mg L⁻¹. Above 2.5 mg L⁻¹, the reaction rate k reached a limit. These results prove that the thermal degradation of ascorbic acid in the juice goes through an oxidative mechanism.

Hesperidin Degradation. For this compound, no significant decrease was noticed during thermal treatments (losses < 2 % at 90 °C after 240 min). In the temperature range studied, the

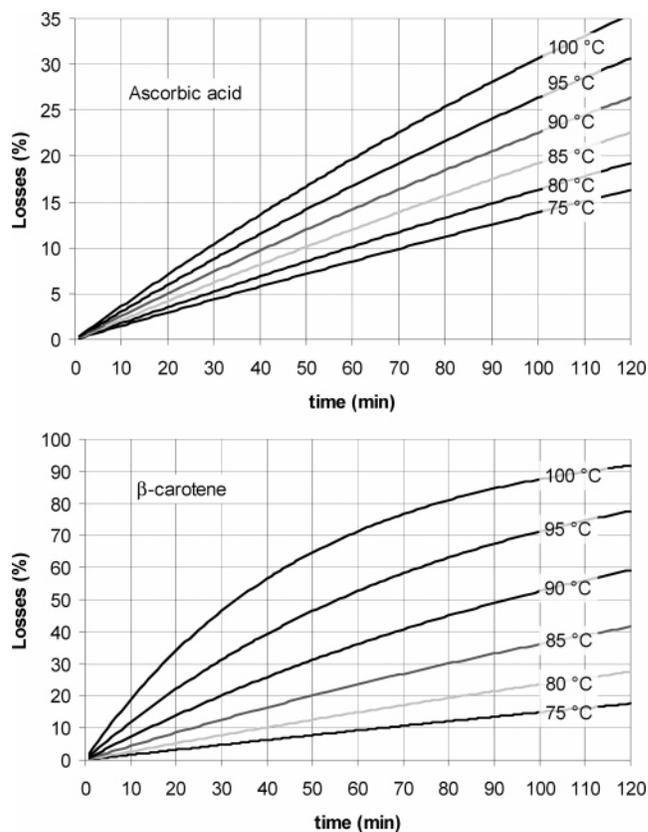


Figure 4. Estimated losses for β -carotene and ascorbic acid during isothermal treatments at different temperatures (D/z model).

Table 5. Comparison between Experimental and Calculated Losses of Nutrients during Isothermal Treatments

| nutrient | heat treatment T (°C)/ t (min) | losses (%) | | |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-----------------|-------------|
| | | experimental ^a | classical model | D/z model |
| β -carotene | 85/120 | 36.5 ± 2 | 42.0 | 41.3 |
| β -cryptoxanthin | 85/120 | 35.0 ± 3 | 29.6 | 28.7 |
| ascorbic acid | 75/30 | 4.1 ± 0.07 | 4.5 | 4.4 |
| | 90/90 | 21.4 ± 0.7 | 20.6 | 20.5 |

^a Experimental data are the means of three determinations ± standard deviations.

thermal stability of this phenolic compound appeared very high. These results were in agreement with those reported by Sanchez-Moreno et al. (38), showing that pasteurization did not modify hesperetin content. This behavior is completely different from anthocyanins that are strongly damaged by heating: 69% losses reported after 120 min at 90 °C in blood orange juice (39). The difference between the chemical structures of these molecules belonging to the subclasses of flavonoids was based on the c-ring and particularly with the presence of positive charge.

Model Validation and Predictions. To check the ability of the models to foresee results, new kinetics were measured during isothermal treatments not tested for identifying parameters. Experimental losses were then compared with calculated values (**Table 5**). In all of the cases, we noticed that both models gave similar results. Estimations were close to the experimental values especially for ascorbic acid. Model accuracy was then verified, and the approach followed for this study was validated for isothermal treatments. To conclude definitively, the models accuracy should also be evaluated for no-isothermal treatments that are closer to real heating processes. The developed models

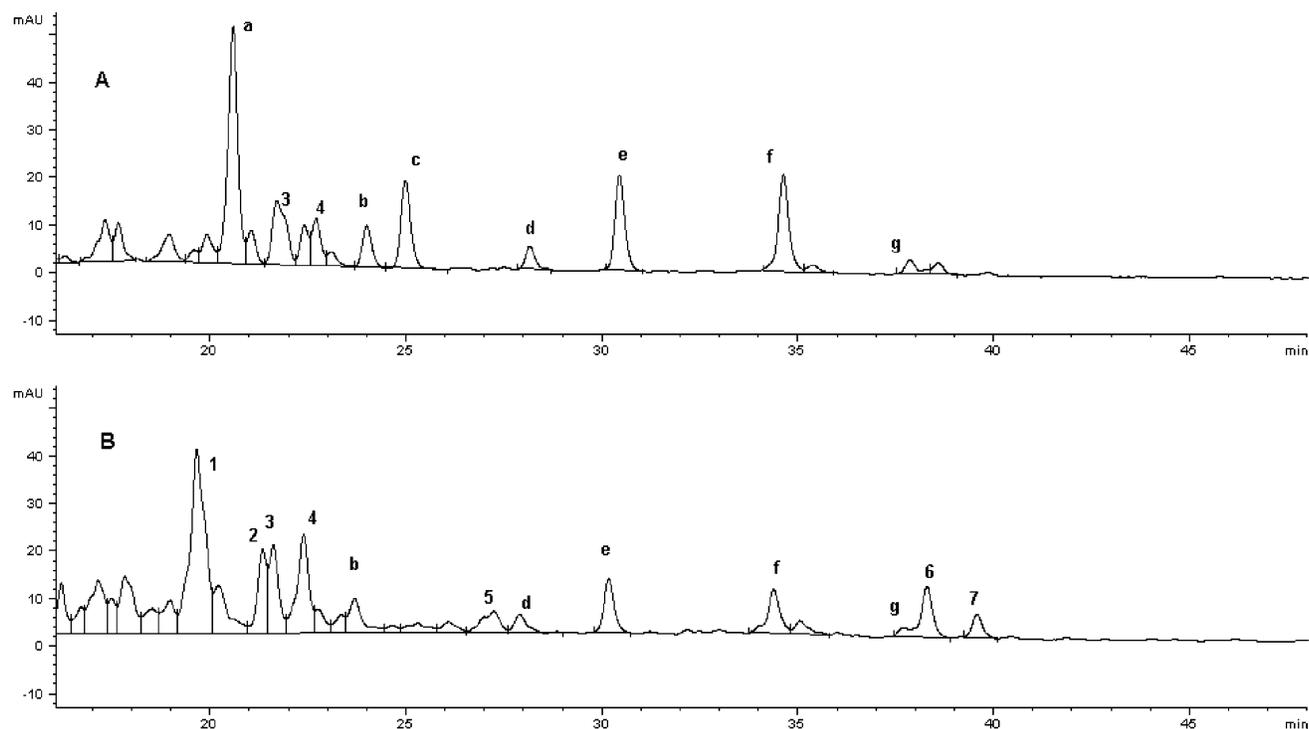


Figure 5. Chromatograms at 400 nm of citrus juice before (A) and after thermal treatment for 5 h at 95 °C (B). Key: 1–7, peaks in heated juice; a–g, peaks in native juice.

Table 6. Chromatographic and Spectral Data Obtained by HPLC-DAD-MS Detection of the Carotenoids in Heated Juice and in Native Juice

| retention time (min) | carotenoid ^a | <i>m/z</i> | spectral maxima (nm) | oxygen atoms (<i>n</i>) | %III/II | juice native | (±) ^b heated |
|----------------------|--|------------|----------------------|---------------------------|---------|--------------|-------------------------|
| 19.65 | auroxanthin (<i>cis</i> or <i>trans</i>) | 602 | 380, 402, 426 | 4 | >100 | – | + (1) |
| 20.61 | violaxanthin (<i>cis</i>) | 602 | 328, 416, 436, 464 | 4 | 87 | + (a) | – |
| 21.33 | auroxanthin (<i>cis</i> or <i>trans</i>) | 602 | 380, 402, 426 | 4 | >100 | – | + (2) |
| 21.60 | mutatoxanthin (<i>cis</i> or <i>trans</i>) | 585 | 408, 428, 452 | 3 | 50 | – | + (3) |
| 22.38 | mutatoxanthin (<i>cis</i>) | 585 | 408, 428, 452 | 3 | 66 | + | + (4) |
| 24.01 | zeaxanthin | 569 | 430, 450, 476 | 2 | 19 | + (b) | + |
| 25.06 | antheraxanthin (<i>cis</i>) | 585 | 421, 442, 468 | 3 | 53 | + (c) | – |
| 27.23 | zeinoxanthin (<i>cis</i>) | – | 338, 424, 444, 468 | 1 | – | – | + (5) |
| 28.18 | zeinoxanthin | 553 | 422, 446, 474 | 1 | 43 | + (d) | + |
| 30.47 | β-cryptoxanthin | 553 | 427, 450, 477 | 1 | 20 | + (e) | + |
| 34.65 | ζ-carotene (<i>cis</i>) | 541 | 296, 78, 400, 424 | – | 70 | + (f) | + |
| 37.87 | β-carotene | – | 452, 478 | – | 12 | + (g) | + |
| 38.28 | ζ-carotene (<i>cis</i> or <i>trans</i>) | 545 | 380, 402, 426 | – | >100 | – | + (6) |
| 39.55 | ζ-carotene (<i>cis</i> or <i>trans</i>) | 545 | 380, 402, 426 | – | >100 | – | + (7) |

^a Tentative identification. ^b +, presence in juice; –, absence in juice. Key: 1–7, peaks in heated juice; a–g, peaks in native juice.

could be easily used as tools to predict losses during whatever heat treatment, for example, isothermal (Figure 4). Calculations confirmed that classical pasteurization treatments do not significantly damage the nutrients studied. Losses were below 2% for 5 min of pasteurization at 85 °C.

Tentative Identification of Degradation Products from Heated Citrus Juice. The spectral, chromatographic, and mass data obtained by HPLC-DAD-MS detection are summarized in Table 6 and illustrated by Figure 5. Peak 1 was tentatively identified as auroxanthin *Z* (*cis*) or *E* (*trans*). A molecular ion at *m/z* 602 was observed, which is consistent with the formula C₄₀H₅₆O₄. The UV–vis spectra showed absorption maxima at 380, 402, and 426 nm, which are characteristic of a chromophore containing seven conjugated carbon–carbon double bonds. Spectral data were in agreement with the presence of two furanoxide functions in 5,8- and 5'8'-positions. This identification is supported by the disappearance of violaxanthin in heated juice, which could have been converted into auroxanthin through the isomerization of its epoxide functions in 5,6- and 5'6'-positions

into furanoxide functions, respectively, in 5,8- and 5'8'-positions. These results are in agreement with those reported by Philip et al. (40) who suggested that acidic conditions and heating promoted furanoid formation through epoxide isomerization. Moreover, auroxanthin was identified in previous studies particularly in processed citrus juice (41, 42). Note that auroxanthin was already present after 15 min at 95 °C, but after 5 h, the content was three times less (data not shown). Peak 2 displays identical spectral data than those of peak 1 but with a lower intensity, suggesting that it could be an isomer of auroxanthin, either *Z* or *E*. Two other peaks 3 and 4 with similar spectral characteristics were attributed to mutatoxanthin isomers. These peaks were already present in native juice but at a lower level. These compounds could derive from *Z*-antheraxanthin recently identified in citrus juices (43) coming from the isomerization of the 5,6-epoxide group into the 5,8-furanoxide group as previously described for auroxanthin. This agrees with the disappearance of *Z*-antheraxanthin in heated juice. Peak b identified as zeaxanthin in native juice was recovered in heated

juice. UV-vis spectra corresponding to peak 5 showed a marked "cis peak" at 338 nm and was tentatively identified as Z-zeinoxanthin. Zeinoxanthin was recently identified (44, 45) as an isomer of β -cryptoxanthin in orange juice. The authors suggest that α -cryptoxanthin and zeinoxanthin were often confused in the literature, with zeinoxanthin designed as α -cryptoxanthin. Like Shlatteer and Breithaupt (45), we did not observe the characteristic fragment of α -cryptoxanthin at m/z 535 but only the molecular ion at m/z 553. Peaks 6 and 7 from heated juice were identified as isomers of ζ -carotene (Z or E) with m/z 545 and a UV-vis spectra characteristic of a conjugated system containing seven carbon-carbon double bonds. In native juice, ζ -carotene was identified with a "cis peak" at 296 nm (peak f). It was also present in heated juice together with other new isomers (peaks 6 and 7). Under our conditions, thermal processing seemed to increase ζ -carotene isomerization in citrus juice.

Our study evaluated the impact of thermal factor on tree types of antioxidant micronutrients—vitamin C, carotenoids, and polyphenol (hesperidin)—in a real product (citrus juice). We conclude that thermal treatments in reference to time/temperature of classical pasteurization conditions do not damage provitamin A carotenoids, polyphenol as hesperidin, and, more surprisingly, vitamin C in citrus juice. However, the model developed in our work could predict the optimal processing conditions that minimize the degradation of vitamin C and carotenoid in citrus juice. Furthermore, xanthophyll carotenoids were shown to be more heat sensitive than carotene and more likely to generate degradation products. Thermal processing of citrus juice induces the formation of carotenoid degradation products such as furanoids and cis isomers. Violaxanthin was the most heat sensitive, and its complete conversion to auroxanthin results in a visually colorless juice. Further experiments are therefore needed to predict degradation kinetics of xanthophylls at temperatures higher than 75 °C. Although some authors reported the lowest contents of vitamin C and carotenoid in thermally processed citrus (46), the storage conditions and not the thermal factor could be a cause of micronutrient losses in fruit juice processing, and further studies must be conducted on the role of other factors such as oxygen and light on the juice's oxidative degradation.

ACKNOWLEDGMENT

We thank The Agronomic Research Station (SRA) INRA/CIRAD of San Guiliano (Corsica) for the kind gift of citrus fruits.

LITERATURE CITED

- Willet, C. W. Diet and health: What should be eat? *Sciences* **1994**, *264*, 533–537.
- Aviram, M.; Dornfeld, L.; Rosenblat, M.; Volkova, N.; Kaplan, M.; Coleman, R.; Hayek, T.; Presser, D.; Fuhrman, B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1062–1076.
- Yano, M. Cancer prevention by citrus. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2002**, *49*, 139–144.
- Cooper, D. A. Carotenoids in health and disease: Recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 221S–224S.
- Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M. J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2140–2145.
- Arena, E.; Fallico, B.; Maccarone, E. Thermal damage in blood orange juice: Kinetics of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde formation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2001**, *36*, 145–151.
- Manso, M. C.; Oliveira, F. A. R.; Oliveira, J. C.; Frias, J. M. Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2001**, *36*, 303–312.
- Yeom, H. W.; Streaker, C. B.; Zhang, Q. H.; Min, D. B. Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4597–4605.
- Roig, M. G.; Bello, J. F.; Rivera, Z. S.; Kennedy, J. F. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Res. Int.* **1999**, *57*, 235–242.
- Burdurlu, H. S.; Koca, N.; Karadeniz, F. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *J. Food Eng.* **2006**, *74*, 211–216.
- Rodriguez-Amaya, D. B. Stability of carotenoids during the storage of foods. In *Shelf Life Studies of Foods and Beverages*; Charalambous, G., Ed.; Elsevier Sci. Publ.: Amsterdam, 1993; pp 591–628.
- Viera, M. C.; Teixeira, A. A.; Silva, C. L. M. Mathematical modelling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuacu (*Theobroma grandifolium*) nectar. *J. Food Eng.* **2000**, *43*, 1–7.
- Choi, M. H.; Kim, G. H.; Lee, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 753–759.
- Shinoda, Y.; Komura, H.; Homma, S.; Murata, M. Browning of model orange juice solution: Factors affecting the formation of decomposition products. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2005**, *69*, 2129–2137.
- Karhan, M.; Aksu, M.; Tetik, N.; Turhan, I. Kinetic modelling of anaerobic thermal degradation of ascorbic acid in rose hip (*Rosa canina* L.) pulp. *J. Food Qual.* **2004**, *27*, 311–319.
- Leizeron, S.; Shimoni, E. Stability and sensory shelf life of orange juice pasteurized by continuous ohmic heating. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4012–4018.
- Johnson, J. R.; Braddock, R. J.; Chen, C. S. Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: Experimental rate constants. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 502–505.
- Van den Broeck, I.; Ludikhuyze, L.; Weemaes, C.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2001–2006.
- Vikram, V. B.; Ramesh, M. N.; Prapulla, S. G. Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *J. Food Eng.* **2005**, *69*, 31–40.
- Ahmed, J.; Shivhare, U. S.; Sandhu, K. S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 2692–2695.
- Henry, L. K.; Pupitasari-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 aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5008–5013.
- O. Rios, A.; Borsarelli, C. D.; Mercadante, A. Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2307–2311.
- Gloria, M. B. A.; Vale, S. R.; Bobbio, P. A. Effect of water activity on the stability of bixin in an annatto extract-microcrystalline cellulose model system. *Food Chem.* **1995**, *52*, 389–391.
- Tsimidou, M. Kinetic studies of saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2890–2898.
- Minguez-Mosquera, M. I.; Jaren-Galan, M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 153–161.

- (26) Pesek, C. A.; Warthesen, J. J. Characterization of the photodegradation of β -carotene in aqueous model systems. *J. Food Sci.* **1989**, *53*, 1517–1520.
- (27) Lee, H. S.; Coates, G. A. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2003**, *36*, 153–156.
- (28) Gama, J. J. T.; Sylos, C. M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 899–903.
- (29) Cortes, C.; Torregrosa, F.; Esteve, M. J.; Frigola, A. Carotenoid profile modification during refrigerated storage in untreated and pasteurized orange juice and orange juice treated with high-intensity pulsed electric fields. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6247–6254.
- (30) Lee, H. S.; Coates, G. A. Thermal pasteurization effects on colour of red grapefruit juices. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 663–666.
- (31) Gama, J. J. T.; Sylos, C. M. Effect of the concentration process on carotenoid composition of Valencia orange juice. In *Pigments in Food, More Than Colors*, 3rd International Congress 14–17 June 2004; Dufossé, L., Ed.; 2004.
- (32) Perez-Galvez, A.; Jaren-Galan, M.; Minguéz-Mosquera, M. I. Impact of the thermal processing on retinol equivalent values of paprika oleoresins. *J. Food Eng.* **2005**, *71*, 379–385.
- (33) Hallström, B.; Skjöldebrand, C.; Tragardh, C. *Heat Transfer and Food Products*; Elsevier Applied Science: Londres, 1988.
- (34) de Dios Alvarado, J.; Palacios Viteri, N. Efecto de la temperatura sobre la degradación aeróbica de vitamina C en jugos de frutas cítricas. *Arch. Latinoam. Nutr.* **1989**, *39*, 601–612.
- (35) Lima, M.; Heskitt, B. F.; Burianek, L. L.; Nokes, S. E.; Sastry, S. K. Ascorbic acid degradation kinetics during conventional and ohmic heating. *J. Food Process. Preserv.* **1999**, *23*, 421–434.
- (36) Robertson, G. L.; Samaniego, C. M. L. Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 184–187.
- (37) Alwazeer, D.; Delbeau, C.; Divies, C.; Cachon, R. Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *89*, 21–29.
- (38) Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Elez-Martinez, P.; De Ancos, B.; Martin-Belloso, O.; Cano, M. P. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4403–4409.
- (39) Kirca, A.; Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem.* **2003**, *81*, 583–587.
- (40) Philip, T.; Chen, T.-S.; Nelson, D. B. Liquid chromatography profiles of major carotenoid esters in commercially processed California navel and orange juice concentrates. *J. Chromatogr. A* **1988**, *442*, 249–265.
- (41) Rouseff, R.; Raley, L.; Hofsommer, H.-J. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2176–2118.
- (42) Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Lapierre, L. J. C. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4038–4045.
- (43) Melendez-Martinez, A. J.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Identification of isolutein (lutein epoxide) as cis-antheraxanthin in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9369–9373.
- (44) Melendez-Martinez, A. J. M.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Identification of zeinoxanthin in orange juices. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6362–6367.
- (45) Schlatterer, J.; Breithaupt, D. E. Cryptoxanthin structural isomers in oranges, orange juice, and other fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6355–6361.
- (46) Melendez-Martinez, A. J.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chem.* **2007**, *101*, 177–184.

Received for review January 8, 2007. Revised manuscript received March 23, 2007. Accepted March 26, 2007.

JF0700529

2 Qualité nutritionnelle des agrumes : estimation *in vitro* de la biodisponibilité des jus d'agrumes

2.1 Objectifs

L'estimation *in vitro* de la biodisponibilité des jus d'agrumes réalisée au cours de cette étude, décrit en fait la première étape de la digestion jusqu'à l'absorption intestinale. Le terme approprié est celui de "bioaccessibilité", plus restrictif que celui de biodisponibilité, qui représente la proportion de microconstituants transférée de la matrice alimentaire dans laquelle ils sont incorporés, vers les micelles mixtes, dans lesquelles ils sont potentiellement absorbables. L'objectif de cette étude est d'évaluer dans un premier temps la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine à l'aide d'un modèle de digestion *in vitro* et d'évaluer ensuite son absorption par l'entérocyte en utilisant les cellules intestinales humaines de type Caco-2 (TC7 clone). Une attention particulière est portée sur le comportement des formes libres et esters de la β -cryptoxanthine. Les études précédentes ont permis de sélectionner des agrumes sur leur teneur en β -cryptoxanthine et sur leur répartition des formes libres et esters. Sur ces jus d'agrumes sélectionnés, l'estimation *in vitro* de la biodisponibilité des caroténoïdes était nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes qui régulent *in fine* la biodisponibilité de ces molécules chez l'homme.

L'évaluation de l'absorption intestinale des formes libres et esters de la β -cryptoxanthine des jus d'agrumes en utilisant un modèle de digestion *in vitro* couplé au modèle cellulaire de type Caco-2 (TC7 clone) a fait l'objet d'une **troisième publication**.

Un jus d'agrumes pouvant être consommé seul ou accompagné d'un repas, le modèle de digestion *in vitro* a été utilisé avec un jus seul et en présence de macronutriments (55 % de glucides, 30 % de lipides et 15 % de protéines) dont la composition est en accord avec les apports journaliers recommandés (**Résultats non publiés**).

2.2 Résultats

2.2.1 Digestion et bioaccessibilité (publication 3)

Les formes libres de la β -cryptoxanthine des jus d'orange et de mandarine représentent un faible pourcentage qui varie de 5 à 18 % contrairement au citron Meyer qui en contient 75 %. Les formes estérifiées étant principalement représentées par le laurate de β -cryptoxanthine et le myristate de β -cryptoxanthine. Les premiers résultats montrent que soumis à un modèle de simulation de digestion, les jus s'enrichissent en β -cryptoxanthine libre. Les pourcentages de forme libre sont de 3 à 4,5 fois plus élevés dans les jus digérés. Ces résultats suggèrent une hydrolyse partielle des esters de β -cryptoxanthine lors de la digestion. L'enzyme responsable de cette hydrolyse pourrait être une carboxyl ester hydrolase ou cholestérol esterase capable de cliver les esters de xanthophylles (Breithaupt & Bamedi, 2001). Les formes esters des jus d'agrumes sont probablement hydrolysées par une enzyme présente dans l'extrait de pancréatine lors de l'étape de digestion intestinale du modèle *in vitro*.

La bioaccessibilité des caroténoïdes des jus d'agrumes est déterminée sur la fraction micellaire des jus digérés. A cause de la teneur élevée en β -cryptoxanthine libre par rapport à la forme estérifiée, le citron Meyer est l'agrumes choisi pour estimer la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine libre. Les oranges et mandarines sont quant à elles utilisées pour évaluer la bioaccessibilité des formes estérifiées. Les résultats indiquent que le pourcentage de bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine libre (40 %) est plus élevé que celui des formes esters (16 %) mais également plus élevé que celui du β -carotène (30 %). Ces résultats confirment que le principal facteur intervenant dans la bioaccessibilité est la micellarisation des caroténoïdes. Pour confirmer ces premiers résultats, le pourcentage de micellarisation est déterminé sur des extraits purifiés riches en caroténoïdes d'agrumes et micellarisés synthétiquement. Des résultats similaires sont obtenus confirmant que le pourcentage de micellarisation de la β -cryptoxanthine libre est plus élevé que celui des formes estérifiées et que celui du β -carotène.

β -Cryptoxanthin from *Citrus* juices: assessment of bioaccessibility using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model

Claudie Dhuique-Mayer^{1*}, Patrick Borel², Emmanuelle Reboul², Bertrand Caporiccio³, Pierre Besancon³ and Marie-Josèphe Amiot²

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UR 24, Tropical food quality, TA50/04, 34398 Montpellier cedex 5, France

²UMR 476 INSERM (National Institute of Health and Medical Research)/1260 INRA (National Institute for Agronomic Research), Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine de la Timone, 13385 Marseille cedex 05, France

³Université Montpellier II E.A Nutrition, 34095 Montpellier cedex 5, France

(Received 8 August 2006 – Revised 5 December 2006 – Accepted 7 December 2006)

β -Cryptoxanthin (β -CX), a provitaminic carotenoid of potential interest for health, is found principally in *Citrus* fruit in both free and esterified forms. Little is known about the intestinal absorption of β -CX especially with regard to the esterified forms. The aim of this study was to evaluate the absorption of free and esterified β -CX using simulated digestion coupled with the Caco-2 model. Bioaccessibility was investigated by measuring the transfer of carotenoids from different citrus juices into micelles using an *in vitro* digestion system. Then, carotenoid uptake was evaluated by adding carotenoid-rich micelles (from the *in vitro* digestion) or synthetic micelles (made from synthetic lipids and carotenoids purified from citrus juice) to human intestinal cells (Caco-2 TC7 clone). Our results showed that β -cryptoxanthin esters (β -CXE) were partially hydrolysed during the *in vitro* digestion. The bioaccessibility of free β -CX measured was significantly higher (40 (SD 1.05) %) than that of β -carotene (30 (SD 1.9) %) and β -CXE (16 (SD 1.5) %). In the same way, the incorporation of free β -CX (27 (SD 1.01) %) into synthetic micelles exceeded ($P < 0.05$) that of β -carotene (10 (SD 0.7) %) and β -CXE (8.8 (SD 0.4) %). In the case of micelles from *in vitro* digestion, the uptake of β -carotene, free β -CX and β -CXE forms by Caco-2 cells was 14.3 (SD 1.8), 3.9 (SD 1.3), and 0.7 (SD 0.08) % respectively. These results showed a preferential uptake by Caco-2 cells of β -carotene and free β -CX compared with the two esters of β -CX.

Bioavailability: Bioaccessibility: Caco-2 cells: Citrus juice, β -Cryptoxanthin

The consumption of citrus fruits might be involved in the prevention of non-communicable diseases such as cancers and cardiovascular diseases (CVD) (Kurowska *et al.* 2000; Yano, 2002; Aviram *et al.* 2004). Citrus juices, such as orange and mandarin, are consumed all over the world and are one of the main dietary sources of β -cryptoxanthin (β -CX) (Lin & Chen, 1995; Mouly *et al.* 1999; Kiong-Cheol *et al.* 2000; Goodner *et al.* 2001; Lee & Castle, 2001). β -CX is the main precursor of vitamin A in citrus juices (Dhuique-Mayer *et al.* 2005). This carotenoid is not fully cleaved in vitamin A in the gut and it is therefore recovered in human plasma (Yeum *et al.* 1996). Recent clinical studies indicated that the frequent intake of citrus fruits increases plasma β -CX concentrations and reported β -CX as a biomarker of mandarin consumption (Sugiura *et al.* 2002; Irwig *et al.* 2002). *In vivo* and *in vitro* experiments suggest that β -CX might prevent certain cancers (Narisawa *et al.* 1999; Tanaka *et al.* 2000; Yano, 2002). However, the biological activities of β -CX greatly depend on its bioavailability.

Carotenoid bioavailability is usually assessed by following changes in plasma carotenoid concentrations after the ingestion of a carotenoid-rich meal (Edwards *et al.* 2002; Tyssandier *et al.* 2002, 2004). However, the wide variations in plasma carotenoid response between individuals and the costs of these studies limit the number possible (Castenmiller & West, 1998). Some animal models are available, but no model appears ideal and again costs limit their use (Lee *et al.* 1999). Recently an *in vitro* model was developed giving promising results (Garrett *et al.* 1999a; Hedren *et al.* 2002; Chang-shu *et al.* 2004). This model first simulates gastric and duodenal processes and then evaluates the micellarisation of carotenoids from a test meal. The quantity of micellised carotenoids is used as an estimate of carotenoid bioaccessibility (the bioaccessibility of a fat-soluble nutrient is the proportion of this micronutrient extracted from the food matrix and solubilised in mixed micelles). Then, Caco-2 cells are used as a model of the intestine in order to measure carotenoid uptake (During *et al.* 2002).

Abbreviations: β -CX, β -cryptoxanthin; β -CXE, β -cryptoxanthin esters; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; MTBE, methyl-*tert*-butyl-ether; THF, tetrahydrofuran.

* **Corresponding author:** Dr C. Dhuique-Mayer, fax +33 4 67 61 44 33, email claudie.dhuique-mayer@cirad.fr

The objective of this study was to assess β -CX bioaccessibility by using an *in vitro* digestion model coupled to Caco-2 (TC-7 clone) intestinal cells. In this study, special attention was given to the behaviour of esterified β -CX forms compared with its free form.

Materials and methods

Chemicals

Extraction solvents were RPE-grade hexane, ethanol and dichloromethane from Carlo-Erba (Val de Reuil, France). Analytic solvents were HPLC-grade methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran (THF) also from Carlo-Erba (Val de Reuil, France), and methyl-*tert*-butyl-ether (MTBE) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Carotenoid standards (98 % pure) used for HPLC analysis were purchased from Extrasynthèse (Genay, France): β -carotene, β -CX, zeaxanthin, lutein, lycopene and β -apo-8'-carotenal. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/l glucose and trypsin-EDTA (500 and 200 mg/l, respectively) was purchased from Bio Whittaker (Fontenay-sous-Bois, France). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Biomedix (Issy-les-Moulineaux, France), and NEAA and penicillin/streptomycin were from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). Pepsin, porcine pancreatin, porcine bile extract and pyrogallol were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Citrus fruits and juices

Different varieties and species of *Citrus* were chosen from Agronomic Research Station (SRA) selections in Corsica: orange cv. Shamouti (Sh) (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), mandarin cv. Wilowleaf (W) (*Citrus deliciosa* Ten), mandarin cv. Hansen (H) (*Citrus reticulata* blanco) and lemon cv. Meyer (*Citrus meyeri* Yu. Tanaka) following the Tanaka classification. SRA numbers were: cv. Shamouti SRA 538; cv. mandarin M SRA 133; cv. mandarin Hansen SRA 356; cv. Meyer lemon SRA 549. The representative sample size (15 fruits/cultivar) was determined in a previous study (Dhuique-Mayer *et al.* 2005). Citrus fruits received at maturity (maturity index: soluble solids/titrable acidity = 7) were immediately hand-squeezed, then filtered through a stainless steel sieve (1 mm). The juices were placed in sealed amber vials (15 ml) under nitrogen and kept frozen at -20°C until analysed; storage time did not exceed 1 month.

Extraction and HPLC analysis of carotenoids from native juices

Extraction, saponification and analysis were carried out according to our previous study (Dhuique-Mayer *et al.* 2005). Citrus juice were extracted with ethanol-hexane (4:3, v/v). Saponification with 10 % methanolic KOH was carried out overnight in the dark at room temperature. HPLC analyses were performed with an Agilent 1100 System. Carotenoids were separated on a C₃₀ column (250 \times 4.6 mm id, 5 μm YMC (EUROP GmbH, Germany). The mobile phases were H₂O as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE as eluent C. The flow rate was fixed at 1 ml/min, the column temperature was set at 25 $^{\circ}\text{C}$, and the injection volume was 20 μl .

A gradient programme was performed: the initial condition was 40 % A/60 % B, 0–5 min; 20 % A/80 % B, 5–10 min; 4 % A/81 % B/15 % C, 10–60 min; 4 % A/11 % B/85 % C, 60–71 min; 100 % B 71–72 min; and back to the initial conditions for re-equilibration. Absorbance was followed using an Agilent 1100 photodiode array detector. Quantification of carotenoids was achieved using calibration curves with β -carotene and β -CX at 450 nm.

Carotenoid extraction from digested juices

A 10 ml aliquot of filtered digested juices (and 10 ml of non-filtered digested juices) was extracted three times with 10 ml of hexane (with 0.1 % butylated hydroxytoluene) and 5 ml of ethanol containing 100 μl of recovery standard (100 μl of lycopene solution, equivalent to 12 μg). Without saponification, the hexanic extracts were evaporated and redissolved in 500 μl of mobile phase (250 μl of dichloromethane and 250 μl of an 80:20 (v/v) mixture of MTBE and methanol). Samples were injected under the analytical conditions described above. With saponification, the hexanic extracts were evaporated and redissolved in 4 ml of hexane and placed in a 15 ml amber vial to which were added 4 ml of 10 % methanolic KOH. Saponification was carried out overnight in the dark at room temperature. The sample was shaken under nitrogen in the sealed vial. The hexanic layer was separated from the aqueous phase with 8 ml of water. The methanolic KOH layer was extracted three times with 10 ml of hexane and 5 ml of ethanol. The extracts were pooled and washed to remove alkali. The pooled extracts were evaporated, dried and redissolved as described above for extraction without saponification.

Isolation of β -cryptoxanthin esters (β -CXE)

β -CXE from mandarin juice extracts were purified by HPLC; the retention times of the respective β -CXE were laurate, 44 min and myristate, 46 min. The identification of β -CXE was previously carried out by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in positive electrospray mode according to the conditions established by Caris-Veyrat *et al.* (2003). The collected fractions of β -CXE were combined and evaporated to dryness, and the residue redissolved in 1 ml of mobile phase (500 μl of dichloromethane and 500 μl of an 80:20 (v/v) mixture of MTBE and methanol). Quantification of β -CXE was achieved using the calibration curves of β -CX and expressed as β -CX equivalent (mg/l).

HPLC analysis of carotenoids from Caco-2 cells

A 500 μl aliquot of scraped cells in PBS was extracted twice with 2 ml of hexane and 500 μl of ethanol containing internal standard (cantaxanthin 2 mg/l). The hexanic phases obtained after centrifugation (2000 rpm, 5 min, room temperature) were evaporated to dryness under nitrogen; the residue was redissolved in 100 μl of dichloromethane-methanol 50:50 (v/v). Carotenoids were separated on a C₃₀ column (250 \times 4.6 mm id, 5 μm YMC (EUROP GmbH, Germany) by HPLC as described above.

