NNT/NL : 2023AIXM0360/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 27 octobre 2023 par

Lisa MORAND-LAFFARGUE

Bioaccumulation et biodisponibilité de vitamines liposolubles et de lutéine dans les larves de mouche soldat noire (*Hermetia Illucens*).

Discipline
Biologie santé

Spécialité
Pathologie vasculaire et nutrition

École doctorale
ED62-Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
C2VN-Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition
BioMiMetiC, Boulbon
INRAE
INSERM

Composition du jury

Sylvie AVALLONE SupAgro Montpellier	Rapporteuse
Erwan ENGEL UR 370 QuaPA, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Christine MORAND UMR 1019, Clermont-Ferrand	Présidente du jury
Jean-Michel LECERF Institut Pasteur, Lille	Examinateur
Patrick BOREL C2VN, Marseille	Directeur de thèse
Damien SABATIER BioMiMetiC, Boulbon	Invité

Affidavit

Je soussignée, Lisa MORAND-LAFFARGUE, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Patrick BOREL, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 10 juin 2023

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et/ou brevets et participation à des conférences

Liste des publications et/ou brevet réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. P. Borel, F. Hammaz, **L. Morand-Laffargue**, B. Creton, C. Halimi, D. Sabatier, C. Desmarchelier (2021), Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste as a sustainable dietary source of provitamin A carotenoids, *Food Chemistry*, volume 359, 129911

2. **L. Morand-Laffargue,** S. Delbecq, B. Creton, D. Sabatier, M. Papin, C. Dhuique-Mayer, P. Borel (2023), Bioaccumulated provitamin A in black soldier fly larvae is bioavailable and capable of improving vitamin A status of gerbils, *Food Research International,* volume 171, 113064.

3. **L. Morand-Laffargue**, B. Creton, C. Halimi, D. Sabatier, C. Desmarchelier, P. Borel (2023), Black soldier fly larvae (Hermetia illucens) as a sustainable and concentrated source of bioavailable lutein for feed, *Journal of Insects as Food and Feed*.

4. **L. Morand-Laffargue**, D. Vairo, C. Halimi, E. Chiarello, B. Creton, D. Sabatier, P. Borel (2023), Ability of black soldier fly larvae to bioaccumulate tocopherols from different substrates and measurement of larval tocopherol bioavailability *in vitro*, *Journal of Insects as Food and Feed*.

5. P. Borel, **L. Morand-Laffargue**, D. Sabatier, F. Charles (2023). Brevet intitulé « Procédé d'obtention d'insectes riches en vitamine D_2 », déposé par INRAE en septembre 2023.

Liste des publications réalisées hors projet de thèse :

1. **L. Morand-Laffargue**, J. Hirschberg, C. Halimi, C. Desmarchelier, P. Borel (2023), The zeaxanthin present in a tomato line rich in this carotenoid is as bioavailable as that present in the food sources richest in this xanthophyll, *Food Research International, 168*, 112751.

Participation à des conférences au cours de la période de thèse :

1. P. Borel, F. Hammaz, **L. Morand-Laffargue**, B. Creton, C. Halimi, D. Sabatier, C. Desmarchelier, Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste

as a sustainable dietary source of provitamin A carotenoids, **Poster**, Journée Francophone de Nutrition, 10-12/11/21, Lille, France.

2. **L. Morand-Laffargue**, D. Vairo, C. Halimi, E. Chiarello, B. Creton, D. Sabatier, P. Borel, Bioavailability of vitamin E in black soldier fly (*Hermetia Illucens*) larvae reared on substrates rich in this vitamin, **Présentation orale (en visioconférence)**, Congrès International Scientifique « Vitamines, Oligoéléments et Xénobiotiques Métalliques en Santé Humaine. », 19-20/05/22, Marrakech, Maroc.

3. **L. Morand-Laffargue**, D. Sabatier., B. Creton, C. Halimi, P. Borel, Lutein bioaccumulation and bioavailability in the black soldier fly larvae, **Présentation orale**, Insects to Feed the World (IFW), 12-16/06/22, Québec, Canada.
   Obtention du prix d'excellence, décerné par l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels de l'Université Laval.

4. **L. Morand-Laffargue**, D. Sabatier, B. Creton, C. Halimi, Hammaz F., C. Desmarchelier., P. Borel, Bioaccumulation et bioaccessibilité de différents caroténoïdes dans les larves de mouche soldat noire, **Présentation orale**, Symposium Tersys Implanteus, 5-6/07/22, Avignon, France.

5. **L. Morand-Laffargue**, D. Vairo, C. Halimi, E. Chiarello, B. Creton, D. Sabatier, P. Borel, Bioavailability of vitamin E in black soldier fly (*Hermetia Illucens*) larvae reared on substrates rich in this vitamin, **Poster**, Journée Francophone de Nutrition, 16-18/11/22, Toulouse, France.

6. **L. Morand-Laffargue,** S. Delbecq, B. Creton, D. Sabatier, M. Papin, C. Dhuique-Mayer, P. Borel (2023), Bioaccumulated provitamin A in black soldier fly larvae is bioavailable and capable of improving vitamin A status of gerbils*,* **Poster**, Symposium Tersys Implanteus 2, 15/07/23, Avignon, France

Résumé

La forte croissance démographique, la diminution des ressources naturelles, sans oublier le dérèglement climatique, poussent l'industrie agroalimentaire à proposer de nouvelles alternatives durables à la production d'aliments pour l'Homme et les animaux d'élevage. Les insectes pourraient devenir l'une de ces alternatives, notamment la mouche soldat noire (*Hermetia Illucens*) dont les larves peuvent par exemple se développer sur une très grande variété de co-produits végétaux de l'industrie agroalimentaire. Ceux-ci peuvent être riches en vitamines et caroténoïdes et pourraient être utilisés en tant que substrat d'élevage afin d'enrichir les larves en ces composés et les valoriser. Le premier objectif était de quantifier la bioaccumulation de vitamines liposolubles (provitamine A et vitamine E) et de lutéine dans les larves de mouche soldat noire (LMSN). Dans un second temps, l'objectif était d'estimer la biodisponibilité des micronutriments bioaccumulés dans les LMSN car celle-ci est un facteur clé pour estimer l'apport réel en micronutriments d'un aliment. La biodisponibilité a été estimée grâce à une méthode de digestion *in vitro*, couplée à un modèle de culture cellulaire intestinale Caco-2. Selon les substrats et les micronutriments, la quantité de micronutriments biodisponible dans les LMSN pouvait être plus importante que celle mesurée dans les substrats. Pour compléter ces résultats, une étude menée chez un animal modèle, la gerbille, a montré que le β-carotène bioaccumulé dans les LMSN était biodisponible et capable d'améliorer un statut déficient en vitamine A. Nous avons enfin mis au point une méthode visant à obtenir des LMSN riches en vitamine D_2 en leur faisant bioaccumuler de l'ergostérol puis en les exposant à des UVB. Ces travaux ont permis de démontrer que, en plus d'être une source reconnue de protéines et de lipides, les LMSN pourraient aussi être des sources de provitamine A, de vitamine E et de vitamine D, qui plus est durables, pour l'alimentation animale et, indirectement, pour l'alimentation humaine.

Mots clés : vitamines, caroténoïdes, insectes, bioaccumulation, biodisponibilité, alimentation animale, alimentation humaine.

Abstract

Strong population growth, decreasing natural resources and climate change are urging the food industry to provide new sustainable alternatives for food and feed. Insects could become one of these alternatives, in particular the black soldier fly (*Hermetia Illucens*) whose larvae can develop on a very wide variety of plant co-products from the agri-food industry. These can be rich in vitamins and carotenoids, and could be used as rearing substrates to enrich larvae with these compounds and enhance their value. The first objective of this thesis was to quantify the bioaccumulation of fat-soluble vitamins (provitamin A and vitamin E) and lutein in black soldier fly larvae (BSFL). The second objective was to estimate the bioavailability of micronutrients bioaccumulated in BSFL, as bioavailability is a key factor in estimating the actual micronutrient intake of a food. Bioavailability was estimated using an *in-vitro* digestion method, coupled with a Caco-2 intestinal cell culture model. Depending on the substrates, the final quantity of micronutrients provided by BSFL could be greater than that provided by the substrates. To complete these results, a study conducted on an animal model, the gerbil, showed that β-carotene bioaccumulated in BSFL was bioavailable and capable of improving vitamin A deficiency status. Finally, we developed a method to obtain vitamin D_2-rich BSFL by bioaccumulating ergosterol in the BSFL and then exposing them to UVB light. This work has shown that, in addition to being a recognized source of proteins and lipids, BSFL could also be sustainable sources of provitamin A, vitamin E and vitamin D for animal feed and, indirectly, for human consumption.

Key words: vitamins, carotenoids, insects, bioaccumulation, bioavailability, animal feed, human food.

Financement

Cette thèse a été financée par la **région Sud Provence Alpes Côte d'Azur** en partenariat avec l'entreprise **BioMiMetiC** (Boulbon, France).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma sincère gratitude au Dr. **Sylvie Avallone** et au Dr. **Erwan Engel** pour leur contribution précieuse en tant que rapporteurs de ma thèse. Je vous suis reconnaissante d'avoir consacré du temps et de l'attention à l'évaluation de mon manuscrit.

Je tiens également à remercier le Dr. **Jean-Michel Lecerf** et le Dr. **Christine Morand** de m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance de thèse.

Je remercie également le Pr. **Marie-Christine Alessi**, directrice de l'UMR C2VN de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je voudrais remercier la **Société française de nutrition** (SFN), de m'avoir permis d'aller présenter mes travaux dans un congrès international au Québec.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, le Dr. **Patrick Borel**, pour son encadrement et ses conseils précieux. Tes connaissances approfondies, ton engagement envers mes travaux ont été une source d'inspiration et m'ont poussée à donner le meilleur de moi-même. Ces trois dernières années ont été intenses mais extrêmement enrichissantes. Je te suis très reconnaissante de la confiance que tu m'as témoignée en me permettant de mener mes recherches avec une certaine liberté, ce qui m'a permis de gagner en autonomie. Merci de m'avoir transmis ta passion pour le monde des insectes, qui je l'espère sera le mien dans un futur proche.

J'adresse également mes remerciements au Dr. **Emmanuelle Reboul**, pour ses conseils et sa gentillesse envers moi tout au long de cette thèse.

Mes remerciements vont également à **Charlotte Halimi** et **Donato Vairo**, respectivement experts CLHP et culture cellulaire, qui ont solutionné de nombreux problèmes techniques. Sans vous, ma thèse aurait été beaucoup plus stressante. Merci encore à toi Charlotte pour ton soutien moral dans les moments difficiles !

J'adresse mes remerciements au Dr. **Sana Raouche** pour sa gentillesse et ses précieux conseils. Merci de m'avoir soutenue !

Je tiens aussi à remercier **Damien Sabatier**, fondateur de l'entreprise BioMiMetiC pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir le fabuleux monde de l'élevage d'insectes. Merci à toi **Benjamin Creton**, pour ta gentillesse et tes conseils précieux d'expert des insectes. Je n'oublierai pas ta bonne humeur, même lorsqu'il fallait couper des kilos et kilos de substrats à 8h du matin dans le froid !

J'adresse aussi mes remerciements au Dr. **Florence Charles** pour sa douceur, sa gentillesse et ses conseils.

J'aimerais aussi remercier les doctorants de mon équipe, qui n'ont rendu que plus belle cette expérience : **Angela, Mark, Marie, Lorrine, Thomas P., Tiffany, Asma, Katherine, Léa, Claire**, mais aussi tout le personnel de l'équipe 1 du C2VN. Je voudrais tout particulièrement remercier **Batoul Hamieh**, ma camarade de thèse et amie, qui m'a soutenue durant toute cette thèse, même dans des moments difficiles. J'espère que nous irons manger un fattouch au Liban toutes les deux !

Je tenais à remercier des collègues que j'ai pu cotoyé durant cette thèse : **Gregory, Guillian, Thomas B., Elena**, qui m'ont donné des conseils et/ou aidée.

Un énorme merci à mes ami(e)s **Ando, William, JM, Pauline, Nora, Léa, Marion,** etc. qui suivent mon évolution de près ou de loin depuis très longtemps.

Je voudrais remercier particulièrement **Flavien Garcia** qui a été là pour moi à chaque moment de doutes. Merci de m'avoir soutenue (et supportée) pendant toute cette thèse, je t'en suis éternellement reconnaissante.

Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à toute ma famille et en particulier à mes grands-parents **Thérèse et Louis** mais aussi à mes parents **Patricia et Joël**, pour leur soutien indéfectible tout au long de ces trois ans, même à 8800 km de distance. Merci de m'avoir couvert d'amour et d'accras lorsque je rentrais à la maison.

“God in his wisdom made the ***fly***. And then forgot to tell us why.”

~ Ogden Nash ~

Liste des abbréviations

α-/β-car : α-/β-carotène
α-/γ-TOC : α-/γ-tocophérol
α-TTP : α-tocophérol transfer protein
1,25(OH)$_2$D : 1,25α-dihydroxyvitamine D
25(OH)D : 25-hydroxyvitamine D
AA : acide aminé
AAE : acide aminé essentiel
ABCA1 : ATP-binding cassette A1
ABCB1 : ATP-binding cassette transporter B1
ABCG1/G5/G8 : ATP-binding cassette transporter G1/G5/G8
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AG : acide gras
AGI : acide gras insaturé
AGMI : acide gras mono-insaturé
AGPI : acide gras poly-insaturé
AGS : acide gras saturé
BCO1/2 : β-carotène oxygénases 1/2
CEH : cholestérol ester hydrolase
CD36 : cluster of differentiation 36
CLHP : chromatographie liquide à haute performance
DBP : vitamin D-binding protein
DHA : acide docosahexaénoïque
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium
DMLA : dégénerescence maculaire liée à l'âge
EFSA : European Food Safety Authority
EPA : acide eicosapentaénoïque
ER : équivalents rétinol
ERO : espèces réactives de l'oxygène
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
HDL : high density lipoprotein
LMSN : larves de mouche soldat noire
LP : lipase pancréatique
LPL : lipoprotéine lipase
MCV : maladie cardiovasculaire
MSN : mouche soldat noire
NCP1L1: NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1
Ox-LDL: oxidized low-density lipoprotein
PBS: phosphate-buffered saline
proVA: provitamine A
PTH: parathormone
RBP: retinol binding protein
RXR : récepteur X des rétinoïdes
SR-B1 : scavenger receptor classe B type1
TAG : triacylglycérols
TRPV : transient receptor potential vanilloid
TTR : transthyrétine
VA : vitamine A
VD$_2$/VD$_3$: vitamine D$_2$/D$_3$
VE : vitamine E
VLDL : very low-density lipoprotein
VDR : vitamin D receptor
VDRE : vitamin D response element

Table des matières

Introduction 1

Synthèse bibliographique 4

1. *Hermetia Illucens*, la mouche soldat noire……5

1.1. Caractéristiques générales et cycle de vie 7

1.1.1. Histoire 7

1.1.2. Caractéristiques phénotypiques et comportementales 7

1.1.3. Cycle de vie 8

1.2. Composition nutritionnelle 9

1.2.1. Macronutriments 9

1.2.2. Micronutriments 17

1.3. Domestication, production et valorisation 22

1.3.1. Les caractéristiques de l'élevage 22

1.3.2. Les substrats utilisés pour l'élevage d'insectes 24

1.3.3. Les avantages environnementaux et socio-économiques de l'élevage d'insectes 25

1.3.4. Les risques potentiels de l'élevage et de la consommation d'insectes 27

1.3.5. Législation et utilisation dans le secteur de l'agroalimentaire 28

2. Vitamines liposolubles et caroténoïdes……..32

2.1. Les caroténoïdes provitaminiques A et la vitamine A 32

2.1.1 Structure et formes 32

2.1.2. Sources 33

2.1.3. Recommandations nutritionnelles 34

2.1.4 Métabolisme 35

2.1.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies 37

2.1.6. Applications industrielles 39

2.2. La lutéine 39

2.2.1 Structure 39

2.2.2. Sources 40

2.2.3. Recommandations nutritionnelles 40

2.2.4. Métabolisme 41

2.2.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies 42

2.2.6. Applications industrielles 44
2.3. La vitamine E 45
2.3.1 Structure et formes 45
2.3.2. Sources 46
2.3.3. Recommandations nutritionnelles 47
2.3.4. Métabolisme 48
2.3.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies 49
2.3.6. Applications industrielles 51
2.4. La vitamine D 51
2.4.1. Structure et formes 51
2.4.2. Sources 52
2.4.3. Recommandations nutritionnelles 53
2.4.4. Métabolisme 54
2.4.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies 56
2.4.6. Applications industrielles 59
3. Digestion et absorption intestinale des vitamines liposolubles et des caroténoïdes…60
3.1. Les différentes phases du processus de digestion 60
3.1.1. Phase salivaire : libération de la matrice alimentaire 60
3.1.2. Phase gastrique : transfert vers la phase huileuse 60
3.1.3. Phase duodénale : formation des micelles 61
3.2. Absorption intestinale via l'entérocyte 63
3.2.1 Captage par la cellule intestinale au pôle apical 63
3.2.2 Transport et métabolisme intra-entérocytaire 65
3.2.3 Sécrétion par la membrane basolatérale de l'entérocyte 66
3.2.4 Excrétion transintestinale des micronutriments liposolubles 67
3.3 Les facteurs influençant la biodisponibilité des micronutriments 69
3.3.1. Nature, modification chimique et quantité des micronutriments ingérés 69
3.3.2. Matrice alimentaire 70
3.3.3. Autres molécules modulant l'absorption 71
3.3.4. Facteurs humains 74
3.3.5. Interactions entre tous ces facteurs 75
Objectifs de la thèse 76
Matériels et méthodes 79
1. Matériels……..80
1.1. Produits chimiques 80

1.2. Aliments et substrats d'élevage 80
2. Obtention de larves riches en micronutriments……81
2.1. Élevage 81
2.2. Cas particulier : LMSN et substrats riches en vitamine D 84
3. Modélisation des digestions……86
3.1. Préparation des aliments et des échantillons destinés à la digestion *in vitro* 86
3.2. Simulation de la digestion des substrats d'élevage et des LMSN 86
3.3. Calcul de la bioaccessibilité 87
4. Expérimentations sur cellules……88
4.1. Culture cellulaire 88
4.2. Test de cytotoxicité au MTT 88
4.3. Etude du captage intestinal par les cellules Caco-2 TC7 89
4.4. Calcul de l'efficacité d'absorption intestinale 89
5. Expérimentation animale……...90
5.1. Les animaux 90
5.2. Comité éthique 90
5.3. Régimes alimentaires 90
5.4. Schéma expérimental 91
6. Extraction des vitamines et caroténoïdes et quantification par chromatographie liquide à haute performance……...92
6.1. Préparation des échantillons 92
6.2. Extraction des vitamines et caroténoïdes 92
6.3. Quantification des vitamines et caroténoïdes 92
6.3.1. Caroténoïdes provitaminiques A et lutéine 92
6.3.2. Rétinol, esters de rétinol et β-carotène 93
6.3.3. La vitamine E 94
6.3.4. L'ergostérol et la vitamine D 94
7. Analyse statistique……..95
Résultats 96
Chapitre 1 : Bioaccumulation et biodisponibilité de caroténoïdes provitaminiques A dans les larves de mouche soldat noire……..97
Chapitre 2 : Bioaccumulation, bioaccessibilité et efficacité d'absorption intestinale de la lutéine dans les larves de mouche soldat noire…….117
Chapitre 3 : Bioaccumulation, bioaccessibilité et efficacité d'absorption intestinale de la vitamine E dans les larves de mouche soldat noire…….134

Chapitre 4 : Optimisation de la teneur en vitamine D_2 de larves de mouche soldat noire après élevage sur un substrat riche en ergostérol et exposition à des UVB…….153

Discussion générale 160

1. Bioaccumulation des vitamines liposolubles et de la lutéine dans les LMSN**…….**161
2. Biodisponibilité des vitamines liposolubles et de la lutéine provenant des LMSN…….170
3. Intérêt de l'enrichissement en micronutriments des LMSN pour la nutrition animale….175
4. Intérêt de l'enrichissement en micronutriments des LMSN pour la nutrition humaine…177
5. Intérêt des LMSN pour recycler des micronutriments de déchets végétaux……..178

Conclusion et perspectives..... 179

Bibliographie 184

Annexe..... 227

Liste des figures

Figure 1 : Avantages des insectes 6
Figure 2 : Vue latérale d'une mouche soldat noire adulte (*Hermetia Illucens*) 8
Figure 3 : Cycle de vie de la mouche soldat noire (*Hermetia Illucens*) 9
Figure 4 : Caractéristiques d'un élevage de mouches soldat noire 23
Figure 5 : Structure chimique de différentes formes de vitamine A 33
Figure 6 : Absorption, métabolisme hépatique et transport sanguin des rétinoïdes 36
Figure 7: Rôle du 11-cis-rétinal dans la vision 37
Figure 8 : Structures chimiques de la lutéine et de la zéaxanthine 39
Figure 9 : Métabolisme de la lutéine et des caroténoïdes en général 42
Figure 10 : Mécanismes bénéfiques supposés d'une supplémentation en lutéine sur les maladies cardiovasculaires 44
Figure 11 : Structure chimique des tocophérols, tocotriénols et de leurs isoformes 45
Figure 12 : Absorption, transport, sécrétion, métabolisme et excrétion de la vitamine E . 49
Figure 13 : Structure des vitamines D_2 et D_3 et de leurs précurseurs 52
Figure 14 : Métabolisme de la vitamine D 55
Figure 15 : Effet de la $1,25(OH)_2D$ sur le maintien de l'homéostasie phosphocalcique 57
Figure 16 : Devenir des lipides dans l'estomac et l'intestin grêle 62
Figure 17 : Anatomie de l'intestin grêle 64
Figure 18 : Voies d'absorption et de sécrétion des vitamines A, D et E, de la lutéine et du β-carotène à travers l'entérocyte 67
Figure 19 : Acteurs possiblement impliqués dans l'excrétion transintestinale du cholestérol 68
Figure 20 : Phase d'ensemencement des œufs de mouche soldat noire 81
Figure 21 : Plateaux d'élevage de LMSN dans un larvarium 82
Figure 22 : Tamisage des LMSN 83
Figure 23 : Etapes de la digestion *in vitro* 87
Figure 24 : Schéma de l'expérimentation de captage intestinal par les cellules Caco-2 89
Figure 25 : Concentration en vitamine D_2 dans les champignons selon la dose d'exposition aux UVB 154
Figure 26 : Concentration en vitamine D_2 dans des LMSN selon la durée d'exposition aux UVB 155
Figure 27 : Concentration en vitamine D_2 dans des LMSN selon le moment d'exposition aux UVB 156

Figure 28 : Concentration en vitamine D_2 dans des champignons et des LMSN exposés à des doses optimales d'UVB 158
Figure 29 : Récapitulatif de certaines données obtenues durant cette thèse 181

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quantité de matière sèche, de cendres totales, de macronutriments et de chitine dans les LMSN 10

Tableau 2 : Composition en AAE des LMSN en fonction de différents substrats d'élevage 12

Tableau 3 : Composition en AG des LMSN en fonction de différents substrats d'élevage.14

Tableau 4 : Concentration en cholestérol et en stérols totaux des LMSN en fonction de différents substrats d'élevage 16

Tableau 5 : Concentrations de minéraux et d'oligo-éléments dans les LMSN 19

Tableau 6 : Concentrations de vitamines et de caroténoïdes dans les LMSN 21

Tableau 7 : Règlementation en vigueur en 2022 dans les pays de l'UE concernant l'utilisation d'insectes pour l'alimentation animale 30

Tableau 8 : Dix des sources les plus riches en vitamine A 34

Tableau 9 : Dix des sources les plus riches en lutéine 40

Tableau 10 : Concentration en α- et γ-tocophérol d'aliments couramment consommés et riches en vitamine E 47

Tableau 11 : Dix des sources les plus riches en vitamine D 53

Tableau 12 : Concentration de vitamine D_2 dans des champignons exposés à différentes doses d'UVB 154

Tableau 13 : Corrélations entre les taux de bioaccumulation des phytomicronutriments étudiés dans les LMSN et différents paramètres, de composition ou de valeur énergétique, des substrats étudiés 166

Tableau 14 : Corrélations entre propriétés moléculaires des phytomicronutriments étudiés et concentrations en ces phytomicronutriments dans les LMSN 168

Introduction

Selon la FAO, d'ici 2050, la population mondiale pourrait augmenter jusqu'à atteindre les 9 milliards de personnes. Pour répondre aux besoins de cette population croissante, toujours selon la FAO, la production agricole mondiale devra augmenter de 70%. La demande de céréales au niveau mondial pourrait donc croître jusqu'à 3 milliards de tonnes, dont plus d'un tiers serait utilisé pour l'alimentation des animaux d'élevage. Cependant, l'industrie agroalimentaire est, entre autres, actuellement responsable d'environ un quart des émissions mondiales de gaz à effet de serre (*1*), imposant aux systèmes alimentaires des alternatives durables et éco-responsables.

Une de ces alternatives pourrait être l'utilisation d'insectes, d'abord pour l'alimentation animale, et directement et/ou indirectement pour l'alimentation humaine. On estime que 2 milliards de personnes dans le monde sont entomophages, c'est-à-dire consomment des insectes, notamment en Asie, Afrique et en Amérique latine (*2*). En plus d'être riches en protéines, leur élevage présente de nombreux avantages, notamment environnementaux. En effet, élever des insectes demande moins d'eau, de terres et émet moins de gaz à effet de serre que l'élevage des animaux traditionnellement consommés dans nos sociétés (bovins, porcins, volailles) (*3*). De plus, certains insectes, comme la larve de mouche soldat noire (LMSN), ont la capacité de se développer sur une très grande variété de substrats différents. La mouche soldat noire contribue à la création d'une économie circulaire car elle est capable de croître sur des co-produits végétaux de l'industrie agroalimentaire et sur des écarts de production des agriculteurs, dont des millions de tonnes sont jetées chaque année et de les convertir en protéines de haute qualité. Il est aussi possible de valoriser la chitine, les lipides et les micronutriments provenant des LMSN, tels que les caroténoïdes provitaminiques A (proVA) comme le β-carotène, mais aussi, la lutéine, et les vitamines E et D, comme décrit dans ce manuscrit.

Les vitamines et les caroténoïdes ne sont pas naturellement synthétisés par l'Homme et doivent être apportés par l'alimentation. Les vitamines liposolubles sont impliquées dans des fonctions biologiques très variées, allant des effets sur l'expression génique pour les vitamines A et D par exemple, à des effets antioxydants pour la vitamine E. Les caroténoïdes, quant à eux, sont des phytomicronutriments lipidiques qui ont aussi des effets biologiques : certains sont proVA, certains sont antioxydants. Les vitamines et certains caroténoïdes sont souvent utilisés dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'additifs, comme la lutéine qui colore la peau des poulets de chair en jaune ou la vitamine E qui sert d'antioxydant dans la conservation des viandes. Les vitamines sont aussi essentielles pour la bonne croissance et la santé des animaux d'élevage : de ce fait, leur alimentation est souvent enrichie en ces micronutriments.

La digestion de ces différents composés est liée à celle des lipides alimentaires. La biodisponibilité des micronutriments et des phytomicronutriments lipidiques dépend de

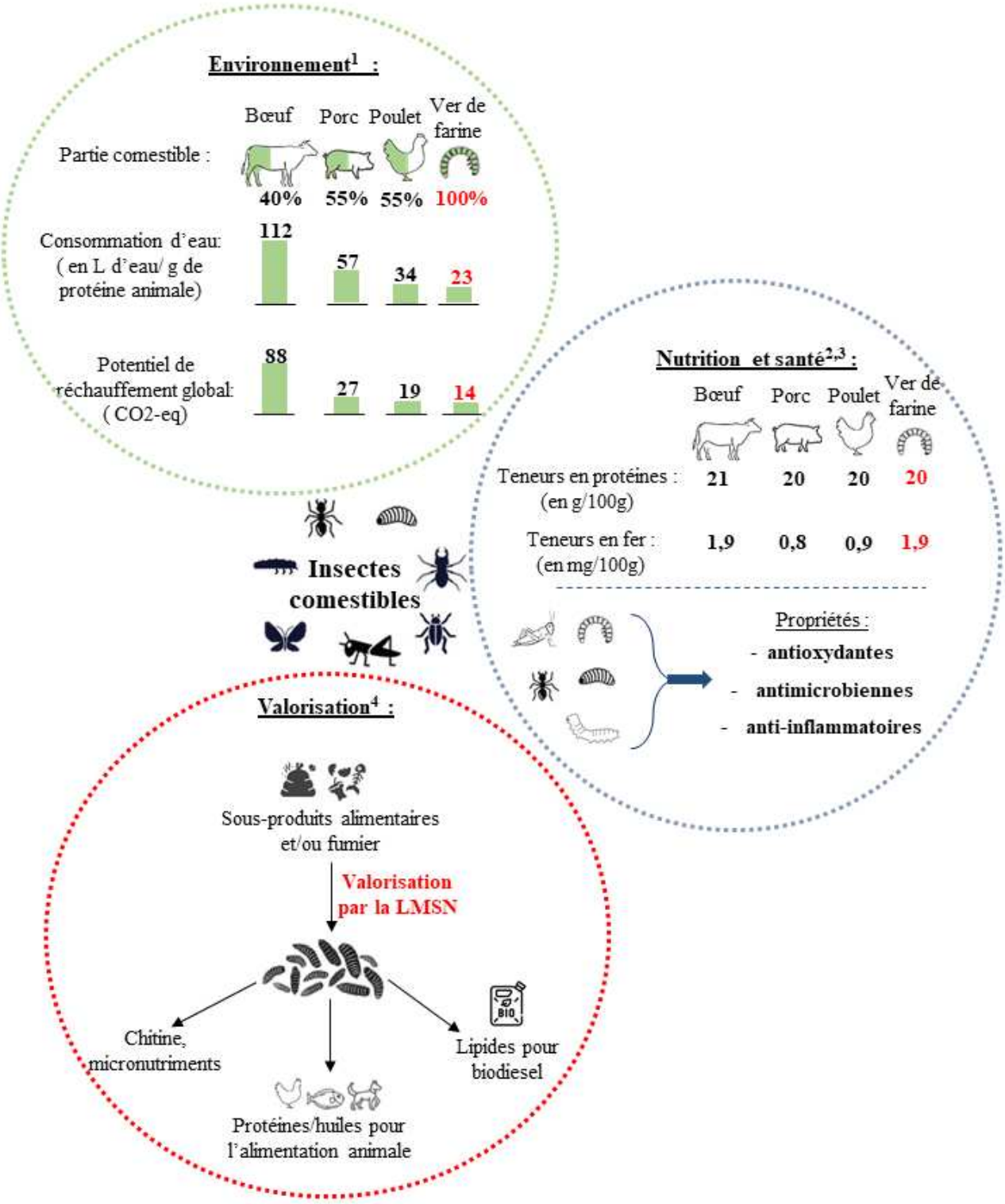
plusieurs facteurs, comme les propriétés physico-chimiques du micronutriment ou encore la matrice alimentaire dans laquelle ils sont contenus (*4*, *5*).

L'objectif de cette thèse était de déterminer si les LMSN peuvent être une bonne source de vitamines et de micronutriments lipidiques afin d'être potentiellement valorisées et utilisées pour enrichir l'alimentation des animaux d'élevage et donc, indirectement, notre alimentation. Pour cela, la bioaccumulation de ces molécules dans les LMSN a été mesurée et leur biodisponibilité dans la matrice substrat a été comparée à celle dans la matrice larve. Les résultats seront regroupés en quatre parties dans ce manuscrit. Dans une première partie, les résultats de bioaccumulation et de bioaccessibilité de caroténoïdes proVA dans les LMSN et ceux d'une étude *in-vivo* évaluant leur biodisponibilité, complétant la première étude, sont présentés. Dans une seconde et troisième partie, la bioaccumulation, la bioaccessibilité et l'absorption intestinale de la lutéine et de la vitamine E, à partir de substrats riches en ces composés, ont été évaluées. Enfin, dans une quatrième partie, seront présentés les résultats d'une étude visant à maximiser la teneur en vitamine D_2 de LMSN grâce à une bioaccumulation préalable d'ergostérol suivie d'une exposition à des UVB.

Synthèse bibliographique

1. *Hermetia Illucens*, la mouche soldat noire

Au total, plus de 2100 espèces d'insectes comestibles ont été répertoriées (*6*), la plupart en Amérique du Sud, en Afrique et en Asie. Les Coléoptères (scarabées) représentent environ 31% de ces insectes comestibles, suivis de 18% pour les Lépidoptères (chenilles) et 14% pour les Hyménoptères (abeilles, guêpes et fourmis). Le nombre de personnes entomophages dans le monde s'élève à près de 2 milliards (*2*). Cependant, dans les pays du monde occidental, la consommation d'insectes reste anecdotique, principalement en raison de leur image négative auprès des consommateurs. Ceux-ci présentent de multiples avantages, que ce soit nutritionnels ou environnementaux (**figure 1**). Les teneurs en nutriments des insectes varient fortement en fonction des espèces, du stade de croissance mais aussi des conditions de croissance. En termes de nutrition, les insectes ont le même profil que la viande : ils sont riches en protéines et en lipides, avec une faible teneur en glucides (*7*). Certains insectes sont aussi de bonnes sources de micronutriments comme le fer, le zinc, le magnésium, le manganèse, le phosphore ou encore le sélénium. En plus de représenter une alternative aux protéines traditionnelles animales, l'élevage d'insectes a un impact environnemental moindre comparé aux animaux d'élevage communs. La LMSN se démarque des autres insectes notamment du fait de sa capacité à être élevée sur une multitude de substrats végétaux, que ce soit des sous-produits alimentaires ou encore du fumier (*8*).



Sources : [1]Van Huis et al., 2013 ; [2]Payne et al., 2016 ; [3]Aguilar-Toalá et al., 2022 ; [4]Raksasat et al., 2020

Figure 1 : Avantages des insectes

1.1. Caractéristiques générales et cycle de vie

1.1.1. Histoire

Hermetia Illucens, appelée plus communément la mouche soldat noire (MSN), a été caractérisée pour la première fois par Linné en 1758. Probablement originaire d'Amérique (*9*), ce diptère a été introduit en Europe du Sud tout d'abord, avant d'être étendu en Europe de l'Ouest du fait de la Deuxième Guerre Mondiale (*10*).

Première fois signalée en Europe en 1926 et en France en 1951 (*11*), une étude archéo-entomologique a montré la présence de *H. illucens* dans le sarcophage de la princesse Isabella d'Aragon (1470-1524), datant de la Renaissance italienne (*12*). La découverte de l'Amérique par Christophe Colomb en 1492 aurait donc pu entraîner l'arrivée de la MSN en Europe.

Actuellement, *H. Illucens* est présente sur tous les continents.

1.1.2. Caractéristiques phénotypiques et comportementales

La MSN est un insecte appartenant à l'ordre des Diptères, ordre caractérisé par une seule paire d'ailes visibles et un appareil buccal adapté pour la succion. Elle fait partie de la famille des Stratiomydiae et de la sous-famille des Hermetiinae. La mouche adulte, de couleur noire, mesure de 13 à 20 mm de longueur et a une apparence similaire à celle des guêpes (**figure 2**) (*13*). Les mâles sont plus petits que les femelles et se distinguent par leur différence anatomique au niveau de leur dernier segment abdominal. Généralement, les adultes MSN se retrouvent en abondance près du fumier, de nourriture en décomposition ou d'animaux morts. Les émanations provenant de matière en décomposition attirent les femelles qui vont y déposer leurs œufs. Les mâles préfèrent quant à eux les endroits ensoleillés avec une végétation importante, pour lesquels ils sont fortement territoriaux en vue de l'accès à la reproduction (*14*). La copulation n'a lieu que 2 ou 3 jours après son évolution en mouche, celle-ci n'ayant qu'une très courte vie au stade adulte (5 à 8 jours). A la suite d'un vol nuptial, leur reproduction, exclusivement diurne, peut s'effectuer (*14*). La reproduction dépend de différents paramètres comme l'espace disponible, l'éclairage ou encore le moment de la journée (*15*). Deux jours sont nécessaires après l'acte de reproduction pour le développement et la ponte des œufs. Durant sa courte existence, la femelle MSN pondra approximativement 900 œufs, préférentiellement à côté ou au-dessus des substrats, et non à l'intérieur de ceux-ci, pour une meilleure chance de survie des œufs. Ils sont pondus sur des substrats secs dans un environnement humide pour limiter la perte de leur eau (*16*).

Figure 2 : Vue latérale d'une mouche soldat noire adulte (Hermetia Illucens)

1.1.3. Cycle de vie

Le cycle de vie de la MSN (**figure 3**) dépend de plusieurs paramètres : population (domestiquée ou sauvage), température, humidité, intensité de la lumière, qualité et quantité de substrat disponible… (*17*). La durée entre la ponte et l'éclosion est relativement longue comparée à celle d'autres insectes de l'ordre des Diptères : entre 102 et 105 heures. La jeune larve, vorace, va alors tomber sur le substrat et commencer à l'ingérer et le digérer très rapidement. En effet, elles peuvent réduire le poids initial des déchets organiques d'environ 50 % dans un délai plus court que le compostage classique (*18*). Les larves sont extrêmement robustes et peuvent résister à des conditions particulières de manque d'oxygène (*16*). A leur éclosion, elles mesurent moins d'1 mm de longueur et peuvent atteindre 2,5 cm à 3,5 cm à leur maturité (*19*). La croissance d'*Hermetia illucens* passe par 5 stades : œuf, larve, prépupe, pupe et adulte. La phase larvaire dure approximativement 15 jours. Le passage du stade larvaire à celui de prépupe se caractérise non seulement par un changement de couleur de la larve, passant du beige au marron foncé, mais aussi par une migration hors du substrat (*17*). En effet, en vue de la future pupation (transformation des larves des diptères en nymphes), la larve devenue prépupe migre de sa source de nourriture jusqu'à un lieu sec et protégé et devient immobile (*20*). Cette étape de pupation est une étape critique du cycle de vie des holométaboles (insectes passant de l'état de larve à l'état adulte via un stade de lymphe intermédiaire : pour la MSN, la pupe). En effet, la prédation, les parasites et le stress (causant une dessiccation) peuvent entraver le bon déroulement de la pupation (*21*). La maturation de la pupe jusqu'au stade final (mouche) peut durer deux semaines (dans des conditions idéales) mais si les conditions environnementales comme la température par exemple n'est pas optimale, cette durée peut s'étendre jusqu'à 4 mois (*16*).

La pupation s'effectue à l'intérieur de l'enveloppe larvaire. L'adulte ne prend que 5 minutes pour émerger de celle-ci (par ce qui était précédemment la tête de la pupe), sécher, ouvrir ses ailes et prendre son envol (*22*).

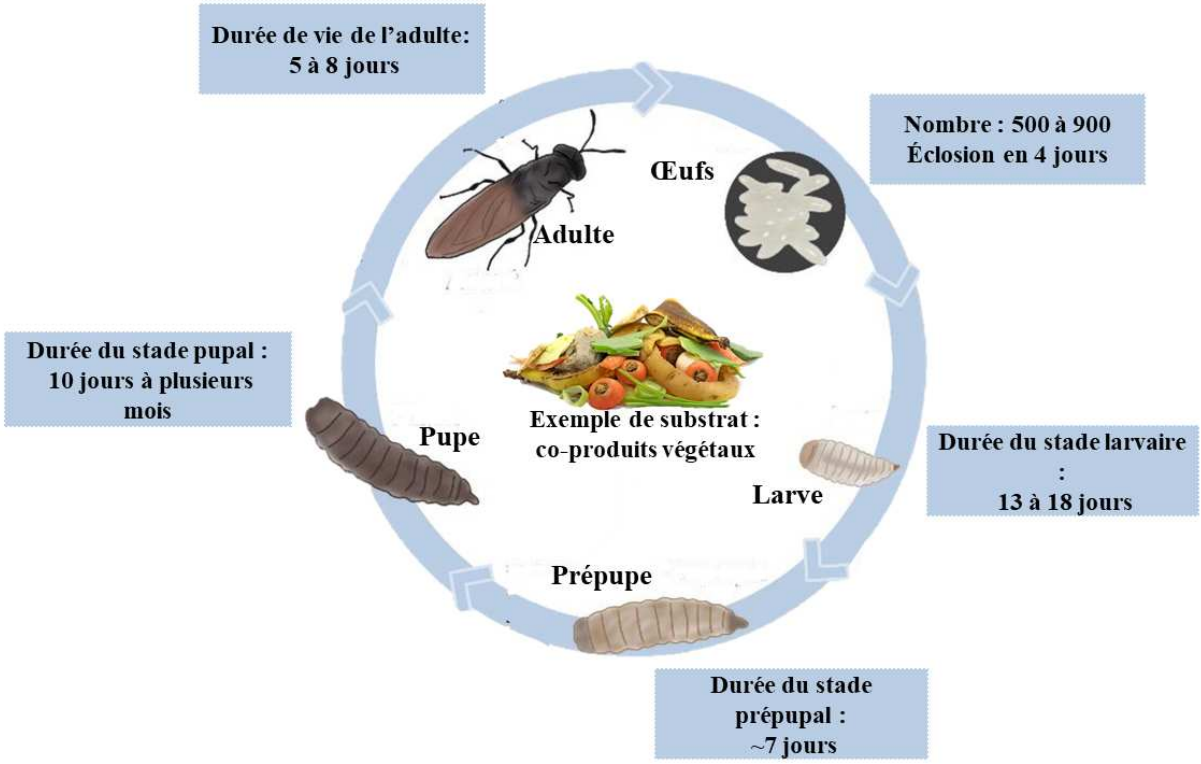


Figure 3 : Cycle de vie de la mouche soldat noire (*Hermetia Illucens*) (adapté de De Smet, 2018 et de Kim *et al.*, 2021 (*23*, *24*))

1.2. Composition nutritionnelle

La composition nutritionnelle des insectes comestibles est très variable. En effet, celle-ci varie en fonction de l'espèce, du stade de développement des insectes, de leur habitat, de leur environnement et de leur alimentation (*19*). Les insectes sont d'importantes sources de nutriments pour les humains et pour de nombreuses espèces animales. La majorité des insectes comestibles apportent suffisamment d'énergie et de protéines dans l'alimentation humaine (*25*). Les insectes sont aussi riches en acides gras mono- et polyinsaturés, en plus de contenir des quantités importantes de minéraux et d'oligo-éléments, comme le cuivre, le fer, le manganèse, le phosphore, le magnésium, le sélénium ou le zinc. De plus, dans certains cas, ils peuvent être riches en certaines vitamines et phytomicronutriments.

1.2.1. Macronutriments

Les macronutriments désignent les éléments organiques présents dans les aliments et nécessaires à la vie de l'organisme en apportant de l'énergie sous forme de calories. Ils regroupent les protéines, les glucides et les lipides. Le **tableau 1** regroupe les quantités des différents macronutriments présents dans les LMSN selon le substrat utilisé pour leur élevage.

Tableau 1 : Quantité de matière sèche, de cendres totales, de macronutriments et de chitine dans les LMSN

	Substrat d'élevage	Valeur*	Référence
Matière sèche (en %)	Poisson	27,0 ± 2,1	Ewald *et al*., 2020 (*26*)
	Déchets alimentaires ménagers	33,0 ± 1,3	
		37,0 ± 0,6	Fitriana *et al*., 2021 (*27*)
	Algues brunes	23,1 ± 0,8	Liland *et al*., 2017 (*28*)
	Drêches de brasserie	35,6	Galassi *et al*., 2021 (*29*)
		34,1 ± 0,2	Campbell *et al*., 2020 (*30*)
Cendres totales	Poisson	16,3 ± 1,8	Ewald *et al*., 2020 (*26*)
	Déchets alimentaires ménagers	18,7 ± 1,4	
		2,7	Spranghers *et al*., 2017 (*31*)
		6,7 ± 1,1	Fitriana *et al*., 2021 (*27*)
	Drêches de brasserie	7,7	Galassi *et al*., 2021 (*29*)
		5,4 ± 0,2	Campbell *et al*., 2020 (*30*)
		5,7	Liu *et al*., 2018 (*32*)
	Fruits et légumes	5,3	Rawski *et al*., 2020 (*33*)
	Aliment pour volailles	8,3	Liu *et al*., 2017 (*34*)
Protéines	Poisson	52,6 ± 2,2	Ewald *et al*., 2020 (*26*)
	Déchets alimentaires ménagers	36,6 ± 0,3	
		43,1	Spranghers *et al*., 2017 (*31*)
		43,9 ± 8,7	Fitriana *et al*., 2021 (*27*)
	Fruits et légumes	35,0	Rawski *et al*., 2020 (*33*)
	Déchets végétaux	32,5	Ravi *et al*., 2020 (*35*)
	Drêches de brasserie	49,9	Liu *et al*., 2018 (*32*)
		49,1 ± 0,5	Campbell *et al*., 2020 (*30*)
		52,5	Galassi *et al*., 2021 (*29*)
Lipides	Aliment pour volailles	28,4	Liu *et al*., 2017 (*34*)
	Drêches de brasserie	33,7	Liu *et al*., 2018 (*32*)
		33,2	Chia *et al*., 2020 (*36*)
	Fruits et légumes	29,8	Rawski *et al*., 2020 (*33*)
	Déchets alimentaires ménagers	40,7 ± 2,3	Ewald *et al*., 2020 (*26*)
	Déchets végétaux	37,5	Ravi *et al*., 2020 (*35*)
Glucides	Déchets de cantine à base de riz	11,5	Ong *et al*., 2017 (*37*)
	Fruits et légumes	8,4	Cammack et Tomberlin*, 2017*
	Déchets végétaux	15	Ravi *et al*., 2020 (*35*)
	Céréales	39,8	Jucker *et al*., 2020 (*40*)
Chitine	Déchets de restaurant	6,7 ± 1,3	Spranghers *et al*., 2017 (*31*)
	Déchets végétaux	5.7 ± 1,8	
	Déchets de supermarché	3,8 – 6,3	Smets *et al*., 2020 (*41*)

*Données en % du poids sec ± écart-type (SD)

1.2.1.a. Protéines et acides aminés

Les protéines sont des éléments nutritifs importants des aliments contribuant à leurs propriétés physiques et gustatives. Ces macronutriments sont la source d'azote majoritaire de l'alimentation pour l'organisme, l'azote étant indispensable à la vie. Les protéines ont plusieurs rôles essentiels au niveau de l'organisme. En effet, les protéines participent au renouvellement des tissus musculaires, de la peau, de la matrice osseuse, etc. Elles ont aussi un rôle hormonal (exemple de l'insuline régulant la glycémie), ou encore enzymatique, etc.

La valeur nutritive des protéines dépend de plusieurs paramètres dont la quantité de protéines présentes et la nature des acides aminés (AA) présents (essentiels ou non essentiels). Un autre paramètre à prendre en compte est la digestibilité des protéines présentes dans l'aliment.

Selon plusieurs études, certains insectes comestibles contiennent plus de protéines que la viande : par exemple, le ver de farine (*Tenebrio Molitor*) contient 25% de protéines en poids frais, contre 17% pour de l'épaule de porc ou encore 21% pour de la poitrine de poulet (*42*, *43*). Chez les insectes, la teneur en protéines dépend de divers éléments. Tout d'abord, elle varie fortement en fonction des espèces (*44*), pouvant aller de 25 à 75% du poids sec (*19*). La teneur en protéines des insectes dépend aussi de leur stade de développement, comme par exemple chez la MSN (*34*) où la proportion de protéines présente dans les LMSN varie de 38% pour une larve âgée de douze jours à 46% pour une jeune pupe. La teneur en protéines varie aussi en fonction de l'alimentation fournie aux insectes, comme le montre le **tableau 1**. Par exemple, concernant les LMSN, leur teneur en protéines s'échelonne de 32,5 % pour celles élevées sur des sous-produits végétaux (*35*) à 52,5 % pour celles élevées sur des drêches de brasserie (*29*). En effet, plusieurs études ont montré que les LMSN élevées sur des drêches de brasserie contenaient une proportion importante de protéines (≈ 50%) (*29*, *30*, *34*).

Les AA sont l'unité de base constituant les protéines. De longueur variable, la chaîne d'AA définit la structure primaire de la protéine. Cette chaîne est capable de se replier, prendre une forme spécifique ou s'associer à d'autres protéines. Il existe de nombreux AA différents mais seulement vingt sont utilisés par l'organisme pour la fabrication des protéines. Parmi ces 20 AA, 11 sont fabriqués par le corps humain et les 9 restants, appelés acides aminés essentiels (AAE), doivent être apportés par l'alimentation car l'organisme est incapable de les synthétiser en quantité suffisante pour satisfaire ses besoins. Chez l'Homme, 8 AA sont qualifiés d'essentiels : phénylalanine, valine, thréonine, tryptophane, isoleucine, méthionine, leucine et lysine. L'histidine fait partie des AAE uniquement chez le nourrisson. Chez le porc, le poulet et la vache, l'arginine et les 9 AA cités précédemment sont des AAE (*45–47*). Le **tableau 2** représente les données recueillies de plusieurs études sur les quantités de ces AAE dans les LMSN selon leurs substrats d'élevage.