In vitro digestion

The *in vitro* digestion system was similar to that previously described by Garrett *et al.* (1999a) with modifications. A volume of 30 ml of juice (or 20 g of concentrate juice at 60° brix) was placed in a 100 ml amber bottle and mixed with 32 ml of 0.9% NaCl containing 12.6 mg/ml pyrogallol as amphiphilic antioxidant. This mixture was homogenized for 10 min at 37°C in a shaking water bath. To mimic the gastric step, the pH was adjusted to 4.00 (SD 0.02) with about 2 ml of 1 M-NaOH, then 2 ml of porcine pepsin (40 mg/ml in 0.1 M-HCl) were added. The homogenate was incubated at 37°C in a shaking water bath for 30 min. To mimic the intestinal step, the pH of the partially digested mixture was raised to 6.00 (SD 0.02) by adding around 20 ml of 0.45 M-sodium bicarbonate pH 6.0. Then a mixture of porcine bile extract and pancreatin (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 of bile extract at 0.1 g/ml were added. Samples were incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min to complete the digestion process. (According to Reboul *et al.* (2006b), the duration of incubation in duodenal conditions was set at 30 min instead of 2 h in order to mimic the digestive transit time of a food particle in the human duodenum.) Micelles were separated by ultracentrifugation (20 000 rpm for 18 h at 10°C using a Beckman L755 TST 41-14 SW rotor). The aqueous fraction was collected from the centrifuge tube using a needle attached to a 10 ml syringe. It was then filtered through a 0.22 µm filter (Millipore). Aliquots were stored at -20°C under nitrogen until analysis.

Synthetic micelles of carotenoid from citrus juice extract

β-CX from citrus juice extract was delivered to Caco-2 cells incorporated in mixed micelles that were prepared as reported by Reboul *et al.* (2005). Stock solutions of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, monoolein, free cholesterol and oleic acid were prepared in chloroform-methanol (2:1, v/v). Appropriate volumes of the following compounds were transferred into glass bottles to obtain the final concentrations: 0.04 mM-phosphatidylcholine, 0.16 mM-lysophosphatidylcholine, 0.3 mM-monoolein, 0.1 mM-free cholesterol, 0.5 mM-oleic acid and 30 µM-citrus juice extract. Stock solution solvents were carefully evaporated under nitrogen. Dried residue was solubilized in DMEM containing 5 mM-taurocholate and vigorously mixed by sonication (Branson 250 W sonifier, Osi) for 3 min. The mixture obtained was sterilised by filtering it through a pre-sterilised 0.22 µm filter (Millipore), and the resulting solutions were optically clear.

Measurement of carotenoid absorption by intestinal cells

Caco-2, clone TC-7 cells were a gift from Dr Monique Roussey (U178 INSERM, Villejuif, France). Cells, passage 70–80, were grown in 25 cm² flasks (TTP, Switzerland) in the presence of DMEM supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 1% NEAA and 1% antibiotics (complete medium). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of air-carbon dioxide (95:5, v/v) and the medium changed every 48 h. Monolayers were subcultured with a 7 d passage frequency when they reached a confluence of about 80% by

treatment with 0.25% trypsin-EDTA. For each experiment, cells were seeded at a density of 250 000 cells/well, and grown on transwells (6-well plate, 24 mm diameter, 1 µm pore size polycarbonate membrane; Becton Dickinson, le Pont-de-Chaix, France). The medium used in apical and basolateral chambers was the complete medium. Media were changed every day for 21 d to obtain confluent, differentiated cell monolayers (Salvini *et al.* 2002). One day before each experiment, the medium used in apical and basolateral chambers was DMEM supplemented with 20% heat-inactivated lipid-free FBS, 1% NEAA and 1% antibiotics. Before each experiment and after 150 min of incubation, cellular integrity was checked by measuring trans-epithelial electrical resistance with a voltohmmeter equipped with a chopstick electrode (Millicell ERS, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). In order to measure carotenoid absorption by Caco-2 cells, carotenoid-rich micelles coming from the *in vitro* digestion were used at 1:3 dilution. At the beginning of each experiment, cell monolayers were washed twice with 1 ml of PBS in the apical side and 2 ml in the basolateral side. The apical side of the cell monolayers received 1 ml of micelles, while the basolateral side received 2 ml of FBS-free medium. Cell monolayers were incubated at 37°C for 30, 60 and 150 min. The short times used in our experiments represent approximately, the time during which the bowel content is in contact with duodenal cells during digestion. After the incubation period, media from each side of the membrane were harvested. Cell monolayers were washed twice with 1 ml of PBS containing 5 mmol/l taurocholate to eliminate adsorbed carotenoids, scraped and collected in 1 ml of PBS. Absorbed carotenoids were estimated as carotenoids both in scraped cells and in the basolateral chambers of the transwells. All the samples were stored at -80°C under nitrogen with 0.5% pyrogallol as a protective antioxidant before carotenoid extraction and HPLC analysis.

Statistical analysis of data

All statistical analyses were performed using XLSTAT software version 7.0. All data were reported as mean (and SD) from three replicates of each experiment. For the *in vitro* digestion experiment, samples were duplicated (*n* 6). Differences between means were tested using non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Means were considered to be significantly different if *P* values were <0.05.

Results

β-Cryptoxanthin changes in digested citrus juices

Both free β-CX and β-CXE were present in citrus fruits (mainly β-CX laurate and β-CX myristate) (Table 1). The percentage of the free form for orange and mandarins varied from 5 to 18%. In contrast, Meyer lemon was characterized by its high content of free β-CX, which accounted for 75% of the total. In orange and mandarin juices, the main ester was myristate, which accounted for >50% of total β-CX. Submitting juices to *in vitro* digestion significantly increased the percentage of the free form of β-CX 3.5- to 5-fold in orange and mandarins, but only 1.1-fold in Meyer lemon.

Table 1. Free and esterified β -cryptoxanthin (mg/200 ml) in native and digested citrus juices (200 ml is the volume of a serving portion of fruit juice) (Mean values of three determinations and standard deviation)

| | Native juices | | | | Digested juices* | | | | | | | |
|-------------|------------------|------|--------------|-------|------------------|-------|--------------|------|--------------|-------|------------|-------|
| | Free β -CX | | β -CXL | | Free β -CX | | β -CXL | | β -CXM | | | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | | |
| Orange Sh | 0.16 (18%) | 0.02 | 0.25 (29%) | 0.03 | 0.47 (53%) | 0.03 | 0.23 (62%)† | 0.02 | 0.04 (11%) | 0.004 | 0.1 (27%) | 0.008 |
| Mandarin W | 0.21 (11%) | 0.01 | 0.52 (28%) | 0.13 | 1.11 (61%) | 0.24 | 0.17 (55%)† | 0.03 | 0.03 (10%) | 0.02 | 0.11 (35%) | 0.06 |
| Mandarin H | 0.17 (5%) | 0.06 | 1.28 (39%) | 0.28 | 1.83 (56%) | 0.32 | 0.32 (20%)† | 0.03 | 0.50 (31%) | 0.16 | 0.78 (49%) | 0.28 |
| Meyer lemon | 0.18 (75%) | 0.03 | 0.03 (11%) | 0.008 | 0.03 (14%) | 0.006 | 0.19 (86%)† | 0.06 | 0.01 (5%) | 0.02 | 0.02 (9%) | 0.003 |

The mean of three determinations is shown.

Values in parentheses indicate the ratio of each β -cryptoxanthin species to the total β -cryptoxanthin.

β -CX, β -cryptoxanthin; β -CXL, β -cryptoxanthin laurate; β -CXM, β -cryptoxanthin myristate.

*Extract made from centrifuged digested juice.

† A significant difference ($P < 0.05$) between the percentage of free β -cryptoxanthin in fresh juice and the corresponding percentage after *in vitro* digestion.

Bioaccessibility of carotenoids from citrus juices

Centrifugation and filtration of digested juices yields the micellar fraction used to estimate bioaccessibility. The *in vitro* digestion model estimates the proportion of carotenoids micellised. Bioaccessibility of total β -CX (free plus esterified forms) and β -carotene from citrus juices is shown in Fig. 1. Mandarin H, mandarin W and orange Sh displayed similar β -CX bioaccessibilities (16, 18 and 22% respectively, $P > 0.05$), whereas for Meyer lemon it was significantly higher (40%, $P < 0.05$). Among the four species of citrus, mandarin H had the highest concentration of total β -CX (2.18 mg/l) in the micelle fraction, followed by mandarin W (1.26 mg/l), Meyer lemon (0.63 mg/l) and orange Sh (0.44 mg/l). Regarding the bioaccessibility of β -carotene (Fig. 1B), the percentage transferred into the micellar fraction did not differ significantly ($P > 0.05$) between the different citrus juices. The percentages of accessible β -carotene were 26, 31, 33 and 30, respectively, for mandarin M, mandarin H, orange Sh and Meyer lemon. The percentages of bioaccessible β -carotene were higher than those of β -CX for all citrus juices except Meyer lemon. Thus, the bioaccessibility of β -CX in Meyer lemon (40%) significantly exceeded ($P < 0.05$) that of β -carotene (30%). Concerning the concentration of β -carotene determined in the micelle fraction, mandarin H and mandarin W displayed the highest values with 0.74 and 0.41 mg/l,

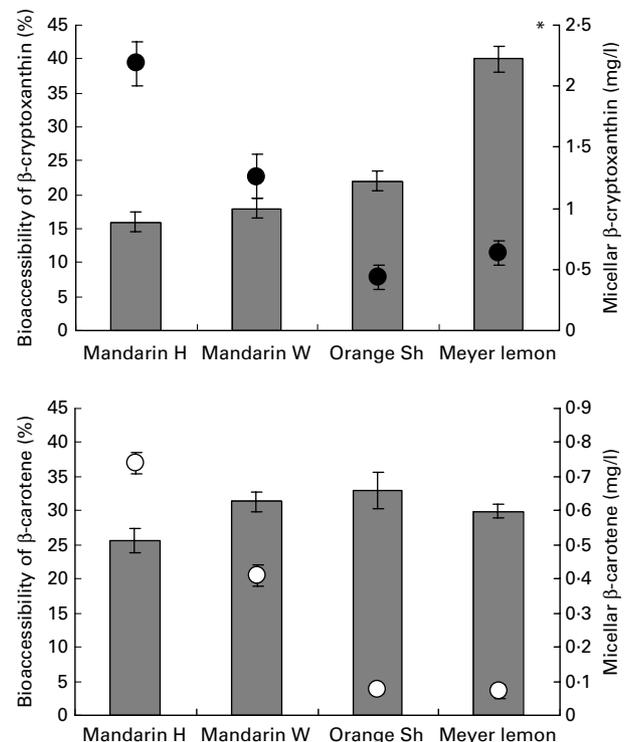


Fig. 1. (A) Bioaccessibility of total β -cryptoxanthin (free plus ester form) in different citrus juices. Bioaccessibility is expressed as the percentage of micellar total β -cryptoxanthin (left axis). ●, concentration of micellar total β -cryptoxanthin in the micelle fraction of different citrus juices (right axis). (B) β -Carotene data. ○, concentration of micellar total β -carotene in the micelle fraction of different citrus juices (right axis). Data are the mean and SD of three experiments with duplicate samples for each experiment ($n = 6$). An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) between bars of the same figure.

respectively, whereas Meyer lemon and orange Sh displayed the lowest values (0.07 mg/l for both). Similar results for carotenoid micellarisation were obtained with synthetic micelles enriched in carotenoids purified from citrus juices (Table 2). The percentage micellarisation of free β -CX was about three times higher (27%) than that of β -carotene (10%) and its esters (9%). The micellarisation of the β -CXE, β -CX laurate, was 2.5 times higher (34%) than that of the other form, β -CX myristate (13.7%).

Uptake of carotenoids by Caco-2 cells exposed to either synthetic micelles or physiological micelles

Synthetic micelles prepared from a mixture of lemon and mandarin carotenoid extract were delivered to Caco-2 cell monolayers (the juices were mixed in a ratio to obtain final percentages of β -CX and β -carotene). Carotenoid uptake by Caco-2 monolayers at 150 min was estimated (Table 3). Cellular uptake was expressed as a percentage of absorbed carotenoids recovered in the scraped cells. The uptake by cells was similar for β -CX and β -carotene (19.0 (SD 0.6) % and 20.6 (SD) 1.2 %). The two esters, β -CX laurate and β -CX myristate, appeared to be less efficiently absorbed (14.4 (SD 0.7) %) in spite of their high contents in micelles. Nevertheless although percentage uptakes were lower than for β -carotene and β -CX, the two esters represented >60% of the total carotenoids in cells. To complete this study, purified β -CXE from carotenoid mandarin extracts were micellarised. In these synthetic micelles containing only β -CX laurate and β -CX myristate, the uptake by cells was similar for the two esters (16 (SD 0.3) %). No trace of free β -CX was found in cells or the basolateral chamber after uptake of the two esters. Note that in this experiment, no carotenoids were found in the basolateral chamber although the preparation of synthetic micelles requires some compounds, such as oleic acid, which are capable of stimulating the synthesis and secretion of chylomicrons in Caco-2 cells (Luchoomum & Hussain, 1999).

The intestinal uptake of citrus juice carotenoids was also assessed by using physiological micelles produced during the *in vitro* digestion of citrus juices. As reported in Table 3, after 150 min of incubation, the four carotenoids present in citrus juice after digestion were absorbed by Caco-2 cells. There were large differences in uptake among the carotenoids, the uptake by cells being inversely proportional to the initial carotenoid concentration present in the micelle digestate. Carotenoid distributions in cells were 64.6% (β -carotene), 19.5% (β -CX), 8.3% (β -CX laurate) and 7.6% β -CX myristate). β -Carotene was the carotenoid that accumulated most (14.3 (SD 1.8) %) in the cells, followed by free β -CX (3.9 (SD 0.9) %). Uptake

by cells of the two esters was very low: 0.7 (SD 0.1) % for myristate and 0.6 (SD 0.1) % for laurate.

Discussion

Because esters of xanthophylls such as β -CXE are widely distributed in nature in several fruits and vegetables and particularly in citrus (Breithaupt & Bamedi, 2001), our study focused on the bioaccessibility of these esters present in citrus juices at different concentrations. The Caco-2 human intestinal cell line was chosen as a model for assessing the intestinal uptake of carotenoids (Garrett *et al.* 1999b; Ferruzzi *et al.* 2001; During *et al.* 2002). In our study, we conducted experiments to assess the bioaccessibility of carotenoids in citrus juices using a Caco-2 cell culture model coupled with an *in vitro* digestion process.

The first step was to evaluate the bioaccessibility of carotenoids using an *in vitro* digestion model. Due to its high ratio of free to ester form of β -CX, Meyer lemon was used to evaluate the bioaccessibility of free β -CX, whereas mandarin and orange were used to study the bioaccessibility of β -CXE. We showed that after submitting citrus juices to *in vitro* digestion conditions, the bioaccessibility of free β -CX exceeded that of β -carotene and β -CXE. These data suggested that the main factor involved in bioaccessibility was the micellarisation capacity of carotenoids. Previous studies (Garrett *et al.* 1999a; Chitchumroonchokchai *et al.* 2004) have reported a preferential micellarisation of xanthophylls such as lutein compared with β -carotene submitted to *in vitro* digestion conditions. In the present study, the behaviours of free β -CX and ester forms were in agreement with previous data. When preparing synthetic micelles with carotenoids purified from citrus juice extracts, we showed that free β -CX was 3-fold more micellarised than β -carotene and the ester forms of β -CX. In a previous study, Borel *et al.* (1996) reported that more apolar carotenoids are preferentially located in the triacylglycerol core of lipid droplets, while more polar carotenoids such as lutein reside near the surface. According to some authors (Cooper, 1997; Tyssandier *et al.* 1998), carotenoids are highly lipophilic compounds characterized by a high octanol partition coefficient ($\log_{10} P > 8$); they reported that the bioavailability of carotenoids is related to their polarity.

The increase in the proportion of free β -CX in micelles after submitting citrus juices to *in vitro* digestion conditions suggests that β -CXE were partially hydrolysed under these conditions. The percentage of hydrolysis was shown to depend on the type of citrus juice. The percentages of free β -CX for mandarin and orange juices were around 3–4.5 times higher than in native juices. Several data from human

Table 2. Carotenoid micellarisation in synthetic micelles from carotenoid citrus extracts (Mean values and standard deviation)

| Micellarised carotenoids (%)* | β -CX | | β -Carotene | | β -CXL | | β -CXM | |
|---|-------------|-----|-------------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Mixed micelles made with carotenoids extracted from mandarin juice | 27.0 | 1.0 | 10.0 | 0.7 | 9.0 | 0.3 | 8.7 | 0.4 |
| Mixed micelles with purified β -cryptoxanthin ester from mandarin extract | – | – | – | – | 34.0 | 1.2 | 13.7 | 0.6 |

β -CX, β -cryptoxanthin; β -CXL, β -cryptoxanthin laurate; β -CXM, β -cryptoxanthin myristate.
*Mean of three determinations (%).

Table 3. Carotenoid distribution in micelles and Caco-2 cells and percentage of carotenoid uptake by cells exposed to synthetic or physiological micelles

| | Concentration μM (%) [*] | | % uptake by cells [†] | |
|------------------------|---|--------------|-----------------------------------|-----|
| | Micelles | Cells | Mean | SD |
| Synthetic micelles | | | | |
| β -Carotene | 1.774 (13.1) | 0.365 (16.8) | 20.6 | 1.2 |
| β -CX | 2.227 (16.4) | 0.419 (19.3) | 19.0 | 0.6 |
| β -CXL | 4.539 (33.5) | 0.658 (30.3) | 14.4 | 0.8 |
| β -CXM | 5.011 (37.0) | 0.727 (33.5) | 14.4 | 0.7 |
| Total carotenoids | 13.554 (100) | 2.169 (100) | – | – |
| Physiological micelles | | | | |
| β -Carotene | 1.060 (12.7) | 0.154 (64.6) | 14.3 | 1.8 |
| β -CX | 1.138 (13.6) | 0.047 (19.5) | 3.9 | 0.9 |
| β -CXL | 2.798 (33.4) | 0.018 (7.6) | 0.6 | 0.1 |
| β -CXM | 3.373 (40) | 0.020 (8.3) | 0.7 | 0.1 |
| Total carotenoids | 8.369 (100) | 0.239 (100) | – | – |

No carotenoids were found in the basolateral chamber.

β -CX, β -cryptoxanthin; β -CXL, β -cryptoxanthin laurate; β -CXM, β -cryptoxanthin myristate.

^{*} Carotenoid composition in micelles and in cells.

[†] Percentage of carotenoids in cell + basolateral chamber/carotenoids in apical chamber.

studies suggest that β -CXE are hydrolysed in the intestinal lumen prior to their absorption (Wingerath *et al.* 1998; Breithaupt & Bamedi, 2001; Breithaupt & Bamedi, 2002). More recently, Breithaupt *et al.* (2003) have confirmed that only free β -CX was detected in plasma after ingestion of β -CXE from a vegetable source. The enzyme involved in hydrolysis is probably a carboxyl ester hydrolase able to hydrolyse xanthophyll esters (Breithaupt & Bamedi, 2002). Our study suggests that the esters could be cleaved in the small intestine by pancreatic lipase before absorption by intestinal cells. β -CXE are hydrolysed during *in vitro* digestion probably by an enzyme present in pancreatin in the intestinal digestion step. We suppose that this enzyme involved in the hydrolysis of esters could be the pancreatic lipase. Lindstrom *et al.* (1988) demonstrates that this enzyme can hydrolyse the same type of substrate as carboxyl ester hydrolase, i.e. cholesteryl oleate or retinyl palmitate in the presence of bile salt in physiological conditions. It would be interesting to study the role of lipases in the hydrolysis of xanthophylls esters. In fact, it was recently shown that classical pancreatic lipase and pancreatic lipase-related proteins 2 were able to hydrolyse retinyl palmitate in the duodenum, which is the site of pancreatic and biliary secretions (Reboul *et al.* 2006a).

The second step was to evaluate the intestinal uptake of carotenoids by Caco-2 cells. Carotenoid accumulation by Caco-2 cells was in inverse proportion to carotenoid content in the micelles, such that the percentages of β -CXE taken up by cells were dramatically reduced. In our study, the preferential cellular uptake of β -carotene compared with β -CXE was remarkable as it is known that the β -carotene concentration in the micelles was lower than that of β -CXE. When we conducted experiments with synthetic micelles produced from citrus juice extracts, we observed large differences in the uptake of carotenoids by cells exposed to the synthetic micelles compared with micelles generated during *in vitro* digestion. In synthetic micelles produced from

lemon + mandarin extract, the cellular accumulation of carotenoids was proportional to the content of micellarised carotenoids in the medium. Although the results obtained with synthetic micelles confirmed a similar preferential uptake of β -carotene and free β -CX, the two ester forms appeared more absorbed by cells from the synthetic micelles than those from the physiological micelles. Chitchumroonchokchai *et al.* (2004) also observed a difference between physiological and synthetic micelles, suggesting that the phospholipid composition of synthetic micelles was a factor in enhancing the carotenoid uptake by cells (Sugawara *et al.* 2001). Differences in the molecular composition of the micelles may contribute to this discrepancy, while particle size and surface charge may affect the ability to interact with the brush border surface (Borel *et al.* 1996).

Our study underlined that β -carotene seems to be absorbed to a similar extent from all types of micelles. Previous studies reported the preferential uptake of β -carotene compared with lutein (Garrett *et al.* 1999b, 2000; During *et al.* 2002; Chang-Shu *et al.* 2004). In these previous studies, carotenoids were in emulsified forms. Borel *et al.* (1996) suggested that the emulsified form of β -carotene was more efficiently taken up than a more polar carotenoid due to the stability of the emulsified compound. Our results supported previous findings suggesting that the transfer of β -carotene across the brush border was more efficient than that of other carotenoids (Garrett *et al.* 2000).

Finally, in the present investigation, it should be stressed that esters were taken up by intestinal epithelial cells. Chitchumroonchokchai & Failla (2006) also reported the presence of zeaxanthin monoester in cells, but they indicated that free zeaxanthin was taken up by Caco-2 cells more efficiently than zeaxanthin esters. On the other hand, the fact that after incubation of purified esters on Caco-2 cells no trace of free β -CX was observed in cells or the basolateral chamber suggests that β -CXE were not cleaved by intestinal cells. These *in vitro* data are consistent with the *in vivo* data reporting a higher plasma response to the free form of β -CX. According to Breithaupt *et al.* (2003), β -CXE were not recovered in plasma but the bioavailabilities of free and β -CXE were comparable.

However, the fact that Caco-2 cells seemed to absorb β -CXE to a lesser extent than the free form corroborated previous studies where the presence of xanthophyll esters was reported in the plasma of humans administered high doses (Bowen *et al.* 2002) of lutein for extended periods (Granado *et al.* 1998) and in human skin (Wingerath *et al.* 1998).

In conclusion, the present study provides the first assessment of β -CX (free and esters) uptake by differentiated Caco-2 cells. The simulated digestion coupled with the Caco-2 cell model appeared to be an efficient tool for studying the uptake of dietary carotenoids. Using this model, although the bioaccessibility of β -CXE was relatively high, the esters were poorly absorbed. When citrus carotenoids were incorporated into synthetic micelles, we showed that the absorption of esters could be enhanced by their vectorisation with phospholipids. Nevertheless, β -CXE appeared to be hydrolysed during the digestion phase, resulting in an apparent enhancement of the bioavailability of the free form of β -CX. Although our results suggest that the Caco-2 cells (TC7 clone) were not able to cleave β -CXE, further investigations are needed to

specify the metabolism of esters within the enterocytes as well as the possible cleavage of β -CX into vitamin A.

Acknowledgements

The authors thank the Agronomic Research Station (SRA) Inra of San Guiliano (Corsica) for the kind gift of citrus fruits. We also thank Catherine Caris-Veyrat for her help in identification of β -CXE by LC-MS, and Guy Self for assistance in English text corrections.

References

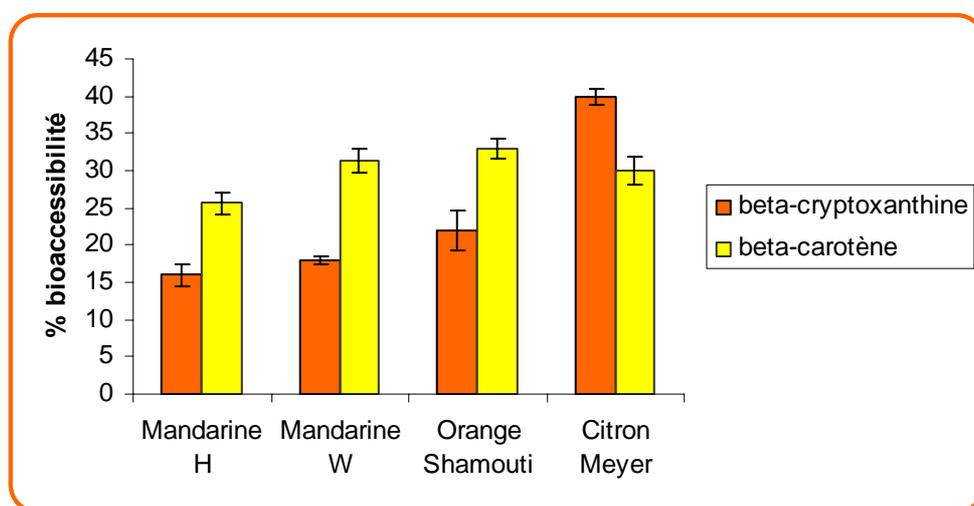
- Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H & Hayek T (2004) Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr* **23**, 423–433.
- 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. *J Lipid Res* **37**, 250–261.
- Bowen PE, Herbst-Espinosa SM, Hussain EA & Stacewicz-Sapuntzakis M (2002) Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *J Nutr* **132**, 3668–3673.
- Breithaupt DE & Bamedi A (2001) Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on β -cryptoxanthin esters. *J Agric Food Chem* **49**, 2064–2070.
- Breithaupt DE & Bamedi A (2002) Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comp Biochem Physiol B* **132**, 721–728.
- Breithaupt DE, Weller P, Wolters M & Hahn A (2003) Plasma response to a single dose of dietary β -cryptoxanthin esters from papaya (*Carica papaya* L) or non-esterified β -cryptoxanthin in adult human subjects: a comparative study. *Br J Nutr* **90**, 795–801.
- Caris-Veyrat C, Schmid A, Carail M & Böhm V (2003) Cleavage products of lycopene produced by *in vitro* oxidations: characterization and mechanisms of formation. *J Agric Food Chem* **51**, 7318–7325.
- Castenmiller JJM & West CE (1998) Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr* **18**, 19–38.
- Chang-shu L, Glahn RP & Hai Liu R (2004) Assessment of bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an *in vitro* digestion. *J Agric Food Chem* **52**, 4330–4337.
- Chitchuroonchokchai C & Failla ML (2006) Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellization and uptake of the xanthophylls by caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* **136**, 588–594.
- Chitchumroonchokchai C, Schwartz SJ & Failla ML (2004) Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* **134**, 2280–2286.
- Cooper DA, Webb DR & Peters JC (1997) Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr* **127**, 1699–1709.
- Dhuique-Mayer C, Caris-Veyrat C, Ollitrault P, Curk F & Amiot MJ (2005) Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *J Agric Food Chem* **53**, 2140–2145.
- During A, Hussain MM, Morel DW & Harrison EH (2002) Carotenoid uptake and secretion by caco2 cells: carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *J Lipid Res* **43**, 1086–1095.
- Edwards AJ, Vinyard BT, Wiley ER, Brown ED, Collins JK, Perkin-veazie P, Baker RA & Clevidence BA (2002) Consumption of watermelon juice increases plasma concentrations of lycopene and β -carotene in humans. *Am J Clin Nutr* **75**, 526–534.
- Ferruzzi MG, Failla ML & Schwartz SJ (2001) Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and caco-2 human cell model. *J Agric Food Chem* **49**, 2082–2089.
- Garrett DA, Failla ML & Sarama RJ (1999a) Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* **47**, 4301–4309.
- Garrett DA, Failla ML & Sarama RJ (2000) Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J Nutr Biochem* **11**, 574–580.
- Garrett DA, Failla ML, Sarama RJ & Craft N (1999b) Accumulation and retention of micellar beta-carotene and lutein by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr Biochem* **10**, 573–581.
- Goodner KL, Rouseff RL & Hofsommer HJ (2001) Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J Agric Food Chem* **49**, 1145–1150.
- Granado F, Olmedilla B, Gil-Martinez E & Blanco I (1998) Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects. *Br J Nutr* **80**, 445–449.
- Hedren E, Diaz V & Svanberg U (2002) Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *Eur J Clin Nutr* **56**, 425–430.
- Irwig MS, El-Soheemy A, Baylin A, Rifai N & Campos H (2002) Frequent intake of tropical fruits that are rich in beta-cryptoxanthin is associated with higher plasma beta-cryptoxanthin concentrations in Costa Rican adolescents. *J Nutr* **132**, 3161–3167.
- Kiong-Cheol K, Chan-Shick K, Nam Ho L, Sam-Pin L & Doo-Khil M (2000) Determination of β -cryptoxanthin in peel and flesh of citrus fruits produced in Cheju Island. *Food Sci Biotechnol* **9**, 288–291.
- Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piche LA & Serratore P (2000) HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* **72**, 1095–1100.
- Lee CM, Boileau AC, Boileau TWM, Williams AW, Swanson KS, Heintz KA & Erdman JW (1999) Review of animals models in carotenoid research. *J Nutr* **129**, 2271–2277.
- Lee HS & Castle WS (2001) Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices. *J Agric Food Chem* **49**, 877–882.
- Lin SD & Chen AO (1995) Major carotenoids in juices of ponkan mandarin and Liucheng orange. *J Food Biochem* **18**, 273–283.
- Lindstrom MB, Sternby B & Borgstrom B (1988) Concerted action of human carboxyl ester lipase and pancreatic lipase during lipid digestion *in vitro*: importance of the physicochemical state of the substrate. *Biochim Biophys Acta* **959**, 178–184.
- Luchoomum J & Hussain MM (1999) Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly. *J Biol Chem* **274**, 19565–19572.
- Mouly PP, Gaydou EM, Lapierre L & Corsetti J (1999) Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J Agric Food Chem* **47**, 4038–4045.
- Narisawa T, Fukaura Y, Oshima S, Inakuma T, Yano M & Nishino H (1999) Chemoprevention by the oxygenated carotenoid beta-cryptoxanthin of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jpn J Cancer Res* **90**, 1061–1065.
- Reboul E, Abou L, Mikail C, Ghiringhelli O, Andre M, Portugal H, Jourdeuil-Rahmani D, Amiot MJ, 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). *Biochem J* **387**, 455–461.
- Reboul E, Berton A, Moussa M, Kreuzer C, Crenon I & Borel P (2006a) Pancretatic lipase and pancreatic lipase-related protein 2,

- but not pancreatic lipase-related protein 1, hydrolyse retinyl palmitate in physiological conditions. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 4–10.
- Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V & Borel P (2006b) Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* **54**, 8749–8755.
- Salvini S, Charbonnier M, Defoort C, Alquier C & Lairon D (2002) Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *Br J Nutr* **87**, 211–217.
- Sugawara T, Kushiro M, Zhang H, Nara E, Ono H & Nagao A (2001) Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* **131**, 2921–2927.
- Sugiura M, Kato M, Matsumoto H, Nagao A & Yano M (2002) Serum concentration of beta-cryptoxanthin in Japan reflects the frequency of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) consumption. *J Health Sci* **48**, 350–353.
- Tanaka T, Kohno H, Murakami M, Shimada R, Kagami S, Sumida T, Azuma Y & Ogawa H (2000) Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin. *Int J Cancer* **88**, 146–150.
- Tyssandier V, Borel P, Choubert G, Grolier P, Alexandre-Gouabau MC & Azais-Braesco V (1998) The bioavailability of carotenoids is positively related to their polarity. *Sci Aliment* **18**, 324.
- Tyssandier V, Cardinault N, Caris Veyrat C, Amiot MJ, Grolier P, Bouteloup C, Azais Braesco V & Borel P (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. *Am J Clin Nutr* **75**, 526–534.
- Tyssandier V, Feillet-Coudray C, Caris-Veyrat C, Guillard JC, Coudray C, Bureau S, Reich M, Amiot-Carlin MJ, Bouteloup-Demange C, Boirie Y & Borel P (2004) Effect of tomato product consumption on the plasma status of antioxidant microconstituents and on the plasma total antioxidant capacity in healthy subjects. *J Am Coll Nutr* **23**, 148–156.
- Wingerath T, Sies H & Stahl W (1998) Xanthophyll esters in human skin. *Arch Biochem Biophys* **355**, 271–274.
- Yano M (2002) Cancer prevention by citrus. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **49**, 139–144.
- Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Krinsky NI & Russell RM (1996) Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr* **64**, 594–602.

2.2.2 Digestion d'un jus d'agrumes accompagnée d'un repas (résultats non publiés)

La digestion d'un jus d'agrumes accompagnée d'un repas répond aux critères selon lesquels le repas doit représenter : 15 % de protéines, 55 % de glucides et 30 % de lipides. Comparativement au modèle de digestion du jus d'agrumes seul, la présence de macronutriments abaisse la bioaccessibilité des caroténoïdes quelque soit la variété du jus ou la nature des caroténoïdes. Les résultats sont reportés sur les figures 8A et 8B.

A



B

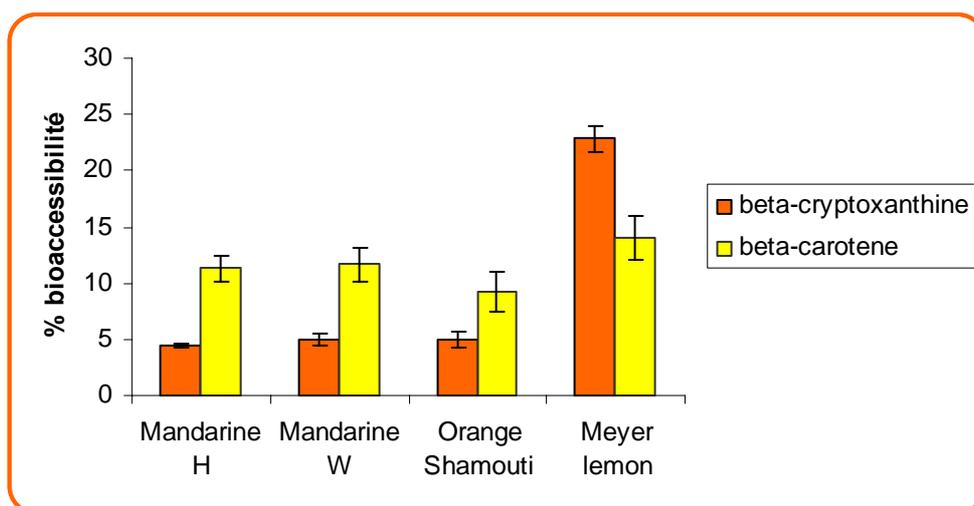


Figure 8 : Pourcentage de bioaccessibilité "in vitro" de la β -cryptoxanthine (forme libre plus esters) et β -carotène dans différents jus d'agrumes A) digestion *in vitro* du jus seul, B) *in vitro* digestion *in vitro* en présence de macronutriments. Les données sont des moyennes \pm SD de trois expérimentations avec échantillons fait en duplicate pour chaque expérimentation (n=6).