Tableau 2 : Composition en AAE des LMSN en fonction de différents substrats d'élevage

Références	Wang *et al*., 2020 (*48*)	Spranghers *et al*., 2017 (*31*)	Kawasaki *et al*., 2019 (*49*)	Campbell *et al*., 2020 (*30*)	Liu *et al*., 2017 (*34*)
Substrat d'élevage	Déchets alimentaires ménagers			Drêches de brasserie	Aliment pour volailles
Arginine*	20,9 ± 2,0	19,9	19,4	21,5	20,5 ± 0,1
Histidine	14,2 ± 1,1	13,8	13,2	13,3	31,6 ± 0,2
Isoleucine	18,4 ± 1,6	19,1	15,7	17,5	15,6 ± 0,1
Leucine	28,6 ± 2,4	30,6	25,9	27,8	27,1 ± 0,1
Lysine	24,0 ± 2,1	23,0	22,2	26,0	23,2 ± 0,2
Méthionine	8,0 ± 0,6	7,1	5,8	8,4	22,4 ± 0,2
Phénylalanine	18,1 ± 1,8	16,4	15,1	17,8	18,6 ± 0,1
Thréonine	19,1 ± 1,5	16,2	14,2	16,2	18,4 ± 0,1
Tryptophane	7,8 ± 0,7	5,4	5,3	6,0	NR
Valine	19,7 ± 1,8	28,2	22,5	24,1	18,7 ± 0,2

Données en $g.kg^{-1}$ de matière sèche ± erreur-type (SE)
NR=Non renseigné
*AAE pour les animaux d'élevage

Le profil en AA des insectes dépend de la nature de l'insecte, c'est-à-dire s'il subit une métamorphose incomplète (insectes hémimétaboles) ou une métamorphose complète (insectes holométaboles) (*19*). Contrairement aux hémimétaboles, les holométaboles comme la MSN ont un profil en AA différents selon leur stade de développement (larve, pupe, prépupe, etc.). Par définition, l'AA limitant est l'AAE dont la concentration dans la denrée est considérée comme insuffisante pour le besoin de l'être vivant. Pour les animaux d'élevage, les poissons et les humains (enfants et adultes), l'AAE limitant est la méthionine (*19*). Pour les animaux de compagnie, Do *et al.,* 2020 (*50*) ont montré que l'AA limitant dépendait du stade de développement des larves mais étaient le plus souvent le tryptophane, la thréonine et la méthionine. Les teneurs en AAE des LMSN dépassent les recommandations de l'OMS/FAO/UNU pour les besoins des adultes (*51*) donc les LMSN pourraient être considérées comme une source de protéines appropriée pour l'alimentation humaine. Les LMSN sont une source très intéressante de protéines pour l'alimentation animale car leur profil en AA est similaire à celui de la farine de poisson, largement utilisée pour nourrir les animaux d'élevage

(*52*). Cependant, pour déterminer la qualité protéique de la LMSN, il est aussi nécessaire de s'appuyer sur les données de digestibilité des protéines. Des interactions entre protéines et produits de l'oxydation des lipides peuvent par exemple entraîner une baisse de la digestibilité des protéines en réduisant l'accès des enzymes aux protéines. En effet, la digestibilité des protéines dans la LMSN séchée est de 48% comparée à 75% lorsque sa composition en lipides est réduite (*53*). La teneur en chitine des LMSN semble également influencer la digestibilité des protéines. En effet, la supplémentation en chitine dans l'alimentation des poissons est négativement corrélée avec la digestibilité des protéines (*54*). La digestibilité des AA peut être estimée grâce à la digestibilité iléale apparente. Elle est mesurée par la différence entre la quantité d'AA ingérée et celle récupérée dans le digesta de l'iléon. De Marco *et al.*, 2015 (*55*) ont montré que le coefficient de digestibilité iléale moyen des AA était de 0,6 pour les poulets nourris par des LMSN, le plus faible étant la méthionine (0,4) et le plus fort l'arginine (0,8). Les coefficients de digestibilité iléale de la larve sont similaires à ceux du soja, du maïs et du blé chez le poulet pour l'arginine, l'histidine, la leucine et la thréonine. Dans le cas de l'isoleucine, de la lysine, de la phénylalanine et de la valine, ces coefficients sont inférieurs chez la larve (*56*, *57*).

1.2.1.b. Lipides et acides gras

Les lipides sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau. Ils sont le macronutriment ayant la plus forte valeur énergétique. Ils jouent un rôle dans le stockage de l'énergie chez de nombreuses espèces animales : les lipides sont stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Certains lipides ont aussi un rôle structural : ainsi les phospholipides sont les composants principaux des membranes cellulaires. Les triglycérides et les phospholipides contiennent des acides gras (AG) qui sont apportés par l'alimentation ou sont synthétisés par l'organisme. Les AG, qui possèdent une chaîne hydrocarbonée, sont classés selon leur degré d'insaturation, c'est-à-dire leur nombre de doubles liaisons : les AG saturés (AGS, aucune double liaison), monoinsaturés (AGMI, une seule double liaison) et polyinsaturés (AGPI, ≥ 2 doubles liaisons). Les insectes comestibles contiennent généralement une forte proportion de lipides (*58*). En effet, selon la composition nutritionnelle des insectes, les lipides sont le deuxième macronutriment le plus abondant, après les protéines. Les teneurs en lipides varient au cours des différentes phases de leur cycle de vie : par exemple, les insectes holométaboles, comme les LMSN, ont tendance à être plus riches en lipides et moins riches en protéines au stade larvaire qu'au stade adulte. Les LMSN possèdent une structure capable d'accumuler les lipides dans leur corps sous forme de graisses, utilisées comme réserve d'énergie (*59*). Les LMSN sont même considérées comme une matière première durable pour la production de

lipides destinés aux biocarburants. Comme le **tableau 1** le montre, la teneur en lipides des LMSN est fortement influencée par le type de substrat. Celle-ci varie de 28,4 % si les LMSN sont élevées sur de l'aliment pour volailles (*34*) à 40,7% si élevées sur des déchets alimentaires ménagers (*26*).

Plusieurs données sur le profil en AG des LMSN sont présentées dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Composition en AG des LMSN en fonction de différents substrats d'élevage

Références	Wang *et al*., 2020 (*48*)	Spranghers *et al*., 2017 (*31*)	Ebeneezar *et al*., 2021 (*60*)	Ewald *et al*., 2020 (*26*)	Campbell *et al*., 2020 (*30*)	Liu *et al*., 2017 (*34*)
Substrat d'élevage	Déchets alimentaires ménagers			Poisson	Drêches de brasserie	Aliment pour volailles
C12 :0	56,2 ± 5,8	57,6	36,5	28,6	36,0	61,4 ± 0,1
C14 :0	9,3 ± 0,8	7,1	10,0	6,1	7,8	10,2 ± 0,1
C16 :0	10,3 ± 1,1	10,3	10,6	12,6	16,8	7,8 ± 0.1
C16 :1 (n-7)	2,4 ± 0,2	3,3	4,2	4,8	2,3	2,5 ± 0,1
C18 :0	1,9 ± 0,2	1,0	1,8	2,2	2,3	1,0 ± 0,0
C18 :1 (n-9)	7,1 ± 0,7	8,0	14,6	25,1	9,4	7,8 ± 0,1
C18 :2 (n-6)	10,3 ± 1,1	7,8	16,6	12,5	18,1	7,2 ± 0,1
C18 :3 (n-3)	NR	1,1	0,2	3,4	1,5	0,4 ± 0,0
Σ des AGS	**80,0**	**78,3**	**61,1**	**49,6**	**64,5**	**81,6**
Σ des AGMI	**9,4**	**12,0**	**21,1**	**31,8**	**12,3**	**10,6**
Σ des AGPI	**10,3**	**9,4**	**17,9**	**18,7**	**19,6**	**7,6**

Données en % d'AG totaux dans la matière sèche ± SE
AGS : Acides gras saturés/ AGMI : Acides gras monoinsaturés/AGPI : Acides gras polyinsaturés
NR= Non renseigné

Les AGS sont ceux trouvés en plus grande proportion (50%-82% des AG totaux selon le substrat), suivis par des AGMI (10-32%) et des AGPI (10-20%). Une des caractéristiques de la LMSN est sa teneur très importante en acide laurique (C12 :0). Même lorsque le substrat d'élevage ne contient que très peu d'acide laurique, la larve est riche en acide laurique (*31*).

Ainsi, la teneur en acide laurique de la larve ne dépend pas de la teneur en cet AG dans le substrat mais de sa teneur en glucides. En effet, les AGS sont produits par la fermentation bactérienne des glucides et l'acide laurique est biosynthétisé par plusieurs espèces d'insectes à partir des glucides de leur régime alimentaire (*61*). Cette quantité d'acide laurique est aussi influencée par le stade de développement de la MSN. Selon plusieurs études (*34*, *62*), elle représente une proportion plus élevée au stade prépupal. Parmi tous les AGS, l'acide laurique est celui qui contribue le moins à l'accumulation de graisses chez l'Homme (*63*). De plus, cet AG présente une forte activité antimicrobienne (*64–66*), tout comme l'acide myristique (*67*, *68*). L'acide laurique possède une faible activité antimicrobienne contre les bactéries lactiques commensales, mais une activité antimicrobienne élevée contre les *Bacteroides* et *Clostridium* pathogènes (*69*). L'acide laurique réduirait le nombre de *Campylobacter* chez les poulets de chair (*70*) , ce qui permettrait de moduler la santé intestinale d'animaux d'élevage.

Concernant les acides gras insaturés (AGI), selon les substrats, ils représentent 20 à 50% des AG totaux (**tableau 3**). L'acide oléique est l'AGMI le plus important dans les LMSN. Chez les animaux, les AGPI contribuent à diverses activités cellulaires telles que la physiologie et la signalisation cellulaire et jouent un rôle important dans la reproduction (*71*). L'acide linoléique est l'AGPI le plus abondant retrouvé dans les LMSN. Chez l'Homme et plusieurs espèces animales, c'est un AG indispensable, c'est-à-dire que l'organisme n'est pas capable de le synthétiser et il est donc nécessaire de l'apporter par l'alimentation (*71*). Les carences en AG indispensables, comme l'acide linoléique (18:2) ou encore linolénique (18:3) provoquent un certain nombre d'effets indésirables chez l'Homme, tels qu'un retard de croissance chez les nourrissons et les enfants, des problèmes de peau, une sensibilité accrue aux infections et une mauvaise cicatrisation des plaies (*72*). Chez l'animal, une étude a montré qu'en l'absence de ces AG indispensables, la croissance, l'apprentissage et l'activité visuelle sont altérés chez les rats et des troubles structurels et métaboliques sévères sont observés (*73*). Au vu de la teneur en acide linoléique des LMSN, une étude a montré qu'il était possible de remplacer une partie de l'huile de soja par de l'huile de LMSN pour l'alimentation de poules pondeuses et que cela n'affectait pas leur performance de ponte ni la qualité de leurs œufs (*74*). Cependant, l'inclusion de LMSN dans l'alimentation de poissons diminue la teneur en acide α-linolénique (C18:3), en acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5) et en acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6) dans les filets de poisson, sans toutefois affecter leur poids (*75*). Dans une autre étude, les teneurs en acide α-linolénique (C18:3) et en DHA dans la chair des poulets n'étaient pas significativement affectées par les inclusions alimentaires de LMSN et les teneurs en EPA ont été significativement augmentées à la suite de cette inclusion (*76*). Le DHA et l'EPA sont des

oméga-3, dont le précurseur est l'acide α-linolénique. Chez l'Homme, les oméga-3 jouent un rôle dans le développement du cerveau et la prévention de différentes pathologies, principalement les maladies cardiovasculaires (*77*). Une des solutions pour enrichir notre alimentation en AG oméga-3 est de nourrir les animaux que nous consommons avec une alimentation enrichie en AG oméga-3. Les LMSN accumulent des oméga-3 à partir des substrats sur lesquels elles sont élevées (*78–80*). Dans une autre étude, l'huile extraite de LMSN a augmenté le dépôt d'AG oméga-3 dans les muscles de carpes juvéniles (*81*). Cette possibilité d'enrichissement des LMSN en oméga-3 (avec des aliments végétaux contenant des oméga-3 tels que noix, des graines ou encore des légumes comme des choux de Bruxelles ou des avocats) représente un véritable avantage pour l'alimentation animale.

Concernant les stérols, le **tableau 4** montre que les teneurs en cholestérol et en stérols totaux des LMSN diffèrent selon le substrat. Ces résultats démontrent qu'il est possible de moduler la concentration en cholestérol des LMSN selon les besoins des animaux d'élevage. Une récente étude a montré que remplacer complètement l'huile de soja par de l'huile de LMSN dans l'alimentation de poulets de chair, réduisait leur taux de cholestérol plasmatique (*82*). Chez l'Homme, un excès de cholestérol favoriserait l'apparition de maladies cardiovasculaires (*83*, *84*). Les LMSN contiennent ≈ 40 mg/kg de cholestérol en poids frais (*28*), contre ≈ 600 mg/kg de cholestérol en poids frais pour la viande de bœuf, porc et poulet (*85*). La faible teneur en cholestérol des LMSN associée à des teneurs importantes de phytostérols rend la graisse des LMSN, préalablement élevées sur des substrats végétaux, légèrement plus saine que les autres graisses animales (*86*).

Tableau 4 : Concentration en cholestérol et en stérols totaux des LMSN en fonction de différents substrats d'élevage

Références	Boukid *et al*., 2021 (*87*)			Matthäus *et al*., 2019 (*51*)	Liland *et al*., 2017 (*28*)	
Substrat d'élevage	Abricots	Drêches de brasserie	Céréales			Algues brunes
Cholestérol	48,0 ± 8,0	225,0 ± 22,0	31,0 ± 4,0	19,0 ± 1,5	120,0	143,0
Stérols totaux	NR	NR	NR	3557 ± 97,7	1881,0	2386,0

Données en $mg.kg^{-1}$ de matière sèche ± SD

1.2.1.c. Glucides et fibres (dont chitine)

Selon le **tableau 1**, les LMSN contiennent de 8,4% (substrat : fruits et légumes) à 39,8% (substrat : céréales) de glucides. Les larves possèdent des intestins avec des symbioses microbiennes, capables de digérer différentes fibres alimentaires. Ainsi, les enzymes digestives de la LMSN sont capables d'hydrolyser la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (*59*, *88*). Le profil glucidique des différents substrats a un impact significatif sur la survie des larves, la réduction des déchets et l'efficacité de bioconversion des déchets. Par exemple, le xylane, composé principal de l'hemicellulose, réduit considérablement l'efficacité de conversion des déchets. Au contraire, les monosaccharides, les disaccharides et des additifs d'amidon ont peu d'effet sur l'efficacité de conversion des déchets (*89*). De plus, des pré-traitements chimiques ou microbiens du substrat peuvent dégrader les glucides complexes en formes plus disponibles pour la LMSN (*90*).

Les fibres sont notamment des polysaccharides présents dans la paroi des cellules végétales qui ne peuvent pas être entièrement digérés par les enzymes digestives synthétisées par l'Homme. D'autres polysaccharides sont aussi considérés comme des fibres car ils ne sont pas non plus digérés par les enzymes digestives humaines. C'est le cas notamment des amidons réticulés et de la chitine qui constitue l'exosquelette (cuticule) des insectes. La fermentation des fibres a lieu dans le côlon, grâce au microbiote intestinal qui va notamment les transformer en acides gras à chaînes courtes. Le **tableau 1** montre que, selon le substrat, la proportion de chitine dans les LMSN varie très peu, entre 3,8 et 6,7% (matière sèche). La teneur en chitine dans les LMSN peut varier selon le stade de développement de la MSN, et plus les adultes sont proches de la métamorphose, plus la teneur en fibres est élevée (*91*). Ainsi, la concentration de chitine varie de manière significative durant les différents stades de vie de la LMSN, et cela indépendamment du régime alimentaire (*35*).

1.2.2. Micronutriments

Les micronutriments (vitamines, minéraux et oligo-éléments) sont des composés présents dans l'alimentation qui sont essentiels mais dont l'organisme a besoin en petites quantités (de quelques grammes à quelques microgrammes en moyenne / j). Ainsi, une carence en l'un d'entre eux peut entraîner des troubles graves, voire mortels. Par exemple, la carence en vitamine A (VA) est la principale cause de cécité dans le monde et altère également la fonction immunitaire et la différenciation cellulaire (*92*). Ils ont de nombreuses fonctions, permettant notamment à l'organisme de produire des enzymes ou des hormones par exemple, nécessaires à une croissance et un développement normal. Les carences les plus courantes dans de

nombreux pays en développement sont les carences en fer, en VA et en iode et touchent plus particulièrement les enfants et les femmes enceintes.

1.2.2.a. Minéraux et oligo-éléments

Les minéraux (calcium, phosphore, magnésium, sodium, potassium et chlore) doivent être ingérés par l'homme à raison de quelques centaines de milligrammes à plusieurs grammes en moyenne par jour. Les oligo-éléments (le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, l'iode, le molybdène ou encore le fluor) doivent être apportés par l'alimentation à raison de quelques microgrammes à quelques milligrammes en moyenne par jour. Les insectes sont reconnus pour leur teneur élevée en minéraux, notamment en calcium, fer, zinc et magnésium. Si la teneur en minéraux des insectes est comparée à celle d'autres sources de protéines animales par exemple, la teneur en fer dans le ver de farine géant (*Zophobas morio*) est proche de celle de la viande de bœuf et supérieure à celle de la viande de porc et de poulet (*93*).

Le **tableau 5** montre que le calcium, le phosphore et le potassium sont les minéraux les plus abondants dans les LMSN et leurs concentrations diffèrent selon les substrats. La LMSN bioaccumule du calcium à partir de leurs substrats d'élevage, tout comme le fer, le magnésium ou encore le potassium (*28*). Le calcium est présent en quantités importantes dans les LMSN car celles-ci convertissent le calcium ingéré en carbonate de calcium, lui-même sécrété par l'hypoderme et recouvrant le tégument larvaire des LMSN (*13*). Pour comparaison, le lait de vache contient ≈ 1 g/kg de calcium en poids frais (*94*), contre ≈ 6 g/kg de calcium en poids frais dans des LMSN (*30*). Chez l'Homme et l'animal, le calcium est essentiel à l'activité musculaire, au renforcement des os, du squelette et des dents, à la contraction cardiaque ou encore à la transmission nerveuse (*95*). An *et al*., 2016 (*96*) ont montré que la qualité de la coquille d'œuf, mesurée par ses paramètres d'apparence, de solidité et d'épaisseur, a été améliorée par la teneur en calcium du régime alimentaire de poules pondeuses. Une étude a aussi montré que l'épaisseur de la coquille d'œuf de poules pondeuses était significativement plus importante chez les poules ayant consommé un régime alimentaire incorporant des prépupes que le groupe contrôle, sans prépupes (*49*).

Tableau 5 : Concentrations de minéraux et d'oligo-éléments dans les LMSN

Références	Wang *et al*., 2020 (*48*)	Spranghers *et al*., 2017 (*31*)	Ebeneezar *et al*., 2021 (*60*)	Campbell *et al*., 2020 (*30*)	Chia *et al*., 2020 (*36*)	Liu *et al*., 2017 (*34*)
Substrat d'élevage	Déchets alimentaires ménagers			Drêches de brasserie		Aliment pour volailles
Ca[a]	19,5 ± 1,6	1,2	22,9	18,5	20,7	29,0 ± 0,1
K[a]	6,2 ± 0,7	6,0	4,8	6,9	8,2	NR
P[a]	3,6 ± 0,4	4,1	5,5	4,4	10,5	3,5 ± 0,1
Mg[a]	2,7 ± 0,2	2,1	2,2	2,9	3,1	NR
Fe[b]	420,0 ± 40,0	110,0	270,0	150,0	240,0	2,0 ± 0,0
Mn[b]	130,0 ± 20,0	20,0	130,6	120,0	250,0	NR
Zn[b]	100,0 ± 20,0	70,0	69,0	110,0	190,0	0,6 ± 0,0

[a] en $g.kg^{-1}$ de matière sèche ± SE
[b] en $mg.kg^{-1}$ de matière sèche ± SE
NR = non renseigné

1.2.2.b. Vitamines

Les vitamines sont essentielles pour stimuler les processus métaboliques et renforcer les fonctions du système immunitaire et certains insectes peuvent en être une excellente source. Cependant, bien que l'on sache que les insectes peuvent contenir et bioaccumuler certaines vitamines, les données sont très parcellaires. Par exemple, leur capacité à bioaccumuler toutes les formes de proVA n'était pas connue. Avant ce projet de thèse, aucune donnée n'était disponible sur les différences ou similarités d'efficacité d'accumulation des vitamines présentes dans différents substrats, sur les concentrations maximales de vitamines que les LMSN peuvent atteindre ou encore sur la biodisponibilité des vitamines lorsqu'elles proviennent des LMSN.

Les vitamines ne sont généralement pas synthétisées dans les insectes (à l'exception de la vitamine D_3 (VD_3) par exemple chez certaines espèces (*97*)) mais ceux-ci peuvent être enrichis grâce à l'ingestion de substrats riches en vitamines (*98*). Les insectes sont généralement riches en riboflavine (vitamine B_2), en acide pantothénique (vitamine B_5) et en biotine (vitamine B_8). Les insectes de l'ordre des orthoptères (sauterelles, grillons, criquets) et des coléoptères (scarabées) sont également riches en acide folique (*99*). La vitamine B_{12} ne peut être obtenue qu'à partir d'aliments d'origine animale et des poudres de grillons en contiendraient environ 10 fois plus que la viande de bœuf (*100*). Cependant ces chiffres peuvent être surévalués du fait de la présence de pseudo-vitamine B_{12} dans les insectes, analogue structurel de la vitamine B_{12}

biologiquement inactif pour l'Homme (*101*). Concernant la VA, les rétinoïdes se trouvent uniquement dans les yeux composés des insectes, où ils sont synthétisés à partir de leur précurseur caroténoïde, ce qui explique que le rétinol soit rarement détecté dans les insectes entiers (*102*). De plus, Oonincx *et al.*, 2018 (*97*) ont montré que les criquets migrateurs, les grillons domestiques et les vers de farine peuvent synthétiser *de novo* de la VD_3 après exposition à des UVB. Les insectes issus d'élevages contiennent généralement de faibles niveaux de vitamine E (VE) par rapport aux insectes trouvés dans la nature. Cependant, les substrats d'élevage peuvent être choisis de manière à augmenter les quantités en VE des insectes (*28*, *103*, *104*). Ainsi, la richesse en vitamines des insectes comestibles dépend de l'espèce mais aussi des substrats utilisés pour l'élevage des insectes.

Comme le montre le **tableau 6**, peu de données sont disponibles concernant les vitamines retrouvées dans les LMSN. Comme de nombreux insectes, la LMSN contient plusieurs molécules du complexe de vitamines B, de grande importance pour la croissance et le métabolisme des animaux d'élevage (*105*). Si nous prenons l'exemple de la riboflavine ou vitamine B_2, les recommandations nutritionnelles chez la truie varient entre 2 et 4 mg de riboflavine par kilogramme d'aliment, pour une croissance et reproduction adéquates (*106*). Selon ces données et celles du **tableau 6**, il suffirait d'une inclusion de 1 à 2% de LMSN séchées dans 1 kg d'aliment pour atteindre ces valeurs. *Finke,* 2013 (*107*) a comparé les concentrations en vitamines chez les LMSN aux recommandations du Conseil national de la recherche des États-Unis (CNR) en matière de nutriments pour la croissance des rats de laboratoire sur une base énergétique. La LMSN apporterait entre 50 et 100% de la VE nécessaire à la croissance du rat. Concernant la VD_3, aucune preuve de synthèse *de novo* n'a été trouvée chez les LMSN (*97*). Enfin, comme précisé précédemment, chez les insectes, les rétinoïdes se trouvent uniquement dans leurs yeux composés, ce qui explique pourquoi les larves holométaboles comme les LMSN, qui n'ont pas d'yeux composés, ne contiennent que de très faibles niveaux de VA (*108*).

1.2.2.c. Caroténoïdes

Les animaux peuvent avoir la capacité de cliver les caroténoïdes, mais la plupart ne peuvent pas les synthétiser *de novo* (*109*). Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la coloration des insectes, sont indirectement impliqués dans la vision (après clivage en VA), servent d'antioxydants ou encore de signaux d'accouplement (*110*). Comme pour les vitamines, peu de données sont disponibles concernant les caroténoïdes dans les insectes, mais *Finke*, 2015 (*102*) a mis en évidence les faibles concentrations en β-carotène (β-car), lutéine et zéaxanthine

de criquets et de différentes espèces de vers. La plupart des caroténoïdes des insectes proviennent des substrats ingérés et sont bioaccumulés dans leur corps (*111*). C'est le cas de la LMSN qui bioaccumule des caroténoïdes, présents dans des substrats riches en ces micronutriments. Par exemple, suite à notre publication montrant que les LMSN peuvent bioaccumuler de fortes concentrations de caroténoïdes proVA (cf. 1er article de cette thèse publié en 2021, **publication n°1**), Leni *et al.*, 2022 (*112*) ont confirmé cette bioaccumulation de caroténoïdes et mis en évidence une corrélation positive entre la concentration de caroténoïdes totaux dans les sous-produits utilisés comme substrats d'élevage et celle des LMSN. Ces résultats (repris dans le **tableau 6**) indiquent que la concentration en un caroténoïde spécifique dans les LMSN peut être modulée en choisissant des substrats riches en ce caroténoïde, ce qui est intéressant pour l'enrichissement de la nourriture destinée aux animaux d'élevage.