Il semblerait qu'à cause de leur lipophilicité, les caroténoïdes soient concentrés dans la fraction huile du modèle. Pour vérifier ce phénomène, les caroténoïdes de la fraction huileuse du modèle (gouttelettes d'huile orange surnageantes sur la phase aqueuse après centrifugation) ont été récupérés et dosés. Les résultats du Tableau 1 indiquent que comparativement à un modèle de digestion sans aliments, les caroténoïdes issus d'une digestion en présence de macronutriments se distribuent de la manière suivante 10 % dans la fraction huileuse et 5 % dans le filtrat micellaire.

Tableau 11. Distribution des caroténoïdes dans la fraction micellaire et huileuse du modèle de digestion en présence d'aliments.

| % bioaccessibilité* | β-cryptoxanthine Mandarine | | β-cryptoxanthine Orange | |
|---------------------|-------------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| | Sans aliments | Avec aliments | Sans aliments | Avec aliments |
| Fraction micellaire | 16,0 ± 1,1 | 5,0 ± 0,7 | 16,8 ± 1,2 | 5,4 ± 0,7 |
| Fraction huile | 0,0 | 10,1 ± 0,8 | 0,0 | 10,2 ± 0,7 |

* moyenne de 3 déterminations

Le modèle que nous avons utilisé permet d'estimer les caroténoïdes qui passent de la fraction micellaire en un temps donné. Cette expérience met en évidence les limites du modèle car les caroténoïdes incorporés dans les lipides sont libérés *in vivo* grâce à une hydrolyse des triacylglycérols (Tyssandier *et al.*, 2003).

2.2.3 Absorption entérocytaire

Les résultats obtenus sur l'absorption intestinale des caroténoïdes des jus d'agrumes par les cellules entérocytaires Caco-2 TC7 ont montré que le β-carotène était absorbé préférentiellement avec la β-cryptoxanthine libre comparativement aux deux formes esters. Cependant les résultats sont différents suivant le type de micelles utilisées. Lorsque les cellules sont exposées aux micelles synthétiques, le pourcentage de caroténoïdes retrouvé dans les cellules intestinales reflète la composition en caroténoïde du milieu micellaire de départ. Par contre, les pourcentages de caroténoïdes retrouvés dans les cellules intestinales après incubation des micelles issues de la digestion *in vitro* sont inversement proportionnels

aux teneurs en caroténoïdes micellarisés du milieu d'origine. Dans ce dernier cas, l'absorption des esters est fortement réduite. L'absorption préférentielle du β -carotène comparée à celle des esters de β -cryptoxanthine, est tout à fait remarquable si l'on tient compte de la concentration initiale en β -carotène, laquelle ne représente que 12 % de la composition en caroténoïdes dans la fraction micellaire alors que les esters en représentent 73 %. Bien que les résultats obtenus avec les micelles synthétiques confirment une absorption préférentielle du β -carotène, la β -cryptoxanthine libre et ses formes estérifiées apparaissent mieux absorbées dans ces conditions plutôt que dans celles utilisant les micelles physiologiques. Ces différences entre les deux types de micelles pourraient s'expliquer par la composition phospholipidique des micelles synthétiques qui pourrait jouer un rôle de vecteur pour les caroténoïdes et faciliter ainsi leur passage à travers l'entérocyte (Sugawara *et al.*, 2001).

Finalement, cette étude a montré que les esters peuvent être absorbés même faiblement par les cellules Caco-2 TC7. Ce résultat corrobore avec certaines études de biodisponibilité chez l'homme qui indiquent la présence d'esters de xanthophylles dans le plasma et dans la peau (Granado *et al.*, 1998 ; Wingerath *et al.*, 1998). Cependant, après incubation d'esters purifiés de β -cryptoxanthine par les cellules Caco-2 TC7, aucune trace de β -cryptoxanthine libre n'a été observée dans les cellules ou dans le compartiment basolatéral. Ces résultats semblent suggérer que les esters ne soient pas clivés par les cellules intestinales du modèle Caco-2 TC7. D'une manière générale les données *in vivo* indiquent que la forme ester n'est généralement pas retrouvée dans le plasma humain bien que les deux formes libres et esters de la β -cryptoxanthine aient des biodisponibilités comparables (Breithaupt *et al.*, 2003). Bien que les résultats suggèrent que les cellules du modèle Caco-2 TC7 ne soient pas capables d'hydrolyser les esters, d'autres études seraient nécessaires afin de préciser le métabolisme du transport entérocytaire des esters.

3 Qualité nutritionnelle des agrumes : Interaction des flavanones sur l'absorption intestinale *in vitro* des caroténoïdes.

3.1 Objectifs

Plusieurs études d'interventions avec suppléments ont donné des résultats décevants (Omenn *et al.*, 1996). Les résultats souvent contradictoires obtenus après l'absorption de composés purifiés suggèrent que l'apport combiné et équilibré de vitamines et molécules antioxydantes peut être à l'origine des effets protecteurs des fruits et légumes vis-à-vis de maladies dégénératives. Il existerait des effets complémentaires et/ou synergiques. L'exemple le plus connu est la combinaison de la vitamine C et la vitamine E face aux dégâts oxydatifs. Les mécanismes d'auto-protection de ces deux vitamines permettent à la vitamine E de régénérer la vitamine C (Pincemail, 1999). Par contre, très peu d'information n'existe sur les interactions pouvant exister entre polyphénols et caroténoïdes au niveau de l'entérocyte. De telles interactions pourraient moduler la biodisponibilité de ces microconstituants. C'est pourquoi dans la dernière partie de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés aux interactions des flavanones sur l'absorption intestinale des caroténoïdes en utilisant le modèle de cellule Caco-2 TC7. Le but de cette étude étant de mettre en présence les antioxydants principaux (flavanones, caroténoïdes et vitamine C) des jus d'agrumes et d'observer les effets sur le captage des caroténoïdes par l'entérocyte (**Publication à soumettre**).

3.2 Résultats

3.2.1 Effet des flavanones sur l'absorption des caroténoïdes (publication 4 soumise prochainement)

Dans cette première expérience, une concentration d'hespérétine a été rajoutée aux solutions micellaires de β -carotène et de β -cryptoxanthine, puis incubée sur les cellules Caco-2 TC7 pendant 24h. L'accumulation de caroténoïdes dans les cellules est 2,5 fois plus élevée en présence d'hespérétine après 24h d'incubation. Afin de comparer l'effet des structures glycosylées ou non-glycosylées des flavanones sur l'absorption des caroténoïdes, l'hespéridine est testée comparativement aux deux aglycones, l'hespérétine et la naringénine.

Dans cette deuxième expérience, les résultats indiquent que l'absorption des caroténoïdes est variable suivant le type de flavanones présent dans le milieu (hespéridine > hespérétine > naringénine) et la concentration des caroténoïdes dans les cellules représente 1253, 1152 et 980 pmol/mg de protéines respectivement pour l'hespéridine, l'hespérétine et la naringénine. Notons cependant que l'augmentation des caroténoïdes intracellulaires est moins importante que dans l'essai précédent (x1,5 versus x2,5). En effet, la quantité de caroténoïdes a également doublée car il s'agit d'un mélange de β -carotène et de β -cryptoxanthine. Des observations similaires ont été faites suite à des essais menés en inserts après 3 heures d'incubation. Une augmentation significative de l'absorption des caroténoïdes par les cellules est observée dès les trois premières heures en présence d'hespéridine et d'hespérétine mais pas en présence de naringénine. L'effet de la présence des flavanones est moins prononcé mais commence dès 3 heures d'incubation.

D'autres essais en inserts ont été conduits en présence d'hespéridine après 3, 5 et 24 h d'incubation. L'augmentation de l'absorption des caroténoïdes par les cellules atteint un maximum après 5 h d'incubation. L'accumulation des caroténoïdes après 5h représente 49 % comparativement au témoin micellaire sans ajout d'hespéridine dont le taux de caroténoïdes capté par les cellules est de 35 %.

3.2.2 Effet de l'ajout d'acide ascorbique sur l'absorption des caroténoïdes

Pour connaître l'effet de la vitamine C sur l'absorption des caroténoïdes par les cellules Caco-2 TC7 et les éventuelles interactions pouvant se produire avec l'hespéridine, une quantité d'acide ascorbique correspondant à une concentration de 50 μ M est ajoutée aux solutions micellaires de caroténoïdes avec ou sans hespéridine. Aucun effet significatif de l'acide ascorbique n'est observé sur l'absorption des caroténoïdes quand il est ajouté seul aux micelles. En revanche, quand l'acide ascorbique est ajouté en présence de l'hespéridine, le pourcentage d'absorption des caroténoïdes est réduit significativement et passe de 48 à 40 %.

3.2.3 Hypothèses

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées suite aux résultats obtenus. La première concerne le rôle inhibiteur des flavonoïdes pour certaines activités enzymatiques en particulier pour la 15, 15' dioxygénase (Nagao *et al.*, 2000). Par ailleurs, les composés phénoliques par leurs propriétés chélatrices sur le fer peuvent perturber l'absorption de certaines molécules (Glahn *et al.*, 2002). Sachant que la 15, 15' dioxygénase est fer-dépendante (During *et al.*, 2001), l'héspéridine pourrait inhiber cette enzyme de clivage du β -carotène et en conséquence, l'accumulation intracellulaire de caroténoïdes serait augmentée. Cependant, ni rétinol ou ester de rétinol n'ont été détectés dans les cellules ou les différents compartiments apical et basal. Notons que le rétinol pourrait se trouver sous d'autres formes conjuguées qui n'auraient pas été détectées.

La deuxième hypothèse concerne l'implication du transporteur SR-B1, glycoprotéine présente dans la bordure en brosse des cellules entérocytes. Cette protéine, dont le rôle principal serait de permettre l'entrée du cholestérol (Krieger, 1999) serait également impliquée dans le transport facilité de la lutéine et du β -carotène (Reboul *et al.*, 2005b ; van Bennekum *et al.*, 2005). Par ailleurs, Zager *et al.* (2003) suggèrent que l'expression de ce transporteur serait inhibée par le fer. En chélatant le fer, l'héspéridine pourrait améliorer l'expression de SR-B1, et augmenterait le captage des caroténoïdes au niveau intracellulaire.

L'acide ascorbique, au contraire des flavonoïdes est connu pour être un promoteur de la biodisponibilité du fer (Cook & Reddy, 2001). L'acide ascorbique agirait en opposition par rapport à l'héspéridine et contrerait son effet. Il en résulterait une diminution de l'effet de l'absorption des caroténoïdes.

Cette étude a montré que les flavanones des agrumes, glycosylés ou non, peuvent avoir un effet sur l'absorption des caroténoïdes par les cellules Caco-2 TC7. Plusieurs hypothèses des mécanismes impliqués sont proposés (Figure 9) mais devront être confirmés par des expérimentations complémentaires dans l'avenir.

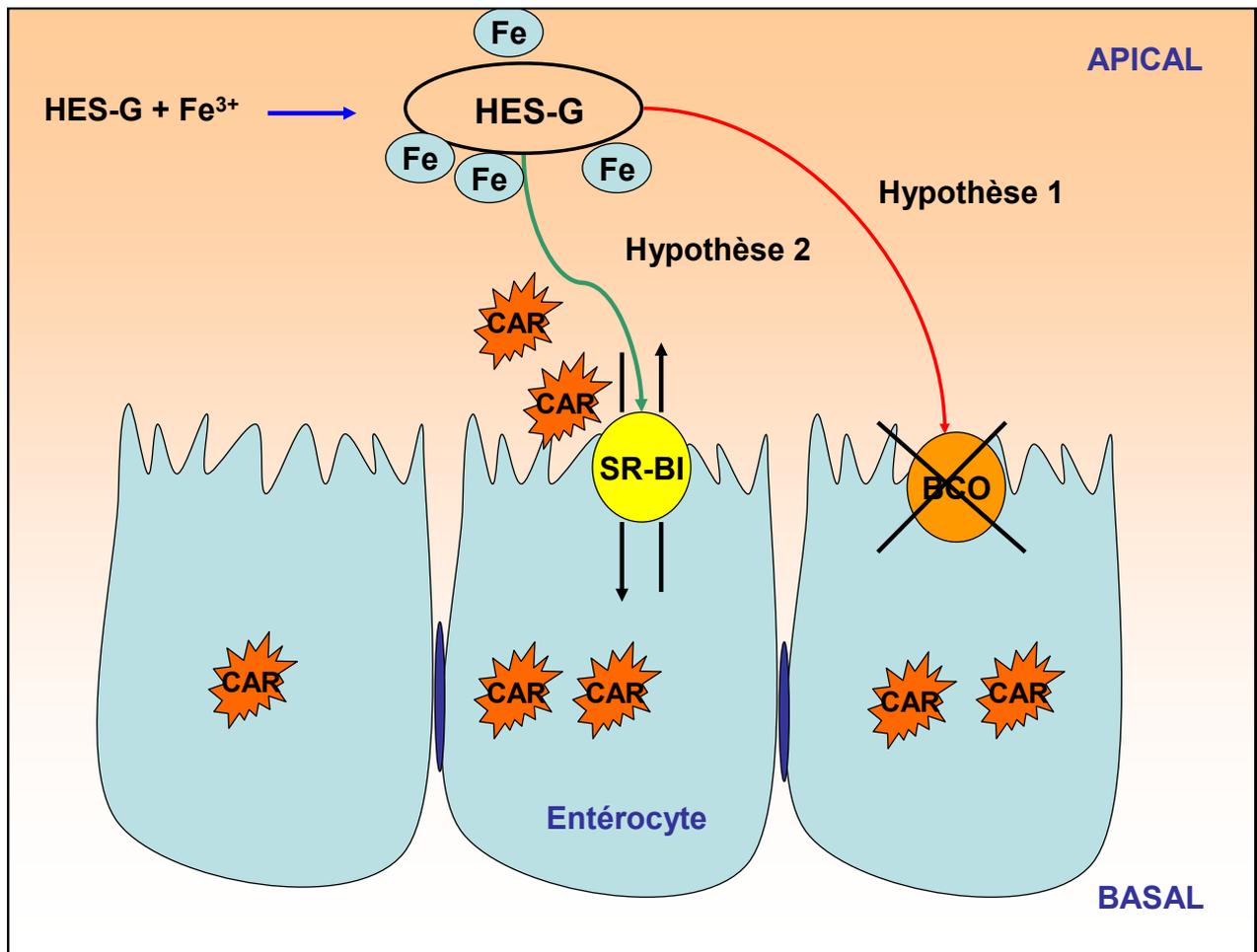


Figure 9. Mécanismes hypothétiques de l'absorption des caroténoïdes par l'entérocyte en présence d'hespéridine. (HES-G : hespéridine; CAR : caroténoïdes ; Fe : Fer libre ; BCO : β-carotène 15, 15'dioxygénase). Hypothèse 1 : en chélatant le Fe III du milieu, l'hespéridine inhiberait l'enzyme BCO ; Hypothèse 2 : en chélatant le Fe III du milieu, l'hespéridine permettrait une meilleure expression du transporteur SR-BI.

Citrus flavanones enhance carotenoids uptake by intestinal Caco-2 cells

Dhuique-Mayer Claudie*¹, During Alexandrine**, Caporiccio Bertrand***, Tourniaire Franck****, Amiot Marie-Josèphe****.

* Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR 95, Tropical food quality, TA-B95/16, 34398 Montpellier cedex 5, France.

** Université catholique de Louvain, Laboratoire de Biochimie cellulaire, Croix du Sud, 5, B_1348, Louvain-la-Neuve, Belgique

*** Université Montpellier II E.A Nutrition, 34095 Montpellier cedex 5, France.

**** UMR 476 INSERM (National Institute of Health and Medical Research)/1260 INRA (National Institute for Agronomic Research), Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine de la Timone, 13385 Marseille cedex 05, France.

1 To whom correspondence should be addressed:
CIRAD département PERSYST-UMR 95 TA-B 95/16
73 Av. J.F Breton, 34398 Montpellier cedex 5, France
Fax: 33 4 67 61 44 33
E-mail: claudie.dhuique-mayer@cirad.fr
Running title: Effect of flavanones on carotenoid uptake

Abstract.

The health benefit of a diet rich in fruit and vegetables is attributed to the complex mixture of phytochemicals. It is now widely believed that the actions of the antioxidant nutrient is a result of additive and synergistic effects of these phytochemicals present in whole foods. Because citrus juices are considered as a rich source of antioxidants including vitamin C, phenolics compounds and carotenoids, our study focused on interactions of flavonoids and Acid ascorbic on intestinal carotenoid uptake. This study was conducted using Caco-2 cell monolayer as the experimental model to determine interaction effects of different flavanones such as hesperidin (HES-G), hesperetin (HES) and naringenin (NGN) on carotenoid uptake. Effect of ascorbic acid (AA) added to HES was also investigated. We demonstrated the enhancing effect of HES-G and HES on β -carotene and β -cryptoxanthine uptake. A minor effect was observed with addition of NGN. However, HES-G and HES significantly increased carotenoid uptake compared to no flavanone addition (1253 ± 93 , 1152 ± 78 and 738 ± 70 pmol/mg cell protein respectively). Moreover, when AA was added in presence of HES-G carotenoid uptake decreased significantly from 48.2 ± 1.3 to 39.8 ± 2.4 % after 5h incubation time. These data suggest that AA counteract the effect of HES-G in regard to iron mechanism involving the eventual participation of the epithelial transporter (SRBI) in the intestinal uptake of carotenoids.

Key words: Hesperidin, uptake, Caco-2 cells, carotenoid, ascorbic acid

1 Introduction

It is now well established that the consumption of carotenoid-rich diets containing fruits and vegetables is associated with beneficial effects on human health such as a reduced risk of certain cancers, cardiovascular diseases and age-related macular degeneration [1]. These effects could be attributed to activities of carotenoids as potent antioxidants and/or as precursor of vitamin A. Carotenoids however are present in fruits and vegetables as part of a complexed matrix and thus carotenoids alone may not explain all the observed health benefit related to plant-derived food consumption [2]. Citrus juices represent a typical combination of various antioxidants including carotenoids, phenolic compounds, and vitamins [3]. The presence of other nutrients in the diet may also affect the intestinal absorption of carotenoids. For instance, carotenoids among themselves compete for their intestinal absorption in vivo [4] and these competitions were confirmed at the intestinal cellular level [5]. Interactions between carotenoids and fibers were also described in vivo; the bioavailability of β -carotene, lycopene, and lutein was indeed markedly decreased by different kinds of dietary fibers in women [6]. Moreover, Richelle et al. [7] reported that plant sterol esters reduced β -carotene bioavailability in normocholesterolemic men, suggesting also interaction between carotenoids and phytosterols for their intestinal absorption. Interactions with fat were studied in rats by Raju et al. [8] which demonstrated that intestinal absorption of β -carotene was improved when specific fatty acids were added to the meal. Lysophosphatidylcholine also enhanced carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 cells [9]. Although polyphenols are important compounds recovered in most food matrices (i.e. citrus juices contain ~300-700 mg hesperidin/L versus ~10-30 mg carotenoids/L) [3], studies on interactions between carotenoids and polyphenols are scarce.

The human intestinal cells Caco-2 can be grown in culture flasks or microporous membrane inserts and have been used to perform uptake and transport studies. These cells are capable of performing many metabolic functions of normal enterocytes such as transport bile salts, vitamins, amino acid and drugs [10-12]. This model has also been utilized to investigate the uptake of nutrients and phytochemicals such as iron [13, 14]. Differentiated Caco-2 cell monolayers cultured on membranes were described a useful model for studying intestinal absorption and metabolism of carotenoids [15], when supplemented with taurocholate and oleic acid and by using Tween micelles as mode of carotenoid delivery. As alternative, in order to simulate the intestinal lumen conditions, carotenoids can be solubilized into mixed micelles [16-18]. The assessment of carotenoid bioavailability from foods was also done in vitro by coupling a simulated in vitro digestion procedure to Caco-2 cells [19-21]. Note here that the TC7 clone of Caco-2 cells exhibits β -carotene 15-15' oxygenase activity; the enzyme responsible for β -carotene cleavage into retinal, the precursor of vitamin A or retinol [22]. In addition, it was reported that the intestinal transport of carotenoids is a facilitated process partly mediated by the specific epithelial

transporter SR-B1 in Caco-2 cells [23, 24]. Therefore, Caco-2 cell model is a complete and useful system to gather more informations regarding the interactions of carotenoids with phytochemicals such as polyphenols or vitamin C since they remain limited.

Because citrus juices are considered as a rich source of antioxidants including vitamin C, phenolics compounds and carotenoids, our study focused on potential interactions between these phytonutrients at the level of their cellular uptake by Caco-2 cells. Among the citrus juice polyphenols, some authors stressed the main role of hesperidin in the total antioxidant capacity of orange juices [25]. Thus, the objectives of the present study were to investigate the effect of citrus flavanones (hesperidin, hesperetin, naringenine) and ascorbic acid on carotenoid uptake by Caco-2 cells. A more complete understanding of the possible synergistic or antagonistic effects of these phytochemicals on the uptake level of micellarized carotenoids by enterocytes is important for the elucidation of the potential impact of this class of phytochemicals on human health.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals.

Extraction solvents were RPE grade hexane, ethanol, and dichloromethane from Carlo-Erba (Val de Reuil, France). HPLC analytical grade solvents were methanol from Carlo-Erba (Val de Reuil, France) and methyl-*tert*-butyl-ether (MTBE) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Carotenoid and flavonoid standards (β-carotene, β-cryptoxanthin, hesperidin, hesperetin, naringenin, 98 % pure) were purchased from Extrasynthèse (Genay, France). Ascorbic acid was from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose and trypsin-EDTA (500 mg/L and 200 mg/L respectively) was purchased from Bio Whittaker (Fontenay-sous-Bois, France). Fetal bovine serum was purchased from Biomedica (Issy-les-Moulineaux, France), non-essential amino acids (NEAAs) and penicillin/streptomycin from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). Pepsin, porcine pancreatin, porcine bile extract, pyrogallol, phospholipids, monoolein, cholesterol, oleic acid and taurocholate were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

2.2 Preparation of synthetic micelles of carotenoid.

β-cryptoxanthin and β-carotene were delivered to Caco-2 cells incorporated into mixed micelles that were prepared as previously described by Reboul *et al.* [18]. Stock solutions of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, monoolein, free cholesterol, and oleic acid were prepared in chloroform:methanol (2:1;v/v). Appropriate volumes of these stock solutions were transferred into glass bottles to obtain 0.04 mM phosphatidylcholine, 0.16 mM lysophosphatidylcholine, 0.3 mM monoolein, 0.1 mM free cholesterol, 0.5 mM oleic acid, 15 μM from β-cryptoxanthin and/or 15 mM β-carotene solutions as final concentrations in the mix working solution. Solvents were carefully evaporated under nitrogen and the dried residue was then solubilized in DMEM containing 5 mM

taurocholate and vigorously mixed by sonication (Branson 250 watt sonifier, Osi) for 3 min. The resulting mixture was sterilized by passage through a 0.22 μm filter (Millipore), and the final micelle solutions were optically clear.

2.4 Cell culture

Caco-2, clone TC-7 cells were a gift from Dr. Monique Roussey (U178 INSERM, Villejuif, France). Cells (passage 50-60) were grown in 25 cm² or 75 cm² flasks (TTP, Switzerland) in the presence of DMEM supplemented with 20 % heat-inactivated FBS, 1% NEAA, and 1% antibiotics (complete medium). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of air/carbon dioxide (95:5, v/v) and the medium was changed every 48 h. Cells were subcultured with a 7-day passage frequency when they reached a confluence of about 80 % by treatment with 0.25 % trypsin-EDTA. For each experiment, cells were seeded at a density of 250 000 cells/well, and grown on 75 cm² flasks or on transwells (6-well plate, 24 mm diameter, 1 μm pore size polycarbonate membrane, Becton Dickinson, le Pont-de-Chaix, France). For the first 16 days, cells were cultured in presence of complete medium and then with serum-free medium (DMEM only). Media were changed every day for 21 days to obtain confluent, differentiated cell monolayers [26]. The day before each experiment, cell monolayers were incubated with DMEM supplemented with 20 % heat-inactivated lipid-free FBS, 1 % NEAA, and 1 % antibiotics. For experiments with transwells, before experiment and after incubation, cell monolayer integrity was checked by measuring trans-epithelial electrical resistance with a voltohmmeter equipped with a chopstick electrode (Millicell ERS, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

2.5 Measurement of carotenoid uptake by intestinal cells

At the beginning of each experiment, cell monolayers were washed twice with 1 mL PBS at the apical side and 2 mL at the basolateral side. The apical side of the cell monolayers received 1 mL mixte micelles of carotenoids (see preparation above) and the basolateral side received 2 mL FBS-free medium. For cells growing in 75 cm² flasks, after washing cells with 15 mL of PBS, 15 mL of micellarized carotenoids in DMEM were added. Cell monolayers and cells in flask were incubated at 37 °C for 3, 5 and 24 h. After the incubation period, media from each side of the membrane were harvested. Cell monolayers were washed twice with 1ml PBS containing 5 mmol/L taurocholate to eliminate adsorbed carotenoids, scraped, and collected in 1 mL PBS. Carotenoid uptakes were estimated as the amounts of carotenoids in both cells plus basolateral medium or in scraped cells only, when grown on transwells or 75 cm² flask, respectively. All the samples were stored at -80°C under nitrogen with 0.5 % pyrogallol as a protective antioxidant before carotenoid extraction and HPLC analysis. Aliquots of cell samples were used to estimate protein concentrations with a bicinchoninic acid kit (BCA kit, Montluçon, France). Uptakes were expressed as pmol of carotenoid per mg of cell proteins.

2.6 Addition of polyphenols and ascorbic acid to micellarized carotenoid solutions

Prior each experiment, an appropriate volume of either hesperitin (HES), hesperidin (HES-G) or ascorbic acid solutions was added to the mixed micelle solution at the final concentration of 250 μ M for HES and HES-G and of 50 μ M for ascorbic acid. The concentrations of different antioxidants were chosen to mimic physiologic doses in duodenum after ingestion of citrus juices.

2.7 HPLC analysis of carotenoids from Caco-2 cells

Aliquots (500 μ l) of scraped cells in PBS were extracted twice with 2 mL of hexane in presence of 500 μ l of ethanol containing internal standard (cantaxanthin 2 mg/L). The hexanic phases obtained after centrifugation (2000 rpm, 5 min, at room temperature) were combined and evaporated to dryness under nitrogen; the residue was redissolved in 100 μ l dichloromethane/methanol 50:50 (v/v). Carotenoid analyses were carried as described previously [3]. HPLC analyses were performed with an Agilent 1100 system. Carotenoids were separated along a C₃₀ column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m YMC (EUROP GMBH, Germany) using for the mobile phase: purified water (eluent A), methanol (eluent B), and methyl-tert-butyl-ether (eluent C). A gradient program was performed: the initial condition was A/B (40:60, v/v), A/B (20:80, v/v) from 5-10 min, A/B/C (4:81:15, v/v/v) between 10-60 min, A/B/C (4:11:85, v/v/v) between 60-71 min, 100 % B between 71-72 min, and back to the initial conditions for reequilibration. Flow rate was fixed at 1 mL min⁻¹, the column temperature was set at 25 °C, and the injection volume was 60 μ l. Absorbance was followed using an Agilent 1100 photodiode array detector. Quantification of carotenoids was achieved using calibration curves with β -carotene and β -cryptoxanthin at 450 nm.

2.8 Statistical analysis of data.

All statistical analyses were performed using XLSTAT software version 7.0. All data were reported as mean \pm standard deviation (SD) from three replicates of each experiment. Differences between mean were determined using non parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test. Means were considered to be significantly different for p values < 0.05.

3 Results

3.1 Effect of polyphenols on carotenoid uptake

In a first experiment, micellarized β -carotene (b-C) or β -cryptoxanthin (b-CX) were incubated separately and in presence or not of HES (250 μ M) for 24h in T-75 flasks. After incubation, carotenoid uptake was evaluated in Caco-2 cells and data are presented in (Fig.1A). In absence of the polyphenol, the amount of the individual carotenoids recovered in cells was approximately 500 pmol b-C or b-CX/ mg proteins. When HES was added, carotenoid uptakes were significantly increased by \sim 2.5 fold, reaching 1136 and 1221 pmol/mg proteins, respectively for b-C and b-CX (p<0.05).

Comparative effects of HES, HES-G, and naringenin (NGN) on carotenoid uptake were then evaluated, when both carotenoids (b-C and b-CX) were

incubated simultaneously (Fig 1 B). After 24h incubation with carotenoids in absence of polyphenol, the amount of carotenoid (b-C + b-CX) in Caco-2 cells was around 750 pmol/ mg proteins. The three polyphenols resulted in a significant increase of the cellular uptake of carotenoids (by \sim 1.6-fold with HES and HES-G and by \sim 1.3-fold with NGN). Carotenoid levels in cells were thus 1253, 1152 and 980 pmol/mg of proteins, respectively when HES-G, HES and NGN were added to the incubation media. A similar experiment was conducted using cell monolayers cultured on inserts incubated with b-CX alone or in presence of either HES-G, HES, and NGN for 3h. Data shown on Fig. 2 are expressed as the percent of b-CX recovered in cells and in the basolateral medium (b-CX uptake) after 3h incubation. In this experiment, effects of polyphenols were less pronounced probably in relation to a shorter time of incubation (3h versus 24h); indeed, b-CX uptake was increased in presence of HES and HES-G (by \sim 1.2-fold, p < 0.05), but not in presence of NGN. Taken together, this set of experiments indicates that polyphenols increase the uptake of carotenoids in intestinal cells, according to the decreasing order: HES-G \approx HES > NGN, and these effects seem to be dependent on the time of incubation.

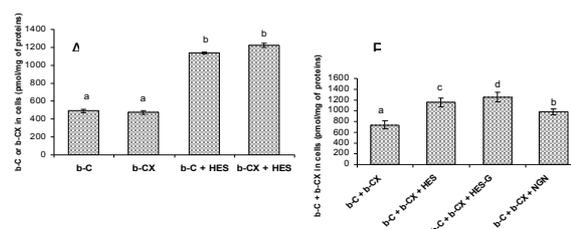


Figure 1. Effect of HES, HES-G and NGN on carotenoid cellular uptake by Caco-2 cells growing in T-75 flasks. **A)** Effect of HES on individual carotenoid uptake (b-C and b-CX). **B)** Effect of HES, HES-G and NGN on carotenoid uptake (b-C plus b-CX). Values are expressed as mean \pm SD of three determinations. Data with different letters display significant statistical differences (p<0.05).

3.2 Effect of incubation time on carotenoid uptake

In this experiment, micellarized b-CX plus b-C in presence or not of HES-G were added to the apical media of cell monolayers on inserts and carotenoid uptakes were evaluated at different incubation times (3, 5, and 24h). Data expressed as percentage of b-CX and b-C in cells and in basolateral medium in function of the incubation time are reported on Fig. 3. Carotenoid uptake reached a maximum after 5h incubation with and without addition of HES-G.

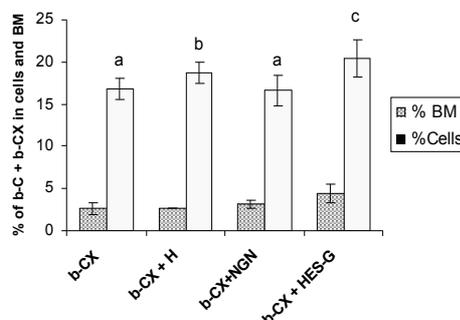


Figure 2. Effect of HES, HES-G and NGN on b-CX cellular uptake by Caco-2 cells growing in inserts after 3 h incubation. Values are expressed as mean \pm SD of three determinations. Data with different letters display significant statistical differences (p<0.05).

The percent of carotenoids recovered in cells in presence of HES-G was close to 50% after 5h incubation and remained similar after 24h of incubation.

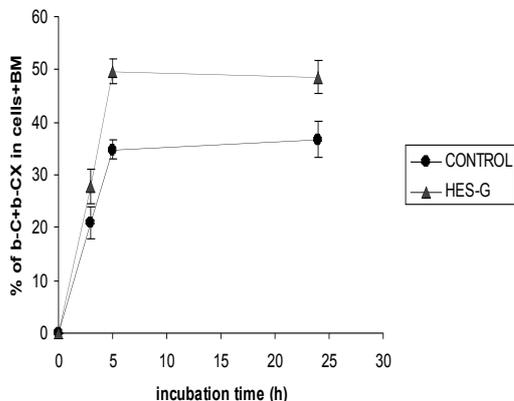


Figure 3. Effect of incubation time on carotenoid (b-C plus b-CX) uptake by Caco-2 cells grown on inserts with and without addition of HES-G. Data are expressed as % of b-CX and b-CX recovered in cells and basolateral medium after incubation. Values are expressed as mean \pm SD, n=6.

Similarly, in the absence of HES-G, the percent of carotenoids in cells was not significantly different between 5h or 24h (35 and 37 %, respectively).

3.3 Effect of ascorbic acid on carotenoid uptake

Micellarized b-C and b-CX in presence or not of ascorbic acid (AA) alone and of HES-G was evaluated using Caco-2 cells after 5 and 24h incubation time. Data are shown on Figure 4. There was no significant effect of AA alone on cellular carotenoid uptake. Indeed, after 5h incubation, the percent of b-C plus b-CX was similar in control and in AA-supplemented cells (37%). However, in presence of HES-G, AA significantly decreased the percent of carotenoids recovered in cells; from $48.2 \pm 1.3\%$ to $39.8 \pm 2.4\%$ %, respectively when cells were incubated with HES-G alone and with HES-G plus AA, after 5h incubation. Similar significant differences were also observed after 24h incubation. The present data thus confirm the previously observed enhancing effects of HES-G on carotenoid uptake shown in Figs. 1 & 2 and also indicate that AA can cancel those effects.

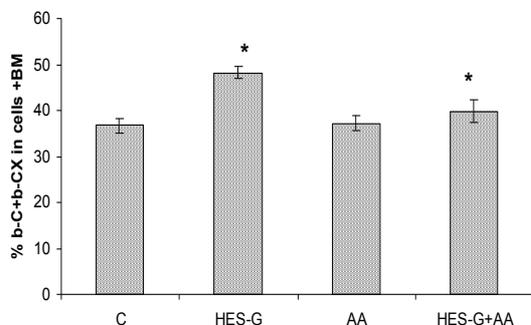


Figure 4. Effect of ascorbic acid (AA) on carotenoid (b-C plus b-CX) uptake by Caco-2 cells grown on inserts with and without addition of HES-G. Data are expressed as % of b-CX and b-CX recovered in cells and basolateral medium after incubation. Values are expressed as mean \pm SD, n=6. * indicates a statistical significant difference.

4 Discussion

The present study demonstrates the enhancing effects of HES-G, HES and NGN on the transport of carotenoids in intestinal cells. These compounds present in citrus juice in glycosylated form belong to the flavonoid family; a polyphenol class well known for its antioxidant behaviour. Beside their antioxidant capacity, another antioxidant mechanism result from the ability they have to chelate metal ions [27, 28]. Studies have shown that these chelating properties were correlated with their structures-activity relationships [29, 30]. Flavonoid group including flavone, flavanol and flavanone (HES-G, NGN) posses different basic structures but the same hydroxylation pattern (3,5,7,3',4'-OH) [31]. The enhancing effect of HES-G, HES and NGN on carotenoid uptake could result of the interaction with iron media by chelating the metal from apical so that iron was not available at brush border level. This chelating effect could have different consequences on carotenoid accumulation. The first hypothesis was that β -carotene 15, 15' dioxygenase was inhibited by the presence of flavanone and consequently carotenoid uptake was increased. By chelating iron from media the flavanones inhibited β -carotene 15, 15' dioxygenase knowing that this enzyme activity is iron dependent. Note that in this experiment no retinol, retinal or retinol esters were found in cells or basolateral medium when β -carotene was incubated alone. Nevertheless, retinoids in cells could be present in a conjugated form not detected in the media. A second hypothesis concerns the expression of the epithelial transporter SRBI (*scavenger receptor class B type I*). Recent studies suggested that SRBI was involved in the carotenoid uptake [23, 24]. On the other hand Zager *et al.* [32] reported that iron reduced expression of SRBI. Thus, by chelating iron from apical media, flavanone allowed a best expression of SRBI and consequently carotenoid uptake could be increased.

The differences observed between the effect of HES-G, HES and NGN on carotenoid uptake could be associated to their structure. HES-G was a glycosylated flavanone compared to the two aglycones HES and NGN. Kim *et al.* [33] suggest that HES-G permeate across the Caco-2 cell monolayer via the paracellular pathway. In contrast to that, our previous results (data not shown) showed that HES-G was recovered at intracellular level after 5 to 24 h incubation on Caco-2 cells. However, HES-G was recovered intact in cells suggesting that it was not cleaved into HES. The major difference between HES-G and HES or NGN was that the aglycone moieties were probably metabolized comparatively with the glycosylated form. These different behaviors of molecules could explain the results obtained and the impact on carotenoid uptake. Moreover, recently Tourniaire *et al.* [34] demonstrated that naringin could be absorbed by Caco-2 cells that P-gp, a specific efflux transporter were capable of transporting naringin from Caco-2 cells to the apical side. For this reason, HES-G probably could be efflued by a transporter outside the cells and act at apical level whereas HES and NGN could be metabolized at intracellular level. HES and NGN the two aglycones moiety are shown to be bioavailable from citrus and were detectable in plasma [35, 36]. Moreover these

two flavonoids were involved on drug-transporters in Caco-2 cells and this might be due to an interaction with P-glycoprotein (ATP-binding cassette (ABC) transporter, modulating transport of drugs) [37, 38]. On the other hand, differences between HES and NGN were the position of OH group in the B-ring which was 3' or 4' respectively. Although, flavanone metal complexation occurs probably between the 5 hydroxyl and the 4 oxo group [29], difference in the hydroxyl group in the B-ring could be determinant in chelating properties of this molecule. In our study, the minor effect of NGN compared to HES or HES-G could be explained by the difference of structure.

The carotenoid uptake in function of incubation time in presence or absence of flavanone showed time dependent and saturable processes. These data could confirm the involvement of epithelial transporter in the intestinal uptake of carotenoids.

Because the high ascorbic acid content in citrus juice, the objective of our experiment was to investigate the interactions between the two other phytochemicals such as flavonoid and carotenoid present in citrus juice. The promoting effect of AA on iron absorption is now well established [39]. AA can reduce Fe³⁺ and thus is a potent enhancer of iron absorption [40]. Some human studies demonstrated the enhancing effect of AA on iron absorption after ingestion of fruit juices [41, 42]. Another study showed the effects of different juices on iron bioavailability using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell model [43]. These data reported the interaction between Fe inhibitors (polyphenolic compounds) and the dominant promoter ascorbic acid present in fruit juices. In our study, when AA was added to HES-G, carotenoid uptake decrease, and this suggest that the effect of HES-G was counteracted by AA. If HES-G has a chelating function, in contrast AA released Fe²⁺ in the media. The iron released could slightly inhibit the action of carotenoid epithelial transporter. Thus, we observed a decrease in carotenoid uptake. However, AA did not appear to overcome the HES-G effect but only counteract it.

In conclusion, the present study first demonstrates that flavonoids with AA bear the ability to interfere with carotenoid intestinal uptake process. The Caco-2 cell model appeared as an efficient tool for studying the uptake of dietary carotenoids associated with other phytochemicals present in diet. Using this model, although our results suggest that carotenoid uptake could be mediated by flavonoids and AA in relation with iron, further investigations are needed to specify the mechanisms responsible of this interactions. However, these data may contribute to new understanding of the biological effect of flavonoids on the intracellular accumulation of carotenoids in intestinal cells.

5 References

- [1] Bendich, A., Olson JA FASEB J. 1989, 3, 1927-1932.
- [2] Lampe JW. Am J Clin Nutr. 1999 Sep;70(3 Suppl):475S-490S
- [3] Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., et al., *J Agric Food Chem* 2005, **53**, 2140-2145.
- [4] Van den Berg, H., 1999, Nutr Rev., 57, 1-10.
- [5] During, A., Hussain, MM., Morel, DW., Harrison, EH., *J Lipid Res* 2002, **43**, 1086-1095.
- [6] Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G. *J Nutr*. 1999 Dec;129(12):2170-6.
- [7] Richelle M, Enslin M, Hager C, Groux M, Tavazzi I, Godin JP, Berger A, Métairon S, Quaille S, Piguët-Welsch C, Sagalowicz L, Green H, Fay LB. *Am J Clin Nutr*. 2004 Jul;80(1):171-7.
- [8] Raju M, Lakshminarayana R, Krishnakantha TP, Baskaran V. *Mol Cell Biochem*. 2006 Aug;288(1-2):7-15.
- [9] Sugawara, T., Kushi, M., Zhang H, Nara E, et al., *J. Nutr* 2001, **131**, 2921-2927.
- [10] Hidalgo, I., Borchard, R., *Bioch.Biophys. Acta* 1990, **1028**: 25-30.
- [11] Boulenc, X. *STP. Pharma Sci*. 1997, **7**: 259-269.
- [12] Artursson, P., Palm, K., Luthman, K., *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, **46**, 27-43.
- [13] Garcia, M.N., Flowers, C. and Cook, J.D., *J.Nutr*.1996, 126: 251-258
- [14] Glahn, R.P., Wien, E.M., Van Campen, D.R., Miller, D.D., *J.Nutr*. 1996, 126: 332-339
- [15] During, A., Harrison, E.H., *Food Research International* 2005, **38**, 1001-1008.
- [16] Garrett, DA., Failla, ML., Sarama, RJ., Craft N., *J. Nutr. Biochem*. 1999, **10**, 573-581.
- [17] Ferruzzi, M.G., Failla M.L., Schwartz, S.J., *J. Agric. Food Chem* 2001, **49**, 2082-2089.
- [18] Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., et al., *Biochem. J* 2005, **387**, 455-461.
- [19] Garrett, DA., Failla, ML., Sarama, RJ., *J. Nutr. Biochem*. 2000, **11**, 574-580.
- [20] Liu CS, Glahn RP, Liu RH. *J Agric Food Chem*. 2004 Jun 30;52(13):4330-7.
- [21] Dhuique-Mayer C, Borel P, Reboul E, Caporiccio B, Besancon P, Amiot MJ. *Br J Nutr*. 2007 Mar 7;:1-8
- [22] During, A., Albaugh, G., Smith, C., Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, **249**, 467-474.
- [23] Reboul E, Abou L, Mikail C, Ghiringhelli O, André M, Portugal H, Jourdeuil-Rahmani D, Amiot MJ, Lairon D, Borel P. *Biochem J*. 2005 Apr 15;387(Pt 2):455-61
- [24] During A, Dawson HD, Harrison EH. *J Nutr*. 2005 Oct;135(10):2305-12
- [25] Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., et al., *J. Agric. Food Chem*. 1999, **47**, 4718-4723.
- [26] Salvini, S., Charbonnier, M., Defoort, C., Alquier C et al., *Br J Nutr* 2002, **87**, 211-217.
- [27] Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A., *Biochem. J* 1998, **330**, 1173-1176.
- [28] Sestili, P., Diamantini, G., Bedini, A., Cerioni, L., et al., *Biochem. J* 2002, **364**, 121-128.
- [29] Fernandez, M.T., Mira, M.L., Florencio, M.H., Jennings, K. R., *J. Inorganic Biochemistry* 2002, **92**, 105-111.
- [30] Mira, L., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., et al., *Free Radic. Res* 2002, **36**, 1199-1208.
- [31] Silva, M.M., Santos, M.R., Carogo G., Rocha R., et al., *Free Radic Res* 2002, **36** (11):1219-27.
- [32] Zager, R. A., Johnson, A.C.M., Hanson, S.Y., Shah, V.O., *Am. J. Pathology* 2003, **163**, 313-320.
- [33] Kim, M., Kometani, T., Okada, S., Shimizu, M., *Biosci.Biotech.Biochem*. 1999, **63**, 2183-2188.
- [34] Tourniaire F, Hassan M, Andre M, Ghiringhelli O, Alquier C & Amiot Mj (2005) Molecular mechanisms of the naringin low uptake by intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**, 957-962.
- [35] Manach, C., Morand, C., Gil-Izquierdo, A., Bouteloup-Demange, C., et al., *Eur. J. Clin. Nutr*. 2003, **57**, 235-242.
- [36] Erlund, I., Silaste, M.L., Alfthan, G., Rantala, M., et al., *Eur. J. Clin. Nutr*. 2002, **56**, 891-898.
- [37] Ofer, M., Wolfram, S., Koggel, A., Spahn-Langguth, H., et al., *Eur.J. Pharm. Sci*. 2005, **25**, 263-271.
- [38] Rodriguez-Proteau, R., Mata, J. E., Miranda, C. L., Fan, Y., et al., *Xenobiotica* 2006, **36**, 41-58.
- [39] Lynch, S.R., Stoltzfus, R.J., *J. Nutr*. 2003, **133**, 2978s-2984s.
- [40] Cook, J. D., Reddy, M.B., *Am. J. Clin. Nutr*. 2001, **73**, 93-98.
- [41] Shah, M., Griffin, I. J., Lifschitz, C. H., Abrams, S. A., *Arch. Pediatrics & Adolescent Medicine* 2003, **157**, 1232-1236.
- [42] Ballot, D., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Gillooly M et al., *Br.J.Nutr* 1987, **57**, 331-343.
- [43] Boato, F., Wortley, G.M., Liu, R. H., Glahn, R.P., *J. Agric. Food Chem*. 2002, **50**, 6935-6938.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les caroténoïdes des jus d'agrumes : du fruit...à la biodisponibilité.

Dans cette étude, nous avons cherché à identifier les déterminants principaux de la variabilité de la valeur nutritionnelle des agrumes associés aux caroténoïdes depuis la cueillette du fruit frais jusqu'à la biodisponibilité en fonction des facteurs génétiques, environnementaux et technologiques. Connaître l'impact de ces différents facteurs sur la composition en caroténoïdes des jus d'agrumes a constitué une première étape afin de sélectionner des jus riches en microconstituants antioxydants et /ou présentant une diversité de structures de caroténoïde, sous forme libre ou esters. A partir de jus sélectionnés, l'étude des mécanismes modulant la biodisponibilité *in vitro* des caroténoïdes a permis d'aborder l'étude de leur devenir dans les processus digestifs pré-absorptifs et leur absorption au niveau intestinal.

Les agrumes ont les compositions en caroténoïdes les plus complexes parmi tous les fruits, et plus de 100 molécules différentes ont été isolées à partir des agrumes. Les esters et les formes libres des xanthophylles sont largement représentés. Le facteur génétique est un des facteurs majeurs de la diversité de la composition en caroténoïdes des jus d'agrumes. Ainsi, de nombreux auteurs se sont intéressés aux profils en caroténoïdes des jus d'agrumes mais ces études sont souvent focalisées sur des fruits (principalement *C. sinensis*) dont l'origine génétique est imprécise. Dans ce contexte, l'étude de l'influence variétale sur les teneurs en caroténoïdes et en autres antioxydants (vitamine C, polyphénols) participant à la qualité nutritionnelle des agrumes a été réalisée sur les espèces orange et mandarine. Ces agrumes représentent un matériel végétal homogène bien identifié génétiquement, et de même origine géographique. Les oranges ont été choisies parmi les variétés les plus connues d'oranges à jus et les plus transformées industriellement. Parmi les agrumes choisis, nos résultats ont mis en valeur la qualité nutritionnelle de trois variétés d'orange (Sanguinelli, Pera et Shamouti) et des petits agrumes (mandarines et clémentine) produits en région méditerranéenne, notamment riches en β -cryptoxanthine et hespéridine (valeurs comprises entre $2,76 \pm 0,15$ et $10,7 \pm 0,45$ mg/L pour la β -cryptoxanthine et 502 ± 3 et 767 ± 3 mg/L

pour l'héspéridine). Notons que les variétés d'orange les plus produites et transformées comme l'orange Valencia ne sont pas les plus intéressantes du point de vue de leurs teneurs en caroténoïdes et héspéridine. En revanche la variété Pera, qui est également une des plus utilisées pour la fabrication des jus semble être une bonne candidate pour sa valeur nutritionnelle. L'orange Sanguinelli représente la variété dont la teneur en β -cryptoxanthine est la plus élevée et correspond à une variété méditerranéenne cultivée en Italie et peu produite pour la fabrication de jus. Cette variété d'orange mériterait plus d'attention pour ces valeurs nutritionnelles. Les mandarines et les clémentines sont des espèces plus intéressantes comparativement aux oranges car ce sont les plus riches en caroténoïdes provitaminiques A, en particulier en β -cryptoxanthine. Ces espèces sont également riches en héspéridine. Ces agrumes sont depuis peu utilisés dans les jus commerciaux, seuls ou en mélange. Par ailleurs, les variétés les plus développées et sur lesquelles repose la majeure partie du commerce mondial sont les mandarines du genre *Citrus reticulata* et les différents hybrides réalisés avec les oranges (tangor) ou les pomelos (tangelos).

La forte corrélation (0,92) indiquée par les résultats statistiques entre les agrumes riches en héspéridine et en β -cryptoxanthine est surprenante car les deux voies de biosynthèses sont indépendantes. Cependant, il est possible que leur augmentation durant la maturation soit régulée par un facteur commun. Par ailleurs, les résultats statistiques permettant de visualiser les distances entre les géotypes étudiés basés sur les teneurs en caroténoïdes et héspéridine, ont révélé que la clémentine (hybride entre orange et mandarine méditerranéenne *Citrus deliciosa*) est très poche de son parent mandarine. La distribution de la β -cryptoxanthine dans les agrumes parents et leur hybride joue d'ailleurs un rôle majeur (Goodner *et al.*, 2001). Ces résultats confirment une forte dominance de la part du parent mandarine dans l'expression des métabolites secondaires. Des résultats similaires ont déjà été observés pour les composés d'arômes par Gancel *et al.* (2003). Dans une étude parallèle (Cf. **Publication 5** annexe 2) la détermination de la diversité des compositions en caroténoïdes au sein du genre *Citrus* a permis d'évaluer l'importance du facteur génétique. Ces analyses, portant sur 25 géotypes appartenant aux 8 espèces cultivées, ont révélé que deux caroténoïdes : la *cis*-violaxanthine et la β -cryptoxanthine déterminent la répartition des géotypes en trois groupes correspondant aux trois taxons de base, mandarine, citron et pamplemousse (*C. reticulata*, *C. medica* et *C. maxima*). Ces trois espèces sont considérées comme étant les trois espèces de base à partir desquelles dériveraient les espèces secondaires (Nicolosi *et al.*, 2000).

Finally, this study highlights the high levels of carotenoids in varieties of citrus fruits grown in a Mediterranean climate and in particular in Corsica. In fact, it is known since the 1960s that fruits exposed to day/night temperatures of 20/5°C develop a pronounced orange color, while fruits exposed to day/night temperatures of 30/10°C are less colored and rather green-yellow (Barry & van Wyk, 2006). The change in color of the citrus peel results from the degradation of chlorophylls and the biosynthesis of carotenoids. Citrus fruits growing in climatic conditions with large temperature fluctuations, such as in Corsica, produce more colored fruits. To confirm the highest richness in carotenoids in the juice and not in the peel, citrus fruits from a Mediterranean climate were compared to citrus fruits from tropical climates, the three varieties of orange previously studied (Sanguinelli, Pera et Valencia) and mandarins/clementines were analyzed. These varieties of citrus fruits from New Caledonia and Tahiti are of the same genetic origin belonging to the SRA collection of Corsica. Tropical orange varieties form a group characterized primarily by their low content in β -carotene and β -cryptoxanthin, carotenoids responsible for the orange color. These results obtained with different varieties and species confirm those of Mouly *et al.* (1999). These authors compared the carotenoid profiles of the same Valencia orange variety from tropical, subtropical and Mediterranean countries. Carotenoid levels, particularly β -cryptoxanthin, of Mediterranean oranges are higher than those of tropical oranges. Oranges from a subtropical climate like Florida are more difficult to differentiate because their β -cryptoxanthin content is higher than that of tropical countries. Light and temperature also play a stimulatory role in carotenoid biosynthesis as shown on bay leaves by Hormaetxe *et al.* (2004). However, bibliographic references indicate that light and temperature are parameters that influence the accumulation of carotenoids, certain observations allow us to state that carotenoids evolve differently according to their structure. Analyses performed (data not shown in this thesis) on pomelos rich in lycopene indicate that for the same variety Star ruby, tropical fruits have higher lycopene levels (17 mg/L) compared to Corsican pomelos (10 mg/L). Thus for citrus fruits, β -cryptoxanthin is a carotenoid that accumulates in citrus fruits from Mediterranean countries. Conversely, lycopene would be present in lower levels, compared to citrus fruits grown in tropical countries. This shows that carotenoid biosynthesis is regulated by complex phenomena and that other studies

sont nécessaires pour déterminer comment les différents facteurs climatiques influent sur la production de ces métabolites secondaires

Ces premiers résultats obtenus dans la première partie concernent des jus d'agrumes fraîchement pressés. Toutefois, il convient de constater que la plupart des jus d'agrumes consommés sont des jus commerciaux. Au niveau mondial, ces jus commerciaux sont fabriqués par les deux producteurs principaux que sont le Brésil et les USA, leaders dans le secteur des agrumes transformés. La question que l'on peut se poser est de savoir qu'elle est la valeur nutritionnelle de ces jus par rapport à leur composition en caroténoïdes sachant que les agrumes tropicaux sont pauvres en caroténoïdes. De plus, ils subissent des traitements technologiques notamment des traitements thermiques comme la pasteurisation, ou des procédés de concentration. Nous avons voulu savoir quel était l'impact des traitements thermiques sur les microconstituants des jus d'agrumes et, en particulier, sur le comportement des caroténoïdes.

Nos résultats ont montré que les traitements thermiques provoquent des dégradations différentes suivant la nature des caroténoïdes. Lors d'un traitement à 55°C, aucune perte n'est observée pour les caroténoïdes provitaminiques A. En revanche, tous les autres caroténoïdes sont plus ou moins affectés avec des pertes qui varient de 10 à 60 % après 15 minutes de traitement. La *cis*-violaxanthine, caroténoïde majoritaire de l'orange est le plus fragile et susceptible de générer des composés d'oxydation. Suite à ces premières expériences, nous avons voulu étudier les cinétiques de dégradation thermiques des caroténoïdes provitaminiques A entre 75 et 100 °C, températures à partir desquelles les pertes observées permettent de déterminer les paramètres cinétiques de dégradation thermique. Ces paramètres, tels que l'énergie d'activation ou la constante de vitesse de la réaction serviront à établir le modèle de prédiction des pertes. D'après ce modèle, le β -carotène et la β -cryptoxanthine seraient stables lors de traitements thermiques classiques comme la pasteurisation ou la concentration. Les pertes seraient inférieures à 2 % pour un traitement de 5 minutes à 85°C. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont étudié la préservation des caroténoïdes des jus d'orange au cours de la pasteurisation et de la concentration (Kim *et al.*, 2003 ; Gama & de Sylos, 2007 ; Sanchez-Moreno *et al.*, 2005). Les conditions de pasteurisation les plus fortes (90°C pendant 1 minute) sont décrites par Sanchez-Moreno *et al.* (2005) qui n'observent pas de pertes en caroténoïdes provitaminiques A après un traitement thermique classique.

Le traitement thermique des jus d'agrumes a provoqué l'apparition de produits d'isomérisation et d'oxydation provenant principalement de la dégradation des xanthophylles. Le traitement thermique des xanthophylles a généré des isomères *cis* et la transformation de composés furanoxydes 5,6 en époxydes 5,8. La présence de ces composés époxydes serait due aux conditions de chauffage dans un milieu acide correspondant à un jus d'agrumes d'après Philip *et al.* (1988). L'auroxanthine (époxyde 5,8) qui remplace progressivement la violaxanthine (furanoxycide 5,6) au cours du traitement thermique est identifiée dans plusieurs études caractérisant des jus commerciaux (Goodner *et al.*, 2001 ; Mouly *et al.*, 1999). Notons que la conversion complète de la violaxanthine en auroxanthine résulte en une perte visuelle de couleur. Ceci est particulièrement vrai pour les jus d'orange dans lesquels la violaxanthine est le caroténoïde majoritaire. Les caroténoïdes provitaminiques, qui sont responsables de l'intensité de la couleur orange, représentent de faibles quantités dans les jus.

Parallèlement aux caroténoïdes, nous avons également étudié les dégradations thermiques de la vitamine C et de l'héspéridine. Ces deux autres microconstituants présents également dans les jus d'agrumes sont des antioxydants participant à la composition des jus qui peuvent interagir lors de traitements thermiques. Dans notre étude, la vitamine C ne s'est pas révélée être aussi sensible aux traitements thermiques que dans d'autres produits alimentaires. L'instabilité de l'acide ascorbique dans des jus de fruits lors de traitements thermiques a été rapportée par plusieurs auteurs par des études de cinétiques (Johnson *et al.*, 1995 ; van den Broeck *et al.*, 1998 ; Vikram *et al.*, 2005). Une fois notre modèle établi, les pertes prévues sont inférieures à 2 % dans le cas d'une pasteurisation à 85°C pendant 5 minutes. Gil-Izquierdo *et al.* (2002) n'ont pas observé de pertes en vitamine C après pasteurisation d'un jus d'orange mais en ont observé sur la partie pulpe (58 %). Ceci met en évidence le rôle important de la matrice dans la dégradation de la vitamine C. La matrice "jus" semble représenter un milieu d'avantage protecteur. Plusieurs autres hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la relative stabilité de l'acide ascorbique dans les jus d'agrumes chauffés. Dans notre cas, le pH acide du jus (3,6) protège certainement l'acide ascorbique des dégradations comme cela a été montré dans des solutions modèles (Rojas & Gerschenson, 1997). Les composés phénoliques présents dans le jus d'agrumes, notamment les flavonoïdes peuvent également contribuer à la protection de l'acide ascorbique dans le cas de réactions de dégradations oxydatives (Miller & Rice-Evans, 1997). Par ailleurs, nous avons également montré que les constantes de vitesse des réactions de dégradation de l'acide ascorbique sont

liées à la concentration en oxygène dissous. Dans le jus initial la concentration en oxygène dissous est de 2,5 mg/L. Les constantes de vitesses des réactions étudiées à 90°C sont 10 fois plus faibles avec un jus désaéré à 0,2 mg/L. La réaction d'ordre 1 en présence d'une quantité d'oxygène dissous de 2,5 mg/L a été également décrite par van den Broeck *et al.* (1998) lors de leur étude cinétique du jus d'orange à 120-150°C. Selon ces auteurs, la dégradation de l'acide ascorbique en présence d'oxygène est une réaction d'ordre 1 décrivant des dégradations en milieu aérobie. Concernant l'héspéridine, aucune dégradation n'a été observée après 2h de chauffage du jus à 90°C. La thermostabilité de ce composé apparaît très élevée dans le jus d'agrumes. Sanchez-Moreno *et al.* (2005) avaient déjà remarqué que la pasteurisation n'affectait pas ce composé phénolique. Le comportement d'autres flavonoïdes comme les anthocyanes, a été étudié dans les jus d'orange sanguine par Kirca *et al.* (2003). Les anthocyanes sont apparus fortement dégradés par le chauffage (69 % de perte à 90°C après 120 minutes).

Notre étude a mis en évidence que le traitement thermique n'affecte pratiquement pas les microconstituants d'intérêt nutritionnel tels que les caroténoïdes provitaminiques, l'héspéridine et la vitamine C dans les conditions de la pasteurisation classique intervenant dans la fabrication des jus de fruits. La synergie entre les molécules antioxydantes (caroténoïdes, vitamine C et polyphénols) constituant notre jus d'agrumes et l'effet matrice semble exercer un effet protecteur. La simplicité des modèles prédictifs développés dans cette étude peut être utilisée pour prévoir l'impact d'un traitement thermique industriel sur la dégradation de la vitamine C et des caroténoïdes provitaminiques d'un jus d'agrumes. Très récemment Melendez-Martinez *et al.* (2007) ont dressé un profil des jus d'agrumes commerciaux vendus en Espagne. Les jus congelés, qui subissent moins de transformation dans leur fabrication, ont les teneurs en vitamine C et caroténoïdes provitaminiques A les plus élevées. Les autres jus issus de procédés comme la pasteurisation et la concentration ont des teneurs très faibles en ces types de vitamines. Enfin, les conditions de stockage peuvent être la cause d'une dégradation de ces micronutriments lors des procédés de fabrication. D'autres études sur le rôle de l'oxygène et de la lumière dans les diverses conditions de stockage seront nécessaires afin d'optimiser les traitements et conditions de stockage et ainsi de prévenir les dégradations oxydatives des microconstituants composant la qualité nutritionnelle des jus.

La connaissance du matériel végétal que constitue le jus d'agrume, en terme de qualité nutritionnelle et en particulier par rapport aux caroténoïdes a été un élément essentiel pour aborder la biodisponibilité. En effet, l'objectif principal de cette thèse est de contribuer à l'amélioration de la qualité nutritionnelle des jus d'agrume en estimant la biodisponibilité *in vitro* des caroténoïdes, molécules clés de la qualité organoleptique, nutritionnelle et hédoniste des jus d'agrumes.

Que se passe-t-il lorsque nous buvons un jus d'agrume ? Comment se comportent les formes libres et esters des caroténoïdes ? Quelles sont les interactions ou synergies entre les caroténoïdes et les autres antioxydants présents dans le jus ? Pour essayer de répondre à ces questions, l'utilisation d'un modèle de digestion associé à un modèle intestinal cellulaire a été proposée afin de comprendre les mécanismes qui régissent la bioaccessibilité et l'absorption intestinale des caroténoïdes des jus d'agrumes.

Dans ce travail un premier modèle de digestion *in vitro* a été choisi pour déterminer la bioaccessibilité des caroténoïdes, c'est-à-dire suivre plus précisément le transfert des caroténoïdes incorporés dans le jus vers les micelles mixtes au cours de la phase gastrique et duodénale. Ensuite, pour évaluer l'absorption intestinale des caroténoïdes, les cellules Caco-2 TC7 ont été choisies comme modèle entérocytaire.

Dans la nature, les xanthophylles sont largement représentées sous forme d'esters dans les fruits et particulièrement chez les agrumes (Breithaupt & Bamedi, 2001). Suivant le pourcentage d'esters de β -cryptoxanthine déterminés dans nos travaux précédents, des agrumes spécifiques appartenant aux espèces orange, mandarine et citron ont été choisis comme fruits modèles pour l'étude de la bioaccessibilité des caroténoïdes. A cause du rapport élevé de la forme libre par rapport aux formes esters, le citron Meyer a été utilisé pour évaluer la bioaccessibilité de la forme libre. Inversement, les mandarines et oranges ont été choisies pour évaluer la bioaccessibilité des esters. Après digestion *in vitro* de ces jus d'agrumes, la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine s'est avérée être significativement plus élevée que celle du β -carotène et des esters de β -cryptoxanthine. Ces résultats rejoignent ceux de Garrett *et al.* (1999a) et de Chitchumroonchokchai *et al.* (2004). Ces auteurs ont observé que la lutéine était préférentiellement micellarisée par rapport au β -carotène dans des conditions de digestion *in vitro*. Nos résultats complémentaires avec des micelles synthétiques ont montré que la β -cryptoxanthine est micellarisée à peu près 3 fois plus que le β -carotène ou les formes

esters à partir d'un extrait caroténoïde de jus de mandarine. L'ensemble de ces données confirme que la micellarisation des caroténoïdes est un facteur clé de la biodisponibilité. Dans une étude précédente, Borel *et al.* (1996) rapportent que les caroténoïdes apolaires sont préférentiellement localisés au centre des triacylglycérols qui forment les gouttelettes lipidiques, alors que les caroténoïdes plus polaires comme les xanthophylles résident près de la surface. Selon Tyssandier *et al.* (1998), dans une étude *in vivo* chez l'animal, la biodisponibilité des caroténoïdes est associée à leur polarité. De même, Cooper *et al.* (1997) montrent que la polarité des caroténoïdes est liée à leur coefficient de partage octanol-eau ($\log_{10} > 8$) qui permet de mesurer leur lipophilicité.

Nous avons utilisé le modèle de digestion *in vitro* pour évaluer la bioaccessibilité des caroténoïdes d'un jus d'agrume consommé seul. En effet, le jus d'agrume est un aliment qui est souvent consommé hors des repas. Cependant, il accompagne parfois un repas, petit déjeuner en Europe ou déjeuner dans les pays anglo-saxons. Nous avons donc voulu tester le modèle de digestion *in vitro* pour un jus d'agrume pris avec un repas représentant les apports journaliers en macronutriments de base (15 % de protéines, 55 % de glucides et 30 % de lipides). Dans les études *in vivo* il est admis que la matière grasse ingérée lors d'un repas améliore la biodisponibilité des caroténoïdes (Roodenburg *et al.*, 2000 ; Ribaya-Mercado, 2002). Contrairement à ce qui était attendu, la matière grasse du modèle n'a pas amélioré la bioaccessibilité des caroténoïdes du jus d'agrume testé. Nos expériences ont montré que sur les 15 % de β -cryptoxanthine récupérés après digestion *in vitro*, 10 % se sont incorporés dans la fraction huileuse. Ce résultat met en évidence les limites du modèle prévu pour mesurer les caroténoïdes de la fraction micellaire. Le modèle ne reflète pas les conditions *in vivo* car dans ce cas, les caroténoïdes incorporés dans les gouttelettes lipidiques seraient libérés grâce à une hydrolyse des triacylglycérols pour permettre ensuite le transfert dans les micelles. En effet, si les triacylglycérols stimulent la sécrétion biliaire et augmentent ainsi la quantité de micelles pouvant solubiliser les caroténoïdes (Borel *et al.*, 2005), l'efficacité de l'hydrolyse des triacylglycérols est liée au transfert des caroténoïdes vers les micelles (Tyssandier *et al.*, 2003). Donc, pour améliorer le modèle, augmenter la concentration en sels biliaires et en pancréatine ainsi que le temps de digestion permettrait peut-être de libérer les caroténoïdes de la fraction huile.

Lors de la digestion *in vitro* des jus d'agrumes, les pourcentages de formes libres augmentent 3 à 4,5 fois par rapport aux jus initiaux. Ces résultats suggèrent une hydrolyse

partielle des esters par une enzyme probablement présente dans la pancréatine. Actuellement, l'enzyme responsable du clivage des esters de xanthophylles n'est pas connue. Cependant, Breithaupt & Bamedi, (2002) ont mis en évidence que la cholestérol estérase ou carboxyl ester lipase hydrolyse efficacement les esters de β -cryptoxanthine lors de tests enzymatiques. Rappelons que ces deux enzymes, la lipase pancréatique et la carboxyl ester lipase, peuvent hydrolyser plusieurs types de substrats : triacylglycérol, rétinyl ester, ou ester de cholestérol. Les auteurs mentionnent également que la lipase pancréatique et la pancréatine de porc sont capables d'hydrolyser les esters de β -cryptoxanthine, mais de manière moins efficace. Par contre, la lipase pancréatique humaine n'accepte pas les esters de β -cryptoxanthine comme substrats. La lipase pancréatique humaine semble être plus spécifique que la lipase pancréatique de porc. Chitchumroonchokchai & Failla (2006) ont rajouté de la carboxyl-ester lipase bovine pour hydrolyser des xanthophylles lors de digestion *in vitro* et observent une hydrolyse des esters de zéaxanthine. Contrairement à notre étude, ces auteurs ne constatent pas d'hydrolyse des esters en présence de pancréatine de porc. Toutefois, entre les deux études, les matrices alimentaires (purée ou jus) jouent certainement un rôle déterminant. Lindstrom *et al.* (1988) ont constaté que les activités des 2 enzymes : lipase pancréatique et carboxyl ester lipase, dépendent des concentrations en sels biliaries et des conditions physiologiques ; de plus, elles agissent de concert sur des substrats différents (micellaires ou non micellaires). La lipase pancréatique agirait plutôt sur des agrégats lipidiques alors que la carboxyl-ester lipase sur des substrats incorporés dans les micelles. Ces résultats pourraient suggérer que dans notre cas, les esters de β -cryptoxanthine seraient hydrolysés avant de passer sous formes de micelles par la lipase pancréatique de porc. Cependant, quelque soit l'enzyme responsable *in vivo* du clivage des esters de xanthophylles, notre étude ou celle de Chitchumroonchokchai & Failla (2006) suggèrent que les esters de xanthophylles sont clivés dans les étapes pré-absorptives.

La seconde étape a été d'évaluer le devenir des caroténoïdes et en particulier des formes libres et esters des xanthophylles au niveau intestinal. Si le modèle de digestion *in vitro* est un outil intéressant pour évaluer la bioaccessibilité des caroténoïdes, les cellules intestinales humaines (Caco-2 TC7) en culture constituent un modèle largement utilisé pour étudier les mécanismes d'absorption. Si les études cliniques indiquent d'une manière générale que les formes esters des xanthophylles ne sont pas retrouvées dans le plasma après ingestion d'aliments riches en esters (Wingerath *et al.* 1995 ; Bowen *et al.*, 2002 ; Breithaupt *et al.*, 2003) aucune conclusion sur la localisation ou les mécanismes d'hydrolyse n'a été formulée.

Notre étude montre pour la première fois, que les esters de β -cryptoxanthine peuvent être captés par les cellules intestinales. Par ailleurs, après incubation d'esters de β -cryptoxanthine purifiés sur cellules Caco-2, aucune trace de forme libre n'a été retrouvée dans les cellules ou dans le pôle basolatéral. Chitchumroonchokchai & Failla (2006), rapportent également la présence d'ester de zéaxanthine dans les cellules intestinales mais ne détecte pas d'activité hydrolytique pour les esters de xanthophylles dans les cellules Caco-2. Les mêmes auteurs montrent que seule la forme libre est transportée par les chylomicrons et qu'aucune réestérification d'esters ne se produit dans la cellule intestinale comme c'est le cas pour le cholestérol. Dans l'étude de Granada *et al.* (1998) des esters de lutéine sont détectés dans le plasma après absorption de suppléments de lutéine mais à des doses supra-nutritionnelles. Wingerath *et al.* (1998) ont également signalé la présence d'esters dans la peau humaine. De telles observations suggèrent une éventuelle réestérification des xanthophylles après l'étape d'absorption intestinale.