Tableau 6 : Concentrations de vitamines et de caroténoïdes dans les LMSN

<table>
<tr><td>Références</td><td>Zulkifli et al., 2022 (105)[a]</td><td>Ebeneezar et al., 2021 (60)*</td><td>Nyakeri et al., 2017 (113)[b]</td><td>Finke, 2013 (107)[b]</td><td colspan="2">Leni et al., 2022 (112)[a]</td></tr>
<tr><td>Substrat d'élevage</td><td colspan="2">Déchets alimentaires</td><td>Mélange de déchets végétaux et de fumier</td><td>NR</td><td>Carottes</td><td>Tomates</td></tr>
<tr><td>Rétinol</td><td>NR</td><td>1,2</td><td>NR</td><td>< 0.3</td><td colspan="2" rowspan="6">NR</td></tr>
<tr><td>Vitamine B_1</td><td>19,8 – 20,0</td><td rowspan="3">NR</td><td>2,4</td><td>7 ,7</td></tr>
<tr><td>Vitamine B_2</td><td>50,0 – 247,4</td><td>22,0</td><td>16,2</td></tr>
<tr><td>Vitamine B_{12}</td><td>NR</td><td rowspan="3">NR</td><td>0,05</td></tr>
<tr><td>Vitamine C</td><td>2,2 – 3,7</td><td>< 10</td></tr>
<tr><td>Vitamine D_3</td><td rowspan="3">NR</td><td>0,2</td><td>0.0025</td></tr>
<tr><td>Vitamine E</td><td>86,1</td><td>13,0</td><td>6,2</td></tr>
<tr><td>α-carotène</td><td colspan="3" rowspan="4">NR</td><td>208,7 ± 31,0</td><td>ND</td></tr>
<tr><td>β-carotène</td><td>ND</td><td>193,4 ± 21,8</td><td>17,9 ± 1,1</td></tr>
<tr><td>Lutéine + Zéaxanthine</td><td rowspan="2">NR</td><td>20,1 ± 0,6</td><td>20,5 ± 0,6</td></tr>
<tr><td>Lycopène</td><td>ND</td><td>215,4 ± 15,4</td></tr>
</table>

[a] en mg. kg^{-1} de matière sèche ± SD

[b] en mg.kg^{-1} de poids frais
[*] données pour l'huile de LMSN
ND : non détecté ; NR : non renseigné

1.3. Domestication, production et valorisation

En plus d'être des organismes nutritionnellement intéressants, du fait de la quantité et qualité de leurs protéines, mais aussi de leurs teneurs élevées en micronutriments, les insectes présentent aussi des avantages environnementaux et socio-économiques. Leur taux de reproduction élevé, leur efficacité de conversion alimentaire et leur croissance rapide en font des candidats prometteurs pour le secteur de l'agroalimentaire. De plus, l'élevage d'insectes a une faible empreinte carbone, hydrique et écologique comparée à celle d'autres espèces animales traditionnellement consommées, ce qui est attractif d'un point de vue environnemental.

1.3.1. Les caractéristiques de l'élevage

La plupart des insectes comestibles sont récoltés dans la nature. Les insectes tels que le ver à soie et l'abeille à miel sont domestiqués depuis longtemps du fait des produits qu'ils fournissent. Les insectes peuvent être soit entièrement domestiqués et élevés en captivité, soit partiellement élevés en captivité, en modifiant l'environnement de l'insecte pour augmenter la production, en essayant de reproduire un milieu de vie le plus proche possible de leur habitat naturel. Afin d'être produite à grande échelle, l'espèce d'insecte doit se développer rapidement dans des conditions environnementales faciles à maintenir et pouvoir se nourrir de substrats abondants et bon marché (*114*). Selon l'espèce d'insectes, les conditions d'élevage les plus appropriées pour la croissance diffèrent.

L'élevage des LMSN est considéré comme aisé à mettre en place. Il se déroule dans deux lieux distincts : d'abord, l'insectarium (**figure 4A**) consacré à la production d'adultes et d'œufs où les mouches, adultes, sont élevées et un deuxième lieu d'élevage, le larvarium (**figure 4B**), séparé du premier, consacré à la croissance et au grossissement des larves. Ces deux lieux sont séparés pour optimiser la collecte des œufs, sinon les femelles adultes seraient fortement attirées par les substrats de production et pondraient leurs œufs de manière anarchique (*17*).
Après l'accouplement, la femelle pond ses œufs en rangs serrés (**figure 4C**), dans des interstices (cachés des prédateurs), à proximité d'œufs d'autres individus et d'une source de nourriture humide (*13*). Les mouches soldat noires adultes ne mangent pas, leur fonction étant exclusivement reproductive, mais une source de nourriture peut être mise à disposition pour leur fournir un substrat sur lequel pondre leurs œufs. Une source d'eau doit être fournie et peut

être supplémentée en sucre pour améliorer la longévité des adultes (*115*). Selon une étude, le matériau le mieux adapté à la conception et à la collecte des œufs de MSN, et qui est le plus recommandé, est le bois (*116*) (**figure 4D**). Les œufs sont collectés manuellement avant leur éclosion, qui a lieu 4 jours après la ponte.

Figure 4 : Caractéristiques d'un élevage de mouches soldat noire

A. MSN sur les parois d'un insectarium ; **B.** Larvarium, **C.** Œufs oviposés ; **D.** Structure utilisée pour l'oviposition des LMSN

La volière (l'insectarium) doit être assez spacieuse pour l'accouplement aérien. Les paramètres de température, d'humidité et de luminosité sont aussi très importants. Ainsi, selon l'étude de Chia *et al.*, 2018 (*117*) la viabilité des œufs est extrêmement faible (moins de 11 %) à 15, 37 et 40℃ par rapport à la plage de températures optimale qui varie de 27 à 30°C (*118*). Holmes *et al.,* 2012 (*119*) ont comparé le taux d'éclosions fructueuses pour différentes humidités de l'environnement, qui est supérieur à 50% pour une humidité relative de 60% et de 70%. De plus, dans la même étude, la mortalité au stade pupal, l'émergence réussie et la longévité des adultes sont considérablement améliorées pour une humidité relative de 70%. Ainsi, la plage d'humidité optimale pour l'élevage de MSN varie de 60 à 70%. De plus, l'accouplement dépend fortement de la lumière directe du soleil (*15*). La clé d'un accouplement réussi est de permettre à la colonie de bénéficier d'un maximum de lumière directe du soleil.

Sous nos latitudes, où la lumière du soleil n'est pas toujours suffisante, et où les élevages se déroulent souvent à l'intérieur, il est préférable d'installer une source de lumière artificielle pour l'élevage de la MSN. L'intensité lumineuse minimale pour l'accouplement est de 63 µmol/m^2/s, la plupart des accouplements ayant lieu à plus de 200 µmol/m^2/s (*15*). Une étude a démontré qu'une lampe halogène de 500 watts, qui a un spectre similaire à celui de la lumière du soleil et une intensité lumineuse de 135 µmol/m^2/s, pouvait stimuler l'accouplement et la ponte, et que les durées de développement des larves étaient similaires aux résultats obtenus avec la lumière naturelle du soleil (*120*).

1.3.2. Les substrats utilisés pour l'élevage d'insectes

Plusieurs facteurs peuvent influencer la croissance des LMSN, comme par exemple l'humidité du substrat : les larves ne se transforment en prépupes que si elle est comprise entre 45 et 75% (*121*). Dans une étude, les performances de croissance larvaire les plus élevées ont été observées pour une humidité du substrat de 60% (*122*). Ainsi, en raison de la composition variable des déchets organiques, l'humidité des aliments est difficile à contrôler et doit être préalablement mesurée en laboratoire.

Les LMSN peuvent se développer sur une multitude de substrats tels que le fumier, le lisier de porc, les déchets organiques ménagers et municipaux, la pulpe de café, les aliments pour volailles ou encore les boues fécales (*17*). La nature du substrat, y compris sa composition nutritionnelle, a des effets plus importants sur la croissance des LMSN que la température ou l'humidité. Par exemple, une faible teneur en protéines dans le substrat a retardé la croissance des vers de farine (*123*), une teneur trop élevée en matières grasses dans le substrat a provoqué leur mort au stade adulte (*124*), probablement du fait de l'agglomération du substrat empêchant la respiration et le mouvement des insectes. Toujours chez le ver de farine, la consommation de glucides a augmenté leur efficacité de croissance, tandis que la consommation de fibres a eu un impact négatif sur la croissance car elle réduit l'ingestion d'aliments, la digestibilité et l'utilisation des nutriments. (*118*, *125*, *126*). De plus, des LMSN élevées sur des substrats alimentaires à forte densité énergétique produisent des prépupes riches en lipides et plus particulièrement riches en AG à chaîne moyenne, qui pourraient apporter une valeur ajoutée par rapport aux ressources alimentaires conventionnelles (*31*).

1.3.3. Les avantages environnementaux et socio-économiques de l'élevage d'insectes

Un des avantages considérables des insectes est leur part comestible élevée. En effet, 80% des criquets et 100% des vers de farine sont comestibles, contre 55% pour les porcs et les poulets et 40% pour les bœufs (*127*, *128*), impliquant une réduction significative des pertes alimentaires. Les insectes ont aussi un indice de conversion plus faible puisqu'ils nécessitent une quantité moindre de nourriture pour produire 1 kg d'insectes. Les indices de conversion sont de 2,5 pour le poulet, 5 pour le porc et 10 pour le bœuf, contre 1,7 pour le grillon domestique (*Acheta domesticus*). Concernant la LMSN, son indice de conversion varie entre 1,4 et 2,6 selon le substrat utilisé (*129*).

Selon la FAO, en 2025, 1,8 milliard de personnes devraient vivre dans des pays ou des régions souffrant d'une pénurie d'eau "absolue" et deux tiers de la population mondiale pourraient se trouver dans des conditions de "stress". Actuellement, l'agriculture représente en moyenne 70 % des prélèvements d'eau douce dans le monde. En termes d'utilisation d'eau, il faut entre 1000 et 3000 litres pour cultiver 1 kg de céréales et jusqu'à 15000 litres pour produire un kilogramme de viande de bœuf (*130*). Selon Miglietta *et al*., 2015 (*131*) l'empreinte eau du ver de farine est de 23 litres/g de protéines, inférieure à celle du bœuf, porc et poulet (respectivement 112, 57 et 34 litres/g).

En 2019, la surface agricole mondiale totale était de 4,8 milliards d'hectares, soit environ un tiers de la surface terrestre mondiale. Un tiers de ces terres représentait des terres cultivées tandis que les deux tiers restants représentaient des prairies et des pâturages utilisés pour le bétail (*132*). Dans les prochaines années, la croissance démographique mondiale ayant pour conséquence l'augmentation des besoins alimentaires, notamment en protéines, sollicitera encore un peu plus les systèmes d'utilisation des terres. Afin de soulager la pression exercée sur ces systèmes, l'élevage d'insectes pourrait être une des solutions car deux à dix fois moins de terres agricoles sont nécessaires pour produire 1 kg de de protéines de ver de farine par rapport à 1 kg de protéines de porcs ou de bovins (*133*).

Une autre préoccupation accompagnant l'importante croissance démographique actuelle est la déforestation. Entre 2015 et 2020, le taux de déforestation a été estimé à 10 millions d'hectares par an et l'agriculture intensive (principalement l'élevage de bétail, la culture du soja et du palmier à huile) a représenté 40 % de la déforestation tropicale entre 2000 et 2010 (*134*). Les aliments à base de soja sont utilisés dans l'alimentation animale pour nourrir plusieurs espèces d'animaux d'élevage. Les résultats d'une étude indiquent que les tourteaux à base de soja peuvent être complètement remplacés par de la farine et de l'huile de LMSN dans les régimes alimentaires des poules pondeuses (*135*). En effet, la qualité des œufs, représentée

par la solidité de la coquille et la composition nutritionnelle du blanc et du jaune d'œuf, ainsi que l'acceptance du régime alimentaire à base de LMSN, n'étaient pas différents de celui à base de soja.

En termes de changement climatique, le système alimentaire mondial est responsable d'environ 21 à 37 % des émissions annuelles de gaz à effet de serre (*136*). L'élevage est la principale source d'émission de méthane et de protoxyde d'azote, deux gaz à effet de serre plus puissants que le dioxyde de carbone. Parmi les espèces d'insectes comestibles, seuls les blattes, les termites et les scarabées sont connus pour produire du méthane (*2*). Le potentiel de réchauffement global est exprimé en équivalents CO_2. *Oonincx et Boer*, 2012 (*133*) ont comparé les potentiels de réchauffement globaux d'animaux d'élevage traditionnellement consommés dans notre société à celui du ver de farine (**figure 1**). Les vers de farine (14 kg CO_2 eq.) ont un potentiel de réchauffement global 6 fois moins élevé que celui des bœufs (88 kg CO_2 eq.) et 2 fois moins élevé que celui des porcs (27 kg CO_2 eq.).

Une autre préoccupation actuelle est le gaspillage alimentaire. Dans le monde, un tiers de la nourriture produite est gaspillée, représentant 1,3 milliard de tonnes par an (*137*). L'un des avantages des insectes est qu'ils peuvent être élevés sur des déchets organiques comme le fumier, le lisier de porc et le compost. Cependant, l'efficacité de bioconversion des déchets organiques diffère selon les espèces d'insectes. Les espèces d'insectes telles que la mouche soldat noire (*Hermetica illucens*), la mouche domestique commune (*Musca domestica*) et le ver de farine (*Tenebrio molitor*) sont trois espèces très étudiées car très efficaces pour la bioconversion des déchets organiques. Ainsi, les LMSN peuvent être élevées sur différents types de déchets alimentaires et peuvent les réduire, par exemple, de 30% pour la pulpe de café (*138*) . Les LMSN peuvent réduire le potentiel de pollution du fumier de 50 à 60%, réduire les bactéries nocives et les populations de mouches domestiques car elles rendent le fumier plus liquide et donc moins propice aux larves de mouches domestiques (*139*). Ainsi, les LMSN sont un modèle d'insecte très intéressant car elles convertissent de nombreux déchets agroalimentaires en biomasse riche en protéines, pouvant remplacer les aliments traditionnels employés pour nourrir le bétail, et en produisant dans le même temps un résidu semblable à du compost, le frass qui peut être utilisé comme engrais. La LMSN participe donc à un modèle d'économie circulaire, consistant à fournir des produits de manière durable en limitant la consommation et le gaspillage des ressources ainsi que la production des déchets.

Une des répercussions sociales intéressante de l'élevage d'insectes est que, principalement dans les pays en développement, certains des membres de la société les plus pauvres ou isolés peuvent être impliqués dans la collecte, la culture, le traitement et la transformation des insectes (*140*). L'élevage d'insectes comestibles joue un rôle significatif dans

la réduction de la pauvreté dans les zones rurales (*141*). En effet, les insectes peuvent être facilement collectés dans la nature ou cultivés avec un minimum de moyens techniques ou financiers. Macombe *et al.,* 2019 (*142*) ont évalué les conséquences sociales potentielles induites en France par le développement à l'échelle industrielle de la production du ver de farine pour l'alimentation animale en étudiant plusieurs scénarios de production et de commercialisation. Le principal effet social positif résulterait de la création d'emplois dans le secteur de la production d'insectes. Les principaux coûts opérationnels dans le secteur de l'élevage d'insectes sont ceux de l'alimentation et de la main-d'œuvre et varient d'une espèce d'insecte à l'autre. En effet, dans le monde, les prix de vente des LMSN séchées varient de 1,8 à 18,9 €/tonne, ceux des vers de farine de 5,7 à 97,0 €/tonne et ceux des grillons domestiques de 18,2 à 85,6 €/tonne. Les coûts opérationnels sont plus bas pour l'élevage de LMSN (2,6 €/tonne), suivi de celui des vers de farine (3,2 €/tonne) et celui des grillons domestiques (5,9 €/tonne) (*143*). Ainsi, les prix et les coûts d'alimentation de la farine de grillons domestiques sont considérablement plus élevés que ceux de la mouche soldat noire et des vers de farine. Par conséquent, les entreprises du secteur de l'alimentation humaine et animale seraient plus enclines à inclure des vers de farine et la LMSN dans leurs produits que des grillons.

1.3.4. Les risques potentiels de l'élevage et de la consommation d'insectes

Un des risques lors de l'élevage des insectes est que des espèces exotiques s'échappent de leur site d'élevage et nuisent à l'environnement naturel extérieur (*144*). De plus, un autre inconvénient de l'élevage de LMSN est leur besoin d'un environnement chaud pour la biodégradation du substrat, ce qui peut être difficile ou coûteux en énergie dans les climats tempérés comme les nôtres. Une autre question qui se pose, tout comme pour les animaux que nous consommons traditionnellement, est le bien-être des insectes. En effet, les insectes sont souvent considérés comme moins sensibles que les animaux d'élevage communs et il existe toujours des débats sur la question du bien-être des insectes en captivité. Des questions éthiques peuvent se poser concernant leur élevage, leur manipulation, leur transport ou encore leur mise à mort. L'incertitude scientifique demeure quant à l'étendue de la complexité cognitive des insectes (*145*).

Afin de vérifier l'innocuité de la consommation d'insectes, les dangers potentiels en termes d'allergies et de contaminants chimiques/biologiques doivent être évalués. Divers allergènes ont été identifiés chez les insectes, notamment la tropomyosine et l'arginine kinase, deux pan-allergènes connus pour leur réactivité croisée avec des protéines homologues chez les crustacés et les acariens (*146*). Deux principaux groupes sont à risque pour le développement

d'une allergie alimentaire à la consommation d'insectes : les sujets allergiques aux crustacés et les individus souvent exposés à des insectes comestibles (des individus constamment exposés à *Tenebrio Molitor*, par exemple les personnes en contact régulier avec des farines dans lesquelles se développe la larve de cet insecte), peuvent être sensibilisés et développer par la suite une allergie alimentaire à cet insecte) (*147*). Concernant les contaminants biologiques, peu de rapports sur des agents pathogènes sont disponibles. Les trois principaux pathogènes bactériens associés aux insectes sont *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.* pathogène et les souches pathogènes du groupe *Bacillus cereus* (*148*). Comme pour les contaminants biologiques, l'accumulation de métaux lourds dans les LMSN a été peu étudiée et de nombreuses données sont manquantes sur le sujet. Les LMSN paraissent accumuler le cadmium de leur régime alimentaire avec des concentrations de cadmium plus élevées dans leur corps que dans leur substrat alimentaire mais elles ne semblent pas accumuler de mycotoxines, ni de pesticides (*149*, *150*). Il semble également que les LMSN puissent excréter des éléments lors de la métamorphose en pupe. En effet, des métaux comme le cadmium et le chrome, qui étaient accumulés dans l'exosquelette des LMSN, sont en grande partie expulsés avec les exuvies (*151*). Du fait de ces potentiels risques, l'élevage d'insectes pour l'alimentation humaine et animale est soumis à des réglementations strictes dans de nombreux pays.

1.3.5. Législation et utilisation dans le secteur de l'agroalimentaire

Du fait de la hausse des prix et de l'impact environnemental des farines de soja et de poisson qui sont deux principales sources de protéines pour l'alimentation animale, l'intérêt pour les sources alternatives de protéines pour animaux ne cesse d'augmenter. Au niveau mondial, le marché des insectes pour l'alimentation animale était évalué à 688 millions USD en 2018 et devrait atteindre 1,4 milliard USD d'ici 2024 (*114*). Dans certaines cultures, les insectes sont consommés depuis de nombreuses décennies mais ce n'est seulement que très récemment qu'ils ont été introduits en Europe en tant qu'aliment nouveau/ « novel food » et en tant qu'aliment pour animaux. Les produits à base d'insectes doivent être certifiés de manière appropriée avant d'être mis sur le marché pour l'alimentation animale et humaine. En raison de la nouveauté des insectes produits industriellement pour l'alimentation humaine et animale, les risques d'entrée de contaminants dans la chaîne alimentaire justifient une enquête et une surveillance accrue.

1.3.5.a. Alimentation animale

Plus de 50 % du marché mondial des aliments à base d'insectes étaient dédiés à l'aquaculture en 2018 (*114*) et les insectes sont de plus en plus incorporés dans l'alimentation

des poissons. Des incorporations de LMSN inférieures à 25% dans l'alimentation d'une espèce de crevette (*Litopenaeus vannamei*) (*152*), de 30% dans l'alimentation d'une espèce d'esturgeon (*Acipenser baerii*) (*33*), et de 10 à 30% dans l'alimentation de tilapia (*Oreochromis spp*.) (*153*), n'ont pas altérées les performances de croissance des crevettes et des poissons, comparé à un régime de farine et d'huile de poisson.

Les insectes peuvent être utilisés en alimentation animale sous certaines conditions. Dans les pays de l'Union Européenne (UE) par exemple, pour nourrir poissons, volailles et porcs d'élevage, les protéines transformées d'insectes sont autorisées mais limitées à 8 espèces d'insectes, à savoir : la mouche soldat noire (*Hermetia illucens*), la mouche domestique (*Musca domestica*), le ver de farine (*Tenebrio molitor*), le ver Buffalo (*Alphitobius diaperinus*), le grillon domestique (*Acheta domesticus*), le grillon domestique tropical (*Gryllodes sigillatus*), le grillon des steppes (*Gryllus Assimilis*) et le ver à soie (*Bombyx mori*). De plus, actuellement, c'est-à-dire en 2023, les insectes entiers tués ne sont pas autorisés en tant qu'aliments pour animaux pour les producteurs de denrées alimentaires, exceptés pour les animaux domestiques et les animaux qui ne sont pas consommés (type animaux de zoo), où l'autorisation dépend des autorités de chaque pays membre de l'UE. Les graisses et les protéines hydrolysées provenant d'insectes sont autorisées pour tous les animaux, que ce soit le bétail ou les animaux domestiques (*154*). Le **tableau 7** résume les différentes formes sous lesquelles les insectes peuvent être utilisées et les animaux pour qui leur utilisation en tant qu'aliment est autorisée (Insectes en tant qu'aliments pour animaux - Règlement (UE) N°68/2013 relatif au catalogue des matières premières pour aliments des animaux et conformément au règlement (CE) n°999/2001 et au règlement (CE) n° 1069/2009). Les insectes élevés au sein de l'UE sont considérés comme des animaux d'élevage. De ce fait, les aliments avec lesquels ils sont nourris sont aussi soumis à des règles bien strictes. En effet, pour le moment, il est interdit de nourrir les insectes avec des produits carnés, du poisson, des fèces, des lisiers et fumiers ou encore des déchets issus du traitement des déchets urbains, domestiques et industriels (*154*).

Tableau 7 : Règlementation en vigueur en 2022 dans les pays de l'UE concernant l'utilisation d'insectes pour l'alimentation animale (adapté d'après *IPIFF, 2022* (*154*))

	Ruminants	Porcs	Volailles	Aquaculture
Protéines d'insectes	●	★	★	★
Protéines hydrolysées d'insectes	●	●	●	●
Graisses d'insectes	●	●	●	●
Insectes entiers (non transformés et/ou transformés)	●	●	●	●
Insectes vivants	●	●	●	●

● = non autorisé au sein de l'UE ; ● = autorisé au sein de l'UE pour toutes les espèces d'insectes ; ★ ● = autorisation dépendant du pays membre de l'UE ; ● = autorisé au sein de l'UE pour certaines espèces d'insectes

1.3.5.b. Alimentation humaine

En Europe, le marché des insectes comestibles pour l'alimentation humaine est encore un marché de niche et leur consommation reste encore limitée du fait de l'aversion pour les insectes ancrée chez les Occidentaux. Cependant, de plus en plus de consommateurs recherchant des sources de nourriture durables, riches en protéines se tournent vers les insectes comestibles. La production et la commercialisation d'insectes en tant qu'aliments en Europe sont régies par la législation sur les « nouveaux aliments » ou « Novel Food », c'est-à-dire le règlement (UE) n° 2015/2283. L'autorisation de mise sur le marché d'une espèce d'insecte (associée à sa transformation) pour l'alimentation humaine est accordée après la soumission d'une demande auprès de la Commission européenne et évaluation de l'innocuité du nouvel aliment par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Dans les pays membres de l'UE, seulement 4 espèces d'insectes comestibles sont autorisées à la commercialisation, sous certaines formes (congelée, séchée, en poudre, etc.) pouvant être différentes selon l'espèce : le ver de farine, le ver Buffalo, le criquet migrateur et le grillon domestique (*155–160*). Actuellement, 13 autres applications de nouveaux aliments à base d'insectes comestibles sont en cours d'évaluation par l'EFSA dont certaines concernent la MSN (*161*).

1.3.5.c. Autres applications

Les lipides provenant des LMSN peuvent être valorisés en biodiesel qui est considéré comme un biodiesel de haute qualité et une alternative à la canne à sucre et au maïs pour la production de biodiesel. Par rapport à l'huile de palme ou à la canne à sucre, qui sont les sources actuelles de biodiesel, les LMSN nécessitent une période de production plus courte et offrent une meilleure fertilité (*128*). Les déjections d'insectes, ou frass, peuvent être utilisées comme engrais et améliorer la fertilité des sols. En effet, par exemple, le taux de croissance et la composition chimique de choux cultivés à l'aide de frass de MSN étaient identiques à celles d'engrais commerciaux (*162*). Une autre valorisation par le biais des insectes est celle de la chitine, formant l'exosquelette des insectes. En effet, après désacétylation de celle-ci, le chitosane est obtenu et peut être utilisé dans de nombreux domaines allant de la médecine à la diététique en passant par la cosmétique. Un des avantages du chitosane est qu'il est non toxique et non allergisant. Comme application médicale, il entre dans la composition de fils de suture et de prothèses vasculaires et dentaires. C'est aussi un agent d'accélération de la cicatrisation. Dans le domaine de l'alimentation, le chitosane est utilisé comme agent de conservation ou encore comme film alimentaire de protection (*128*, *163*).

2. Vitamines liposolubles et caroténoïdes

Les micronutriments sont reconnus pour leur rôle essentiel dans le métabolisme et le maintien de la fonction tissulaire (*164*). Ils comprennent vitamines, minéraux et oligo-éléments et sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Chez l'Homme ou l'animal, une vitamine ne peut pas être synthétisée par l'organisme, ou en quantité insuffisante, et doit donc être apportée par l'alimentation en tant que tel ou en tant que précurseur. Une molécule peut être une vitamine pour une espèce et ne pas l'être pour une autre. Par exemple la vitamine C n'est pas une vitamine pour le rat et la souris mais l'est pour le cochon d'inde. Une vitamine est classée "liposoluble" ou "hydrosoluble" selon sa solubilité. Les vitamines du groupe B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 et B12) et la vitamine C sont solubles en phase aqueuse et sont donc appelées les vitamines hydrosolubles. Les vitamines A, D, E et K sont solubles principalement dans les lipides et sont donc appelées vitamines liposolubles. Les vitamines liposolubles sont impliquées dans des fonctions biologiques très variées, allant des effets sur l'expression génique (VA et VD), à des effets antioxydants (VE), en passant par un rôle de cofacteur (vitamine K). Les caroténoïdes sont des phytomicronutriments liposolubles qui ont des effets biologiques chez l'Homme et les animaux, e.g. certains sont proVA, certains sont antioxydants. Leur consommation et leur statut ont été associés à l'incidence de certains cancers, de maladies cardiovasculaires (MCV) et de maladies oculaires liées à l'âge (*165*). Dans cette introduction, nous nous focaliserons sur la lutéine, les caroténoïdes proVA et les vitamines A, D et E, molécules choisies car nous avons commencé nos recherches sur la bioaccumulation des micronutriments lipidiques dans les LMSN.

2.1. Les caroténoïdes provitaminiques A et la vitamine A

2.1.1 Structure et formes

Dans l'organisme, la VA est présente sous plusieurs formes (**Figure 5**). Ses deux principales formes dans l'alimentation humaine sont la VA préformée (essentiellement le rétinol et les esters de rétinol) et les caroténoïdes proVA tels que l'α-carotène (α-car) et le β-car, convertis ensuite par notre organisme en rétinol. Ces deux formes de VA proviennent de sources différentes : la VA préformée se trouve dans les aliments d'origine animale, e.g. foie, lait, beurre, alors que les caroténoïdes se trouvent essentiellement dans les aliments d'origine végétale (*166*). Le rétinol (que l'on appelle souvent la VA alors que la VA est constituée de toutes les molécules ayant une activité vitaminique A, cf. **Figure 5**) ainsi que les esters de rétinol sont les rétinoïdes les plus abondants dans notre organisme. Les esters de rétinol sont la

forme de stockage du rétinol et sont formés lorsque la molécule de rétinol est estérifiée avec un AG. Les esters de rétinol les plus abondants dans l'organisme sont l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide stéarique et l'acide linoléique (*167*). Les esters de rétinol sont généralement privilégiés pour les compléments alimentaires en raison de leur stabilité et de leur biodisponibilité car le rétinol est très sensible à l'oxydation (*168*). Le dérivé aldéhydique de la VA, le 11-cis-rétinal, sert de chromophore dans les cellules photoréceptrices de la rétine. La photo-isomérisation du 11-cis-rétinal en all-trans-rétinal active une cascade de signaux qui conduit à la perception de la lumière chez les vertébrés (*169*). Concernant l'acide rétinoïque, sa concentration dans les tissus est généralement très faible, de 100 à 1000 fois inférieure à celle du rétinol (*167*).

Les caroténoïdes possèdent un long squelette carboné, portant des doubles liaisons conjuguées avec des formes linéaires et cycliques, ce qui permet des diversités structurelles (configuration cis ou trans) (*170*). Les caroténoïdes sont classés en fonction de la présence ou de l'absence d'atome d'oxygène dans leur structure : les carotènes sont des hydrocarbures purs (sans oxygène) et les xanthophylles possèdent des atomes d'oxygène (*171*). Le β-car possède une structure composée de 11 doubles liaisons conjuguées (**Figure 5**) et de ce fait, il présente un pic d'absorption majeur dans le spectre visible avec un maximum d'absorption à ≈450 nm, responsable de sa couleur orange à rouge.

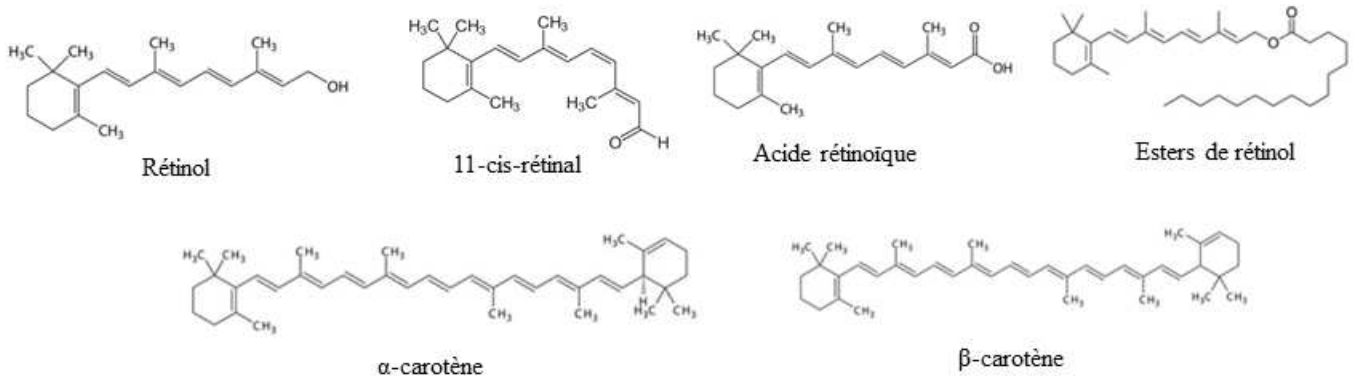


Figure 5 : Structure chimique de différentes formes de vitamine A

2.1.2. Sources

Notre organisme étant incapable de produire naturellement de la VA, il est donc nécessaire de l'obtenir par l'alimentation, soit sous forme de VA préformée, soit sous forme de caroténoïdes proVA. Approximativement 33% de la VA proviendraient du rétinol préformé contenu dans les produits carnés et les produits laitiers, 48% proviendraient de sources de β-car, présent majoritairement dans les légumes et 19% d'autres caroténoïdes proVA, i.e. α-car

et β-cryptoxanthine notamment (*172*). Parmi les caroténoïdes proVA existants, seuls le β-car, l'α-car et la β-cryptoxanthine sont présents en quantités significatives dans l'alimentation humaine (*166*). Des concentrations élevées de caroténoïdes proVA peuvent être trouvées dans les légumes jaunes et oranges comme les carottes, les patates douces ou les citrouilles, les fruits jaunes et orange comme les mangues, les abricots ou les papayes et les légumes à feuilles vertes foncées comme les choux ou les épinards (*169*). Le **tableau 8** indique les concentrations en VA de différents aliments riches en cette vitamine. Ces concentrations sont exprimées en µg d'équivalents rétinol (ER), unité représentant la quantité de carotènes nécessaire pour avoir la même activité vitaminique A dans l'organisme que le rétinol. Chez l'Homme, pour les caroténoïdes alimentaires, 1 µg de rétinol a la même activité que 6 µg de β-car ou 12 µg d'autres caroténoïdes proVA. Pour les produits purs, le coefficient de conversion est de 2 pour le β-car.

Tableau 8 : Dix des sources les plus riches en vitamine A (d'après Oruch et Pryme, 2012 (*173*))

Sources	Concentration (µg ER*/100g**)
Foie (bœuf, porc, poulet, dinde, poisson), Huile de foie de morue	6500
Carottes	835
Feuilles de brocolis	800
Patates douces	709
Beurre	684
Choux Kale	681
Epinards	469
Citrouilles	400
Feuilles de choux	333
Fromage cheddar	265

*ER : équivalents rétinol
**poids frais

2.1.3. Recommandations nutritionnelles

Les recommandations nutritionnelles peuvent être légèrement différentes selon les pays. En France, concernant la VA, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a établi des Références Nutritionnelles pour la Population (RNP). Ces références sont calculées pour couvrir les besoins de la quasi-totalité (97,5%) de différents groupes de la population (hommes adultes, femmes adultes, enfants…).

Selon la saisine n°2018-SA-0238 (*174*), les RNP ont été calculées à 250 µg ER/jour pour les nourrissons et enfants de 6 mois à 3 ans, entre 600 et 750 µg ER/jour pour les adolescents et les adultes de 18 ans et plus, cette valeur variant selon l'âge et le sexe. Des RNP bien spécifiques ont été établies pour les femmes enceintes (700 µg/jour) et les femmes allaitantes (1300 µg/jour). Selon la dernière étude INCA 3 de 2014-2015, les apports journaliers moyens en rétinol des français sont de 470 µg/jour et pour le β-car, 2700 µg/jour (*175*).

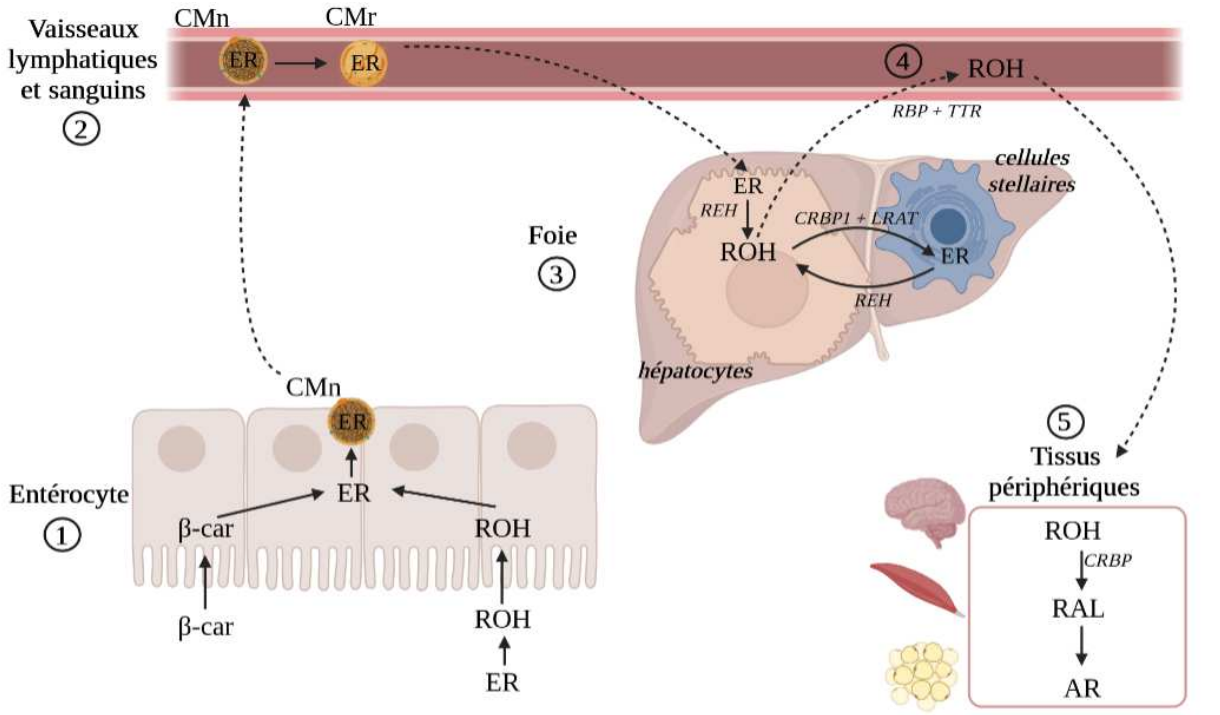
La VA étant liposoluble, l'organisme en stocke des quantités très importantes, principalement dans le foie et, dans de très rares cas, ces niveaux peuvent s'accumuler de manière excessive, provoquant une hypervitaminose A. L'ANSES a donc fixé une limite de sécurité de 3 000 ER/jour pour les adultes au-delà de laquelle une intoxication peut survenir (*174*). La tératogénicité est l'effet secondaire le plus grave de l'hypervitaminose A (*176*). Parmi des enfants nés de femmes ayant pris plus de 3000 ER de VA préformée par jour sous forme de suppléments, environ 1 enfant sur 57 présentait une malformation attribuable au supplément (*177*). La déficience en VA est une forme répandue de carence en micronutriments dans de nombreux pays en développement. Elle affecte environ 21% des enfants en bas-âge et environ 6% des femmes enceintes dans le monde. Elle serait responsable de la mort d'environ 800.000 personnes par an (*178*). A titre d'exemple, une étude a évalué à 76% le nombre de mères allaitantes présentant une carence en VA dans les zones rurales d'Éthiopie (*179*). C'est la principale cause de cécité chez les jeunes enfants et elle est également associée à des taux de décès importants dus à des infections graves. La carence en VA peut provoquer plusieurs symptômes oculaires, une anémie ainsi qu'une faible résistance aux infections (*180*). Une des solutions les plus efficaces chez les jeunes enfants est la supplémentation en VA, qui est associée à une réduction cliniquement significative de la morbidité et de la mortalité (*181*).

2.1.4 Métabolisme

Comme précisé précédemment, les rétinoïdes proviennent de l'alimentation, soit sous forme de rétinoïdes préformés (rétinol et esters de rétinol), soit sous forme de proVA (caroténoïdes). Ces derniers peuvent être transformés en rétinoïdes dans l'intestin et dans d'autres tissus. Les rétinoïdes sont absorbés au niveau des entérocytes depuis la lumière intestinale (cf. partie 3). Le rétinol est estérifié en rétinyl esters qui sont incorporés dans les chylomicrons natifs, lipoprotéines riches en triglycérides (TAG), et sécrétés dans la lymphe. De ce fait, une quantité suffisante de lipides est nécessaire pour permettre une formation optimale des chylomicrons (*182*).

Dans la circulation, les TAG des chylomicrons natifs sont partiellement hydrolysés par la lipoprotéine lipase et acquièrent dans le même temps l'apolipoprotéine E, formant les chylomicrons résiduels (*182*). Les chylomicrons transportent les esters de rétinol vers le foie, site principal de stockage des rétinoïdes. Environ 80 % de la VA présente dans l'organisme est stockée sous forme d'esters de rétinol dans les cellules stellaires du foie. Ces réserves peuvent être utilisées en cas de pénurie de rétinol dans l'alimentation (*183*). Dans ce cas, les esters de rétinol hépatiques sont désestérifiés et le rétinol est sécrété dans le sang lié à la protéine de liaison du rétinol (RBP) et à la transthyrétine (TTR). Ce complexe permet au rétinol d'être distribué aux tissus périphériques (**Figure 6**) (*184*).

La VA est distribuée dans pratiquement tous les tissus de l'organisme (poumon, intestin, estomac, foie, tissus adipeux, muscle, etc.). Il a été montré que le rétinol pénètre dans les cellules de ces tissus périphériques grâce à une protéine membranaire nommée STRA6 (*185*, *186*). Celle-ci est capable de se lier au complexe rétinol-RBP et de faciliter son absorption dans les cellules. Le rétinol peut alors être converti en acide rétinoïque pour exercer ses effets génomiques (via RAR et RXR).



AR: acide rétinoïque; β-car: β-carotène; CMn: chylomicrons natifs; CMr: chylomicrons résiduels; CRBP: cellular retinol binding protein; ER: esters de rétinol; LRAT: lecithin retinol acyltransferase; RAL: rétinaldéhyde;RBP: serum retinol binding protein; REH: retinyl ester hydrolases; ROH : rétinol; TTR: transthyrétine.

Figure 6 : Absorption, métabolisme hépatique et transport sanguin des rétinoïdes

2.1.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies

La VA joue plusieurs rôles biologiques importants dans l'organisme. Elle est en effet notamment impliquée dans la fonction visuelle, dans le système immunitaire, dans la croissance et le développement, dans la différentiation cellulaire et dans la fonction reproductive.

2.1.5.1.a. Vision

Dans la rétine, le 11-cis rétinal s'associe avec une protéine, l'opsine pour former un complexe nommé rhodopsine, pigment crucial pour la perception lumineuse (*187*). Comme précisé précédemment, sous l'effet d'un stimuli lumineux, le 11-cis-rétinal est transformé en trans rétinal (**Figure 7**), ce qui a pour conséquence la phototraduction du signal lumineux en signal électrique (*169*). Ce trans rétinal peut être retransformé en 11-cis-retinal, et donc être recyclé. Une carence en VA entraîne une déficience de la vision en basse lumière, en raison d'une formation déficiente de la rhodopsine, endommage les photorécepteurs et peut provoquer une héméralopie, i.e. une cécité nocturne (*188*, *189*).

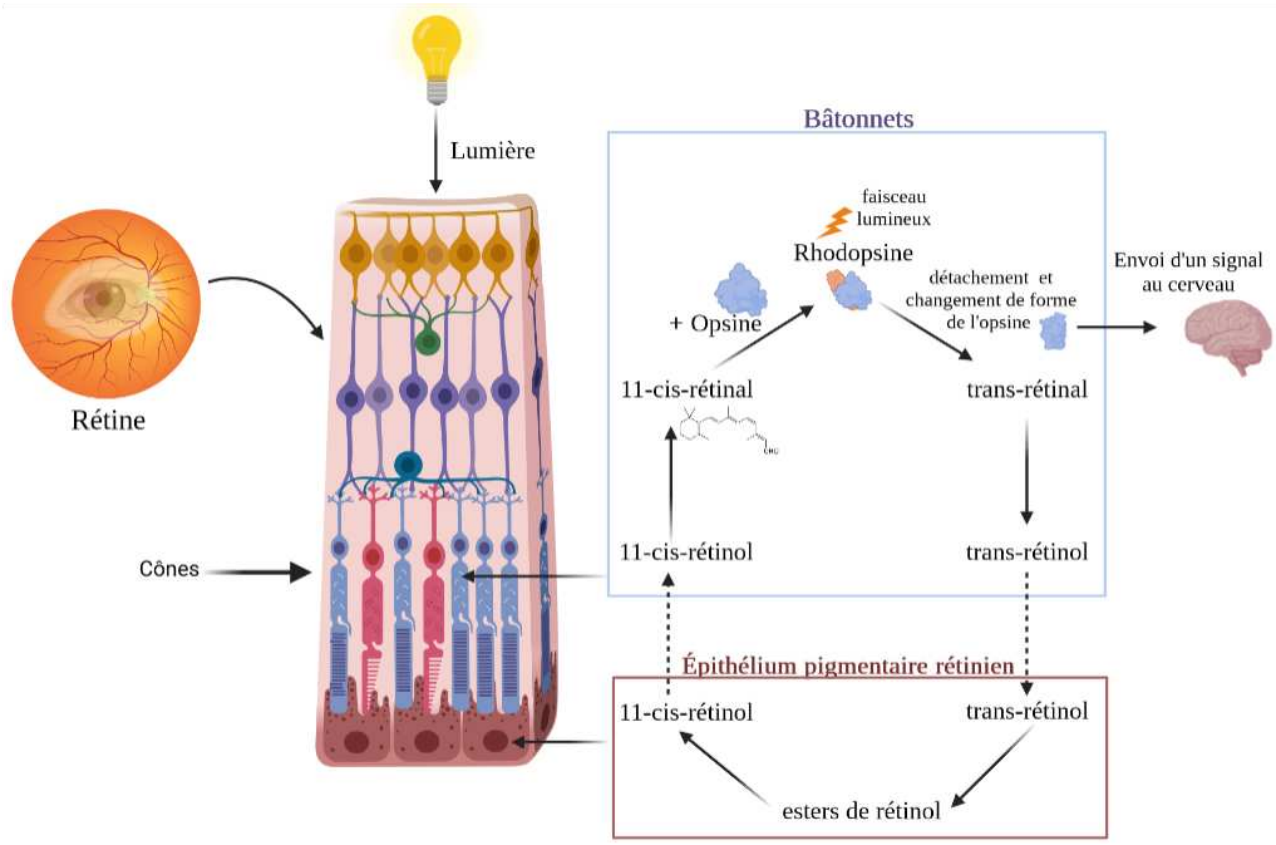


Figure 7: Rôle du 11-cis-rétinal dans la vision (adapté d'après Carazo *et al.*, 2021 (*166*))

2.1.5.b. Système immunitaire

Compte tenu de l'importante baisse de résistance aux infections qu'entraîne la carence en VA, plusieurs études ont tenté de découvrir les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de cette déficience immunitaire (*190*). L'acide rétinoïque serait responsable de la prolifération des cellules T (lymphocytes cytotoxiques T), des cellules jouant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire contre les virus et les cancers. Cette prolifération serait la conséquence d'une augmentation de la sécrétion et de la signalisation de l'interleukine 2 (IL-2), cytokine facteur de croissance des lymphocytes T (*191*). La déficience en VA peut également inhiber le processus normal d'apoptose des cellules de la moelle osseuse, entraînant une augmentation du nombre de cellules myéloïdes dans la moelle osseuse, ce qui indique que la VA est impliquée dans la régulation de l'homéostasie de la moelle osseuse (*192*).

2.1.5.c. Maladies cardiovasculaires

L'acide rétinoïque est reconnu pour avoir des effets protecteurs étendus sur le système vasculaire. Une étude a montré que la quantité d'acide rétinoïque est associée à un risque de mortalité plus faible dans une cohorte de patients souffrant d'une maladie coronarienne (*193*). Une autre étude a révélé que le 9-cis-acide rétinoïque améliore de manière significative l'état de santé de souris souffrant d'athérosclérose induite par un régime riche en matières grasses, en augmentant les niveaux d'expression protéique d'ABCA1 et d'ABCG1 qui sont des transporteurs régulant le métabolisme des lipides cellulaires (*194*).

2.1.5.d. Cancers

Le rôle des caroténoïdes et de la VA dans la survenue de cancers est assez controversé, en particulier dans le cas du β-car. Les rétinoïdes seraient capables d'inhiber la carcinogenèse dans divers organes dans des modèles animaux, de réduire des lésions épithéliales humaines précancéreuses et de prévenir les tumeurs secondaires après une thérapie curative pour les tumeurs malignes épithéliales telles que le cancer de la tête et du cou, du poumon, du foie et du sein (*195–197*). Des risques plus faibles de cancer du poumon ont été observés pour les sujets possédant les quintiles les plus élevés par rapport aux quintiles les plus bas de β-cryptoxanthine (15 %), de β-car (19 %) et de rétinol (27 %) du sérum, ces résultats suggérant qu'une consommation élevée de fruits et légumes, et donc riche en caroténoïdes peut réduire le risque de cancer du poumon (*198*). Cependant, des études ont montré qu'une supplémentation trop importante en β-car chez les fumeurs pouvait accroitre le risque de cancer du poumon chez cette population (*199*, *200*).

2.1.6. Applications industrielles

Le β-car est utilisé en tant qu'additif (E160a) dans l'industrie agroalimentaire. C'est un colorant obtenu à partir de végétaux (comme des carottes, des patates douces, etc.) y compris des algues (*Dunaliella salina*) ou alors obtenu par synthèse chimique ou fermentation de champignons (*Blakeslea trispora*). L'acide rétinoïque est souvent utilisé dans les techniques de reproduction assistées, en particulier pendant le développement d'embryons *in-vitro* chez plusieurs espèces comme les bovins, les chèvres, les moutons, les porcs, etc. Grâce à son pouvoir antioxydant, l'ajout d'acide rétinoïque, jusqu'à 50 nM, aurait le potentiel d'améliorer la maturation des ovocytes de diverses espèces d'animaux d'élevage (*201–203*).

2.2. La lutéine

2.2.1 Structure

La lutéine est un caroténoïde, plus précisément une xanthophylle (c'est-à-dire un caroténoïde possédant des atomes d'oxygènes), comme la zéaxanthine. La zéaxanthine et la lutéine sont des isomères structurels, la zéaxanthine possédant un système de 11 doubles liaisons conjuguées, légèrement plus long que les 10 doubles liaisons conjuguées de la lutéine (**Figure 8**). La chaîne carbonée représente la partie hydrophobe et les groupes hydroxyles la partie hydrophile de la molécule de lutéine (*204*). La lutéine peut exister sous huit formes de stéréoisomères en raison de trois centres chiraux (*205*). Dans la nature, l'isomère géométrique le plus courant de la lutéine est l'isomère all-trans (all-E), qui est thermodynamiquement plus stable que l'isomère cis (*206*). Grâce à sa structure chimique, la lutéine possède plusieurs propriétés contribuant au maintien de la fonction rétinienne et à la prévention d'un certain nombre de maladies oculaires : ses deux groupes hydroxyles la rendent plus polaire et plus hydrophile que les carotènes, ce qui lui permet d'agir comme antioxydant en piégeant efficacement les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (*170*).