Parallèlement à l'absorption des esters, la forme libre de la β -cryptoxanthine et le β -carotène ont été également étudiés dans des proportions reflétant la composition des jus d'agrumes. Deux types de micelles ont été testés pour délivrer les caroténoïdes aux cellules Caco-2: des micelles synthétiques et des micelles dites "physiologiques" issues de la digestion *in vitro* d'un jus d'agrumes. Les résultats, bien que quantitativement différents, ont donné des préférences d'absorption entérocytaire pour les 4 caroténoïdes en présence et pour les 2 types de micelles : β -carotène > β -cryptoxanthine libre > esters de β -cryptoxanthine. Quelque soit le type de micelles plusieurs études ont précédemment décrit une absorption préférentielle du β -carotène par rapport aux autres caroténoïdes (Garrett *et al.*, 1999b, 2000 ; During *et al.*, 2002). Cela peut supposer que le transfert du β -carotène à travers la bordure en brosse est plus efficace que pour les autres caroténoïdes plus polaires (Garrett *et al.*, 1999b). En effet, au regard des travaux de Borel *et al.* (1996), la forme émulsifiée du β -carotène serait plus stable, comparativement à un composé plus polaire, et donc plus facilement captée par la bordure en brosse de l'entérocyte. Plus probablement, la sélectivité des molécules suggère que l'absorption intestinale des caroténoïdes peut être un processus facilité par l'intermédiaire de transporteurs. Cette hypothèse est supportée par de récentes études mettant en évidence la participation du transporteur SR-B1 dans le captage de la lutéine et du β -carotène (Reboul *et al.*, 2005b ; van Bennekum *et al.*, 2005).

L'accumulation du β -carotène est plus grande dans le cas des micelles générées par la digestion *in vitro*. La composition en caroténoïdes est inversée après absorption par les cellules. Ceci est particulièrement remarquable sachant que la proportion en β -carotène représente 12,7 % dans la micelle et passe à 64 % après absorption par les cellules. Cette sélectivité vis-à-vis des esters est moindre lorsque les cellules sont incubées avec des micelles synthétiques. La différence entre les deux types de micelles est due aux composés entrant dans la composition des micelles. La composition lipidique des micelles semble être un facteur clé dans l'absorption intestinale des caroténoïdes. La base de cette composition a été établie à l'origine par Homan & Hamelshle, (1998) ; elle contient des sels biliaires et divers lipides : cholestérol, monoacylglycérol, acide gras et phospholipides. Suite à ces travaux, il a été mis en évidence avec des cellules Caco-2 que l'absorption du cholestérol était réduite par la présence de phosphatidylcholine dans les micelles mais pas par la lysophosphatidylcholine. De plus, Sugawara *et al.* (2001) ont montré que l'absorption micellaire des caroténoïdes est inhibée de façon dose-dépendante par la phosphatidylcholine, alors que la lysophosphatidylcholine avait un effet contraire. La composition de nos micelles, correspondant aux modifications proposées par Reboul *et al.* (2005a), permet d'avoir un rapport optimum de 80/20 lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine reflétant les proportions retrouvées en fin de duodénum chez l'homme (Armand *et al.*, 1996). La proportion élevée de lysophosphatidylcholine dans les micelles synthétiques joue certainement un rôle positif dans la captation des caroténoïdes. Chitchumroonchokchai *et al.* (2004) observent également une différence entre micelles synthétiques et micelles issues d'un modèle de digestion *in vitro* ; ces auteurs suggèrent que la lysophosphatidylcholine est un vecteur permettant une meilleure absorption des caroténoïdes. De plus, les micelles synthétiques forment une population homogène de particules de taille similaires contrairement aux micelles physiologiques. Ces différences dans la composition moléculaire et la taille des micelles pourraient conduire à des interactions différentes avec la bordure en brosse de l'entérocyte (Borel *et al.*, 1996).

En résumé, cette étude d'estimation *in vitro* de la biodisponibilité des jus d'agrumes a permis de connaître la bioaccessibilité des formes libres et esters de β -cryptoxanthine et de leur absorption par les cellules intestinales. Bien que la bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine soit relativement élevée, les esters β -cryptoxanthine sont faiblement absorbés par l'entérocyte. Ces observations rejoignent les résultats obtenus *in vivo* chez l'homme mentionnant que seules les formes libres des xanthophylles sont retrouvées dans le plasma (Breithaupt *et al.*,

2003). Cependant, l'hydrolyse des esters de β -cryptoxanthine observée lors de la phase de digestion suggère une augmentation de la biodisponibilité de la forme libre. La biodisponibilité comparable des formes libres et esters de β -cryptoxanthine dans l'étude de Breithaupt *et al.* (2003) chez l'homme laisse penser que cette hydrolyse est particulièrement efficace *in vivo*. Bien que nos résultats suggèrent que les esters de β -cryptoxanthine ne soient pas clivés par l'entérocyte, d'autres études seraient nécessaires afin d'élucider le métabolisme des esters au niveau des cellules intestinales.

Suite à cette première partie sur la bioaccessibilité des caroténoïdes des jus d'agrumes, nous nous sommes intéressés aux éventuelles interactions possibles au niveau intestinal entre les caroténoïdes et d'autres antioxydants (polyphénols et vitamine C) naturellement présents dans les jus d'agrumes. Pour évaluer l'effet de différentes flavanones d'agrumes sur l'absorption des caroténoïdes par les cellules Caco-2 TC7, des solutions respectant les conditions physiologiques d'héspéridine, héspéretine et naringénine ou de vitamine C ont été ajoutées aux micelles de caroténoïdes. Nos résultats ont montré d'une manière générale que les flavanones glycosylées (formes généralement présentes dans les fruits) ou sous forme aglycone augmentaient significativement l'absorption de la β -cryptoxanthine ou du β -carotène. Cependant, l'héspéridine semble avoir plus d'effet que l'héspéretine et la naringénine. Les flavanones telles que l'héspéridine ou la naringine sont connues pour être capables de chélater le fer (sous forme Fe^{3+}) (Fernandez *et al.*, 2002). Le site préférentiel de ce mécanisme se situerait entre le 5 hydroxyl et le groupe céto en position 4 (Fernandez *et al.*, 2002 ; Mira *et al.*, 2002). L'effet chélateur supposé des flavanones vis-à-vis du fer est une hypothèse pour expliquer l'augmentation de l'absorption des caroténoïdes par les cellules Caco-2. En effet, la suppression du fer du milieu au niveau apical pourrait avoir plusieurs conséquences sur l'accumulation des caroténoïdes dans la cellule. La première hypothèse concerne l'inhibition de l'enzyme 15,15'-dioxygénase par les flavanones. During *et al.* (2001) ont montré que l'activité de cette enzyme est dépendante du fer. En chélatant le fer présent dans le milieu, l'enzyme serait inhibée et la première conséquence serait l'accumulation des caroténoïdes provitaminique A au niveau intracellulaire. Cependant, aucune trace de rétinol, rétinaldéhyde ou ester de rétinol n'a été retrouvée dans les compartiments cellulaire, basolatéral ou apical. Néanmoins, les rétinoïdes pourraient très bien se retrouver sous la forme de conjugués et hydrophiles et donc ne pas être extraits avec les composés lipophiles. La deuxième hypothèse met en jeu l'implication d'un éventuel transporteur SR-B1. Suite à des récentes études, il a été démontré que ce transporteur du cholestérol pouvait également

intervenir dans le transport des caroténoïdes (Reboul *et al.*, 2005b; van Bennekum *et al.*, 2005). Par ailleurs, Zager *et al.* (2003) rapportent que l'expression de cette protéine serait inhibée par la présence de fer dans le milieu. En chélatant le fer du milieu, les flavanones permettraient une augmentation de l'expression de SR-B1 et il en résulterait une concentration intracellulaire plus élevée en caroténoïdes. En admettant que le pouvoir chélateur des trois types de flavanone soit équivalent, leur comportement par rapport à l'entérocyte est certainement différent compte tenu de la forme glycosylée ou non des molécules. Une seule étude, suggère que le passage de l'héspéridine à travers les cellules intestinales du modèle Caco-2 serait paracellulaire (Kim *et al.*, 1999). Contrairement à ce qui est rapporté par cette étude, des expérimentations préliminaires que nous avons conduites sur l'absorption intestinale de l'héspéridine ont montré que cette dernière était capable d'entrer dans les entérocytes (résultats non montrés dans cette thèse). Tourniaire *et al.* (2005) ont également démontré que la P-glycoprotéine pouvait transporter un glycoside de flavonoïde comme la naringine. Rappelons que la P-glycoprotéine appartient à la famille des transporteurs ABC permettant de protéger l'organisme contre l'entrée de composés toxiques en les effluant vers la lumière intestinale. Dans cette étude, le rôle de la P-glycoprotéine a été mis en évidence dans l'efflux de naringine hors de l'entérocyte vers la lumière intestinale suggérant que la forme glycosylée de la naringine n'est pas hydrolysée par les cellules Caco-2. L'héspéridine contrairement aux aglycones héspéretine et naringénine ne serait pas métabolisée à l'intérieur de l'entérocyte. En conséquence l'héspéridine restée intacte pendant l'expérience pourrait avoir un effet plus important sur l'absorption des caroténoïdes.

La vitamine C représente le principal antioxydant des jus d'agrumes. Son rôle et la diversité de ses actions ne se limitent pas à une protection antioxydante et elle est connue par ailleurs pour favoriser l'absorption de certains minéraux comme le fer. En effet, l'effet promoteur de l'acide ascorbique sur l'absorption du fer est maintenant bien établi (Lynch & Stoltzfus, 2003). L'acide ascorbique agit au niveau de la lumière intestinale en réduisant les ions ferriques (Fe^{3+}) et en libérant ainsi les ions ferreux (Fe^{2+}). Dans notre étude, nous avons voulu évaluer l'effet des interactions entre flavonoïdes et acide ascorbique sur l'absorption des caroténoïdes. L'acide ascorbique ajouté seul au milieu micellaire n'a eu aucun effet sur l'absorption des caroténoïdes. Par contre, l'acide ascorbique ajouté à l'héspéridine a eu pour effet d'abaisser les concentrations intracellulaires en caroténoïdes. Il semblerait que l'effet chélateur de l'héspéridine vis-à-vis du fer soit contrecarré par l'acide ascorbique. *In vivo*, l'effet inhibiteur des polyphénols sur la biodisponibilité du fer a été démontré pour certains jus

de fruits mais pas pour les jus d'agrumes. En effet, pour les jus d'agrumes l'effet inhibiteur du fer était contrecarré par l'acide ascorbique dont le rôle de promoteur de la biodisponibilité vis-à-vis du fer est bien connu (Boato *et al.*, 2002).

Ces premiers résultats sur les interactions des flavanones et de la vitamine C sur l'absorption intestinale des caroténoïdes suscitent beaucoup d'interrogations sur les interactions existantes de ces trois classes de microconstituant. Nos expérimentations ont été menées avec des molécules isolées dans un milieu simplifié mais ont révélé que les flavanones sont probablement susceptibles de modifier l'absorption des caroténoïdes au niveau de l'entérocyte. Cependant quelques points restent à démontrer, notamment l'implication du transporteur SR-B1. Des expérimentations supplémentaires mettant en jeu un anticorps bloquant ou un inhibiteur chimique permettraient de diminuer l'absorption des caroténoïdes et pourraient ainsi suggérer que ce transporteur joue un rôle dans le captage des molécules sur Caco-2 TC7. Par ailleurs, des essais comparatifs avec de la quercétine seraient souhaitables car ils mettraient en évidence les différences liées aux relations structure-activité des flavonoïdes vis-à-vis de l'absorption et du métabolisme intestinal des caroténoïdes. La position et le nombre de substituants groupes hydroxyles ou méthoxy pour l'hespérétine en particulier sur le cycle B pourraient avoir une influence sur l'effet des flavanones par rapport à l'absorption des caroténoïdes par les Caco-2 TC7. Cette étude est toutefois une étude préliminaire mais qui, pour la première fois, démontre une possible interaction entre flavanones et caroténoïdes au niveau intestinal. Les hypothèses vérifiées permettront d'ouvrir une voie sur la compréhension des mécanismes et les interactions possibles entre les caroténoïdes et les autres antioxydants tels que les polyphénols et la vitamine C.

Conclusion et perspectives

Si les résultats de ce travail de thèse ont permis de répondre à un certain nombre de questions, d'autres restent en suspens et feront l'objet d'investigations futures.

D'une manière générale, cette étude a participé à l'amélioration des connaissances sur la qualité nutritionnelle d'agrumes méditerranéens et pourrait servir d'appui à la sélection variétale en Corse. En effet, jusqu'à présent en dehors des qualités gustatives et de la disparition des pépins, la sélection variétale des agrumes ne s'est jamais faite sur des critères nutritionnels telle que la composition en caroténoïdes. Par ailleurs, pour l'industrie des jus de

fruits, la valorisation nutritionnelle mise en évidence dans ces travaux permettrait de positionner des jus d'agrumes riches en microconstituants.

En regard de la composition en caroténoïdes, la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes commerciaux est décevante comparativement à un jus pressé. Des analyses quantitatives ont révélé qu'un jus commercial flash-pasteurisé (100 % jus) contient 5 fois moins de caroténoïdes qu'un jus pressé provenant de la même variété. Les variétés d'agrumes destinées à la transformation en jus sont peu nombreuses (principalement : Valencia, Pera, Pineapple et Hamlin) et proviennent pour une large part de Floride et du Brésil. Ceci explique en partie la faible teneur en caroténoïdes des jus commerciaux. N'oublions pas que la législation américaine autorise l'ajout d'extrait de paprika ou de jus de mandarine pour "recolorer" ces jus, pratique non autorisée en Europe. Si les agrumes méditerranéens sont plus intéressants pour leurs teneurs en caroténoïdes, la production est surtout orientée vers le marché en fruits frais et 16 % seulement des agrumes produits sont destinés à la transformation en jus.

L'étude préliminaire de l'influence du facteur environnemental sur la composition en caroténoïdes mériterait d'être complétée afin de cerner les paramètres précis (lumière, température) qui modulent les enzymes responsables de la biosynthèse des caroténoïdes. D'autres études seraient nécessaires pour connaître l'effet de l'environnement sur le métabolisme des caroténoïdes dans la plante. Des études d'interaction variété d'agrumes/ environnement sont à poursuivre.

Si l'on considère l'influence du facteur technologique sur la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes, il semblerait que la matrice des jus d'agrumes soit intéressante car ce milieu acide permet de préserver l'acide ascorbique, les flavonoïdes et les caroténoïdes provitaminiques. Là encore, il conviendrait d'approfondir le rôle des interactions entre microconstituants afin d'optimiser les paramètres des conditions de conservation en fonction de la qualité nutritionnelle du produit fini et des agrumes de départ.

La connaissance de la biodisponibilité des formes esters des jus d'agrumes mérite d'être approfondie à la fois par des modèles *in vitro* et par des études cliniques *in vivo*. L'étude de Breithaupt *et al.* (2003) démontre que la biodisponibilité des esters est identique à celle des formes libres suggérant une hydrolyse efficace des esters de xanthophylles. L'identification des enzymes responsables du clivage des esters et la localisation de leur activité reste à

élucider. Le fait que la carboxyl ester lipase soit active *in vitro* sur les esters de xanthophylles ne prouve pas qu'elle le soit *in vivo*. Chez le rat, la carboxyl ester lipase n'est pas nécessaire pour obtenir l'hydrolyse de rétinyl ester (van Bennekum *et al.*, 1999). De même, la lipase pancréatique humaine n'acceptant pas les esters comme substrats *in vitro* n'implique pas qu'elle n'est pas un rôle à jouer *in vivo*, seule ou en association avec d'autres enzymes. Plusieurs enzymes pourraient être candidates pour cette hydrolyse et pourraient fonctionner dans des conditions physiologiques bien précises.

Au niveau de l'entérocyte, si notre étude a montré que les esters de xanthophylle pouvaient être captés par la cellule, nous n'avons aucune information sur leur devenir dans le milieu basolatéral. Les esters de xanthophylles sont-ils sécrétés dans les chylomicrons par les cellules Caco-2 ? Et existe-t-il une possibilité pour que les xanthophylles sous forme libre soient réestérifiées dans la cellule de l'entérocyte ? L'unique étude disponible, de Chitchumroonchokchai & Failla (2006) doit être confirmée pour connaître le devenir des esters après l'absorption par l'entérocyte. Il faudrait pouvoir vérifier au niveau du modèle entérocytaire s'il existe une enzyme pouvant hydrolyser les esters ou les réestérifier. Ces informations seraient nécessaires avant de passer aux études cliniques chez l'homme. Des études cliniques en utilisant des intubations gastriques et duodénales permettraient de récupérer les fractions correspondant aux différentes étapes de la digestion afin de suivre le devenir des esters. La complémentarité des modèles *in vitro* et des études cliniques est indispensable pour élucider la problématique des esters.

Pour conclure, la dernière partie de ce travail sur les interactions caroténoïdes/polyphénols a soulevé de nombreuses questions en particulier au niveau des métabolites formés dans l'entérocyte. Le fait que le rétinol n'a pas pu être détecté dans les cellules Caco-2 TC7 après incubation de β -carotène pose le problème de l'activité de la 15, 15' dioxygénase. Cette enzyme est-elle réellement présente dans les cellules Caco-2 TC7 utilisées ? Une identification par western blot de la protéine et une vérification de son expression serait nécessaire pour valider nos hypothèses. Par ailleurs, le rétinol pourrait-il exister sous une forme conjuguée plus hydrosoluble dans les cellules ? Dans ce cas, cela expliquerait que ces formes ne soient pas détectées dans nos extraits organiques purifiés. Les travaux réalisés dans la littérature démontrant la présence de rétinol dans les cellules Caco-2 TC7 après incubation de β -carotène ont été faits avec des micelles "Tween" et donc de structure différente. Des expérimentations avec ce type de micelles permettraient de vérifier l'existence de rétinol et de

comprendre les mécanismes de clivage du β -carotène au niveau entérocytaire. Enfin, l'effet des flavonoïdes sur l'absorption des caroténoïdes amène à se questionner sur le devenir de l'hespéridine et de la forme aglycone correspondante l'hespérétine dans la cellule Caco-2. La présence supposée des métabolites de l'hespérétine (glucuronidés ou sulfatés) au niveau intracellulaire reste à vérifier ainsi que la présence d'hespéridine dans les différents compartiments apical, cellulaire et basal. Il serait également intéressant de mettre en évidence les mécanismes cellulaires impliqués dans la captation et le transport de l'hespéridine et de son aglycone par les entérocytes lors de leurs interactions avec les caroténoïdes et/ou la vitamine C.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Al-Delaimy W. K., Slimani N., Ferrari P., Key T., Spencer E., Johansson I., Johansson G., Mattisson I., Wirfalt E., Sieri S., Agudo A., Celentano E., Palli D., Sacerdote C., Tumino R., Dorronsoro M., Ocke M. C., Bueno-De-Mesquita H. B., Overvad K., Chirlaque M. D., Trichopoulou A., Naska A., Tjonneland A., Olsen A., Lund E., Skeie G., Ardanaz E., Kesse E., Boutron-Ruault M. C., Clavel-Chapelon F., Bingham S., Welch A. A., Martinez-Garcia C., Nagel G., Linseisen J., Quiros J. R., Peeters P. H., Van Gils C. H., Boeing H., Van Kappel A. L., Steghens J. P. & Riboli E. (2005) Plasma carotenoids as biomarkers of intake of fruits and vegetables: ecological-level correlations in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Eur J Clin Nutr* **59**, 1397-1408.
- Altmann S. W., Davis H. R., Jr., Zhu L. J., Yao X., Hoos L. M., Tetzloff G., Iyer S. P., Maguire M., Golovko A., Zeng M., Wang L., Murgolo N. & Graziano M. P. (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201-1204.
- 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. *Am J Physiol* **271**, G172-183.
- Arts I. C. & Hollman P. C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 317S-325S.

B

- Baron-Delage S., Mahraoui L., Cadoret A., Veissiere D., Taillemite J. L., Chastre E., Gespach C., Zweibaum A., Capeau J., Brot-Laroche E. & Cherqui G. (1996) Dereglulation of hexose transporter expression in Caco-2 cells by ras and polyoma middle T oncogenes. *Am J Physiol* **270**, G314-323.
- Barry G. H. & Van Wyk A. A. (2006) Low-temperature cold shock may induce rind colour development of 'Nules Clementine' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit. *Postharvest Biol Tech* **40**, 82-88.
- Behrens I., Kamm W., Dantzig A. H. & Kissel T. (2004) Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin. *J Pharm Sci* **93**, 1743-1754.
- Belliot J. P. (2003) Stabilité des vitamines. In *Les vitamines dans les industries agroalimentaires*, pp. 289 [C Bourgeois, editor]. Paris: TEC & DOC, Lavoisier.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F. R., Ortuno A. & Del Rio J. A. (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* **45**, 4505-4515.
- Bernier J. J., Adrian J. & Vindon N. (1988) *Les aliments dans le tube digestif*. Paris: Doin.
- Berr F. & Kern F., Jr. (1984) Plasma clearance of chylomicrons labeled with retinyl palmitate in healthy human subjects. *J Lipid Res* **25**, 805-812.
- Besançon P. (1990) Besoins alimentaires et qualité nutritionnelle des aliments. In *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments* [JC Cheftel, H Cheftel, P Besançon and editors]. Paris: TEC & DOC, Lavoisier.

- Birlouez-Aragon I. (2004) Que penser de l'impact nutritionnel et santé des jus de fruits et autres aliments enrichis en vitamine C. *Informations diététiques* **4**, 39-42.
- Blomhoff R., Green M. H. & Norum K. R. (1992) Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Ann Rev Nutr* **12**, 37-57.
- Boato F., Wortley G. M., Liu R. H. & Glahn R. P. (2002) Red grape juice inhibits iron availability: Application of an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *J Agric Food Chem* **50**, 6935-6938.
- Boileau A. C., Merchen N. R., Wasson K., Atkinson C. A. & Erdman J. W., Jr. (1999) Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J Nutr* **129**, 1176-1181.
- Bone R. A., Landrum J. T., Friedes L. M., Gomez C. M., Kilburn M. D., Menendez E., Vidal I. & Wang W. (1997) Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Exp Eye Res* **64**, 211-218.
- Borel P. (2003) Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin Chem Lab Med* **41**, 979-994.
- Borel P., Draï J., Faure H., Fayol V., Galabert C., Laromiguiere M. & Le Moel G. (2005) [Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids]. *Ann Biol Clin (Paris)* **63**, 165-177.
- 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. *J Lipid Res* **37**, 250-261.
- Borel P., Grolier P., Mekki N., Boirie Y., Rochette Y., Le Roy B., Alexandre-Gouabau M. C., Lairon D. & Azais-Braesco V. (1998a) Low and high responders to pharmacological doses of beta-carotene: proportion in the population, mechanisms involved and consequences on beta-carotene metabolism. *J Lipid Res* **39**, 2250-2260.
- Borel P., Tyssandier V., Mekki N., Grolier P., Rochette Y., Alexandre-Gouabau M. C., Lairon D. & Azais-Braesco V. (1998b) Chylomicron beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *J Nutr* **128**, 1361-1367.
- Borradaile N. M., De Dreu L. E. & Huff M. W. (2003) Inhibition of net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes* **52**, 2554-2561.
- Bowen P. E., Espinosa S. M., Hussain E. A. & Stacewicz-Sapuntzakis M. (2002) Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *J Nutr* **132**, 3668-3673.
- Bowen P. E., Hussain E. A., Stacewicz-Sapuntzakis M., Damayanti B. & Burns J. (1997) Evaluation of bioavailability of lutein and lutein diesters in humans. *Faseb J Abstract*. **2587**.
- Brat P., George S., Bellamy A., Du Chaffaut L., Scalbert A., Mennen L., Arnault N. & Amiot M. J. (2006) Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J Nutr* **136**, 2368-2373.
- Breithaupt D. & Bamedi A. (2002) Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comparative bioch physiol part B*. **132**, 721-728.
- Breithaupt D. E. & Bamedi A. (2001) Carotenoid esters in vegetables and fruits: A screening with emphasis on beta-cryptoxanthin esters. *J Agric Food Chem* **49**, 2064-2070.
- Breithaupt D. E., Weller P., Wolters M. & Hahn A. (2003) Plasma response to a single dose of dietary beta-cryptoxanthin esters from papaya (*Carica papaya* L.) or non-esterified beta-cryptoxanthin in adult human subjects: a comparative study. *Br J Nutr* **90**, 795-801.

- Breithaupt D. E., Weller P., Wolters M. & Hahn A. (2004) Comparison of plasma responses in human subjects after the ingestion of 3R,3R'-zeaxanthin dipalmitate from wolfberry (*Lycium barbarum*) and non-esterified 3R,3R'-zeaxanthin using chiral high-performance liquid chromatography. *Br J Nutr* **91**, 707-713.
- Britton G. (1998) Overview of carotenoid biosynthesis
In *Carotenoids -Volume 3: Biosynthesis and Metabolism*, pp. 123-129 [G Britton, S Liaaen-Jensen and H Pfander, editors]. Basel: Birkhäuser.
- Brown M. J., Ferruzzi M. G., Nguyen M. L., Cooper D. A., Eldridge A. L., Schwartz S. J. & White W. S. (2004) Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr* **80**, 396-403.

C

- Cardinault N., Tyssandier V., Grolier P., Winklhofer-Roob B. M., Ribalta J., Bouteloup-Demange C., Rock E. & Borel P. (2003) Comparison of the postprandial chylomicron carotenoid responses in young and older subjects. *Eur J Nutr* **42**, 315-323.
- Castenmiller J. J. M. & West C. E. (1998) Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Ann Rev Nutr* **18**, 19-38.
- Chen C. S. (1993) Orange and tangerines juices. In *Fruit Juice Processing Technology*, pp. 119 [S Naguy, CS Chen and PZ Shaw, editors]. Aubumdale, Florida, USA.: Agscience Inc.
- Chitchumroonchokchai C. & Failla M. L. (2006) Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* **136**, 588-594.
- Chitchumroonchokchai C., Schwartz S. J. & Failla M. L. (2004) Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* **134**, 2280-2286.
- Choi J. S. & Han H. K. (2005) Enhanced oral exposure of diltiazem by the concomitant use of naringin in rats. *Int J Pharm* **305**, 122-128.
- CNUCED, Conférence des Nations Unies pour le Commerce et le Développement (2003): <http://www.untacd.org> ; (15/10/2005).
- Cook J. D. & Reddy M. B. (2001) Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr* **73**, 93-98.
- Cooper D. A., Webb D. R. & Peters J. C. (1997) Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr* **127**, 1699S-1709S.
- Cortes Sanchez-Mata M., Camara-Hurtando M., Diez-Marques C. & Esperanza Torija-Isasa M. (2000) Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris L*). *Eur. Food Res Technol* **210**, 220-225.

D

- Dauchet L., Ferrieres J., Arveiler D., Yarnell J. W., Gey F., Ducimetiere P., Ruidavets J. B., Haas B., Evans A., Bingham A., Amouyel P. & Dallongeville J. (2004) Frequency of fruit and vegetable consumption and coronary heart disease in France and Northern Ireland: the PRIME study. *Br J Nutr* **92**, 963-972.
- De Pee S. & West C. (1996) Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr* **50**, S38-53.
- De Pee S., West C. E., Permaesih D., Martuti S., Muhilal & Hautvast J. G. (1998) Orange fruit is more effective than are dark-green, leafy vegetables in increasing serum

- concentrations of retinol and beta-carotene in schoolchildren in Indonesia. *Am J Clin Nutr* **68**, 1058-1067.
- Deming D. M., Baker D. H. & Erdman J. W., Jr. (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. *J Nutr* **132**, 2709-2712.
- Dennison B. A., Rockwell H. L. & Baker S. L. (1997) Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity. *Pediatrics* **99**, 15-22.
- Dennison B. A., Rockwell H. L., Nichols M. J. & Jenkins P. (1999) Children's growth parameters vary by type of fruit juice consumed. *J Am Coll Nutr* **18**, 346-352.
- Doostdar H., Burke M. D. & Mayer R. T. (2000) Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **144**, 31-38.
- During A., Dawson H. D. & Harrison E. H. (2005) Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr* **135**, 2305-2312.
- During A. & Harrison E. H. (2004) Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys* **430**, 77-88.
- During A., Hussain M. M., Morel D. W. & Harrison E. H. (2002) carotenoid uptake and secretion by caco2 cells: carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *Int J Lipid Res*, pp. 1086-1085.
- During A., Smith M. K., Piper J. B. & Smith J. C. (2001) beta-Carotene 15,15'-Dioxygenase activity in human tissues and cells: evidence of an iron dependency. *J Nutr Biochem* **12**, 640-647.
- Duval C., Touche V., Tailleux A., Fruchart J. C., Fievet C., Clavey V., Staels B. & Lestavel S. (2006) Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 1259-1263.

E

- Edwards A. J., Nguyen C. H., You C. S., Swanson J. E., Emenhiser C. & Parker R. S. (2002) Alpha- and beta-carotene from a commercial puree are more bioavailable to humans than from boiled-mashed carrots, as determined using an extrinsic stable isotope reference method. *J Nutr* **132**, 159-167.
- Erlund I., Meririnne E., Alfthan G. & Aro A. (2001) Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr* **131**, 235-241.
- Erlund I., Silaste M. L., Alfthan G., Rantala M., Kesaniemi Y. A. & Aro A. (2002) Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* **56**, 891-898.

F

- Fanciullino A. L., Dhuique-Mayer C., Luro F., Casanova J., Morillon R. & Ollitrault P. (2006) Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *J Agric Food Chem* **54**, 4397-4406.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003: <http://www.Fao.org>; (20/07/2005).

- Faulks R. M. & Southon S. (2005) Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1740**, 95-100.
- Faure H., Fayol V., Galabert C., Grolier P., Le Moel G., Steghens J. P., Van Kappel A. & Nabet F. (1999) [Carotenoids: 1. Metabolism and physiology]. *Ann Biol Clin (Paris)* **57**, 169-183.
- Favier J. C. (1995) *Repertoire général des aliments*. Paris: INRA, CNEVA, CIQUAL, TEC&DOC.
- Fernandez M. T., Mira M. L., Florencio M. H. & Jennings K. R. (2002) Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorganic Biochem* **92**, 105-111.
- Ferruzzi M. G., Failla M. L. & Schwartz S. J. (2001) Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and caco-2 human cell model. *J Agric Food Chem* **49**, 2082-2089.
- Fiore A., La Fauci L., Cervellati R., Guerra M. C., Speroni E., Costa S., Galvano G., De Lorenzo A., Bacchelli V., Fogliano V. & Galvano F. (2005) Antioxidant activity of pasteurized and sterilized commercial red orange juices. *Mol Nutr Food Res* **49**, 1129-1135.
- Franke A. A., Cooney R. V., Henning S. M. & Custer L. J. (2005) Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem* **53**, 5170-5178.
- Fujioka K., Greenway F., Sheard J. & Ying Y. (2006) The effects of grapefruit on weight and insulin resistance: relationship to the metabolic syndrome. *J Med Food* **9**, 49-54.

G

- Gahler S., Otto K. & Bohm V. (2003) Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *J Agric Food Chem* **51**, 7962-7968.
- Gama J. J. T. & De Sylos C. M. (2007) Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chem* **100**, 1686-1690.
- Gancel A. L., Ollitrault P., Froelicher Y., Tomi F., Jacquemond C., Luro F. & Brillouet J. M. (2003) Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *J Agric Food Chem* **51**, 6006-6013.
- Gardner P. T., White T. A. C., Mcphail D. B. & Duthie G. G. (2000) The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem* **68**, 471-474.
- Garrett D. A., Failla M. L. & Sarama R. J. (1999a) Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* **47**, 4301-4309.
- Garrett D. A., Failla M. L. & Sarama R. J. (2000) Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J Nutr Biochem* **11**, 574-580.
- Garrett D. A., Failla M. L., Sarama R. J. & Craft N. (1999b) Accumulation and retention of micellar beta-carotene and lutein by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr Biochem* **10**, 573-581.
- Gartner C., Stahl W. & Sies H. (1996) Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to beta-carotene in the human. *Int J Vitam Nutr res* **66**, 119-125.

- Gerber M. (2000) Bénéfice santé du modèle de consommation méditerranéen. In *Alimentation méditerranéenne et santé: actualités et perspectives* [P Besançon, S Debosque, F Delpuch, B Descomps, M Gerber, JL Leger, M Padilla and M Puygrenier, editors]. Paris: John Libbey Eurotext.
- Gil-Izquierdo A., I. Gil M. & Ferreres F. (2002) Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5107-5114.
- Gissinger R. (2003) Les vitamines dans les jus de fruits. In *Les vitamines dans les industries alimentaires*, pp. 388 [C Bourgeois, editor]. Paris: TEC & DOC, Lavoisier.
- Glahn R. P., Cheng Z., Welch R. M. & Gregorio G. B. (2002) Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using an in vitro digestion/caco-2 cell culture model. *J Agric Food Chem* **50**, 3586-3591.
- Goodner K. L., Rouseff R. L. & Hofsommer H. J. (2001) Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J Agric Food Chem* **49**, 1145-1150.
- Gorinstein S., Caspi A., Libman I., Lerner H. T., Huang D., Leontowicz H., Leontowicz M., Tashma Z., Katrich E., Feng S. & Trakhtenberg S. (2006) Red grapefruit positively influences serum triglyceride level in patients suffering from coronary atherosclerosis: studies in vitro and in humans. *J Agric Food Chem* **54**, 1887-1892.
- Gorinstein S., Leontowicz H., Leontowicz M., Krzeminski R., Gralak M., Delgado-Licon E., Martinez Ayala A. L., Katrich E. & Trakhtenberg S. (2005) Changes in plasma lipid and antioxidant activity in rats as a result of naringin and red grapefruit supplementation. *J Agric Food Chem* **53**, 3223-3228.
- Granado F., Olmedilla B., Gil-Martinez E. & Blanco I. (1998) Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects. *Br J Nutr* **80**, 445-449.
- Grolier P., Borel P., Scalbert A. & Remesy C. (2001) *Traité de Nutrition clinique de l'adulte*, Flammarion ed. Paris: Médecines-Sciences
- Guardia T., Rotelli A. E., Juarez A. O. & Pelzer L. E. (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* **56**, 683-687.
- Guilbert P. & Pascalon H. (2002) *Baromètre Santé Nutrition*. Saint Denis: INPES.
- Gutmann H., Fricker G., Torok M., Michael S., Beglinger C. & Drewe J. (1999) Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake. *Pharm Res* **16**, 402-407.

H

- Haegle A. D., Gillette C., O'Neill C., Wolfe P., Heimendinger J., Sedlacek S. & Thompson H. J. (2000) Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 421-425.
- Harmon A. W. & Patel Y. M. (2004) Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Res Treat* **85**, 103-110.
- Hauri H. P., Sterchi E. E., Bienz D., Fransen J. A. & Marxer A. (1985) Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* **101**, 838-851.
- Hollander D. & Ruble P. E., Jr. (1978) beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *Am J Physiol* **235**, E686-691.

- Homan R. & Hamelshle K. L. (1998) Phospholipase A2 relieves phosphatidylcholine inhibition of micellar cholesterol absorption and transport by human intestinal cell line Caco-2. *J Lipid Res* **39**, 1197-1209.
- Hormaetxe K., Hernandez A., Becerril J. M. & Garcia-Plazaola J. I. (2004) Role of red carotenoids in photoprotection during winter acclimation in *Buxus sempervirens* leaves. *Plant Biol* **6**, 325-332.
- Howard A. N., William N. R., Palmier C. R., Cambou J. P., Evans A. E. & Foote J. W. (1996) do hydroxy-carotenoids prevent coronary heart disease? a comparison between Belfast and Toulouse. *Int J Vitam Nutr Res* **66**, 113-118.
- Hu K. Q., Liu C., Ernst H., Krinsky N. I., Russell R. M. & Wang X. D. (2006) The biochemical characterization of ferret carotene-9',10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **281**, 19327-19338.
- Hu X., Jandacek R. J. & White W. S. (2000) Intestinal absorption of beta-carotene ingested with a meal rich in sunflower oil or beef tallow: postprandial appearance in triacylglycerol-rich lipoproteins in women. *Am J Clin Nutr* **71**, 1170-1180.

I

INSEE, Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (2000) Annuaire statistique de la France 2000 Lavoisier, Paris.

J

- Jeon S. M., Park Y. B. & Choi M. S. (2004) Antihypercholesterolemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits. *Clin Nutr* **23**, 1025-1034.
- Jian L., Du C. J., Lee A. H. & Binns C. W. (2005) Do dietary lycopene and other carotenoids protect against prostate cancer? *Int J Cancer* **113**, 1010-1014.
- Jimenez-Escrig A., Jimenez-Jimenez I., Sanchez-Moreno C. & Saura-Calixto F. (2000) Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Sci Food Agric* **80**, 1686-1690.
- Johnston C. S., Dancho C. L. & Strong G. M. (2003) Orange juice ingestion and supplemental vitamin C are equally effective at reducing plasma lipid peroxidation in healthy adult women. *J Am Coll Nutr* **22**, 519-523.
- Johnson J.R., Braddock R.J. & Chen C.S. (1995) Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. *J. Food Sci.* **60**, 502-505.
- Jung U. J., Lee M. K., Jeong K. S. & Choi M. S. (2004) The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Nutr* **134**, 2499-2503.
- Jung U. J., Lee M. K., Park Y. B., Kang M. A. & Choi M. S. (2006) Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1134-1145.

K

- Kahle K., Kraus M. & Richling E. (2005) Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res* **49**, 797-806.
- Kanno S., Tomizawa A., Hiura T., Osanai Y., Shouji A., Ujibe M., Ohtake T., Kimura K. & Ishikawa M. (2005) Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol & Pharm Bull* **28**, 527-530.

- Kawaii S., Tomono Y., Ogawa K., Sugiura M., Yano M. & Yoshizawa Y. (2004) Anticancer activity and flavonoid content of various Citrus juices. *Nutraceutical Beverages: Chemistry, Nutrition, and Health Effects* **871**, 76-89.
- Khachik F., Spangler C. J., Smith J. C., Jr., Canfield L. M., Steck A. & Pfander H. (1997) Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem* **69**, 1873-1881.
- Kim H. K., Jeong T. S., Lee M. K., Park Y. B. & Choi M. S. (2003) Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim Acta* **327**, 129-137.
- Kim J. Y., Jung K. J., Choi J. S. & Chung H. Y. (2006) Modulation of the age-related nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway by hesperetin. *Aging Cell* **5**, 401-411.
- Kim M., Kometani T., Okada S. & Shimuzu M. (1999) Permeation of hesperidin glycosides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Biosci Biotech and Biochem* **63**, 2183-2188.
- Kirca A., Ozkan M. & Cemeroglu B. (2003) Thermal stability of black carrot anthocyanins in blond orange juice. *J Food Qual* **26**, 361-366.
- Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliovaara M., Reunanen A., Hakulinen T. & Aromaa A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* **76**, 560-568.
- Kohno H., Taima M., Sumida T., Azuma Y., Ogawa H. & Tanaka T. (2001) Inhibitory effect of mandarin juice rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino) 1-(3 pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. *Cancer lett.* **174**, 141-150.
- Kostic D., White W. S. & Olson J. A. (1995) Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr* **62**, 604-610.
- Krieger M. (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Ann Rev Biochem* **68**, 523-558.
- Krinsky N. I. & Yeum K. J. (2003) Carotenoid-radical interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 754-760.
- Kurowska E. M., Spence J. D., Jordan J., Wetmore S., Freeman D. J., Piche L. A. & Serratore P. (2000) HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* **72**, 1095-1100.

L

- Le Marchand L., Murphy S. P., Hankin J. H., Wilkens L. R. & Kolonel L. N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 154-160.
- 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. *J Nutr* **129**, 2271-2277.
- Lee H. S. (2000) Objective measurement of red grapefruit juice color. *J Agric Food Chem* **48**, 1507-1511.
- Lee H. S. & Coates G. A. (1999) Thermal pasteurization effects on color of red grapefruit juices. *J Food Sci* **64**, 663-666.
- Lemke S. L., Dueker S. R., Follett J. R., Lin Y., Carkeet C., Buchholz B. A., Vogel J. S. & Clifford A. J. (2003) Absorption and retinol equivalence of beta-carotene in humans is influenced by dietary vitamin A intake. *J Lipid Res* **44**, 1591-1600.
- Lessin W. J., Catigani G. L. & Schwartz S. J. (1997) Quantification of *cis-trans* isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. *J Agric Food Chem* **45**, 3728-3732.

- Lidebjer C., Leanderson P., Ernerudh J. & Jonasson L. (2006) Low plasma levels of oxygenated carotenoids in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.
- Lin S. D. & Chen A. O. (1995) Major carotenoids in juices of ponkan mandarin and Liucheng orange. *J Food Biochem* **18**, 273-283.
- Lin Y., Dueker S. R., Burri B. J., Neidlinger T. R. & Clifford A. J. (2000) Variability of the conversion of beta-carotene to vitamin A in women measured by using a double-tracer study design. *Am J Clin Nutr* **71**, 1545-1554.
- Lindstrom M. B., Sternby B. & Borgstrom B. (1988) Concerted action of human carboxyl ester lipase and pancreatic lipase during lipid digestion in vitro: importance of the physicochemical state of the substrate. *Biochim Biophys Acta* **959**, 178-184.
- Liu C. S., Glahn R. P. & Liu R. H. (2004) Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion.
- Lohezic-Le Devehat F., Marigny K., Doucet M. & Javaudin L. (2002) [Grapefruit juice and drugs: a hazardous combination?]. *Therapie* **57**, 432-445.
- Lotito S. B. & Frei B. (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* **41**, 1727-1746.
- Lowe G., Woodward M., Rumley A., Morrison C., Tunstall-Pedoe H. & Stephen K. (2003) Total tooth loss and prevalent cardiovascular disease in men and women: possible roles of citrus fruit consumption, vitamin C, and inflammatory and thrombotic variables. *J Clin Epidemiol* **56**, 694-700.
- Luchoomum J. & Hussain M. M. (1999) Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and performed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly. *J Biol Chem* **274**, 19565-19572.
- Lynch S. R. & Stoltzfus R. J. (2003) Iron and ascorbic acid: Proposed fortification levels and recommended iron compounds. *J Nutr* **133**, 2978s-2984s.

M

- Maggio D., Polidori M. C., Barabani M., Tufi A., Ruggiero C., Cecchetti R., Aisa M. C., Stahl W. & Cherubini A. (2006) Low levels of carotenoids and retinol in involutional osteoporosis. *Bone* **38**, 244-248.
- Manach C., Morand C., Gil-Izquierdo A., Bouteloup-Demange C. & Remesy C. (2003) Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr* **57**, 235-242.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. & Jimenez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-747.
- Manach C., Scalbert A., Remesy C. & Morand C. (2006) Consommation et biodisponibilité des polyphénols. In *Les polyphénols en agroalimentaire*, pp. 361-379 [P Sarni-Manchado and V Cheynier, editors]. Paris: TEC & DOC.
- Mannisto S., Smith-Warner S. A., Spiegelman D., Albanes D., Anderson K., Van Den Brandt P. A., Cerhan J. R., Colditz G., Feskanich D., Freudenheim J. L., Giovannucci E., Goldbohm R. A., Graham S., Miller A. B., Rohan T. E., Virtamo J., Willett W. C. & Hunter D. J. (2004) Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 40-48.
- Mehrlander K., Will F., Dietrich H., Sembries S. & Dongowski G. (2004) Analytical characterisation of grape juices and polyphenol extracts produced with a two-step enzymatic process. *Deutsche Lebens -Rundschau* **100**, 77-83.

- Melendez-Martinez A. J., Vicario I. M. & Heredia F. J. (2007) Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chem* **101**, 177-184.
- Miller N. J. & Rice-Evans C. A. (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res* **26**, 195-199.
- Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M. & Rice-Evans C. A. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* **384**, 240-242.
- Mira L., Fernandez M. T., Santos M., Rocha R., Florencio M. H. & Jennings K. R. (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research* **36**, 1199-1208.
- Mitsunaga Y., Takanaga H., Matsuo H., Naito M., Tsuruo T., Ohtani H. & Sawada Y. (2000) Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier. *Eur J Pharmacol* **395**, 193-201.
- Miyagi Y., Om A. S., Chee K. M. & Bennink M. R. (2000) Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutr Cancer* **36**, 224-229.
- Moon Y. J., Wang X. & Morris M. E. (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* **20**, 187-210.
- Mouly P. P., Gaydou E. M., Lapierre L. & Corsetti J. (1999) Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J Agric Food Chem* **47**, 4038-4045.

N

- Nagao A., Maeda M., Lim B. P., Kobayashi H. & Terao J. (2000) Inhibition of beta-carotene-15,15'-dioxygenase activity by dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* **11**, 348-355.
- Narisawa T., Fukaura Y., Oshima S., Inakuma T., Yano M. & Nishino H. (1999) Chemoprevention by the oxygenated carotenoid beta-cryptoxanthin of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jap J Cancer Res* **90**, 1061-1065.
- Nayak N., Harrison E. H. & Hussain M. M. (2001) Retinyl ester secretion by intestinal cells: a specific and regulated process dependent on assembly and secretion of chylomicrons. *J Lipid Res* **42**, 272-280.
- Nève J. (2002) Optimisation of dietary intakes of antioxidants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **16**, 292-300.
- Newby P. K., Peterson K. E., Berkey C. S., Leppert J., Willett W. C. & Colditz G. A. (2004) Beverage consumption is not associated with changes in weight and body mass index among low-income preschool children in North Dakota. *J Am Diet Asso* **104**, 1086-1094.
- Nicol M. & Maudet M. (2000) Caroténoïdes et vitamine A, Actualités. *OC L* **7**, 266-270.
- Nicolosi E., Deng Z. N., Gentile A., La Malfa S., Continella G. & Tribulato E. (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theo Appl Genetics* **100**, 1155-1166.

O

- O'connor T. M., Yang S. J. & Nicklas T. A. (2006) Beverage intake among preschool children and its effect on weight status. *Pediatrics* **118**, E1010-E1018.
- O'Neill M. E., Carroll Y., Corridan B., Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Van Den Berg H., Hininger I., Rousell A. M., Chopra M., Southon S. & Thurnham D. I. (2001) A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br J Nutr* **85**, 499-507.

- Ohtsuki K., Abe A., Mitsuzuwi H., Kondo M., Uemura K., Iwasaki Y. & Kondo Y. (2002) Effects of long-term administration of hesperidin and glucosyl hesperidin to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitam (Tokyo)* **48**, 420-422.
- Omenn G. S., Goodman G. E., Thornquist M. D., Balmes J., Cullen M. R., Glass A., Keogh J. P., Meyskens F. L., Valanis B., Williams J. H., Barnhart S. & Hammar S. (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **334**, 1150-1155.

P

- Padula M. & Rodriguez-Amaya D. B. (1987) Change in individual carotenoids and vitamin C on processing and storage of goyava juice. *Acta Alimentaria* **16**, 209-216.
- Park S. H., Park E. K. & Kim D. H. (2005) Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory activity of flavanones from Citrus unshiu and Poncirus trifoliata. *Planta Med* **71**, 24-27.
- Parker R. S. (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Faseb J* **10**, 542-551.
- Parker R. S., Swanson J. E., You C. S., Edwards A. J. & Huang T. (1999) Bioavailability of carotenoids in human subjects. *Proc Nutr Soc* **58**, 155-162.
- Peretti N., Delvin E., Sinnott D., Marcil V., Garofalo C. & Levy E. (2007) Asymmetrical regulation of scavenger receptor class B type I by apical and basolateral stimuli using Caco-2 cells. *J Cell Biochem* **100**, 421-433.
- Perez A. G., Luaces P., Oliva J., Rios J. J. & Sanz C. (2005) Changes in vitamin C and flavour components of mandarin juice due to curing of fruits. *Food Chem* **91**, 19-24.
- Philip T., Chen T.-S. & Nelson D. B. (1988) Liquid chromatography profiles of major carotenoid esters in commercially processed california navel and orange juice concentrates. *J. Chromatogr. A*, **442**, 249-265.
- Philippeau G. (1979) *Bureau d'études statistiques de l'ITCF (Institut Technique des Céréales et des Fourrages)*. Paris: ITCF-3ième édition.
- Pincemail J. (1999) Evaluation du stress oxydant: une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, coeur, poumon* **4**, 148-154.
- Pinto M., Robine-Leon S., Appay M. D., Kedingner M., Triadou N. & Dussaulx E. (1983) Entrocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biol Cell* **47**, 323-330.

R

- Rapisarda P., Tomaino A., Lo Cascio R., Bonina F., De Pasquale A. & Saija A. (1999) Antioxydant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J Agric Food Chem* **47**, 4718-4723.
- Reboul E., Borel P., Mikail C., Abou L., Charbonnier M., Caris-Veyrat C., Goupy P., Portugal H., Lairon D. & Amiot M. J. (2005a) Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and beta-carotene bioavailability in men. *J Nutr* **135**, 790-794.
- Reboul E., Abou L., Mikail C., Ghiringhelli O., Andre M., Portugal H., Jourdheuil-Rahmani D., Amiot M. J., Lairon D. & Borel P. (2005b) Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J* **387**, 455-461.
- Reboul E., Richelle M., Perrot E., Desmoulins-Malezet C., Pirisi V. & Borel P. (2006) Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* **54**, 8749-8755.

- Reboul E., Thap S., Tourniaire F., Andre M., Juhel C., Morange S., Amiot M. J., Lairon D. & Borel P. (2007) Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *Br J Nutr* **97**, 440-446.
- Ribaya-Mercado J. D. (2002) Influence of dietary fat on beta-carotene absorption and bioconversion into vitamin A. *Nutr Rev* **60**, 104-110.
- Riedl J., Linseisen J., Hoffmann J. & Wolfram G. (1999) Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J Nutr* **129**, 2170-2176.
- Riso P., Visioli F., Gardana C., Grande S., Brusamolino A., Galvano F., Galvano G. & Porrini M. (2005) Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J Agric Food Chem* **53**, 941-947.
- Rock C. L. (1997) Carotenoids: biology and treatment. *Pharmacol Ther* **75**, 185-197.
- Rojas A. N. & Gerschenson L. N. (1997) Influence of system composition on ascorbic acid destruction at processing temperatures. *J Sci Food Agric* **74**, 369-378.
- Romanchik J. E., Morel D. W. & Harrison E. H. (1995) Distributions of carotenoids and alpha-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. *J Nutr* **125**, 2610-2617.
- Roodenburg A. J., Leenen R., Van Het Hof K. H., Weststrate J. A. & Tijburg L. B. (2000) Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr* **71**, 1187-1193.
- Rossi M., Garavello W., Talamini R., La Vecchia C., Franceschi S., Lagioui P., Zamboni P., Dal Maso L., Bosetti C. & Negri E. (2007) Flavonoids and risk of squamous cell esophageal cancer. *Int J Cancer* **120**, 1560-1564.
- Rousset M., Laburthe M., Pinto M., Chevalier G., Rouyer-Fessard C., Dussaulx E., Trugnan G., Boige N., Brun J. L. & Zweibaum A. (1985) Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. *J Cell Physiol* **123**, 377-385.

S

- Sanchez-Moreno C., Cano M. P., De Ancos B., Plaza L., Olmedilla B., Granada F., Elez-Martinez P., Martin-Belloso O. & Martin A. (2004) Pulsed electric fields-processed orange juice consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-isoprostanes in healthy humans. *J Nutr Biochem* **15**, 601-607.
- Sanchez-Moreno C., Plaza L., De Ancos B. & Cano M. P. (2003) Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J Sci Food Agric* **83**, 430-439.
- Sanchez-Moreno C., Plaza L., Elez-Martinez P., De Ancos B., Martin-Belloso O. & Cano M. P. (2005) Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *J Agric Food Chem* **53**, 4403-4409.
- Scalbert A., Johnson I. T. & Saltmarsh M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**, 215S-217S.
- Sestili P., Diamantini G., Bedini A., Cerioni L., Tommasini I., Tarzia G. & Cantoni O. (2002) Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem J* **364**, 121-128.
- Shah M., Griffin I. J., Lifschitz C. H. & Abrams S. A. (2003) Effect of orange and apple juices on iron absorption in children. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* **157**, 1232-1236.
- Shi J. & Le Maguer M. (2000) Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* **40**, 1-42.

- Skinner J. D. & Carruth B. R. (2001) A longitudinal study of children's juice intake and growth: the juice controversy revisited. *J Am Diet Assoc* **101**, 432-437.
- So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., Moussa M. & Carroll K. K. (1996) Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer* **26**, 167-181.
- Solomon O., Svanberg U. & Sahlström A. (1995) Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 18°C. *Food Chem* **53**, 363-368.
- Souci S. W., Frachmann W. & Kraut H. (2000) Food composition and nutrition tables. Stuttgart : CRC Press, Medpharm, Scientific Publishers, 6th revised edition.
- Stahl W., Nicolai S., Briviba K., Hanusch M., Broszeit G., Peters M., Martin H. D. & Sies H. (1997) Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* **18**, 89-92.
- Stahl W., Schwarz W., Sundquist A. R. & Sies H. (1992) cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys* **294**, 173-177.
- Stahl W., Schwarz W., Von Laar J. & Sies H. (1995) All-trans beta-carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cis geometrical isomer. *J Nutr* **125**, 2128-2133.
- Staudte H., Sigusch B. W. & Glockmann E. (2005) Grapefruit consumption improves vitamin C status in periodontitis patients. *Br Dent J* **199**, 213-217, discussion 210.
- Sugawara T., Kushiro M., Zhang H., Nara E., Ono H. & Nagao A. (2001) Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* **131**, 2921-2927.
- Sugiura M., Matsumoto H., Kato M., Ikoma Y., Yano M. & Nagao A. (2004) Seasonal changes in the relationship between serum concentration of beta-cryptoxanthin and serum lipid levels. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **50**, 410-415.

T

- Takanaga H., Ohnishi A., Matsuo H. & Sawada Y. (1998) Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. *Biol & Pharm Bull* **21**, 1062-1066.
- Tanaka T., Kohno H., Murakami M., Shimada R., Kagami S., Sumida T., Azuma Y. & Ogawa H. (2000) Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin. *Int J Cancer* **88**, 146-150.
- Tanaka T., Makita H., Kawabata K., Mori H., Kakumoto M., Satoh K., Hara A., Sumida T., Tanaka T. & Ogawa H. (1997) Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis* **18**, 957-965.
- Taungbodhitham A. K., Jones G. P., Walhlqvist M. L. & Briggs D. R. (1998) Evaluation of method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chem.* **63**, 577-584.
- Taylor C. A., Hampl J. S. & Johnston C. S. (2000) Low intakes of vegetables and fruits, especially citrus fruits, lead to inadequate vitamin C intakes among adults. *Eur J Clin Nutr* **54**, 573-578.
- Ting S. V. (1980) Nutrients and Nutrition of Citrus fruits. In *Citrus Nutrition and Quality*, pp. 10 [S Naguy and JA Attaway, editors]. Houston, Texas: ACS Symposium series.
- Tomas-Barberan F. A. & Clifford M. N. (2000) Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* **80**, 1073-1080.

- Tonucci L. H., Holden J. M., Beecher G. R., Khachick F., Davis C. & Mulokosi G. (1995) Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. *J Agric Food chem* **43**, 579-586.
- Tourniaire F., Hassan M., Andre M., Ghiringhelli O., Alquier C. & Amiot M. J. (2005) Molecular mechanisms of the naringin low uptake by intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr & Food Res* **49**, 957-962.
- Tyssandier V., Borel P., Choubert G., Grolier P., Alexandre-Gouabau M. C. & Azais-Braesco V. (1998) The bioavailability of carotenoids is positively related to their polarity-La biodisponibilité des caroténoïdes est en relation directe avec leur polarité. *Sci Aliment (France)* **18**, 324.
- Tyssandier V., Cardinault N., Caris Veyrat C., Amiot M. J., Grolier P., Bouteloup C., Azais Braesco V. & Borel P. (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. *Am J Clin Nutr* **75**, 526-534.
- Tyssandier V., Lyan B. & Borel P. (2001) Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochim biophys acta* **1533**, 285-292.
- Tyssandier V., Reboul E., Dumas J. F., Bouteloup-Demange C., Armand M., Marcand J., Sallas M. & Borel P. (2003) Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G913-923.

U

- Uchiyama S., Sumida T. & Yamaguchi M. (2004) Oral administration of beta-cryptoxanthin induces anabolic effects on bone components in the femoral tissues of rats in vivo. *Biol & Pharm Bull* **27**, 232-235.
- Uchiyama S. & Yamaguchi M. (2005) Beta-cryptoxanthin stimulates cell differentiation and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone and Mineral Res* **20**, S363-S363.

V

- Van Bennekum A., Werder M., Thuahnai S. T., Han C. H., Duong P., Williams D. L., Wettstein P., Schulthess G., Phillips M. C. & Hauser H. (2005) Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochem* **44**, 4517-4525.
- Van Den Broeck I., Ludikhuyze L., Weemaes C., Van Loey A. & Hendrickx M. (1998) Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *J Agric Food Chem* **46**, 2001-2006.
- Van Het Hof K. H., Brouwer I. A., West C. E., Haddeman E., Steegers-Theunissen R. P., Van Dusseldorp M., Weststrate J. A., Eskes T. K. & Hautvast J. G. (1999) Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of beta-carotene. *Am J Clin Nutr* **70**, 261-268.
- Van Het Hof K. H., West C. E., Weststrate J. A. & Hautvast J. G. (2000) Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* **130**, 503-506.
- Van Vliet T., Van Vliissingen M. F., Van Schaik F. & Van Den Berg H. (1996) beta-Carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J Nutr* **126**, 499-508.
- Vanamala J., Leonardi T., Patil B. S., Taddeo S. S., Murphy M. E., Pike L. M., Chapkin R. S., Lupton J. R. & Turner N. D. (2006) Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis* **27**, 1257-1265.

- Vikram V. B., Ramesh M. N. & Prapulla S. G. (2005) Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *J. Food Ing.*, **69**, 31-40.
- Vinson J. A. & Jang J. (2001) In Vitro and In Vivo Lipoprotein Antioxidant Effect of a Citrus Extract and Ascorbic Acid on Normal and Hypercholesterolemic Human Subjects. *J Med Food* **4**, 187-192.

W

- Wang X. D. (1994) Review: absorption and metabolism of beta-carotene. *J Am Coll Nutr* **13**, 314-325.
- Werder M., Han C. H., Wehrli E., Bimmler D., Schulthess G. & Hauser H. (2001) Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochem* **40**, 11643-11650.
- West C. E. & Castenmiller J. J. J. M. (1998) Quantification of the "SLAMENGI" factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Int J Vitam Nutr Res* **68**, 371-377.
- Wingerath T., Sies H. & Stahl W. (1998) xanthophyll esters in human skin. *Arch Biochem Biophys* **355**, 271-274.
- Wingerath T., Stahl W. & Sies H. (1995) Beta-cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in beta-cryptoxanthin esters. *Arch Biochem Biophys* **324**, 385-390.
- Wolters M. & Hahn A. (2004) LDL susceptibility to copper-induced oxidation after administration of a single dose of free or esterified beta-cryptoxanthin. *Ann Nutr Metab* **48**, 163-168.

Y

- Yamaguchi M. (2006) Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. *Yakugaku Zasshi* **126**, 1117-1137.
- Yamaguchi M. & Uchiyama S. (2004) beta-Cryptoxanthin stimulates bone formation and inhibits bone resorption in tissue culture in vitro. *Mol Cell Biochem* **258**, 137-144.
- Yang M., Tanaka T., Hirose Y., Deguchi T., Mori H. & Kawada Y. (1997) Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer* **73**, 719-724.
- Yeum C. H. & Choi J. S. (2006) Effect of naringin pretreatment on bioavailability of verapamil in rabbits. *Arch Pharm Res* **29**, 102-107.
- You C. S., Parker R. S., Goodman K. J., Swanson J. E. & Corso T. N. (1996) Evidence of cis-trans isomerization of 9-cis-beta-carotene during absorption in humans. *Am J Clin Nutr* **64**, 177-183.
- Young L.B. & Erickson L.C. (1961) Influences of temperatures on color change in Valencia oranges. *Proc Am Soc Hortic Sci* **78**, 197-200.
- Yuan, J.M., Stram, D.O., Arakawa, K., Lee, H.P & Yu, M.C. (2003) Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese health study. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention* **12**, 890-898.

Z

- Zager R. A., Johnson A. C. M., Hanson S. Y. & Shah V. O. (2003) Acute tubular injury causes dysregulation of cellular cholesterol transport proteins. *Am J Pathology* **163**, 313-320.

ANNEXES

ANNEXE 1

J.O n° 203 du 3 septembre 2003 page 15047 texte n° 11

Décret n° 2003-838 du 1er septembre 2003 pris pour l'application de l'article L. 214-1 du code de la consommation en ce qui concerne les jus de fruits et certains produits similaires destinés à l'alimentation humaine

NOR: ECOC0300070D

Le Premier ministre,

Sur le rapport du ministre de l'économie, des finances et de l'industrie,

Vu la directive 2001/112/CE du Conseil du 20 décembre 2001 relative aux jus de fruits et à certains produits similaires destinés à l'alimentation humaine ;

Vu le code de la consommation, notamment ses articles L. 214-1, L. 214-2 et R. 112-1 à R. 112-33 ;

Vu le décret n° 89-674 du 18 septembre 1989 relatif aux additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine ;

Vu l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments en date du 28 février 2003 ;

Le Conseil d'Etat (section des finances) entendu,

Décète :

Article 1

Il est interdit de détenir en vue de la vente ou de la distribution à titre gratuit, de mettre en vente, de vendre ou de distribuer à titre gratuit les jus de fruits ou certains produits similaires destinés à l'alimentation humaine mentionnés à l'annexe I qui ne répondent pas aux définitions et règles fixées dans le présent décret et ses annexes.

Article 2

Ne peuvent être utilisés, pour la fabrication des produits définis à la partie I de l'annexe I, que les traitements et les substances visés à la partie II de cette annexe et les matières premières conformes à l'annexe II. Les nectars de fruits doivent répondre aux dispositions de l'annexe IV.

Toutefois, peuvent être ajoutés aux produits définis à la partie I de l'annexe I, d'une part, des additifs dans les conditions prévues par le décret du 18 septembre 1989 susvisé et, d'autre part, sur arrêté conjoint des ministres respectivement chargés de la consommation, de l'agriculture et de la santé, après avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, des vitamines et minéraux.

Article 3

Les dénominations énumérées à la partie I de l'annexe I sont réservées aux produits qui y sont définis et ne peuvent être utilisées dans le commerce que pour désigner ces produits.

Certains produits définis à la partie I de l'annexe I peuvent comporter, outre la dénomination obligatoire, les dénominations particulières mentionnées à l'annexe III.

Article 4

Le chapitre II du titre Ier du livre Ier de la partie réglementaire du code de la consommation concernant l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires est applicable aux produits qui font l'objet du présent décret dans toutes ses dispositions qui ne sont pas contraires à celui-ci.

L'étiquetage et la présentation de ces produits font l'objet des dispositions complémentaires suivantes :

- a) Lorsque le produit provient d'une seule espèce de fruit, l'indication de celle-ci se substitue au mot : « fruit » ;
- b) Pour les produits fabriqués à partir de deux fruits ou plus, sauf en cas d'emploi de jus de citron dans les conditions fixées au point 1 de la partie II de l'annexe I, la dénomination est complétée par l'énumération des fruits utilisés, dans l'ordre décroissant du volume des jus ou purées de fruits mis en oeuvre. Toutefois, pour les produits fabriqués à partir de trois fruits ou plus, l'indication des fruits utilisés peut être remplacée par la mention : « plusieurs fruits », par une mention similaire ou par celle du nombre de fruits utilisés ;
- c) Pour les jus de fruits auxquels des sucres ont été ajoutés à des fins d'édulcoration, la dénomination de vente doit comporter la mention : « sucré » ou « avec addition de sucres », suivie de l'indication de la quantité

maximale de sucres ajoutée, calculée en matière sèche et exprimée en grammes par litre ;

d) La reconstitution dans leur état d'origine et au moyen des substances strictement nécessaires à cette opération des produits définis à la partie I de l'annexe I n'entraîne pas l'obligation de mentionner sur l'étiquetage la liste des ingrédients utilisés à cette fin. L'addition au jus de fruits de pulpes ou de cellules, telles que définies à l'annexe II, est indiquée sur l'étiquetage ;

e) Pour les mélanges de jus de fruits et de jus de fruits obtenus à partir d'un concentré ainsi que pour le nectar de fruits obtenu entièrement ou partiellement à partir d'un ou de plusieurs concentrés, l'étiquetage comporte la mention : « à base de concentré(s) » ou « partiellement à base de concentré(s) », selon le cas. Cette mention doit figurer, en caractères clairement visibles, à proximité immédiate de la dénomination ;

f) Pour le nectar de fruits, l'étiquetage doit comporter l'indication de la teneur minimale en jus de fruits, en purée de fruits ou en mélange de ces ingrédients par la mention : « teneur en fruits : ... % minimum ». Cette mention doit figurer dans le même champ visuel que la dénomination ;

g) L'étiquetage du jus de fruits concentré visé au point 2 de la partie I de l'annexe I qui n'est pas destiné à être livré au consommateur final doit porter une mention indiquant la présence et la quantité de sucres ajoutés, de jus de citrons ajouté ou d'acidifiants ajoutés. Cette mention figure sur l'emballage, sur une étiquette attachée à l'emballage ou sur un document d'accompagnement.

Article 5

Les dispositions du présent décret entrent en vigueur le 12 juillet 2003 et le décret n° 78-1109 du 23 novembre 1978 est abrogé à compter de la même date.

Pourront toutefois être commercialisés jusqu'à épuisement des stocks les produits satisfaisant aux prescriptions de ce dernier décret et étiquetés avant le 12 juillet 2004.

Article 6

Le garde des sceaux, ministre de la justice, le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie, le ministre de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales et le secrétaire d'Etat aux petites et moyennes entreprises, au commerce, à l'artisanat, aux professions libérales et à la consommation sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent décret, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 1er septembre 2003.

A N N E X E I

DÉNOMINATIONS, DÉFINITIONS ET CARACTÉRISTIQUES DES PRODUITS

I. - Définitions

1. a) Jus de fruits :

Le produit fermentescible mais non fermenté, obtenu à partir de fruits sains et mûrs, frais ou conservés par le froid, d'une espèce ou de plusieurs espèces en mélange, possédant la couleur, l'arôme et le goût caractéristiques du jus des fruits dont il provient. Les arômes des fruits, les pulpes et les cellules provenant du jus et séparés pendant la transformation peuvent être restitués.

Dans le cas des agrumes, le jus de fruits doit provenir de l'endocarpe. Toutefois, le jus de limettes peut être obtenu à partir du fruit entier, conformément aux bonnes pratiques de fabrication qui doivent permettre de réduire au maximum la présence dans le jus de constituants des parties extérieures du fruit.

b) Jus de fruits obtenus à partir d'un concentré :

Le produit obtenu en remettant dans le jus de fruits concentré l'eau extraite du jus lors de la concentration, ainsi qu'en restituant les arômes et, le cas échéant, les pulpes et les cellules que le jus a perdus mais qui ont été récupérés lors du processus de production du jus de fruits dont il s'agit ou de jus de fruits de la même espèce. L'eau ajoutée doit présenter des caractéristiques appropriées, notamment du point de vue chimique, microbiologique et organoleptique, de façon à garantir les qualités essentielles du jus.

Le produit ainsi obtenu doit présenter des caractéristiques organoleptiques et analytiques au moins équivalentes à celles d'un type moyen de jus obtenu à partir de fruits de la même espèce au sens du point a.

2. Jus de fruits concentré :

Le produit obtenu à partir de jus de fruits d'une ou plusieurs espèces par l'élimination physique d'une partie déterminée de l'eau de constitution. Lorsque le produit est destiné à la consommation directe, cette élimination est d'au moins 50 %.

3. Jus de fruits déshydraté/en poudre :

Le produit obtenu à partir de jus de fruits d'une ou plusieurs espèces par l'élimination physique de la quasi-totalité de l'eau de constitution.

4. Nectar de fruits :

a) Le produit fermentescible mais non fermenté, obtenu en ajoutant de l'eau et des sucres et/ou du miel aux produits définis aux points 1, 2 et 3, à de la purée de fruits ou à un mélange de ces produits, et qui est en outre conforme à l'annexe IV.

L'addition de sucres et/ou de miel est autorisée dans une quantité non supérieure à 20 % en poids par rapport au poids total du produit fini.

Dans le cas de la fabrication de nectars de fruits sans addition de sucres ou à faible valeur énergétique, les sucres peuvent être remplacés totalement ou partiellement par des édulcorants, conformément au décret du 18 septembre 1989 susvisé ;

b) Par dérogation au point a ci-dessus, les fruits figurant à l'annexe IV, parties II et III, ainsi que l'abricot, peuvent servir, individuellement ou en mélange, à la fabrication de nectars sans addition de sucres, de miel et/ou d'édulcorants.

II. - Ingrédients, traitements et substances autorisés

1. Ingrédients autorisés :

Conformément à l'article 2 du décret, l'addition de vitamines et de minéraux peut être autorisée dans les produits définis à la partie I de la présente annexe.