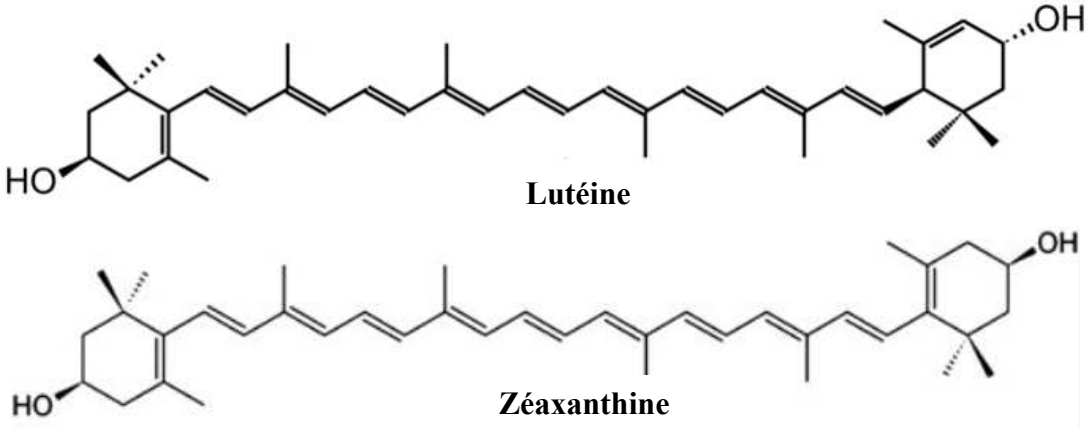


Figure 8 : Structures chimiques de la lutéine et de la zéaxanthine

2.2.2. Sources

La lutéine est un caroténoïde majoritairement présent dans les légumes à feuilles vert foncé comme les épinards, le chou Kale ou le persil, mais aussi dans les œufs (plus particulièrement le jaune d'œuf) (**Tableau 9**). En France, les deux principaux aliments contribuant à l'apport quotidien en lutéine sont l'épinard et la laitue (*207*). La méthode de préparation de l'aliment a aussi un impact important sur la teneur en lutéine. En effet, par exemple, les épinards cuits contiennent 13,5 mg/100 g de lutéine alors que les épinards crus en contiennent 7,2 mg/100g, soit deux fois moins (*208*). Dans une autre étude, la cuisson à l'eau et à la vapeur du brocoli a entraîné une augmentation de la lutéine par rapport au brocoli non cuit (*209*).

Tableau 9 : Dix des sources les plus riches en lutéine (d'après Perry *et al*., 2009 (*208*))

Sources	Concentration (µg /100g*)
Epinards cuits	13504
Chou Kale cuit	8884
Coriandre	7703
Persil	4326
Laitue romaine	3824
Pistaches décortiquées	1405
Courgettes cuites	1355
Asperges cuites	991
Œuf cru	917
Oignons verts	782

*poids frais

2.2.3. Recommandations nutritionnelles

La consommation moyenne de lutéine en France est d'environ 2.5 mg/jour (*207*), contre 1 à 2 mg/jour aux Etats-Unis (*210*). A ce jour, il n'existe aucune recommandation officielle concernant l'apport alimentaire optimal en lutéine. Cependant, l'étude clinique AREDS 2 (*211*) a montré qu'une supplémentation de 10 mg/jour de lutéine pouvait réduire le risque de progression de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Concernant une possible limite de sécurité supérieure, elle n'est pas connue, mais il semble qu'elle soit supérieure à 20 mg/jour car *Shao et Hathcock*, 2006 (*212*) ont montré qu'un apport de 20 mg/jour n'entrainait pas d'effet nocif observable.

2.2.4. Métabolisme

La lutéine est transférée dans la phase lipidique alimentaire puis, dans un second temps, dans les micelles mixtes qui transportent la lutéine vers son site d'absorption (**Figure 9**). Le métabolisme intestinal de la lutéine et des vitamines liposolubles est détaillé dans la partie 3.

L'affinité spécifique des xanthophylles pour les lipoprotéines de haute densité (HDL) peut influencer la manière dont elles sont distribuées dans les tissus après leur passage par le foie. Cette distribution est régulée par une absorption préférentielle au niveau tissulaire grâce à leur interaction avec le récepteur des lipoprotéines HDL et d'autres acteurs clés impliqués dans le transport du cholestérol et des lipides (*213*). La lutéine est accumulée dans les yeux, le foie et les tissus adipeux. Chez l'Homme, les niveaux les plus élevés de xanthophylles sont atteints dans la macula de l'œil, où leurs concentrations varient entre 0,1 et 1 mM (*213*). Les caroténoïdes qui atteignent le foie via les chylomicrons y sont stockés ou éliminés dans la bile, ou resécrétés dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) pour être distribués aux tissus périphériques (*214*). Des métabolites de la lutéine ont été détectés dans les tissus humains, comme la 3′-épilutine, qui pourrait être formée par une réduction de la 3′-oxolutéine, produite à partir de la lutéine et de la méso-zéaxanthine, détectée seulement dans la rétine, et pourrait être formée par migration de la double liaison à partir de la lutéine (*215*).

Les β-carotène oxygénases 1 et 2 (BCO1 et BCO2) sont les deux seules enzymes, retrouvées chez les animaux, responsables du clivage des caroténoïdes sur des sites spécifiques de leur chaine carbonée (*216*, *217*). Alors que la BCO1 clive les caroténoïdes de la proVA, la BCO2 métabolise également les caroténoïdes non proVA, tels que la lutéine ou la zéaxanthine, en apo-caroténoïdes à longue chaîne (*218*). Il a été montré que, chez des souris knock-out *BCO2* nourries avec de la lutéine, l'homéostasie des caroténoïdes est altérée et les caroténoïdes s'accumulent fortement dans plusieurs tissus (*219*). Ainsi, il est supposé que cette enzyme BCO2 préviendrait l'accumulation potentiellement toxique de pigments xanthophylles dans les tissus. La BCO2 pourrait réduire l'accumulation de xanthophylles en les convertissant en molécules plus petites (*220*). Cependant, les produits de clivage et leurs métabolites n'ont pas encore été détectés dans les tissus animaux. Li *et al.*, 2017 (*221*) ont rapporté que, contrairement à la plupart des autres mammifères, la BCO2 exprimée dans l'œil humain est inactive sur le plan enzymatique. Ceci a pour conséquence l'accumulation unique de ces pigments intacts dans la macula.

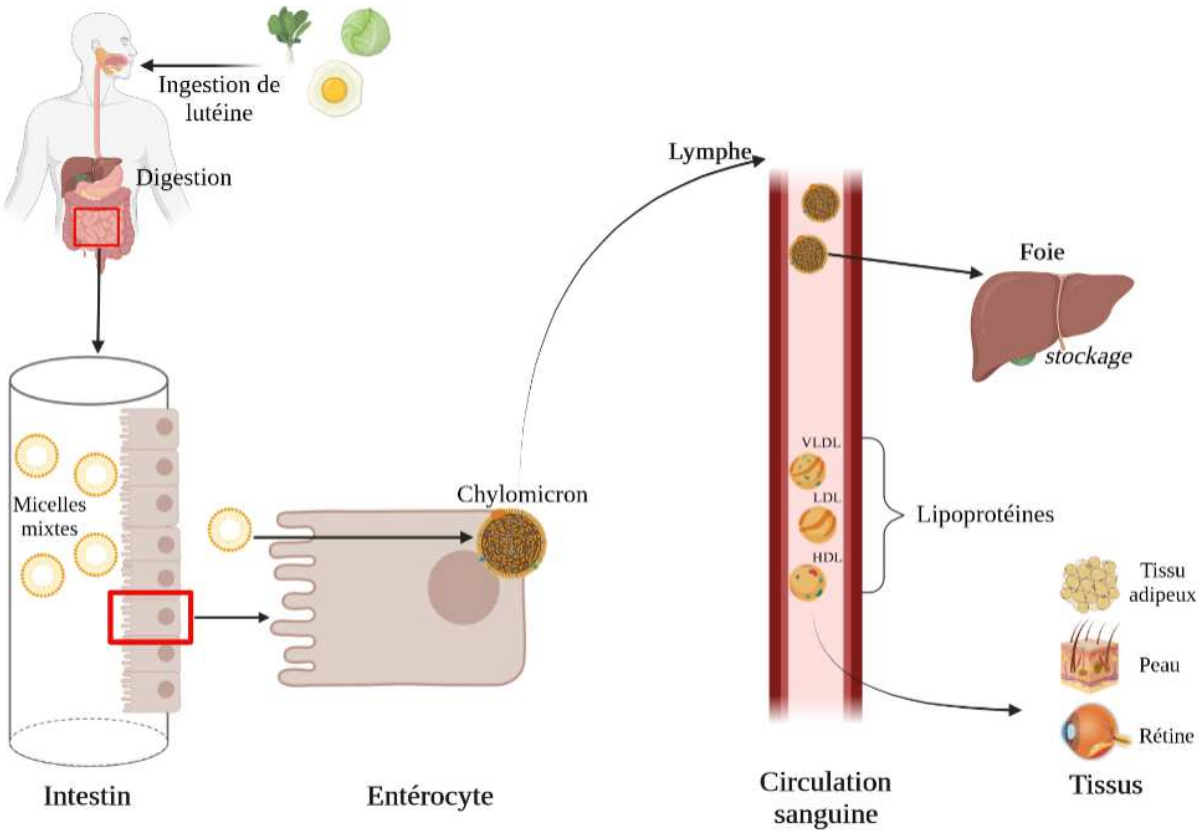


Figure 9 : Métabolisme de la lutéine et des caroténoïdes en général (adapté d'après *Desmarchelier et Borel*, 2017 (*214*)

2.2.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies

Tout comme le β-car, la lutéine est un antioxydant puissant, notamment pour la protection oculaire. La lutéine est fortement impliquée dans la protection contre les maladies oculaires, la DMLA et la cataracte. Ce caroténoïde pourrait aussi jouer un rôle dans la prévention de MCV mais aussi dans la prévention de cancers tel que le cancer du sein.

2.2.5.a. Santé oculaire

Par rapport aux autres caroténoïdes, la lutéine et son isomère, la zéaxanthine, sont particulièrement concentrées dans la région centrale de la rétine appelée macula (*222*). Une étude a constaté que des sujets âgés présentant des concentrations rétiniennes relativement élevées de lutéine et de zéaxanthine avaient une plus grande sensibilité en vision nocturne, diurne ainsi que des cônes sensibles aux longueurs d'onde courtes par rapport à ceux dont les niveaux de ces pigments maculaires étaient plus faibles (*223*). De nombreuses études ont montré un effet bénéfique d'une supplémentation en lutéine sur la progression de DMLA chez les personnes âgées (*224*, *225*). Le stress oxydatif génère des ERO comme les radicaux libres,

le peroxyde d'hydrogène ou encore l'oxygène singulet. Ceux-ci causent des dommages cellulaires, favorisent le processus de vieillissement de la rétine et conduisent finalement à la progression de la DMLA (*226*). Les xanthophylles maculaires, situées dans la bicouche lipidique de la membrane rétinienne, sont capables de prévenir la DMLA et de protéger la rétine contre la peroxydation et les photodommages en agissant comme des antioxydants qui neutralisent ces ERO (*227*, *228*). Les doubles liaisons conjuguées de la molécule de lutéine sont très efficaces pour neutraliser l'oxygène singulet (*229*). Les xanthophylles diminuent également l'exposition des photorécepteurs de la fovéa à la lumière bleue provenant du soleil, mais aussi des écrans numériques et des lampes LED. En effet, la densité du pigment maculaire augmente avec l'apport alimentaire en xanthophylle et pourrait assurer la photoprotection de la fovéa contre les effets nocifs de la lumière bleue (*230*).

2.2.5.b. Maladies cardiovasculaires

Une étude a montré que le taux de lutéine dans le sérum de sujets souffrant d'athérosclérose précoce était significativement inférieur à celui des témoins, suggérant que la lutéine pourrait jouer un rôle protecteur dans la prévention de l'athérosclérose précoce (*231*, *232*). En effet, dans l'étude de Dwyer *et al.,* 2001 (*231*), la lutéine a significativement réduit (de ≈ 40%) la formation de lésions dues à l'athérosclérose chez des souris modèles. Dans une autre étude, l'augmentation de la lutéine dans le sérum de sujets atteints d'athérosclérose précoce après supplémentation a réduit les cytokines inflammatoires et régulé les lipides du sérum (**Figure 10**), ce qui pourrait jouer un rôle important dans l'athérosclérose précoce (*233*). La prolifération et la migration anormales des cellules musculaires lisses vasculaires jouent un rôle important dans le développement de MCV telles que l'hypertension ou l'athérosclérose. Les anomalies du facteur de croissance dérivé des plaquettes, qui est un stimulateur de la croissance et de la motilité de ces cellules musculaires lisses vasculaires, contribueraient aux MCV (*234*). Lo *et al.,* 2012 (*234*), ont montré que la lutéine était capable de bloquer la migration de ces cellules induite par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (**Figure 10**).

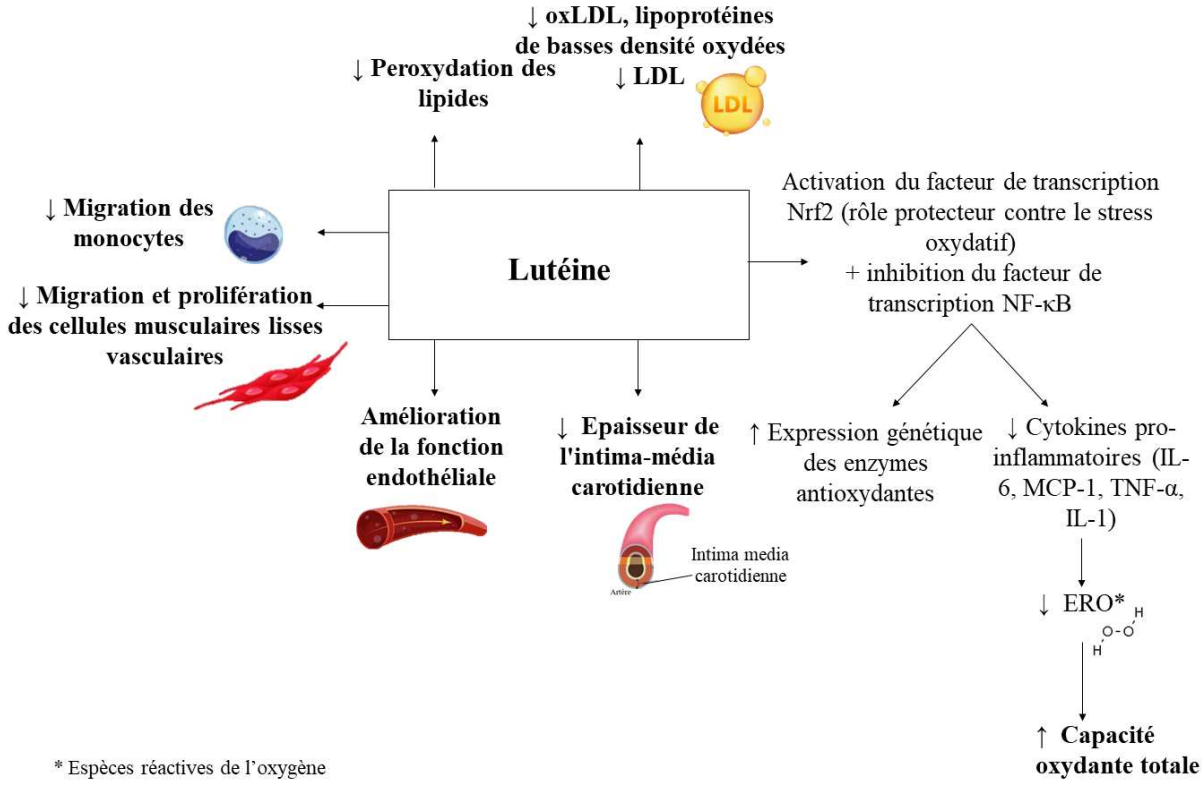


Figure 10 : Mécanismes bénéfiques supposés d'une supplémentation en lutéine sur les maladies cardiovasculaires (adapté d'après Hajizadeh-Sharafabad *et al., 2019* (*235*))

2.2.5.c. Cancers

Il a été montré que la lutéine favorisait l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses du sein en augmentant la production de ERO spécifiques au type de cellule et en altérant plusieurs voies de signalisation (*236*, *237*). Des anomalies dans la régulation de l'apoptose contribuent à divers états pathologiques, parmi lesquels le cancer. La perturbation de l'apoptose entraîne la progression de la tumeur. Tout comme les études précédentes, Eom *et al*., 2022 (*238*) ont constaté que la lutéine induisait l'apoptose des cellules cancéreuses gastriques par le biais d'un mécanisme médié par les ERO. Un autre exemple est celui du cancer de la prostate : la lutéine pourrait modifier l'expression des gènes associés à la croissance et à la survie de ces mêmes cellules cancéreuses (*239*).

2.2.6. Applications industrielles

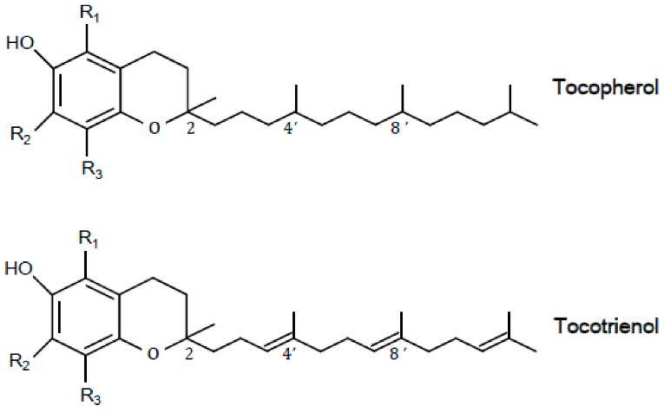
La lutéine est couramment prise par voie orale, en tant que complément alimentaire, pour ses effets bénéfiques concernant la prévention de maladies oculaires, notamment la cataracte et, chez les personnes âgées, la DMLA. Les compléments alimentaires de lutéine sont souvent dérivés d'œillets d'Inde (*Tagetes erecta*) (*240*). En France, le E161b est un additif

alimentaire, élaboré à partir de cette plante qui est utilisé dans les yaourts aromatisés, ou encore les confiseries, confitures, soupes, etc. La lutéine est couramment utilisée dans l'alimentation des volailles, pour colorer leur chair et le jaune d'œuf. Les résultats d'une étude menant à déterminer l'impact d'une supplémentation en lutéine sur les performances de production, et la qualité du lait de vaches laitières ont montré que l'ajout de lutéine alimentaire avait un effet croissant sur le rendement laitier, augmentait le pourcentage de matière grasse et la concentration en lactose du lait (*241*). Dans une autre étude, la supplémentation en *Tagetes erecta* peut non seulement améliorer les valeurs de jaunissement du bec, de la peau et du muscle, mais aussi augmenter la capacité antioxydante et la qualité de la viande de poulets de chair (*242*).

2.3. La vitamine E

2.3.1 Structure et formes

La VE est une vitamine liposoluble d'origine végétale et sa molécule est constituée d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale située en position C2. La VE existe sous la forme de huit composés différents : les α-, β-, γ- et δ-tocophérols et les quatre tocotriénols correspondants. Les formes α-, β-, γ- et δ- diffèrent par le nombre et la position des groupes méthyles sur le cycle chromanol (**Figure 11**).



R_1	R_2	R_3	
CH_3	CH_3	CH_3	α-
CH_3	H	CH_3	β-
H	CH_3	CH_3	γ-
H	H	CH_3	δ-

Figure 11 : Structure chimique des tocophérols, tocotriénols et de leurs isoformes

La synthèse chimique de l'α-tocophérol (α-TOC) produit un mélange équimolaire de huit stéréo-isomères différents : RRR, SRR, RSR, RRS, RSS, SSR, SRS et SSS. L'α-TOC synthétique est appelé all-rac-α-tocophérol. Les tocophérols les plus abondants dans le plasma et les tissus humains sont l'α-TOC et le γ-tocophérol (γ-TOC). Les mammifères ne synthétisent pas naturellement la VE. Il est donc nécessaire qu'ils acquièrent la VE à partir d'aliments riches en cette vitamine. Les isoformes α, β, γ et δ du tocophérol ne sont pas interconverties par les mammifères (*243*).

2.3.2. Sources

La VE étant exclusivement synthétisée par les organismes photosynthétiques, les animaux ne peuvent l'acquérir que par le biais de leur alimentation. Les aliments d'origine végétale sont la principale source de VE (**Tableau 10**). Les noix, les graines et les huiles végétales contiennent de grandes quantités d' α-TOC, et des quantités significatives sont également présentes dans les légumes à feuilles vertes et les céréales enrichies (*244*). En particulier, les huiles végétales sont considérées comme les principales sources alimentaires permettant d'atteindre les doses journalières recommandées. Les fruits et légumes contiennent généralement de plus faibles quantités de VE, mais les épinards, les olives et les avocats ont des teneurs en tocophérol élevées par rapport aux autres légumes et fruits (**Tableau 10**). Les proportions des quatre tocophérols varient selon la source alimentaire, les plus abondants étant l'α-TOC et le γ-TOC. En particulier, les huiles végétales varient dans leur teneur en différentes formes de tocophérols : les huiles de germe de blé, de tournesol, d'olive et de colza sont de bonnes sources d'α-TOC et les huiles de soja, de maïs et de colza de γ-TOC.

Tableau 10 : Concentration en α- et γ-tocophérol d'aliments couramment consommés et riches en vitamine E (d'après Zaaboul & Liu, 2022 (*245*))

Sources	α-tocophérol (mg /100g*)	γ-tocophérol (mg/100g*)
Huiles végétales		
Huile de colza	9 - 12	22 - 30
Huile de germes de blé	220 - 232	89
Huile de maïs	16	56
Huile d'olive extra vierge	16 - 25	7
Huile de tournesol	51	2
Noix et légumineuses		
Amandes	22 - 30	n.d.
Cacahuètes	7 - 13	9 - 23
Cerneaux de noix	3-4	16 - 31
Noisettes	26 - 32	2 - 4
Fruits et légumes		
Avocat	3 - 5	n.d.
Brocoli	3 - 4	n.d.
Epinards	4	<1
Olives	27	2
Poivron rouge	3 - 4	<1

*en poids frais
n.d. : non détecté.

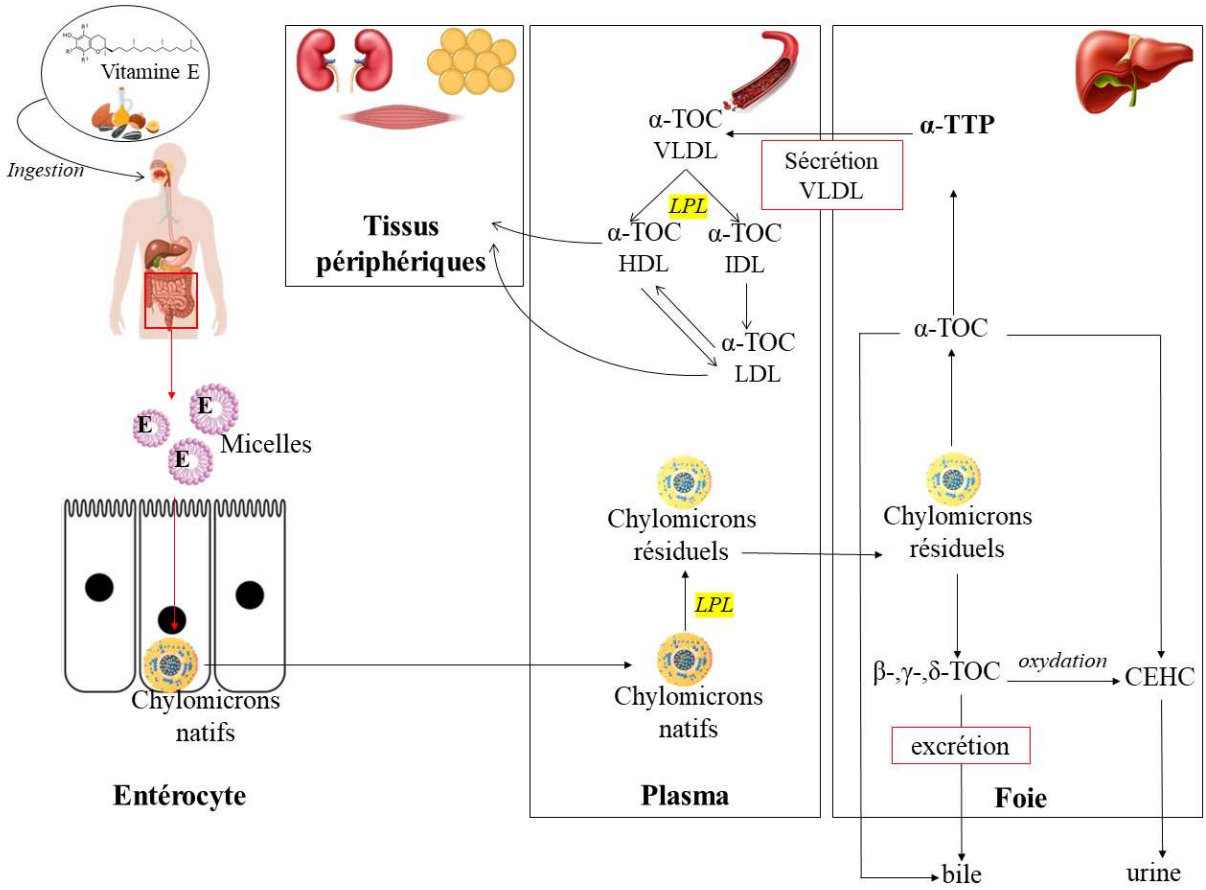
2.3.3. Recommandations nutritionnelles

Une valeur d'apport satisfaisant a été définie par l'ANSES en prenant en compte la valeur moyenne de la consommation de la population française (hors compléments alimentaires), selon l'étude INCA 3. L'apport satisfaisant en VE est fixé à 7 mg/jour pour les enfants de 1 à 6 ans, puis à 9 mg/jour pour ceux de 7 à 10 ans et à 10 mg/jour pour les adolescents de 11 à 17 ans. Concernant les femmes adultes, l'apport satisfaisant est de 9 mg/jour, et pour les hommes adultes, cette valeur est de 10 mg/jour (*174*). Au vu des résultats de l'enquête INCA 3 (*175*), cette valeur paraît être atteinte par la population française puisque les adultes consomment en moyenne 9,8 mg/jour de VE. L'EFSA a proposé une limite supérieure de sécurité de 300 mg/jour (*246*).

2.3.4. Métabolisme

La digestion de la VE dans la lumière de l'intestin grêle est liée à celle des lipides alimentaires car elle est solubilisée dans ces derniers : ce processus nécessite des sécrétions biliaires et pancréatiques pour former des micelles qui seront ensuite absorbées par l'épithélium intestinal. La majorité de son absorption a lieu dans l'intestin grêle, comme précisé dans la partie 3.

Les tocophérols absorbés par l'alimentation sont sécrétés dans les chylomicrons qui pénètrent dans la circulation via la lymphe. Ensuite, les TAG des chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), ce qui entraîne la production de chylomicrons résiduels. Le transport de la VE des cellules hépatiques jusque dans les VLDL naissants est assuré par une protéine de transfert du tocophérol spécifique, l'α-TTP (**Figure 12**). L' α-TTP est située dans le foie et a une affinité préférentielle pour le RRR-α-TOC (*247*, *248*). L'α-TTP est principalement responsable du maintien d'une teneur élevée en α-TOC dans les tissus et de l'enrichissement préférentiel de celui-ci par rapport aux autres formes de VE dans l'organisme (*249*). A la surface de l'endothélium vasculaire des tissus périphériques, les VLDL sont catabolisées par la LPL et transfèrent l'α-TOC aux tissus adjacents et aux HDL. Environ 50 à 60 % des VLDL résiduels sont absorbées par le foie, tandis que les 40 à 50 % restants sont acheminés vers d'autres tissus périphériques, la majorité de la VE retrouvée dans l'organisme se trouvant dans le tissu adipeux (*250*). La VE est métabolisée par ω-hydroxylation par le cytochrome P450, suivie d'une β-oxydation, d'une conjugaison et enfin d'une excrétion, le métabolite de l'α-TOC étant l'α-carboxyéthyl hydroxychromane (CEHC) (*251*). Il existe deux voies principales d'excrétion de la VE. La principale voie d'excrétion est la bile, qui est ensuite excrétée dans les fèces. La deuxième voie est l'urine, après que la VE ait été raccourcie par un processus similaire à la β-oxydation, afin de la rendre plus soluble dans l'eau.



α-,β-,γ-,δ-TOC = α-,β-,γ-,δ-tocophérol ; α-TTP : α–tocopherol transfer protein; CEHC : carboxyethyl hydroxychromans; HDL : high density lipoprotein; IDL : intermediate density lipoprotein; LDL : low density lipoprotein; LPL : lipoprotéine lipase; VLDL : very low density lipoprotein.

Figure 12 : Absorption, transport, sécrétion, métabolisme et excrétion de la vitamine E

2.3.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies

La VE contribue à la protection des cellules contre le stress oxydatif, c'est-à-dire contre l'agression des cellules par les ERO, produits en permanence par l'organisme. Elle neutralise ces particules et limite donc le stress oxydatif qui favoriserait le vieillissement et serait impliqué dans plusieurs maladies telles que les MCV et le cancer. De plus, la VE pourrait réduire les risques de déficience cognitive chez les personnes âgées.

2.3.5.a. Fonction cognitive

Le stress oxydatif peut jouer un rôle clé dans le développement des troubles cognitifs. Une supplémentation en VE peut avoir des effets bénéfiques sur les fonctions cognitives. L'utilisation de suppléments vitaminiques (dont la VE) a permis d'améliorer de manière significative les performances cognitives de sujet dont l'état nutritionnel était satisfaisant (*252*). Une autre étude a constaté que les sujets dont l'apport en VE était inférieur à 50 % de l'apport

journalier recommandé présentaient de moins bonnes performances cognitives que ceux dont l'apport était plus élevé (*253*).

Une étude a suivi pendant 8 ans 140 sujets âgés ne souffrant initialement pas de troubles cognitifs afin de détecter un possible développement d'un trouble cognitif léger ou d'une démence de type Alzheimer. Les analyses des taux de VE dans le sérum ont montré un risque plus faible de troubles cognitifs chez les sujets présentant des taux plus élevés de γ-TOC, de β-tocotriénol et de tocotriénols totaux (*254*). Une étude clinique a montré que, chez des patients atteints d'un déficit cognitif léger à modéré dû à la maladie d'Alzheimer, une supplémentation de 2000 UI/jour d'α-TOC a permis de ralentir le déclin fonctionnel de 19% par rapport à un placebo (*255*). Au contraire, certaines études ont montré des résultats non-significatifs concernant l'impact de la VE sur la fonction cognitive (*256*, *257*). Par conséquent, les avantages de la VE en tant que traitement des troubles neurodégénératifs font encore l'objet de débats.

2.3.5.b. Maladies cardiovasculaires

Tout comme pour la fonction cognitive, l'impact bénéfique de la VE sur la prévalence de MCV reste à confirmer. Les lipoprotéines de basse densité oxydées (ox-LDL) semblent jouer un rôle important dans l'athérogenèse et les concentrations circulantes d'ox-LDL ont été reconnues comme un facteur de risque de MCV. Une supplémentation alimentaire de 400 UI / jour de VE est associée à une réduction d'ox-LDL plasmatiques (*258*, *259*).

Dans une étude clinique réalisée pour évaluer l'effet d'une supplémentation en VE sur l'incidence des crises cardiaques chez les hommes, la supplémentation en α-TOC a été associée à une réduction considérable du taux d'infarctus du myocarde non mortel chez les patients atteints d'athérosclérose coronarienne symptomatique (*260*). Plusieurs études ont démontré que la VE est associée à une réduction des MCV chez les personnes atteintes de diabète et possédant un génotype Haptoglobine 2-2, génotype présentant un risque élevé d'événements cardiovasculaires chez les patients diabétiques (*261*, *262*).

2.3.5.c. Cancer

En raison de leurs fortes propriétés antioxydantes, les tocophérols ont été suggérés pour réduire le risque de cancer. Des taux de VE sérique moindre ont été associés à un risque plus important de cancers. D'abord, une étude a montré que les personnes dont les taux de VE sérique se situaient dans le quintile inférieur présentaient un risque de cancer du poumon 2,5 fois plus élevé que les personnes dont les taux se situaient dans le quintile supérieur (*263*). Un

taux plus élevé d'α-TOC était associé à une réduction statistiquement significative de l'incidence du cancer de la prostate (*264*, *265*). Les données d'une étude démontrent que l'arrêt de croissance de cellules cancéreuses de la prostate (lignée PC3) médié par le γ-TOC suit un mécanisme PPAR (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes) -γ-dépendant (*266*). Une étude a montré que le δ-tocophérol était plus actif que l'α- ou le γ-TOC dans l'inhibition de la croissance tumorale dans le poumon, possiblement en piégeant les ERO et en induisant l'apoptose (*267*).

2.3.6. Applications industrielles

La VE est utilisée en cosmétique mais aussi comme additif en industrie agro-alimentaire, sous les codes E306, E307, E308 et E309 (E306 étant sous forme naturelle et les trois autres sous forme synthétique) dans une multitude de produits comme les matières grasses, les viandes, les poissons, les glaces, les farines, etc. De par son pouvoir antioxydant, elle est utilisée comme conservateur et limite l'oxydation et donc le rancissement des aliments. La VE est reconnue comme une vitamine essentielle nécessaire à tous les animaux d'élevage car elle a un rôle d'antioxydant intracellulaire, préservant l'intégrité des membranes des cellules biologiques. Les besoins en VE de la plupart des espèces animales sont compris entre 10 et 40 UI/kg d'aliment, c'est-à-dire entre 7 et 27 mg/kg de tocophérol naturel (d-α-TOC) et entre 4 et 18 mg/kg de tocophérol synthétique (dl-α-TOC**)** (*268*). La VE peut avoir un effet bénéfique sur l'infection du pis des vaches, c'est-à-dire la mammite, ou encore sur la qualité du lait de vaches laitières (*269–271*). De plus, des niveaux élevés d'α-TOC dans les tissus protègeraient le bœuf haché et les steaks longuement vieillis de la décoloration et de l'oxydation des lipides (*272*).

2.4. La vitamine D

2.4.1. Structure et formes

La VD est le nom générique des composés présentant l'activité biologique du cholécalciférol (VD_3) et ayant une fonction antirachitique. Toutes les formes de VD appartiennent à une famille de lipides appelés sécostéroïdes. La structure des sécostéroïdes est quasi-similaire à celle des stéroïdes : la différence réside dans le fait que deux des atomes de carbone d'un des cycles des quatre cycles stéroïdiens typiques ne sont pas reliés, contrairement aux stéroïdes. La VD est un précurseur hormonal qui se présente sous plusieurs formes : l'ergocalciférol, ou vitamine D_2 (VD_2) et le cholécalciférol, ou VD_3, mais aussi leurs métabolites, le calcidiol (25-hydroxyvitamine D, $25(OH)D_3$) et le calcitriol (1,25α-

dihydroxyvitamine D, 1,25$(OH)_2$D)). La différence structurelle entre les VD_2 et VD_3 se situe dans leurs chaînes latérales (**Figure 13**). En effet, la VD_2 contient une double liaison entre les carbones 22 et 23 et un groupe méthyle sur le carbone 24 de l'anneau brisé, contrairement à la VD_3 (*273*).

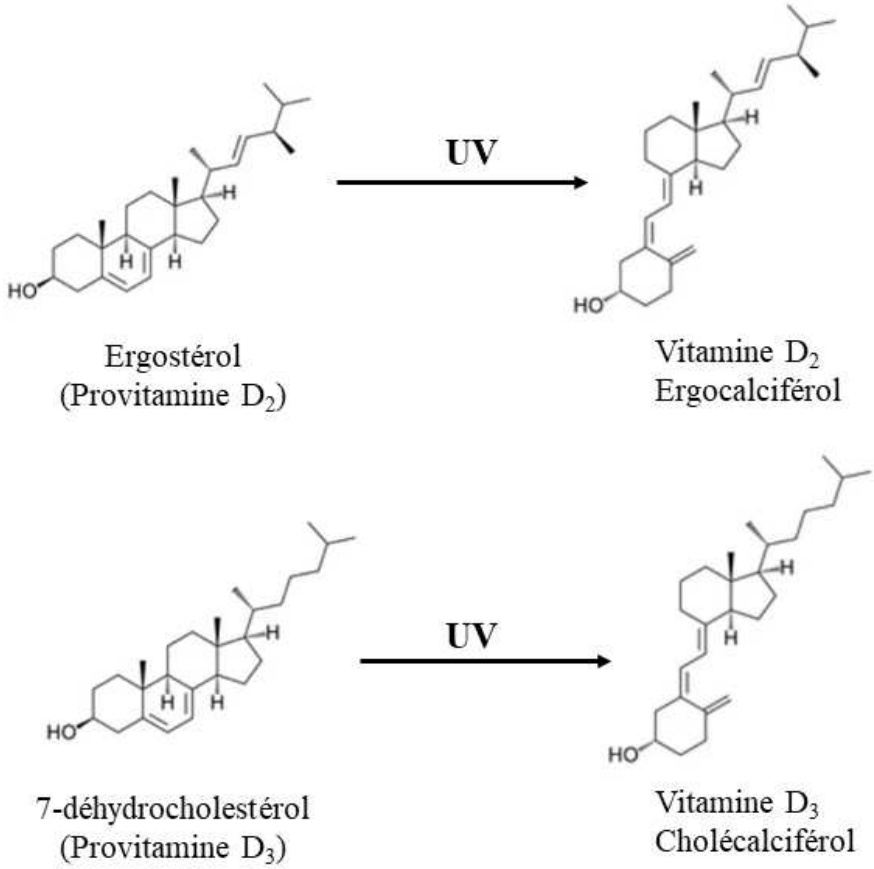


Figure 13 : Structure des vitamines D_2 et D_3 et de leurs précurseurs

2.4.2. Sources

La VD a la capacité d'être synthétisée au niveau de la peau de manière endogène par le biais de rayonnements UVB, mais généralement en quantité insuffisante. En effet, les écrans solaires et une pigmentation plus importante de la peau peuvent réduire la synthèse cutanée de la VD_3 jusqu'à 90 %. Chez les personnes âgées, la synthèse cutanée de la VD_3 peut être réduite jusqu'à 75 %, surtout en hiver (*274*). Par conséquent, elle doit aussi être apportée par l'alimentation. Une fraction importante de VD_3, estimée à environ 80%, est produite de manière endogène dans la peau à partir du 7-déshydrocholestérol sous l'action de la lumière UV (*274*, *275*). La VD_2 peut être synthétisée par les plantes et les champignons. En effet, l'exposition de champignons (contenant de l'ergostérol) à des rayons UVB peut être utilisée car elle augmente leur teneur en ergocalciférol : les champignons pourraient alors constituer une source alimentaire intéressante de VD. La VD_3 peut avoir deux origines : elle peut être fabriquée dans

la peau lorsqu'elle est exposée à la lumière et elle peut être retrouvée dans le poisson et la viande. Très peu d'aliments naturels contiennent de la VD et les poissons gras, comme le saumon, sont considérés comme les meilleures sources (**Tableau 11**) (*276*). De petites quantités de VD sont retrouvées dans le foie de bœuf, les produits laitiers et le jaune d'œuf (*275*). La VD alimentaire est principalement retrouvée sous la forme de VD_3 et son métabolite $25(OH)D_3$.

Tableau 11 : Dix des sources les plus riches en vitamine D (d'après O'Mahony *et al*., 2011 (*277*)

Sources	Concentration (µg /100g*)
Huile de foie de morue	210 - 250
Saumon	6 - 25
Maquereau	9 - 16
Hareng	6 - 15
Champignons de Paris, traités aux UV	12
Thon	7
Sardines	5
Jaune d'œuf	5
Tranches de dinde	2
Beurre	1

*poids frais

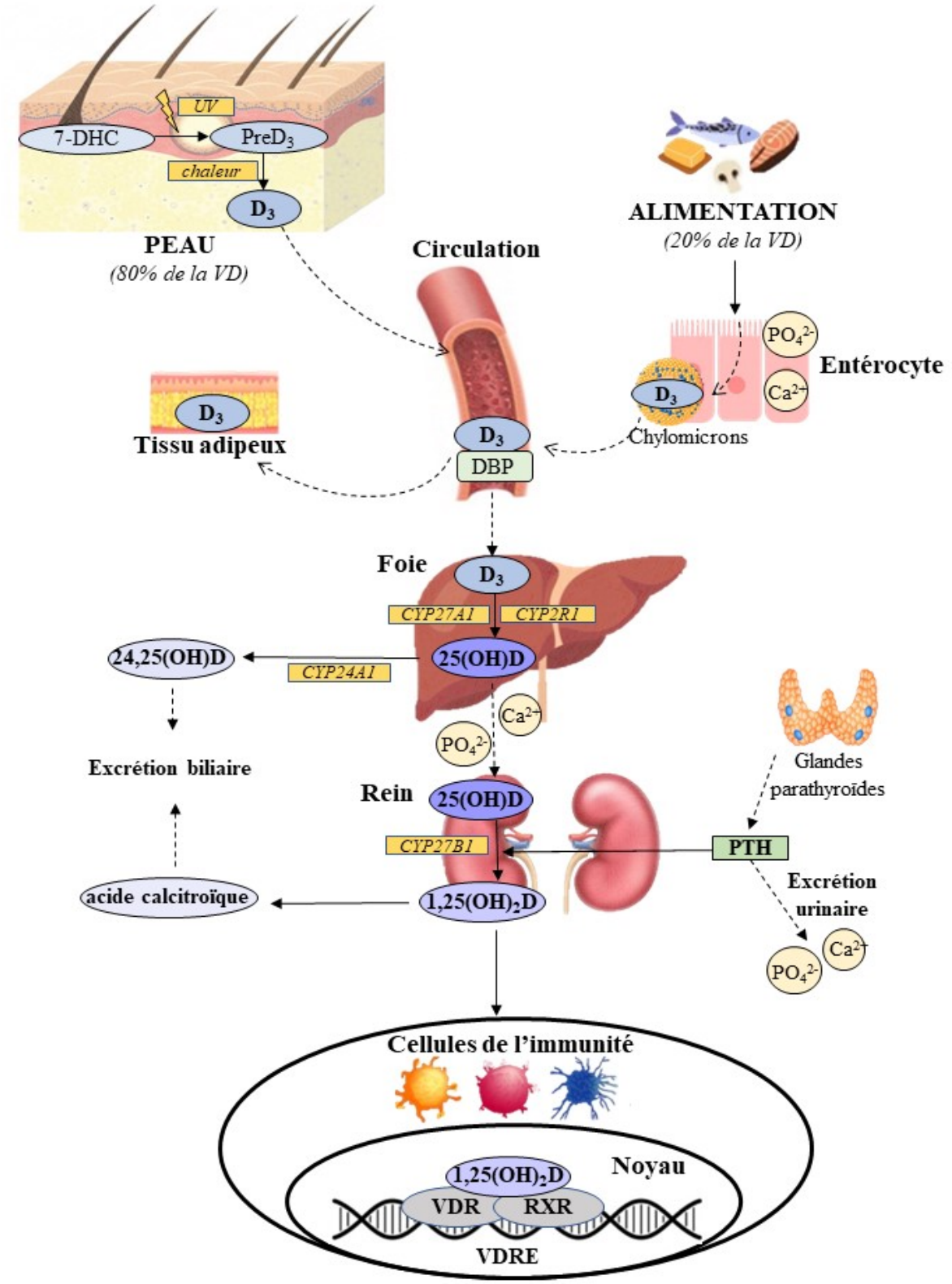
2.4.3. Recommandations nutritionnelles

L'ANSES a établi des valeurs d'apport satisfaisant pour la VD alimentaire, sans prendre en compte la VD apportée par l'ensoleillement. Ces valeurs sont de 10 µg/jour pour les nourrissons et de 15 µg/jour pour les enfants, adolescents et adultes (*174*). Selon l'étude INCA 3, les adultes français en consomment en moyenne 3,1 µg/jour, soit environ cinq fois moins que l'apport satisfaisant (*175*). Le statut en VD peut être évalué en mesurant le taux de 25(OH)D dans le sang. Selon une étude réalisée en France (*278*), l'insuffisance en 25(OH)D (<30 ng/ml) concernait 80% des adultes, 42% présentaient un déficit sévère à modéré (<20 ng/ml) et 5% un déficit sévère (<10 ng/ml). La carence en VD provoque un rachitisme chez les enfants, qui se définit comme un défaut de minéralisation (ostéomalacie) de l'os ou du tissu ostéoïde en croissance (*279–281*). Chez les enfants en âge de se tenir debout, le rachitisme se caractérise par un défaut ou un retard d'ossification se traduisant par des déformations osseuses caractéristiques des membres inférieurs. Un faible taux de VD a également été associé à un

risque accru d'autres maladies, comme l'ostéoporose, les MCV, le diabète, ainsi que certains cancers (*282–284*). Au contraire, un excès de VD est assez rare, mais l'ANSES a déterminé une limite de sécurité supérieure de 25 µg/jour pour les nourrissons, 50 µg/jour pour les enfants de 1 à 10 ans et de 100 µg/jour pour les adolescents et les adultes (*174*).

2.4.4. Métabolisme

La majorité de la VD est synthétisée dans la peau (80%) et le reste est apporté par le biais de l'alimentation, en même temps que le calcium et les phosphates. La VD et ses métabolites, liés à la protéine de liaison de la VD (DBP), sont ensuite transportés dans le foie pour y être transformés en 25(OH)D (**Figure 14**). Au vu de sa structure, la VD_2 a une affinité réduite pour la DBP, entraînant son élimination de la circulation plus rapidement que la VD_3 et limitant sa conversion en 25(OH)D (*285*). Par conséquent, à moins d'être administrée quotidiennement, la supplémentation en VD_2 n'entraîne pas un taux sanguin de 25(OH)D aussi élevé que des quantités similaires de VD_3. Le principal intervenant dans la synthèse de 25(OH)D est la CYP2R1, ou cytochrome P450 2R1, une VD 25-hydroxylase. Ensuite, la 25(OH)D, qui est une forme biologiquement inactive, est resécrétée dans le sang pour être transportée vers les reins où elle est convertie en sa forme active, la $1,25(OH)_2D$, par l'enzyme 25-hydroxyvitamine D-1-hydroxylase, également connue sous le nom de CYP27B1 (*286–289*). Cette conversion a lieu principalement dans les reins mais peut également se produire dans d'autres tissus (peau, cerveau, tissu adipeux, côlon, etc.). La parathormone (PTH) a la capacité de stimuler la production de calcitriol rénal en activant le CYP27B1, alors que la FGF-23, qui est une hormone phosphaturique impliquée dans le métabolisme minéral osseux, et le calcitriol lui-même, inhibent le CYP27B1 (*285*, *290*). Pour exercer son rôle biologique, la $1,25(OH)_2D_2$ et la $1,25(OH)_2D_3$ qui ont des affinités similaires pour le VDR, doivent se lier au facteur de transcription VDR qui peut former des hétérodimères avec des récepteurs apparentés, comme le récepteur du rétinoïde X (RXR). Ce complexe se lie aux éléments de réponse de la VD (VDRE) dans l'ADN pour réguler la transcription des gènes sous contrôle du VDRE (*289*, *291*). L'excès de $1,25(OH)_2D$ est excrété par la bile ou l'urine sous forme d'acide calcitroïque.



$1,25(OH)_2D$: 1,25α-dihydroxyvitamine D; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamine D; 7-DHC: 7-Déshydrocholestérol; Ca^{2+}: calcium; CYP(27A1, R21,24A1,27B1): cytochromes P450; D3: Vitamine D3; DBP: Vitamin D Binding Protein; PO_4^{2-}: phosphate; PTH:Parathormone; VDR: Vitamin D Receptor; RXR: retinoid X receptor; VDRE: Vitamin D Response Element.

Figure 14 : Métabolisme de la vitamine D

2.4.5. Effets biologiques et rôle dans la prévention de pathologies

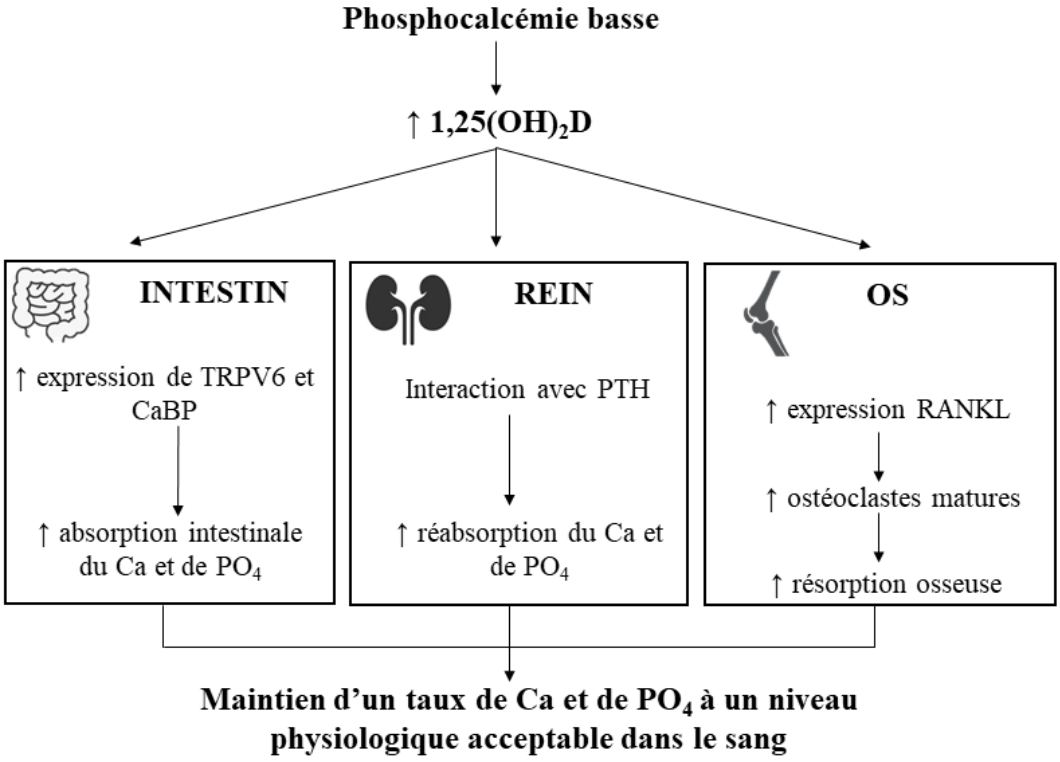
La VD est cruciale pour maintenir la santé des os et des muscles et joue un rôle primordial dans le renforcement de notre système immunitaire et dans la santé cardiovasculaire. De plus, des associations ont été trouvées entre de faibles niveaux sanguins de VD et le risque de développer plusieurs types de cancer.