Les arômes, les pulpes et les cellules définis à la partie I, point 1, paragraphe a, qui ont été restitués au jus de fruit doivent avoir été séparés de ce jus pendant la transformation, tandis que les arômes, les pulpes et les cellules définis à la partie I, point 1, paragraphe b, qui ont été restitués au jus de fruit peuvent également provenir d'un jus de fruit de la même espèce.

Uniquement dans le cas du jus de raisin, les sels d'acides tartriques peuvent être restitués.

Pour les produits définis dans la partie I, points 1, 2 et 3, autres que les jus de poires ou de raisins, l'addition de sucres est autorisée :

- pour corriger le goût acide, la quantité de sucres ajoutée, exprimée en matière sèche, ne peut dépasser 15 grammes par litre de jus ;
- à des fins d'édulcoration, la quantité de sucres ajoutée, exprimée en matière sèche, ne peut dépasser 150 grammes par litre de jus.

La quantité totale de sucres ajoutée pour corriger le goût acide et à des fins d'édulcoration ne doit pas dépasser 150 grammes par litre.

Pour les produits définis dans la partie I, points 1, 2, 3 et 4, dans le but de corriger le goût acide, l'addition de jus de citrons et/ou de jus concentré de citrons, jusqu'à 3 grammes par litre de jus, exprimé en acide citrique anhydre, est autorisée.

Le dioxyde de carbone, en tant qu'ingrédient, est autorisé.

L'addition, au même jus de fruits, de sucres et de jus de citrons, concentré ou non, ou d'acidifiants, est interdite.

2. Traitements et substances autorisés :

- procédés mécaniques d'extraction ;
- procédés physiques usuels et procédés d'extraction à l'eau (procédé in line, diffusion) de la partie comestible des fruits autres que le raisin pour la fabrication des jus de fruits concentrés, à condition que les jus de fruits concentrés ainsi obtenus soient conformes à la partie I, point 1 ;
- pour les jus de raisins issus de raisins traités par sulfitage à l'aide d'anhydride sulfureux, le désulfitage par des procédés physiques est autorisé à condition que la quantité totale de SO₂ présent dans le produit fini n'excède

pas 10 mg/l ;

- enzymes pectolytiques ;
- enzymes protéolytiques ;
- enzymes amylolytiques ;
- gélatine alimentaire ;
- tanins ;
- bentonite ;
- gel de silice ;
- charbons ;
- adjuvants de filtration et adjuvants de précipitation chimiquement inertes (par exemple perlites, diatomite lavée, cellulose, polyamide insoluble, polyvinylpyrrolidone, polystyrène), conformes aux textes réglementaires concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires ;
- adjuvants d'adsorption chimiquement inertes conformes aux textes réglementaires concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et utilisés pour réduire les teneurs en naringine et en limonoïdes des jus d'agrumes sans modifier sensiblement les teneurs en glucosides limonoïdes, en acides, en sucres (y compris les oligosaccharides) ou en minéraux.

A N N E X E I I

DÉFINITIONS DES MATIÈRES PREMIÈRES

1. Fruit :

Tous les fruits. Pour l'application du présent décret, la tomate n'est pas considérée comme un fruit.

2. Purée de fruits :

Le produit fermentescible mais non fermenté obtenu par tamisage de la partie comestible de fruits entiers ou épluchés sans élimination de jus.

3. Purée de fruits concentrée :

Le produit obtenu à partir de purée de fruits par élimination physique d'une partie déterminée de l'eau de constitution.

4. Sucres pour la production de :

a) Nectars de fruits :

- les sucres tels que définis par le décret n° 2003-586 du 30 juin 2003 ;
- le sirop de fructose ;
- les sucres dérivés de fruits ;

b) Jus de fruits obtenus à partir d'un concentré :

- les sucres tels que définis par le décret n° 2003-586 du 30 juin 2003 ;
- le sirop de fructose ;

c) Jus de fruits :

- les sucres visés au point b contenant moins de 2 % d'eau.

5. Miel :

Le produit défini par le décret n° 2003-587 du 30 juin 2003.

6. Pulpes ou cellules :

Les produits obtenus à partir des parties comestibles du fruit de la même espèce sans élimination de jus. En outre, pour les agrumes, les pulpes ou les cellules sont les vésicules renfermant le jus tirées de l'endocarpe.

A N N E X E I I I

DÉNOMINATIONS PARTICULIÈRES POUR CERTAINS PRODUITS

MENTIONNÉS À L'ANNEXE I

a) « Vruchtendrank » : pour les nectars de fruits.

b) Süßmost :

La dénomination « Süßmost » ne peut être utilisée qu'en liaison avec les dénominations « Fruchtsaft » ou « Fruchtnektar » :

- pour les nectars de fruits obtenus exclusivement à partir de jus de fruits, de jus de fruits concentrés ou d'un mélange de ces deux produits, non consommables en l'état du fait de leur acidité naturelle élevée ;

- pour les jus de fruits obtenus à partir de poires, avec addition de pommes, le cas échéant, mais sans addition de sucres.

c) « Succo e polpa » ou « sumo e polpa » : pour les nectars de fruits obtenus exclusivement à partir de purée de fruits et/ou de purée de fruits concentrée.

d) « Æblemost » : pour le jus de pommes non additionné de sucres.

e) « Sur ... saft », complétée par l'indication, en langue danoise, du fruit utilisé : pour les jus non additionnés de sucres, obtenus à partir de cassis, cerises, groseilles rouges, groseilles blanches, framboises, fraises ou baies de sureau.

« Sød ... saft » ou « sødet ... saft », complétée par l'indication, en langue danoise, du fruit utilisé : pour les jus obtenus à partir de ce fruit, additionnés de plus de 200 grammes de sucres par litre.

f) « Äpplemust » : pour le jus de pommes non additionné de sucres.

g) « Mosto » : synonyme de jus de raisin.

ANNEXE IV

DISPOSITIONS PARTICULIÈRES AUX NECTARS DE FRUITS

| NECTARS DE FRUITS Obtenus à partir de | TENEUR MINIMALE En jus ou purée (en % du volume du produit fini) |
|---|---|
| <i>I Fruits à jus acide non consommable en l'état</i> | |
| Fruits de la passion | 25 |
| Morelles de Quito | 25 |
| Cassis | 25 |
| Groseilles blanches | 25 |
| Groseilles rouges | 25 |
| Groseilles à maquereau | 30 |
| Fruits de l'argousier | 25 |
| Prunelles | 30 |
| Prunes | 30 |
| Quetsches | 30 |
| Sorbes | 30 |
| Cynorhodons | 40 |
| Cerises aigres | 35 |
| Autres cerises | 40 |
| Myrtilles | 40 |
| Baies du sureau | 50 |
| Framboises | 40 |
| Abricots | 40 |
| Fraises | 40 |
| Mûres | 40 |
| Airelles rouges | 30 |
| Coings | 50 |
| Citrons et limettes | 25 |
| Autres fruits appartenant à cette catégorie | 25 |

| NECTAR DE FRUITS Obtenus à partir de | TENEUR MINIMALE En jus et /ou purée (en % dans le produit fini) |
|--|---|
| <i>II Fruits pauvres en acide ou avec beaucoup de pulpe non consommables en l'état</i> | |
| Mangues | 25 |
| Bananes | 25 |
| Goyaves | 25 |
| Papayes | 25 |
| Litchis | 25 |
| Azeroles | 25 |
| Corossol | 25 |
| Cœur de bœuf ou cachiman | 25 |
| Chemiroles | 25 |
| Grenades | 25 |
| Anacarde ou noix de cajou | 25 |
| Caja | 25 |
| Imbu | 25 |
| Autres fruits appartenant à cette catégorie | 25 |
| <i>III Fruits à jus consommables en l'état</i> | |
| Pommes | 50 |
| Poires | 50 |
| Pêche | 50 |
| Agrumes, sauf citrons et limettes | 50 |
| Autres fruits appartenant à cette catégorie | 50 |
| | 30 |

ANNEXE 2

Carotenoid Diversity in Cultivated Citrus Is Highly Influenced by Genetic Factors

ANNE-LAURE FANCIULLINO,[†] CLAUDIE DHUIQUE-MAYER,^{*,†} FRANCOIS LURO,[‡]
 JOSEPH CASANOVA,[§] RAPHAEL MORILLON,[†] AND PATRICK OLLITRAULT[†]

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),
 Département FLHOR, TA50/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France; Institut National de Recherche
 Agronomique (INRA) UR GEQA Site de San Giuliano, F-20230 San Giuliano, France; and Université
 de Corse, Equipe Chimie et Biomasse, UMR CNRS 6134, Route des Sanguinaires,
 F-20000 Ajaccio, France

Citrus fruits are complex sources of carotenoids with more than 100 kinds of pigments reported in this genus. To understand the origin of the diversity of carotenoid compositions of citrus fruit, 25 genotypes that belong to the 8 cultivated *Citrus* species were analyzed. Juice extracts of mature fruit were analyzed by high-performance liquid chromatography using a C₃₀ column. The 25 citrus genotypes presented different carotenoid profiles with 25 distinct compounds isolated. Statistical analyses revealed a strong impact of genotype on carotenoid compositions. Two kinds of classifications of genotypes were performed: on qualitative data and on quantitative data, respectively. The results showed that variability in carotenoid compositions was more interspecific than intraspecific. Two carotenoids, *cis*-violaxanthin and the β -cryptoxanthin, strongly determined the classification on qualitative data, which was also in agreement with previous citrus variety classifications. These findings provide evidence that, as for other phenotypical traits, the general evolution of cultivated *Citrus* is the main factor of the organization of carotenoid diversity among citrus varieties. To the authors' knowledge this is the first study that links the diversity of carotenoid composition to the citrus genetic diversity. These results lead to the proposed major biosynthetic steps involved in the differential carotenoid accumulation. Possible regulation mechanisms are also discussed.

KEYWORDS: *Citrus*; carotenoids; HPLC analysis; juice composition; biosynthesis regulation; citrus phylogeny

INTRODUCTION

Carotenoids are major components in *Citrus* juice quality. External and juice colors are mainly due to the presence of these pigments. Carotenoids of *Citrus* juices are also involved in the prevention of chronic diseases such as certain cancers (1), probably because of their antioxidant properties (2–4). In addition, with more than 100 different kinds of carotenoids isolated in *Citrus*, citrus fruits are complex sources of carotenoids (5).

The carotenoid composition of citrus juices has been widely investigated. It has been demonstrated that the carotenoid composition of citrus juices was influenced by several factors such as the growing conditions (5), the geographical origin (6), the fruit maturity (7), and particularly the citrus variety (8–12). Concerning this last factor, Kato et al. (11) showed that

mandarin and orange juices accumulated high contents of several carotenoids (violaxanthin, lutein, zeaxanthin, and β -cryptoxanthin), whereas lemon juice was poor in these components. Goodner et al. (10) demonstrated that mandarins, oranges, and their hybrids were quite distinct because of their β -cryptoxanthin contents. Juices of red grapefruits contained two major carotenoids: lycopene and β -carotene (12). Despite the carotenoid composition of some citrus varieties today being well characterized, the origin of this diversity is still not well understood. Only a few studies have compared the carotenoid composition of citrus varieties that belong to different citrus species. Consequently, very little is known about relationships between carotenoid biosynthesis and citrus genetic diversity. Further investigations dealing with genetic determinism of carotenoid content diversity in the *Citrus* genus are required to be able to manage these traits in citrus-breeding programs.

At the biochemistry level, carotenoid biosynthesis is now well established (13, 14). Carotenoids are synthesized in plastids by enzymes that are nuclear encoded (14). The C₄₀-carotenoid skeleton is formed by the condensation of two molecules of the C₂₀-precursor geranylgeranyl diphosphate (GGDP) to pro-

* Author to whom correspondence should be addressed [telephone +33-(0)467614482; fax +33(0)467614433; e-mail claudie.dhuique-mayer@cirad.fr].

[†] Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

[‡] INRA Unité GEQA.

[§] Université de Corse, Equipe Chimie et Biomasse.

duce the colorless 15-*cis* phytoene under the action of the phytoene synthase (PSY) enzyme. Then, in plants, two enzymes, phytoene desaturase (PDS) and ζ -carotene desaturase (ZDS), catalyze four consecutive desaturation steps to convert phytoene into the red lycopene. Recently, Isaacson et al. (15) and Park et al. (16) have isolated the gene that encodes the carotenoid isomerase (CRTISO), which catalyzes the isomerization of poly-*cis*-carotenoids to *all-trans*-carotenoids. Cyclization of lycopene is a branching point: one branch leads to β -carotene and the other to β -carotene. The lycopene β -cyclase (LCY-b) then converts lycopene into β -carotene in two steps, whereas the formation of β -carotene requires the action of two enzymes, lycopene ϵ -cyclase (LCY-e) and LCY-b (17). β -Carotene is converted into lutein by hydroxylations catalyzed by ϵ -carotene hydroxylase (HY-e) and β -carotene hydroxylase (HY-b). Other xanthophylls are produced from β -carotene with reactions of hydroxylations catalyzed by HY-b and epoxidation catalyzed by zeaxanthin epoxidase (ZEP). The carotenoid biosynthetic pathway has been known for a long time, but just a few studies have investigated the regulation of carotenoid biosynthesis in *Citrus* (18–21). It is worth noting that these works have been focused on the regulation of carotenoid biosynthesis during citrus fruit maturation. Thus, we should improve our understanding of regulation mechanisms involved in the variability of carotenoid composition of mature citrus fruits. It is important to identify which part of the diversity is related to the allelic diversity of the genes involved in biosynthetic pathway and which one is due to a diversification of the regulation.

The origin and evolution of cultivated *Citrus* have been widely investigated by numerical taxonomy based on morphological characters (22, 23) and molecular marker analyses (24–27). Strong correlations have been found between phenotypical and molecular organization diversity at the interspecific level. Generalized linkage disequilibrium has resulted from the evolutive story of cultivated *Citrus* (26). All authors have agreed to the existence of three major basic taxa from which originated all of the cultivated forms: *Citrus medica* (citrons), *Citrus reticulata* (mandarins), and *Citrus maxima* (pummelos). The global linkage disequilibrium may be the result of an initial allopatric evolution of these three taxa and a further limitation of sexual recombination, probably due to the predominant apomixis of most varieties. *C. medica* is originated from an area covering northeastern India, Burma, and western China; *C. reticulata* from Vietnam, southern China, and Japan; and *C. maxima* from the tropical region of Malaysia and Indonesia (28, 29). At the intraspecific level phenotypic diversity may have resulted from mutational events combined with sexual recombinations for the basic taxa (*C. medica* and *C. maxima* particularly). Only mutational events have been involved in the diversification of secondary species such as *C. sinensis* or *C. paradisi* (26). Combined with human selection and clonal multiplication, mutational events may have produced a high level of phenotypic diversity, whereas global genetic diversity analyzed with molecular markers has remained very low or negative. This was particularly true for *C. sinensis*. With regard to the carotenoid contents, which are clearly associated with the visual attractiveness of fruit, one may suppose that human selection has been an important factor in diversification process.

The objective of this paper is to analyze the organization of the diversity of carotenoid content in the *Citrus* genus in order (i) to evaluate how this organization is related, on the one hand, to the global structuration resulting from the origin of cultivated forms and, on the other hand, to more recent mutation/selection processes; (ii) to try to identify the key steps of the biosynthetic

Table 1. Genotypes Used for Juice Preparation

| no. | common name | Tanaka system | ICVN no. ^a |
|-----|------------------------|---|-----------------------|
| 1 | Willowleaf mandarin | <i>C. deliciosa</i> Ten. | 0100133 |
| 2 | Wase Satsuma | <i>C. unshiu</i> Marc. | 0100230 |
| 3 | Hansen mandarin | <i>C. reticulata</i> Blanco | 0100357 |
| 4 | seedless pummelo | <i>C. maxima</i> (Burm.) Merr. | 0100710 |
| 5 | Deep Red pummelo | <i>C. maxima</i> (Burm.) Merr. | 0100757 |
| 6 | Chandler pummelo | <i>C. maxima</i> (Burm.) Merr. | 0100608 |
| 7 | Etrog citron | <i>C. limonimeditica</i> L. | 0100130 |
| 8 | Diamante citron | <i>C. medica</i> L. | 0100540 |
| 9 | Marsh grapefruit | <i>C. paradisi</i> Macf. | 0100188 |
| 10 | Star Ruby grapefruit | <i>C. paradisi</i> Macf. | 0100293 |
| 11 | Ray Ruby grapefruit | <i>C. paradisi</i> Macf. | 0100604 |
| 12 | Shamouti orange | <i>C. sinensis</i> (L.) Osb. | 0100299 |
| 13 | Sanguinelli orange | <i>C. sinensis</i> (L.) Osb. | 0100243 |
| 14 | Cara Cara navel orange | <i>C. sinensis</i> (L.) Osb. | 0100666 |
| 15 | Huang pi Chen orange | <i>C. sinensis</i> (L.) Osb. | 0100567 |
| 16 | Maroc sour orange | <i>C. aurantium</i> L. | 0110033 |
| 17 | Bouquetier de Nice | <i>C. aurantium</i> L. | 0100688 |
| 18 | Myrtle-leaf orange | <i>C. myrtifolia</i> Raf. | 0100708 |
| 19 | Eureka Frost lemon | <i>C. limon</i> (L.) Burm. f. | 0100004 |
| 20 | Volkamer lemon | <i>C. limonia</i> Osbeck | 0100729 |
| 21 | Meyer lemon | <i>C. meyeri</i> Yu. Tan. | 0100549 |
| 22 | Rangpur lime | <i>C. limonia</i> Osbeck | 0110050 |
| 23 | Mexican lime | <i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swing. | 0100140 |
| 24 | Palestine sweet lime | <i>C. limettioides</i> Tan. | 0100802 |
| 25 | Clementine | <i>C. clementina</i> Hort. ex Tan. | 0100092 |

^a International Citrus variety numbering.

pathway involved in this organization by a stop of the pathway or by a differential level of activity; and (iii) at the end to establish potential links between the evolution of cultivated *Citrus* and the functionality of key steps of the biosynthetic pathway.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Juice Preparation. Fruit of 25 genotypes belonging to *Citrus* genus (Table 1) were harvested from adult trees at the last stage of fruit development [stage III (30)] during the 2004–2005 season. Fruit maturity depends on cultivar and climate. Fruit maturity was estimated using commercial maturity indicators (31, 32). Therefore, the development stage was characterized by determining juice content, soluble solids content (SSC), titratable acidity (TA), and maturity index (SSC/TA ratio) (Table 2).

Fruits were provided by the germplasm collection of the Station de Recherches Agronomiques INRA-CIRAD of San Giuliano. All trees were subjected to standard cultural practices. For each of the 25 varieties, 3 individual plants, growing in the same field, were used and 15 pieces of fruit were collected from each plant on the same day as in Dhuique-Mayer et al. (8). Thus, 3 samples of 15 fruits were separately analyzed for each variety.

Fruit samples were immediately hand-squeezed and filtered through a stainless steel sieve with 1 mm pore size. Juice content was expressed as percentage of fruit weight. Juices were placed in sealed amber vials (15 mL) under nitrogen and kept frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ before analysis; storage time did not exceed 1 month. Maturity index determination was carried out on an aliquot of each fruit juice sample (15 mL). The TA of juices was determined by titration to pH 8.2 with 0.1 mol L^{-1} NaOH and expressed as percentage of anhydrous citric acid, and SSC was determined with a refractometer (Atago model, 0–32%). Maturity index was evaluated as the SSC/TA ratio.

Reagents and Standards. Extraction solvents were RPE grade hexane, ethanol, and dichloromethane from Carlo-Erba (Val de Reuil, France). Analytic solvents were HPLC grade methanol from Carlo-Erba and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Reagents for analyses were pure grade sodium chloride, sodium sulfate, magnesium hydroxide carbonate, and 0.1 N sodium hydroxide from Carlo-Erba. Standards used were purchased from Extrasynthese (Genay, France): β -carotene, β -cryptoxanthin,

Table 2. Characterization of Maturity Stage of the Genotypes Used

| no. | common name | juice content (% ± SD) ^a | SSC ^b ± SD | TA ^c (% ± SD) | maturity index ^d ± SD |
|-----|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 1 | Willowleaf mandarin | 35.0 ± 3.2 | 9.9 ± 0.7 | 1.0 ± 0.1 | 10.0 ± 1.6 |
| 2 | Wase Satsuma | 33.2 ± 1.6 | 10.0 ± 0.4 | 1.3 ± 0.1 | 7.5 ± 0.3 |
| 3 | Hansen mandarin | 46.9 ± 2.4 | 9.4 ± 0.6 | 1.5 ± 0.1 | 6.2 ± 0.9 |
| 4 | seedless pummelo | 5.2 ± 2.0 | 13.1 ± 0.2 | 2.2 ± 0.3 | 6.1 ± 1.2 |
| 5 | Deep Red pummelo | 21.5 ± 3.7 | 10.0 ± 0.4 | 1.2 ± 0.1 | 8.1 ± 0.8 |
| 6 | Chandler pummelo | 19.4 ± 0.9 | 11.5 ± 0.5 | 1.1 ± 0.1 | 10.6 ± 0.3 |
| 7 | Etrog citron | | | 4.8 ± 0.5 | |
| 8 | Diamante citron | | | 5.3 ± 0.2 | |
| 9 | Marsh grapefruit | 31.6 ± 1.4 | 10.8 ± 0.2 | 1.6 ± 0.0 | 6.6 ± 0.2 |
| 10 | Star Ruby grapefruit | 31.9 ± 0.1 | 10.2 ± 1.1 | 1.7 ± 0.2 | 6.0 ± 0.0 |
| 11 | Ray Ruby grapefruit | 36.3 ± 0.5 | 8.9 ± 0.1 | 1.6 ± 0.1 | 5.7 ± 0.1 |
| 12 | Shamouti orange | 31.2 ± 2.5 | 11.3 ± 0.5 | 1.2 ± 0.0 | 9.9 ± 0.6 |
| 13 | Sanguinelli orange | 41.0 ± 1.5 | 10.2 ± 0.2 | 1.2 ± 0.1 | 8.5 ± 0.6 |
| 14 | Cara Cara navel orange | 44.3 ± 3.3 | 10.1 ± 0.1 | 0.9 ± 0.0 | 10.8 ± 0.7 |
| 15 | Huang pi Chen orange | 39.9 ± 3.9 | 7.4 ± 0.3 | 1.2 ± 0.1 | 6.4 ± 0.6 |
| 16 | Maroc sour orange | 24.1 ± 3.5 | | 4.1 ± 0.3 | |
| 17 | Bouquetier de Nice | 18.6 ± 2.3 | | 3.3 ± 0.2 | |
| 18 | Myrtle-leaf orange | 32.4 ± 1.4 | | 3.6 ± 0.0 | |
| 19 | Eureka Frost lemon | 39.1 ± 0.9 | | 4.9 ± 0.1 | |
| 20 | Volkamer lemon | 37.3 ± 1.5 | | 4.5 ± 0.3 | |
| 21 | Meyer lemon | 41.1 ± 2.3 | | 4.1 ± 0.1 | |
| 22 | Rangpur lime | 42.4 ± 1.0 | | 5.0 ± 0.2 | |
| 23 | Mexican lime | 32.7 ± 1.8 | | 7.5 ± 0.1 | |
| 24 | Palestine sweet lime | 33.5 ± 2.0 | 7.4 ± 0.3 | 0.0 ± 0.0 | |
| 25 | Clementine | 32.6 ± 2.2 | 10.8 ± 0.3 | 0.7 ± 0.0 | 16.3 ± 1.7 |

^a SD, standard deviation. ^b SSC, soluble solid content. ^c TA, titratable acidity expressed as percentage of anhydrous citric acid. ^d SSC/TA ratio.

Table 3. Spectral Characteristics of Carotenoids Found in Juices of 25 Genotypes

| no. | RT (min ± SD) ^a | tentative identification | λ_{\max} (nm) observed | | | | λ_{\max} (nm) literature | | | | ref | | |
|-----|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------|----------|----------|----------------------------------|----------------|----------|----------|-------|------|----|
| | | | peak I | peak II | peak III | % III/II | peak I | peak II | peak III | % III/II | | | |
| 1 | 15.76 ± 0.09 | <i>cis</i> -apocarotenoid | <i>cis</i> 328 | 408 | 430 | 458 | | 405 | 430 | 460 | 10 | 33 | |
| 2 | 16.33 ± 0.04 | <i>cis</i> -neoxanthin | <i>cis</i> 328 | 416 | 439 | 468 | 76 | 418 | 441 | 470 | 81.6 | 9 | |
| 3 | 17.35 ± 0.04 | neochrome | | 399 | 422 | 448 | 75 | 399.7 | 420.0 | 446.0 | | 10 | |
| 4 | 17.96 ± 0.05 | | | 400 | 422 | 448 | | | | | | | |
| 5 | 18.71 ± 0.07 | <i>cis</i> -violaxanthin | <i>cis</i> 328 | 412 | 436 | 464 | 81 | <i>cis</i> 328 | 414 | 438 | 466 | 95.1 | 9 |
| 6 | 19.59 ± 0.04 | luteoxanthin | | 396 | 418 | 443 | 75 | | 397 | 419 | 445 | 92.4 | 9 |
| 7 | 19.92 ± 0.04 | mutatoxanthin | | 404 | 426 | 448 | 31 | | 406.5 | 427.5 | 451.5 | | 36 |
| 8 | 20.57 ± 0.09 | lutein ^b | | 422 | 444 | 472 | 48 | | 421 | 445 | 474 | 60 | 33 |
| 9 | 20.78 ± 0.06 | | | 407 | 428 | 451 | | | | | | | |
| 10 | 21.89 ± 0.04 | zeaxanthin ^b | | 426 | 450 | 476 | 17 | | 428 | 450 | 478 | 26 | 33 |
| 11 | 22.55 ± 0.04 | <i>cis</i> -isolutein | <i>cis</i> 330 | 417 | 440 | 468 | 47 | | 418.7 | 440.5 | 466.8 | | 10 |
| 12 | 24.25 ± 0.08 | | | 422 | 446 | 473 | 44 | | | | | | |
| 13 | 25.40 ± 0.09 | | <i>cis</i> 338 | 420 | 444 | 470 | | | | | | | |
| 14 | 25.89 | | | 406 | 428 | 452 | 40 | | | | | | |
| 15 | 26.10 ± 0.04 | α -cryptoxanthin | | 422 | 445 | 473 | 47 | | 421 | 445 | 475 | 60 | 33 |
| 16 | 26.96 ± 0.06 | phytoene | | 276 | 286 | 298 | | | 276 | 286 | 297 | 10 | 33 |
| 17 | 28.16 ± 0.08 | β -cryptoxanthin ^b | | 427 | 450 | 477 | 20 | | 428 | 450 | 478 | 27 | 33 |
| 18 | 28.59 ± 0.03 | phytofluene | | 331 | 348 | 368 | 68 | | 331 | 348 | 367 | 90 | 33 |
| 19 | 32.25 ± 0.09 | ζ -carotene | | 379 | 400 | 424 | 90 | | 379 | 400 | 424 | 85.9 | 9 |
| 20 | 33.35 ± 0.09 | α -carotene | | 422 | 444 | 470 | 34 | | 422 | 445 | 473 | 55 | 33 |
| 21 | 35.51 ± 0.09 | β -carotene ^b | | | 452 | 477 | 12 | | 425 | 450 | 477 | 25 | 33 |
| 22 | 36.84 ± 0.09 | <i>cis</i> - β -carotene | <i>cis</i> 342 | 425 | 449 | 475 | | <i>cis</i> 340 | 422 | 446 | 473 | 34 | 19 |
| 23 | 38.82 ± 0.04 | | | 433 | 456 | 488 | | | | | | | |
| 24 | 45.95 | lycopene <i>cis</i> -isomer | <i>cis</i> 355 | 441 | 466 | 490 | | <i>cis</i> 358 | 438 | 465 | 493 | 45 | 9 |
| 25 | 55.57 ± 0.06 | lycopene ^b | | 446 | 472 | 502 | 71 | | 448 | 474 | 506 | 73.7 | 9 |

^a RT, retention time ± standard deviation (SD). ^b Identified using authentic standards. Solvents used were water, MeOH, and MTBE (refs 19, 10, and 36); water, MeCN:MeOH (75:25), and MTBE (ref 9); and petroleum ether or EtOH or hexane (ref 33). Whatever the solvent, gradient programs were different. As a result, these data were used only to compare spectral characteristics found with those already described in different solvents.

zeaxanthin, lutein, lycopene, β -apo-8'-carotenal (purity of standards was verified by HPLC and photodiode array detection).

Preparation of Standards. Concentrations of standard solutions were calculated by spectrophotometric measurement dissolving standard with the appropriate solvent and using a molar extinction coefficient (ϵ_{mol}) (33). To prepare the solution of internal standard, lycopene or β -apo-8'-carotenal was diluted in dichloromethane to obtain a final concentration of 120 mg L⁻¹ for lycopene and 260 mg L⁻¹ for β -apo-8'-carotenal.

Carotenoid Extraction. Carotenoid extraction was carried out according to the method of Dhuique-Mayer et al. (8). Twenty grams of juice was stirred with 120 mg of MgCO₃ and 35 mL of extraction solvent (ethanol/hexane, 4:3 v/v, containing 0.1% of BHT as antioxidant) for 5 min. Lycopene (750 μ L of solution, equivalent to 90 μ g) or β -apo-8'-carotenal (150 μ L, equivalent to 40 μ g) was added as an internal standard. Residue was separated from the liquid phase by filtration with a filter funnel (porosity no. 2) and re-extracted with 35 mL of ethanol/hexane (4:3, v/v). The residue was washed with 30 mL

Table 4. (Continued)

| carotenoids ^a | retention time | | | | | | | | | | | | | total |
|--------------------------|----------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|
| | 25.89 | 26.1 | 26.96 | 28.16 | 28.59 | 32.25 | 33.35 | 35.51 | 36.84 | 38.82 | 45.95 | 55.57 | | |
| Star Ruby grapefruit | mean | – | – | 2.130 | – | 1.711 | 0.369 | – | 2.826 | 0.171 | 0.287 | – | 10.072 | 17.566 |
| | SD | – | – | 0.098 | – | 0.068 | 0.020 | – | 0.105 | 0.022 | 0.045 | – | 0.652 | 0.775 |
| Ray Ruby grapefruit | mean | – | – | 0.581 | – | 0.510 | 0.293 | – | 1.142 | – | – | – | 6.855 | 9.381 |
| | SD | – | – | 0.143 | – | 0.132 | 0.061 | – | 0.362 | – | – | – | 2.758 | 3.444 |
| Shamouti orange | mean | – | 0.288 | 0.758 | 2.694 | 0.703 | 0.957 | 0.091 | 0.587 | – | – | – | – | 27.770 |
| | SD | – | 0.036 | 0.082 | 0.362 | 0.084 | 0.125 | 0.024 | 0.053 | – | – | – | – | 2.064 |
| Sanguinelli orange | mean | – | 1.026 | 1.123 | 3.979 | 1.107 | 1.241 | 0.232 | 0.289 | – | – | – | – | 36.703 |
| | SD | – | 0.111 | 0.111 | 0.230 | 0.100 | 0.071 | 0.029 | 0.020 | – | – | – | – | 0.573 |
| Cara Cara navel orange | mean | – | 0.182 | 13.059 | 1.698 | 5.062 | 1.213 | 0.122 | 1.521 | – | 0.073 | 0.254 | 2.263 | 37.743 |
| | SD | – | 0.030 | 1.107 | 0.327 | 0.298 | 0.077 | 0.013 | 0.106 | – | 0.027 | 0.073 | 0.501 | 1.385 |
| Huang pi Chen orange | mean | – | – | 0.265 | tr | 0.191 | 0.255 | – | 0.079 | – | – | – | – | 1.743 |
| | SD | – | – | 0.088 | – | 0.053 | 0.066 | – | 0.008 | – | – | – | – | 0.094 |
| Maroc sour orange | mean | – | – | – | 1.415 | – | 0.149 | – | 0.203 | – | – | – | – | 2.263 |
| | SD | – | – | – | 0.153 | – | 0.018 | – | 0.050 | – | – | – | – | 0.210 |
| Bouquetier de Nice | mean | – | – | – | 2.044 | – | 0.151 | – | 0.058 | – | – | – | – | 3.446 |
| | SD | – | – | – | 0.266 | – | 0.041 | – | 0.008 | – | – | – | – | 0.497 |
| Myrtle-Leaf orange | mean | – | – | – | 3.312 | – | 0.192 | – | – | – | – | – | – | 5.224 |
| | SD | – | – | – | 0.642 | – | 0.030 | – | – | – | – | – | – | 0.918 |
| Eureka Frost lemon | mean | tr | – | – | 0.165 | tr | 0.126 | – | tr | – | – | – | – | 0.291 |
| | SD | – | – | – | 0.007 | – | 0.026 | – | – | – | – | – | – | 0.020 |
| Volkamer lemon | mean | – | – | 0.151 | 2.510 | 0.285 | 0.241 | – | 0.105 | – | – | – | – | 6.517 |
| | SD | – | – | 0.010 | 0.098 | 0.024 | 0.028 | – | 0.016 | – | – | – | – | 0.181 |
| Meyer lemon | mean | – | – | 0.097 | 0.863 | – | 0.108 | – | 0.192 | – | – | – | – | 1.260 |
| | SD | – | – | 0.016 | 0.046 | – | 0.012 | – | 0.032 | – | – | – | – | 0.067 |
| Rangpur lime | mean | – | – | – | 3.996 | 0.187 | 0.253 | – | 0.862 | – | – | – | – | 8.403 |
| | SD | – | – | – | 0.119 | 0.024 | 0.021 | – | 0.237 | – | – | – | – | 0.157 |
| Mexican lime | mean | – | – | – | – | – | – | 0.053 | 0.239 | – | – | – | – | 0.349 |
| | SD | – | – | – | – | – | – | 0.008 | 0.031 | – | – | – | – | 0.046 |
| Palestine sweet lime | mean | – | – | – | 0.280 | – | – | – | tr | – | – | – | – | 0.280 |
| | SD | – | – | – | 0.009 | – | – | – | – | – | – | – | – | 0.007 |
| Clementine | mean | – | 0.214 | 0.946 | 9.087 | 1.265 | 1.098 | 0.147 | 2.434 | – | – | – | – | 24.962 |
| | SD | – | 0.041 | 0.081 | 0.545 | 0.069 | 0.059 | 0.060 | 0.201 | – | – | – | – | 1.169 |
| F value | | 200.8 | 247.0 | 316.5 | 62.2 | 212.1 | 155.5 | 39.1 | 86.9 | 1193.9 | 67.9 | 46.9 | 51.8 | |
| P > F (%) | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | |
| LSD ^e | | 0.002 | 0.047 | 0.426 | 0.806 | 0.246 | 0.135 | 0.029 | 0.240 | 0.003 | 0.019 | 0.020 | 0.954 | |

^a Carotenoids are designated by their retention time in order of elution. ^b Not detected. ^c SD, standard deviation. ^d tr < 0.05 mg L⁻¹. ^e Least significant difference. For β -cryptoxanthin the limit of detection (LOD) is 0.0046 μ g and the limit of quantification (LOQ), 0.0152 μ g. Concentrations are the mean of at least three independent determinations. The 25 genotypes are significantly different for all 25 carotenoid pigments ($P < 0.01\%$).

of ethanol and with 30 mL of hexane until it was colorless. Organic phases were transferred in a separatory funnel and successively washed with 2 \times 50 mL of 10% sodium chloride and 3 \times 50 mL of distilled water. The aqueous layer was removed. The hexanic phase was dried using anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated at 40 °C in a rotary evaporator. The residue was dissolved in 500 μ L of dichloromethane and 500 μ L of MTBE/methanol (80:20, v/v). This solution was diluted 6-fold in a MTBE/methanol mixture for varieties with numbers 1, 2, 3, 10–14, and 25 (see Table 1) and 3-fold for varieties with numbers 16–18 and 20–22. Samples were placed in amber vials before HPLC analysis.

Saponification. Hexanic extract was evaporated with a rotary evaporator, redissolved with 20 mL of hexane, and placed in a 50 mL amber vial to which was added 20 mL of 10% methanolic KOH. Saponification was performed overnight at room temperature protected from the light. The sample was shaken under nitrogen in the sealed vial. The sample was transferred to a separatory funnel to which 50 mL of distilled water was added to separate the layers. The hexanic layer was washed with distilled water until free of alkali. The methanolic KOH layer was extracted with 3 \times 10 mL of dichloromethane. The extracts were pooled and washed to remove alkali. The extracts were dried using anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated in a rotary evaporator. The residue was dissolved as described above. Analyses were carried out under red light to avoid carotenoid degradation during extraction and saponification.

HPLC Analysis of Carotenoids. Carotenoids were analyzed by HPLC using an Agilent 1100 system (Massy, France) according to the previously published method of Dhuique-Mayer et al. (8). Carotenoids were separated along a C₃₀ column [250 \times 4.6 mm i.d., 5 μ m YMC (EUROP GmbH)]; the mobile phases were H₂O as eluent A, methanol

as eluent B, and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL min⁻¹, column temperature was set at 25 °C, and injection volume was 20 μ L. A gradient program was performed: the initial condition was 40% A/60% B; 0–5 min, 20% A/80% B; 5–10 min, 4% A/81% B/15% C; 10–60 min, 4% A/11% B/85% C; 60–71 min, 100% B; 71–72 min, back to the initial condition for reequilibration. Absorbance was followed at 290, 350, 400, 450, and 470 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV–visible spectra were collected, stored, and integrated using an Agilent Chemstation plus software.

Identification and Quantification of Carotenoids. Carotenoids were identified using retention times, absorption spectra, and co-injection with authentic standards. The spectral fine structure value, % III/II, was calculated as the percentage of the quotient between band III and band II (λ_{max}), taking the trough between the two bands as the baseline. The UV–visible spectra and % III/II were compared with those reported in the literature. Quantification of carotenoids was achieved using calibration curves with β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, lycopene, and β -apo-8'-carotenal with five concentrations. Correlation coefficients ranged from 0.994 to 0.998. Other carotenoids were quantified as β -carotene. Each carotenoid was quantified using area collected at 290, 350, 400, 450, or 470 nm depending on its maximum λ . Recoveries were determined by adding internal standard (lycopene or β -apo-8'-carotenal) before the extraction of each sample analyzed and used to correct carotenoid contents after HPLC analysis. The concentration of each carotenoid was expressed as milligrams per liter. Analysis precision was checked from three consecutive extractions–saponifications–injections of one sample (corresponding to one plant), and coefficients of variation were $\leq 5\%$. Coefficients of variation obtained from three consecutive extractions–saponifications–injections

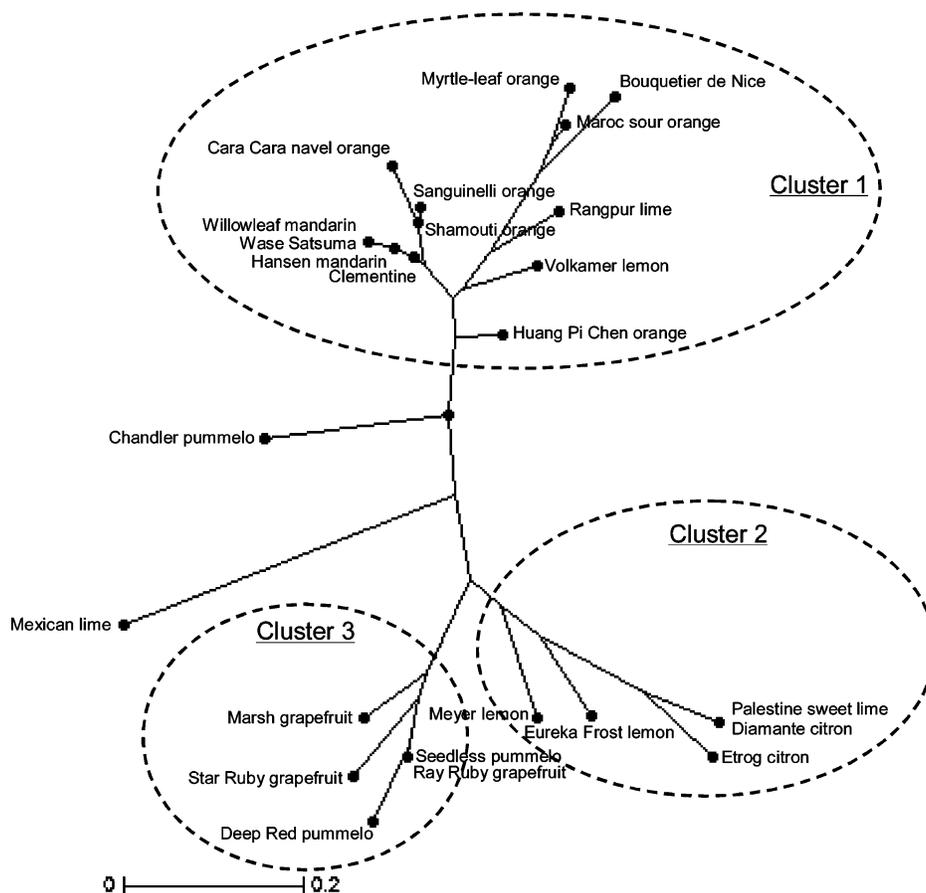


Figure 1. Diversity of carotenoid profiles of the 25 citrus genotypes on the basis of the presence or absence of carotenoids. The tree was constructed according to the neighbor-joining method using a dice matrix of dissimilarity. The three clusters that we have identified are circled.

of three samples belonging to the same variety (corresponding to three plants) were $\leq 20\%$ for almost all carotenoids and $\leq 30\%$ for β -carotene and lycopene of grapefruit and pummelo varieties. Concentrations are given as the mean of data from three extractions. The total contents in carotenoid pigments of juices from the 25 genotypes were calculated by summing concentrations of all compounds. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated for β -cryptoxanthin by preparing serial dilutions of this compound in mobile phase (concentrations ranging from 1 to 10 mg L⁻¹). Calibration curves and then LOD and LOQ were determined with $\text{LOD} = 3 \times S/a$ and $\text{LOQ} = 10 \times S/a$ (where S is the standard deviation of the blank signal and a the slope of the calibration curve).

Statistical Analyses. The data matrix was composed of the contents (mean of three samples) of 25 carotenoid variables and 25 genotypes. The carotenoid variables were scored as 1 for the presence and 0 for the absence for qualitative analysis. @DARwin 4.0 software (CIRAD, Montpellier, France) was used for dissimilarity analysis and tree construction. Two representations were constructed according to the neighbor-joining method and from the presence or absence of variables and a matrix of Dice's distances for the first one and from carotenoid contents and Euclidian distances for the second one. Connections between clusters and qualitative variables were analyzed according to the chi2 method using the MEANS and FREQ procedures of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989). The statistical comparison of data was performed by ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., 1989) to reveal significant differences among the 25 genotypes studied.

RESULTS

Diversity of Carotenoid Composition of Citrus Genotypes.

For each of the 25 varieties at least 3 juice samples (three plants) were analyzed by HPLC. Twenty-five carotenoids were detected, and their chromatographic and spectral characteristics are

reported in **Table 3**. Variations in retention time were $\leq 6\%$, and variations in wavelength were $\leq 7\%$ for all pigments. Five carotenoids were identified by comparison of their retention time and UV-visible spectra with those of standards. Others pigments were tentatively identified using spectral characteristics reported in the literature. Spectral characteristics of peaks match those reported with an average difference of $\leq 5\%$. Carotenoid contents were determined and expressed as the average concentration of three data in milligrams per liter (**Table 4**). The comparison of data by ANOVA showed that the 25 genotypes were significantly different for all carotenoid pigments ($P < 0.01\%$). Consequently, a very strong effect of genotype is found to explain the variability of each component.

Mandarins, oranges (apart from Huang pi Chen orange), and Clementines were the species richest in carotenoid contents (total contents ≥ 22.481 mg L⁻¹). Star Ruby and Ray Ruby grapefruits were also among the richest citrus varieties with high total carotenoid contents of 17.566 and 9.381 mg L⁻¹, respectively, whereas Marsh grapefruit presented only traces of phytoene, phytofluene, ζ -carotene, and β -carotene. Sour oranges and pummelos presented total contents between those of mandarins, oranges, and Clementines and those of lemons, limes, and citrons, which were the poorest in pigments (total contents ≤ 1.26 mg L⁻¹). However, Volkamer lemon and Rangpur lime were richer in pigments than sour oranges or pummelos, with 6.517 and 8.403 mg L⁻¹, respectively, as total contents. β -Cryptoxanthin, β -carotene, *cis*-violaxanthin, and lycopene appeared to widely contribute to the total amount of carotenoids, although some of them were absent in fruits of several genotypes. Thus, differences between the 25 genotypes were

qualitative and quantitative. Moreover, the analyses revealed more interspecific differences than intraspecific differences.

Organization of the Carotenoid Diversity Based on the Presence/Absence of Each Compound. The tree of **Figure 1** was constructed on the basis of the presence or absence of each carotenoid. The 25 genotypes were classified in 3 clusters. The first one comprised 13 genotypes (3 mandarins, Clementine, 4 oranges, 3 sour oranges, Rangpur lime, and Volkamer lemon). The second cluster was smaller, with 5 genotypes (2 citrons, 2 lemons, and Palestine sweet lime). The third one also contained 5 genotypes (2 pummelos and 3 grapefruits). Mexican lime and Chandler pummelo were not included in these three clusters. Clusters and carotenoid variables were analyzed according to the chi² method to determine which pigments were mainly responsible for these clusters. Two carotenoids strongly determined this classification: *cis*-violaxanthin and β -cryptoxanthin. *cis*-Violaxanthin was present in all varieties belonging to cluster 1, whereas this pigment was absent in the varieties of cluster 2. Similarly, β -cryptoxanthin was present in all varieties belonging to clusters 1 and 2 but was absent for varieties of cluster 3. Moreover, other xanthophylls were also important for cluster 1: lutein, isolutein, and zeaxanthin. Conversely, some carotenoids did not contribute to the cluster formation such as peaks 4, 9, 14, and 21–24 (see **Table 3**). These pigments were present in only one or two varieties apart from β -carotene (peak 21), which was present in almost all of them. Thus, for qualitative data it was possible to distribute the 23 citrus genotypes in 3 main clusters. Varieties belonging to the same species were included in the same cluster except for Rangpur lime and Volkamer lemon, which were located in cluster 1 and not in cluster 2 as expected.

Organization of the Carotenoid Diversity Based on the Concentration of Each Compound. The tree of **Figure 2** was obtained on the basis of the average concentration of each carotenoid from juices of three samples. To evaluate the quantitative data impact on the classification previously obtained (**Figure 1**), we have imposed the structure of the tree of **Figure 1** for the construction of the one of **Figure 2**. It is important to note that the distance scales are not the same in **Figures 1** and **2**. Quantitative data revealed more information at the intraspecific level. Concerning the varieties that were included in cluster 1 of **Figure 1**, mandarins and Clementines were separated from oranges in **Figure 2**. Mandarins and Clementines accumulated high amounts of β -cryptoxanthin, whereas oranges accumulated high quantities of *cis*-violaxanthin (the β -cryptoxanthin/*cis*-violaxanthin ratio was ≥ 1.5 for mandarin and Clementine varieties and ≤ 0.3 for orange varieties) (see **Table 4**). Sour oranges, Rangpur lime, and Volkamer lemon were no longer in cluster 1. Huang pi Chen orange was closer to cluster 2, this genotype having a low carotenoid content in juice. β -Cryptoxanthin was the major pigment in sour oranges, Rangpur lime, and Volkamer lemon. *cis*-Violaxanthin was the major pigment in Huang pi Chen orange, but the contents of these pigments were roughly 3 times lower than for oranges, mandarins, and Clementines. It is worth noting that the repartition of the mandarin varieties in **Figures 1** and **2** does not overlap. This was due to differences in β -cryptoxanthin contents. Similarly, the spread of the group of oranges could be explained by contents in *cis*-violaxanthin. Cara Cara orange was far away from the other oranges; the accumulation of carotene such as phytoene, phytofluene, and lycopene was higher.

Concerning cluster 2, all genotypes accumulated low amounts of carotenoids, which explained why all varieties overlapped. In cluster 3, the spread of the group of pummelos and grapefruits

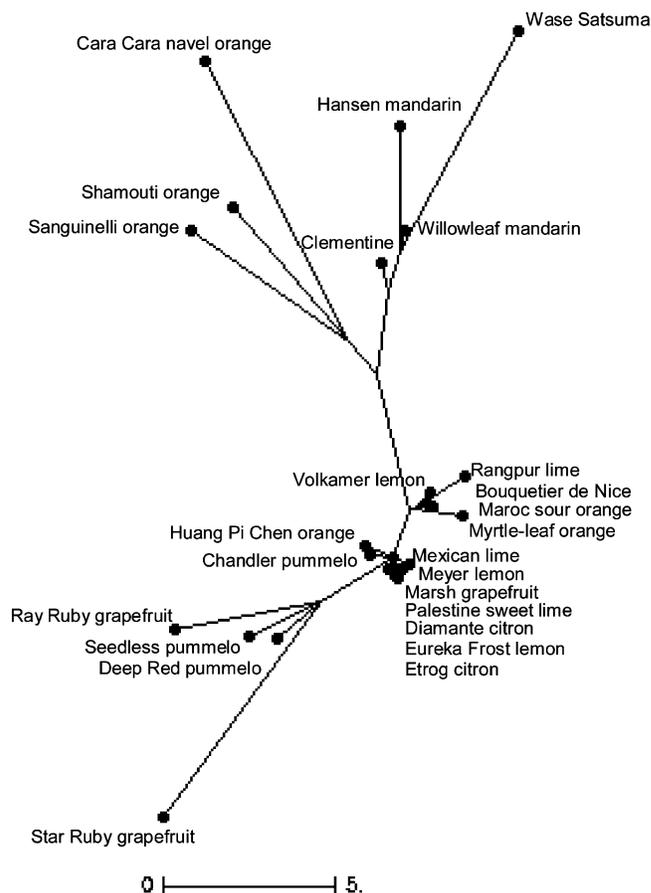


Figure 2. Diversity of carotenoid profiles of 25 citrus genotypes on the basis of carotenoid contents. The tree was constructed according to the neighbor-joining method using Euclidian distances.

was also greater. Two genotypes were distant: Marsh grapefruit contained only traces of pigments, which explained why it overlapped varieties of cluster 2, and Star Ruby grapefruit presented the highest content of lycopene.

DISCUSSION

Genotypic Component of Carotenoid Content Diversity.

We analyzed the carotenoid composition of the 25 genotypes to evaluate the contribution of genotype diversity to carotenoid profiles. Because the samplings were quite high (45 fruits per genotype) and several extraction/saponification/HPLC analyses were performed for each genotype, we can conclude that the contribution of the genotype diversity to the variance of each carotenoid is very high. Therefore, the carotenoid diversity is highly influenced by genetic factors when other sources of variation such as growing conditions, geographical origin, fruit maturity, and method of analysis are minimized. Then, we can analyze more accurately the relationships between genetic and carotenoid diversities.

Relationships between the Organization of Carotenoid Contents and Genetic Diversity. Twenty-five genotypes were evaluated on the basis of the carotenoids detected in juices. The classification obtained allowed us to distribute the genotypes in three clusters. Cluster 1 of **Figure 1** contained the three mandarins (*C. reticulata*), cluster 2 the two citrons (*C. medica*), and cluster 3 two of the three pummelos (*C. maxima*). These three species being the three basic taxa of cultivated *Citrus*, our results suggest that, as for other phenotypical traits, the general evolution of cultivated *Citrus* has been the main factor

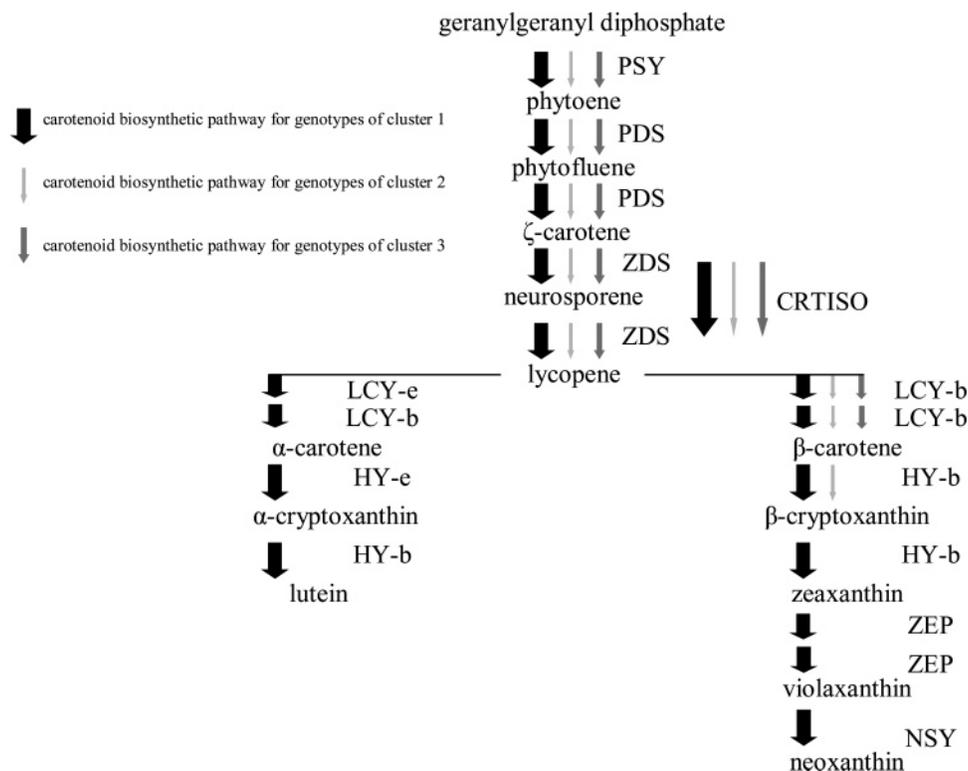


Figure 3. Carotenoid biosynthetic pathway obtained through the qualitative carotenoid composition in 25 citrus genotypes. Behaviors of genotypes of each cluster are represented by different arrows. PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; ZDS, ζ -carotene desaturase; CRTISO, carotenoid isomerase; LCY-b, lycopene β -cyclase; LCY-e, lycopene ϵ -cyclase; HY-b, β -carotene hydroxylase; HY-e, ϵ -carotene hydroxylase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NSY, neoxanthin synthase.

of the organization of carotenoid diversity. Looking to secondary species, the classification obtained from qualitative data (presence–absence of 25 carotenoid components; **Figure 1**) is in agreement with previous classifications based on molecular markers, leading to phylogenetic inferences. In fact, in cluster 1, sweet oranges and sour oranges were close to mandarins. It was demonstrated that they were closely related with mandarins but possessed some alleles of pummelos (26). Clementine was also in cluster 1 and, according to previous studies, this genotype was found to be a hybrid between a mandarin and a sweet orange (27). Rangpur lime and Volkamer lemon, which belong to cluster 1, are hybrids between citron and mandarin and between citron and sour orange, probably back-crossed with mandarin, respectively (27). The two *C. limon* and the lime varieties were in cluster 2 close to the citron, as was found with molecular markers. Nicolosi et al. (27) suggested that lemons were hybrids between citron and sour orange and that Palestine sweet lime was a hybrid between a citron and a sweet orange. Similarly, grapefruits were present in cluster 3. Indeed, they were found to be hybrids between pummelo and sweet orange (27). Moreover, Mexican lime and Chandler pummelo, which should be expected to be included in clusters 2 and 3, respectively, were isolated. Concerning Mexican lime, one possible explanation is that Mexican lime is a hybrid between a citron and *Citrus micrantha* (27), a species that was not included in our study. The *C. micrantha* parent may be responsible of the position of Mexican lime on the tree of **Figure 1**. To confirm our conclusion, the same method of analysis should be applied to other genotypes.

Relationships between Carotenoid Profiles and Steps of the Biosynthetic Pathway. One purpose was to try to identify the steps of the carotenoid biosynthetic pathway involved in differential carotenoid accumulation. The behavior of genotypes

of each cluster is illustrated in **Figure 3**, where each arrow shows which pigments were synthesized. Genotypes of cluster 1 produced the *cis*-violaxanthin and the lutein or the isolutein. It is important to stress that isolutein comes from lutein by oxidation that occurs in fruit (33). For genotypes of cluster 2, the last detected compound was β -cryptoxanthin. Concerning genotypes of cluster 3, the last detected compound was β -carotene.

For cluster 1, our results lead us to guess that the transformation of β -carotene into β -cryptoxanthin and zeaxanthin by hydroxylations catalyzed by β -carotene hydroxylase (HY-b) are key steps. The transformation of zeaxanthin into violaxanthin by zeaxanthin epoxidase (ZEP) seems also to play a major role. Indeed, the β -cryptoxanthin/*cis*-violaxanthin ratio allows the orange group to be differentiated from the mandarin group (tree of **Figure 2**). Concerning the five genotypes of cluster 2, qualitative data and especially quantitative data suggest that the most important step is the formation of phytoene from geranylgeranyl diphosphate by the action of a phytoene synthase (PSY). Actually, for all of the genotypes of cluster 2, carotenoid contents were very low. From the qualitative data, the last compound detected for the genotypes of cluster 3 was β -carotene. However, from the quantitative point of view, lycopene was present in a very large amount, which suggests the importance of the cyclization of lycopene, which is a branching point in the pathway.

Relationships between Biosynthetic Pathway Functionality and Citrus Evolutionary Process. Our results provide some evidence that at the interspecific level differences are qualitative and that it can be due to the allopatric evolution of the three taxa and a limitation of sexual recombination. Actually, genotypes of cluster 1, closely related with mandarins, synthesized all compounds and particularly *cis*-violaxanthin. For

genotypes of cluster 2, related with citrons, and for genotypes of cluster 3, related with pummelos, the biosynthesis was stopped at the level of β -cryptoxanthin and β -carotene, respectively. Lutein was not detected for genotypes of clusters 2 and 3. At the intraspecific level, differences are quantitative. It can be illustrated by differences reported for *C. sinensis* varieties. On the basis of qualitative data these genotypes were placed in cluster 1, whereas quantitative data showed strong differences. These results can be explained by mutational events that are responsible for the diversification among these genotypes.

Hypothesis on the Regulation Mechanisms at These Key Steps. Several possible mechanisms were considered to explain the regulation of the carotenoid biosynthetic pathway. One possible explanation was the existence of several isoforms of enzyme encoded by different genes or the existence of several alleles of one gene. A second explanation was a differential expression of the biosynthetic genes at the transcriptional level. Another one was a defect in one enzyme activity or in an enzyme-associated factor. Studies on tomato have demonstrated that the accumulation of lycopene during fruit ripening was controlled by transcriptional regulation with an increase of the expression of PSY and PDS genes and a down-regulation of LCY-b and LCY-e (34). In *Citrus*, Rodrigo et al. (19) and Kato et al. (11) also demonstrated that during fruit development differential gene expression at the transcriptional level explained differences in carotenoid accumulation. To our knowledge, only Kato et al. (11) studied the expression of the biosynthetic genes using several genotypes belonging to different species. These authors showed that the mechanism leading to diversity in β , β -xanthophyll composition between Satsuma mandarin and Valencia orange was due to HY-b substrate specificity and the balance expression between upstream biosynthetic genes (PSY, PDS, ZDS, and LCY-b) and downstream biosynthetic genes (HY-b and ZEP). Regulation of gene expression at the transcriptional level seems to be the major mechanism controlling the carotenoid accumulation during fruit ripening and controlling the differences in carotenoid accumulation between varieties. However, other mechanisms should be investigated to explain the differences between genotypes at mature stage. Actually, regulation at the transcriptional level appears to be more relevant to explain differences between genotypes that are close in phylogenetic classifications. This proposition is supported by the study of Kato et al. (11), who have shown that the differences between mandarin and orange were explained by this regulation. The presence of different isoforms or different alleles of the biosynthetic genes should be studied using genotypes belonging to the different clusters previously formed. For example, the existence of several isoforms of HY-b was supported by studies on tomato and pepper, where two isoforms were present depending on the tissue concerned (35). In *Citrus*, Kim et al. (21) isolated two clones, CHX1 and CHX2, encoding for HY-b that corresponded to alleles of the same gene. In addition, their results suggested that the expression of HY-b gene was not regulated at the transcriptional level during mandarin fruit ripening and that another isoform of HY-b or other enzymes involved in the carotenoid biosynthesis may be transcriptionally regulated.

Whatever the regulation mechanisms, extended experiments are required. Indeed, it would be necessary to monitor the gene expression of varieties of the same cluster to verify that carotenoid contents are dependent on the gene expression involved in the key steps. It would also be interesting to check if qualitative differences among clusters are related to the allelic

diversity. For that, the estimation of the number of gene loci and their sequencing would be required.

Conclusion. Our results based on the presence or absence of carotenoid compounds showed that the 25 genotypes were included in only 3 clusters. This classification is in agreement with previous genetic studies. It stresses the fact that at the interspecific level, the organization of the diversity of carotenoid composition is linked to the global evolution process of cultivated citrus rather than to more recent mutational/human selection process. However, this selection process has been clearly efficient for the intraspecific diversification of secondary species such as *C. sinensis* and *C. paradisi*. It mainly results in quantitative variations that should be related to the modification of specific enzymatic activities (mutation of the gene of the enzymes of the biosynthetic pathway) or to the modification of gene regulation.

The genotypes of each cluster may have specific functional or regulation mechanisms with respect to carotenoid biosynthesis. The different behaviors among the three clusters lead us to identify the most important steps of the biosynthetic pathway involved in the diversification of carotenoid contents in *Citrus* species. This information will be very useful for further genomic works on the variability of the origin of carotenoid biosynthesis.

ACKNOWLEDGMENT

We thank C. Dubois (CIRAD, Montpellier, France) for helpful discussions and C. Jacquemond and F. Curk (SRA INRA-CIRAD, San Giuliano, France) for assistance.

LITERATURE CITED

- (1) Yano, M. Cancer prevention by Citrus. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Chem.* **1999**, *47*, 128–135.
- (2) Garner, P. T.; White, T. A. C.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* **2000**, *68*, 471–474.
- (3) Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 430–439.
- (4) Riso, P.; Visioli, F.; Gardana, C.; Grande, S.; Brusamolino, A.; Galvano, F.; Galvano, G.; Porrini, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 941–947.
- (5) Gross, J. *Pigments in Fruits*; Harcourt Brace Javanovich: London, U.K., 1987.
- (6) Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Lapiere, L.; Corsetti, J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4038–4045.
- (7) Lee, H. S.; Castle, W. S. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 877–882.
- (8) Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M.-J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2140–2145.
- (9) Lee, H. S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2563–2568.
- (10) Goodner, K. L.; Rouseff, R. L.; Hofsommer, H. J. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1146–1150.
- (11) Kato, M.; Ikoma, Y.; Matsumoto, H.; Sugiura, M.; Hyodo, H.; Yano, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1–14.

- (12) Lee, H. S.; Coates, G. A. Characterization of color fade during frozen storage of red grapefruit juice concentrates. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3988–3991.
- (13) Hirschberg, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 210–218.
- (14) Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *385*, 4–12.
- (15) Isaacson, T.; Ronen, G.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* **2002**, *14*, 333–342.
- (16) Park, H.; Kreunen, S. S.; Cutriss, A. J.; DellaPenna, D.; Pogson, B. J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, promellar body formation and photomorphogenesis. *Plant Cell* **2002**, *14*, 321–332.
- (17) Cunningham, F. X.; Pogson, B.; Sun, Z.; McDonald, K. A.; DellaPenna, D.; Gantt, E. Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **1996**, *8*, 1613–1626.
- (18) Ikoma, Y.; Komatsu, A.; Kita, M.; Ogawa, K.; Omura, M.; Yano, M.; Moriguchi, T. Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* **2001**, *111*, 232–238.
- (19) Rodrigo, M.-J.; Marcos, J. F.; Zacarias, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6724–6731.
- (20) Rodrigo, M.-J.; Marcos, J. F.; Alferez, F.; Mallent, M. D.; Zacarias, L. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J. Exp. Bot.* **2003**, *54*, 727–738.
- (21) Kim, I.-J.; Ko, K.-C.; Kim, C.-S.; Chung, W.-I. Isolation and characterization of cDNA encoding β -carotene hydroxylase in Citrus. *Plant Sci.* **2001**, *161*, 1005–1010.
- (22) Barret, H. C.; Rhodes, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* **1976**, *1*, 105–136.
- (23) Ollitrault, P.; Faure, X.; Normand, F. Citrus rootstocks characterization with dark and leaf isozymes: application for distinguishing nucellar from zygotic trees. In *VIIIth International Citrus Congress*; 1992; pp 13–36.
- (24) Herrero, R.; Asins, M. J.; Carbonell, E. A.; Navarro, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 1. Intraspecific and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* **1996**, *92*, 599–609.
- (25) Herrero, R.; Asins, M. J.; Pina, J. A.; Carbonell, E. A.; Navarro, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 2. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* **1997**, *93*, 1327–1334.
- (26) Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Cottin, R. La diversité des agrumes: structuration et exploitation par hybridation somatique. *C. R. Acad. Agric.* **2000**, *86*, 197–221.
- (27) Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; LaMalfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *100*, 1155–1166.
- (28) Webber, H. J. History and development of the citrus industry. In *The Citrus Industry. 1. History, World Distribution, Botany and Varieties*; Reuther, W., et al., Eds.; University of California Press: Berkeley, CA, 1967; pp 1–39.
- (29) Scora, R. W. On the history and origin of citrus. In 'Symposium on the biochemical systematics, genetics and origin of cultivated plants'. *Bull. Torrey Bot. Club* **1975**, *102*, 369–375.
- (30) Bain, J. M. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Bot.* **1958**, *6*, 1–24.
- (31) Samson, J. A. Citrus. In *Tropical Fruits*, 2nd ed.; Longman Group: Essex, U.K., 1986; pp 73–138.
- (32) Davies, F. S.; Albrigo, L. G. Citrus. In *Crop Production Science in Horticulture*; CAB International: Wallingford, U.K., 1994; pp 202–254.
- (33) Britton, G.; Liaanen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy*; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 1995.
- (34) Ronen, G.; Cohen, M.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene ϵ -cyclase is down-regulated during and is elevated in the mutant delta. *Plant J.* **1999**, *17*, 341–351.
- (35) Bouvier, F.; Keller, Y.; d'Harlingue, A.; Camara, B. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum*). *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1391*, 320–328.
- (36) Rouseff, R.; Raley, L. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2176–2181.

Received for review October 27, 2005. Revised manuscript received April 14, 2006. Accepted April 21, 2006. We thank the Collectivité Territoriale de Corse for granting this study.

JF0526644

RESUME : Les jus d'agrumes sont des aliments riches en phytonutriments antioxydants tels que la vitamine C, les polyphénols et particulièrement les caroténoïdes. Bien qu'il soit établi que ces micronutriments/microconstituants soient bénéfiques pour la santé humaine, leur teneurs dans les jus d'agrumes et leur absorption lors de la digestion restent encore mal connues. L'objectif général de cette étude a été d'identifier les déterminants principaux de la variabilité de la qualité nutritionnelle des agrumes associés aux caroténoïdes du fruit frais jusqu'à la biodisponibilité en tenant compte des facteurs génétiques, environnementaux et technologiques. Afin d'estimer la biodisponibilité *in vitro* des caroténoïdes (et en particulier de la β -cryptoxanthine sous forme libre ou ester) de jus d'agrumes sélectionnés, un modèle de digestion *in vitro* couplé à des cellules intestinales de type Caco-2 a été utilisé afin de mieux comprendre les mécanismes associés aux processus digestifs. Nos résultats montrent que la β -cryptoxanthine esterifiée est partiellement hydrolysée durant l'étape de digestion *in vitro*. La bioaccessibilité de la β -cryptoxanthine libre (soit le transfert micellaire) est plus élevée que celle du β -carotène et des formes esters. Par ailleurs, les résultats sur l'absorption entérocytaire ont montré que le β -carotène et la β -cryptoxanthine libre sont préférentiellement captés par les cellules Caco-2 (clone TC7) par rapport aux formes esterifiées. La dernière partie de ce travail a permis de mettre en évidence les interactions des flavanones contenues dans les agrumes, lesquelles semblent augmenter l'absorption des caroténoïdes par les cellules intestinales du modèle Caco-2.

TITLE : Evaluation of the nutritional quality of *Citrus* juices: *in vitro* estimation of carotenoid bioavailability

ABSTRACT : *Citrus* juices are a dietary source potentially rich in various antioxidant phytochemicals including vitamin C, polyphenols and carotenoids. Although, it is established that these compounds display health beneficial effects, their content in *Citrus* juices and their absorption during the digestion step remain still largely unknown. The general objective of the present study was to identify the main determinants of the variability in nutritional quality associated with carotenoids in fresh fruit and their bioavailability with respect to genetic, environmental and technological factors. In order to evaluate the bioavailability of carotenoid and particularly β -cryptoxanthin as free and ester forms from *Citrus* juices selected, an *in vitro* digestion model coupled to Caco-2 intestinal cells was used to understand mechanisms occurring during digestion process. Our results show that β -cryptoxanthin ester was partially hydrolysed during the *in vitro* digestion. The bioaccessibility (or the micellar transfer) of free β -cryptoxanthin was higher than that of β -carotene and ester forms. Moreover, results on intestinal absorption showed that β -carotene and free β -cryptoxanthin were preferentially uptaken by Caco-2 (TC7 clone) cells compared to the two ester forms. The last part of this work underlines *Citrus* flavanone interactions which can increase the carotenoid uptake by Caco-2 intestinal cells.

DISCIPLINE : Sciences

MOTS-CLES : *Citrus* juices, caroténoïdes, biodisponibilité, cellules Caco-2, digestion *in vitro*, flavanones.

ADRESSE DU LABORATOIRE : CIRAD-Persyst-UMR 95 TA-B95/16 34398 MONTPELLIER Cedex 5