2.4.5.a. Métabolisme phosphocalcique

Le métabolisme phosphocalcique a une importance primordiale pour l'élaboration du squelette et doit être régulé de manière très précise afin de maintenir l'homéostasie phosphocalcique. En réponse à la phosphocalcémie, la $1,25(OH)_2D$ (forme active de la VD) ou calcitriol va agir sur trois organes cibles : l'intestin (absorption), le rein (excrétion) et l'os (stockage). D'abord, dans l'intestin grêle, le $1,25(OH)_2D$ améliore l'absorption intestinale du calcium en stimulant l'expression du récepteur épithélial du calcium (TRPV6) et de la calbindine, protéine de liaison au calcium (CaBP).

La PTH induit la libération de calcium et de phosphate de l'os vers le plasma, en plus de réduire l'excrétion du calcium et de stimuler la production rénale de $1,25(OH)_2D$, qui augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphate (*292*). Ainsi, la $1,25(OH)_2D$ permet de diminuer la fuite urinaire de calcium par une augmentation de sa réabsorption.

Lorsque l'apport alimentaire en calcium ne suffit pas à satisfaire les besoins en calcium de l'organisme, la $1,25(OH)_2D$ stimule l'expression du ligand du récepteur activateur de NFκB (RANKL) mobilisant les cellules souches précurseurs des ostéoclastes et les incitant à devenir des ostéoclastes matures (**Figure 15**) (*293*). Les ostéoclastes décomposent alors les tissus osseux, libérant les minéraux qui sont transférés vers le sang : ce processus est la résorption osseuse.



Ca: calcium; CaBP: calbindine; PO_4: phosphate; PTH: parathormone; RANKL: receptor activator of nuclear factor- κB ligand; TRPV6: transient receptor potential vanilloid subfamily member 6

Figure 15 : Effet de la 1,25(OH)$_2$D sur le maintien de l'homéostasie phosphocalcique

2.4.5.b. Système immunitaire

La VD a un effet sur les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Les rapports sur le traitement de la tuberculose par l'huile de foie de morue (très riche en VD) sont les premières preuves de l'action de la VD comme stimulant de l'immunité innée. Une étude réalisée au Pakistan sur des sujets souffrant de tuberculose rapporte que 79% de ces sujets présentaient une carence en VD et que de faibles niveaux de VD ont été associés à un risque cinq fois plus élevé de progression de la tuberculose (*294*). Le mécanisme supposé par lequel la VD peut prévenir ou limiter l'infection par *Mycobacterium Tuberculosis* serait la liaison de la 1,25(OH)$_2$D au facteur de transcription de la VD (VDR), puis à l'élément de réponse VDRE régulant l'expression de gènes impliqués dans la production de cytokines (*295*). De nombreuses cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif expriment le VDR, et certaines de ces cellules ont également la capacité d'exprimer la 1-α-hydroxylase (ou CYP27B1), une enzyme convertissant la 25(OH)D en 1,25(OH)$_2$D. La VD inhibe la prolifération des cellules B et T et bloque la sécrétion d'immunoglobulines. En conséquence, la production de cytokines inflammatoires (IL-17, IL-21) diminue alors qu'au contraire la production de cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-10, augmente. La VD a

également des effets sur les monocytes et les cellules dendritiques puisqu'elle inhibe la production de cytokines inflammatoires des monocytes (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 et TNFα) (*296*, *297*).

2.4.5.c. Maladies cardiovasculaires

Le VDR et le CYP27B1 ont été observés dans les myocytes et fibroblastes cardiaques, les cellules endothéliales et les muscles lisses vasculaires. Les voies activées, $1,25(OH)_2D$/VDR, pourraient jouer un rôle dans la fonction cardiovasculaire. La $1,25(OH)_2D$ peut moduler indirectement la pression artérielle en diminuant les niveaux de PTH et elle interfère avec le système rénine-angiotensine (RAS) qui régule la pression artérielle. Le rôle de la rénine est de cliver l'angiotensinogène en angiotensine I, qui est à son tour clivée en angiotensine II. Grâce à l'activation de récepteurs spécifiques, l'angiotensine II augmente la pression artérielle. Ainsi, les souris VDR ou CYP27B1 inactivées présentaient des niveaux accrus de rénine et, par conséquent, d'angiotensine II, ce qui a entraîné une hypertension et une hypertrophie cardiaque (*298*, *299*). Chez les personnes âgées, la carence en 25(OH)D est associée à un risque d'infarctus du myocarde plus élevé, et l'excès de PTH à un risque plus élevé d'insuffisance cardiaque (*300*).

2.4.5.d. Cancer

Le VDR est exprimé par des lignées de cellules cancéreuses et joue probablement un rôle dans la pathogenèse et la progression du cancer. CYP27B1 y est également exprimé à un niveau élevé. Le $1,25(OH)_2D$ aurait un effet antiprolifératif sur les cellules de myélome, de mélanome et sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses (*301*). Il a été rapporté que la $1,25(OH)_2D$/VDR peut inhiber les activités de NF-kB (*302*, *303*), facteur de transcription régulant l'expression des gènes contrôlant l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Cela a pour conséquence une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, une inhibition de la prolifération cellulaire et de l'inflammation associée au cancer.

2.4.6. Applications industrielles

Plusieurs pays européens ont mis en place des politiques de supplémentation en VD et, en France, sa supplémentation est autorisée mais non obligatoire, comme par exemple dans certains yaourts, laits de vache et boissons de soja (*304*). Dans l'alimentation animale, la VD est essentielle, en particulier chez les bovins, puisqu'en plus d'assurer l'homéostasie du calcium et le métabolisme osseux, elle pourrait également prévenir la fièvre du lait (hypocalcémie) chez les vaches laitières (*305*, *306*). De plus, une étude a montré que des champignons enrichis en VD_2 ont amélioré significativement les performances et le poids de porcs (*307*). Chez le poulet, la VD participe au développement du squelette et du muscle ainsi qu'à la bonne formation de la coquille d'œuf. L'augmentation de la supplémentation en VD_3 aurait un effet favorable sur la capacité de marche et le bien-être des poulets de chair élevés dans des conditions d'haute densité d'élevage (*308*).

3. Digestion et absorption intestinale des vitamines liposolubles et des caroténoïdes

La digestion est le processus de décomposition des aliments en nutriments et micronutriments qui peuvent être absorbés par l'intestin. Lors de la digestion, les aliments sont acheminés dans le système digestif et décomposés en petites molécules que l'organisme peut absorber. Au cours de la digestion, les nutriments et micronutriments vont se distribuer entre les phases aqueuses et lipidiques du chyme en fonction de leur solubilité dans ces deux phases. Les vitamines liposolubles et les caroténoïdes, hydrophobes, vont être étroitement associés aux lipides et à leur métabolisme. Nous nous focaliserons donc sur la digestion des lipides et de ces micronutriments liposolubles dans la suite de ce chapitre.

La biodisponibilité, c'est-à-dire la proportion d'un nutriment consommé dans le régime alimentaire qui est absorbée et utilisée par l'organisme, est influencée par plusieurs facteurs comme le type de micronutriments, sa quantité dans le repas ou encore la matrice alimentaire. Ces facteurs ont été répertoriés dans l'acronyme mnémotechnique "SLAMENGHI" (*309*)

3.1. Les différentes phases du processus de digestion

3.1.1. Phase salivaire : libération de la matrice alimentaire

La première étape de digestion des lipides commence dans la bouche lorsque les lipides rentrent en contact avec la salive. La salive est composée à 99 % d'eau et contient de nombreuses protéines, des métabolites peptidiques et des ions. Elle contribue non seulement à la protection des muqueuses contre les agents pathogènes, mais aussi à la capacité de goûter, de détecter et de digérer les macronutriments et les micronutriments contenus dans les aliments. Une lipase linguale a été décrite chez le rat mais pas chez l'Homme (*310*). La destruction mécanique des aliments solides est une étape essentielle, car elle réduit la taille des particules, augmente la surface et facilite la libération des nutriments (*311*). Les graisses sont alors plus accessibles aux enzymes digestives et se transforment en minuscules gouttelettes, se séparant de la phase aqueuse.

3.1.2. Phase gastrique : transfert vers la phase huileuse

Après avoir été mastiqués, les aliments pénètrent dans l'œsophage où une série de contractions musculaires, ou péristaltisme, les pousse vers l'estomac. L'estomac agirait comme un organe émulsifiant puisque le péristaltisme propulse le contenu gastrique contre le pylore,

dispersant ainsi les gouttelettes d'huile et d'autres substances solides (*312*). Lorsque les aliments rentrent en contact avec la paroi stomacale, une hormone, la gastrine, stimule la sécrétion de l'acide chlorhydrique via les cellules pariétales. Ce processus permet de séparer la phase lipidique du repas de la phase aqueuse. Ainsi, les vitamines liposolubles et caroténoïdes sont transférés de la matrice alimentaire vers la phase huileuse qui se trouve sous forme de grosses gouttelettes lipidiques (*313*, *314*).

De plus, la digestion des lipides est initiée par la lipase gastrique, contenue dans le suc gastrique, qui se fixe à la surface des gouttelettes lipidiques et décompose une partie des TAG en diacylglycérols et en AG dans l'estomac où 5 à 30 % des TAG peuvent être hydrolysés (**Figure 16**) (*315*, *316*).

3.1.3. Phase duodénale : formation des micelles

Les aliments partiellement digérés mélangés aux sécrétions salivaires et gastriques (chyme) entrent ensuite dans le duodénum, le premier segment de l'intestin grêle, et y sont mélangés avec du bicarbonate de sodium, des sels biliaires, des phospholipides et des enzymes sécrétées à la fois par le foie et le pancréas (*317*, *318*). L'arrivée des AG libres dans la lumière intestinale déclenche la libération de cholécystokinine dans la circulation sanguine. La vésicule biliaire répond à la cholécystokinine en se contractant, libérant ainsi des sels biliaires dans la lumière intestinale. Les sels biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol. Grâce à leur structure amphipathique, ils peuvent émulsifier les grosses gouttelettes lipidiques en gouttelettes de plus petites tailles et augmentent ainsi leur exposition aux lipases digestives. Les sels biliaires sont en grande partie réabsorbés dans l'iléon terminal et renvoyés vers le foie : c'est la circulation entéro-hépatique.

Un autre acteur entre en jeu dans la digestion : le bicarbonate de sodium, sécrété par le pancréas, qui neutralise l'acidité gastrique en entraînant une hausse du pH qui passe d'une valeur acide d'environ 2 (pH de l'estomac à jeun) à un pH dans le duodénum d'environ 6,5, pH où la lipase pancréatique (LP) est très active (son pH optimal étant d'environ 8) (*313*, *319*, *320*). La LP est la principale enzyme impliquée dans la digestion des TAG, responsable de 70% de leur hydrolyse (*321*). Pour une activité optimale, la LP a besoin d'un cofacteur polypeptidique : la colipase. Celle-ci se lie à l'interface huile-eau grâce aux acides biliaires et ancre la LP à la surface. En l'absence de colipase, les acides biliaires éliminent la LP de la surface des lipides et inhibent ainsi la lipolyse (*312*, *322*). Dans le suc pancréatique, d'autres enzymes interviennent dans le processus de digestion, comme la phospholipase-A2 qui hydrolyse les phospholipides en lyso-phospholipides, ou la cholestérol ester hydrolase (CEH), qui hydrolyse

notamment les esters de cholestérol mais qui peut aussi hydrolyser d'autres molécules estérifiées, e.g. esters de caroténoïdes.

Ces enzymes permettent l'hydrolyse des TAG et des diacylglycérols en monoacylglycérols et en AG (**Figure 16**). Quand ces produits de la lipolyse sont incorporés dans les micelles biliaires composées notamment de sels biliaires, de cholestérol et de phospholipides, des micelles mixtes sont ainsi créées. Celles-ci se composent d'un centre hydrophobe contenant du cholestérol et des AG libres. Les phospholipides, amphipathiques et les monoglycérides forment l'extérieur de la micelle avec des queues hydrophobes au centre et des têtes hydrophiles à l'extérieur. Les micelles sont responsables du transport des lipides alimentaires (produits d'hydrolyse des TAG, cholestérol, phospholipides, vitamines liposolubles, caroténoïdes…) jusqu'à la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales, où ils sont absorbés.

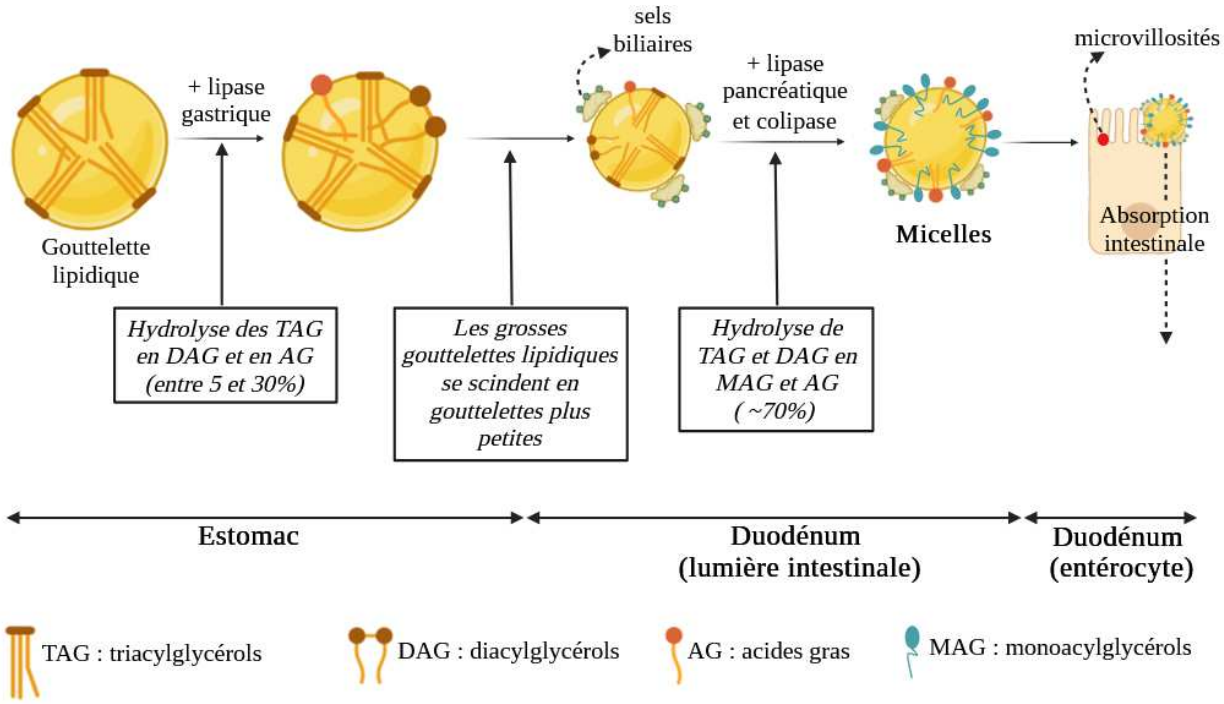


Figure 16 : Devenir des lipides dans l'estomac et l'intestin grêle

Les caroténoïdes, comme tous les composés liposolubles, sont d'abord en partie transférés dans la phase lipidique du bol alimentaire et émulsifiés en gouttelettes lipidiques dans l'estomac, puis le duodénum. Il est admis que ce sont les formes libres des micronutriments qui sont absorbées par la muqueuse intestinale. Par conséquent les formes estérifiées doivent être préalablement hydrolysées pour pouvoir être absorbées. L'hydrolyse des esters de xanthophylles et de rétinol par les lipases dans la lumière intestinale serait donc indispensable

à leur absorption. La CEH du suc pancréatique serait responsable de la libération des xanthophylles libres à partir des esters de xanthophylle (*323*). Concernant les esters de rétinol, la CEH ne serait pas l'enzyme impliquée dans leur hydrolyse (*324*, *325*) mais la LP (*326*, *327*). Cependant, la LP n'est pas la seule enzyme responsable de l'hydrolyse des esters de rétinol puisqu'une étude a montré que le taux d'absorption des esters de rétinol chez les souris double knock-out LP et CEH était toujours de 50 %, comparé à celui des souris WT (*328*), impliquant l'existence d'autres enzymes, comme la lipase apparentée de type 2 (*327*). En ce qui concerne les formes estérifiées de VE et VD, il a été montré qu'elles étaient hydrolysées par la CEH (*329*, *330*).

La bioaccessibilité des caroténoïdes, c'est-à-dire la proportion de caroténoïde consommé dans un repas qui est libérée de la matrice alimentaire pendant la digestion dans le contenu luminal, qui est incorporée dans les micelles mixtes, et qui est donc absorbable par l'intestin grêle, est différente selon la nature du caroténoïde. En effet, les xanthophylles semblent avoir une bioaccessibilité plus importante que les carotènes (*165*, *331*, *332*). Cela pourrait être dû à leurs solubilités différentes dans les micelles mixtes selon leurs caractéristiques moléculaires, en particulier leur hydrophobie. Les molécules les plus hydrophobes ont tendance à rester à l'intérieur des gouttelettes d'huile, réduisant leur bioaccessibilité (*333–335*)

3.2. Absorption intestinale via l'entérocyte

L'étape finale de l'absorption des vitamines liposolubles et des caroténoïdes commence lorsque les micelles mixtes atteignent la membrane apicale des entérocytes. Ces micronutriments traversent alors cette membrane par des mécanismes non encore complètement élucidés puis sont transportés dans l'entérocyte jusqu'au site de leur incorporation dans les chylomicrons avec les autres lipides alimentaires, e.g. TAG, phospholipides et cholestérol. Les chylomicrons transportant ces micronutriments liposolubles entrent ensuite dans le système lymphatique puis rejoignent la circulation systémique pour être distribués dans l'organisme.

3.2.1 Captage par la cellule intestinale au pôle apical

Les entérocytes sont des cellules épithéliales de l'intestin liées par des jonctions étanches, responsables de l'absorption des nutriments, micronutriments et phytomicronutriments provenant de l'alimentation. Leur principale fonction est de permettre le transport de ces composés de la lumière de l'intestin grêle jusqu'au milieu intérieur afin de les

acheminer vers la circulation sanguine. Le pôle apical de l'entérocyte se distingue du pôle basolatéral par l'existence de plusieurs excroissances cytoplasmiques, appelées microvillosités augmentant la surface d'échange (**Figure 17**). Elles sont environ 60 par µm² et donnent aux cellules une structure en brosse. Au niveau de cette bordure en brosse et donc du pôle apical, les micronutriments solubles sont absorbés par le biais de transporteurs et/ou par diffusion passive selon leur nature.

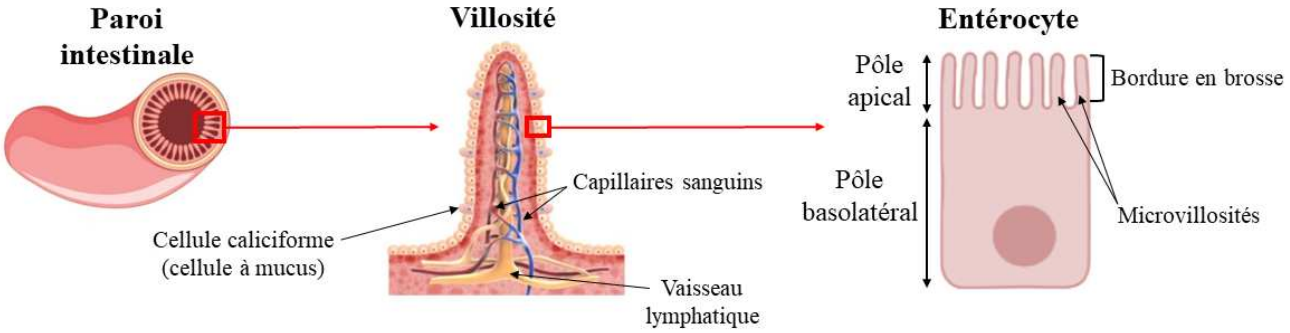


Figure 17 : Anatomie de l'intestin grêle

Plusieurs protéines sont impliquées dans l'absorption intestinale des vitamines liposolubles et des caroténoïdes. Tout d'abord, deux récepteurs de la famille des « scavenger » de classe B : SR-B1, récepteur « scavenger » de type 1 (SR-B1) et CD36, sont deux protéines réceptrices membranaires, principalement localisées sur la membrane de la bordure en brosse des cellules épithéliales. Identifiés tout d'abord comme récepteurs des HDL dans la circulation sanguine, il a été démontré qu'il participent au transport sélectif et à la régulation du cholestérol et des lipides sanguins (*336–338*). De plus, la protéine Niemann–Pick C1 (NCP1L1) est une protéine ayant comme fonction d'assurer la médiation du transport des stérols extracellulaires à travers la membrane de la bordure en brosse (*339*, *340*). Elle est également fortement exprimée dans le foie humain où elle pourrait permettre de limiter la perte excessive de cholestérol par voie biliaire (*341*). Ainsi, les récepteurs SR-B1, CD36 et NCP1L1, transporteurs intestinaux du cholestérol ont été identifiés comme participant au captage de plusieurs vitamines liposolubles et de caroténoïdes (**Figure 18**).

À des concentrations physiologiques, le transport de la VA est actif mais le transporteur intestinal du rétinol n'est toujours pas identifié à ce jour. Il semblerait que les transporteurs SR-B1 et CD36 ne soient pas impliqués dans son captage intestinal (*342*, *343*). À des concentrations plus importantes, un phénomène de diffusion passive permettrait son absorption dans l'entérocyte (*344*). De plus, les récepteurs SR-B1, CD36 et NPC1L1 semblent être impliqués dans le captage des caroténoïdes proVA, comme le β-car (*343*, *345*, *346*). Des études

ont aussi constaté l'implication de ces récepteurs dans le captage de la lutéine (*345*, *347*, *348*), de la VE (*349–351*) et de la VD (*352–354*).

Les mécanismes par lesquels ces récepteurs permettent l'entrée des micronutriments liposolubles dans l'entérocyte ne sont pas encore élucidés. Une première hypothèse est que ces récepteurs permettent le passage de ces micronutriments à travers la membrane via une sorte de tunnel, avant qu'ils soient pris en charge par des transporteurs intracellulaires (*355*). La seconde hypothèse est que ces micronutriments se lient aux récepteurs avant que ce complexe soit endocyté (*356*, *357*). Cette hypothèse provient du fait que SR-B1 s'accumule dans les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (*358*) et que CD36 pourrait coopérer avec des protéines telles que la cavéoline-1, protéine impliquée dans l'endocytose lipidique (*356*). Mais cela est peu probable vu la faible spécificité de ces récepteurs vis-à-vis des micronutriments ayant des formules chimiques très différentes. La dernière hypothèse est que ces récepteurs contribuent indirectement à l'absorption des lipides, et donc indirectement à celle des micronutriments liposolubles qui sont incorporés dans les lipides, en influençant leur transport et le métabolisme des chylomicrons. En effet, le récepteur SR-BI agirait comme un capteur de lipides dans les entérocytes (*359*), favoriserait le flux de lipides à travers les cellules intestinales, et agirait sur la sécrétion des chylomicrons (*360*). Cette dernière hypothèse ne donne pas d'indications sur les mécanismes par lesquels ces micronutriments sont absorbés par l'entérocyte.

3.2.2 Transport et métabolisme intra-entérocytaire

Les composés liposolubles nécessitent des transporteurs protéiques, ou lipidiques, pour se déplacer à travers le cytosol aqueux des entérocytes. Le β-car peut être, soit incorporé intact avec les graisses alimentaires et le cholestérol dans les chylomicrons (dans l'entérocyte, jusqu'à 40 % des caroténoïdes absorbés ne sont pas transformés (*361*)), soit converti en rétinal par une enzyme cytosolique, BCO1, qui se lie à la protéine cellulaire de liaison au rétinol de type II, la CRBPII (**Figure 18**) (*362*, *363*). Cette protéine assure le transport de la VA depuis la membrane jusqu'à l'appareil de Golgi, site d'assemblage des chylomicrons (*364*). Le rétinal est ensuite réduit en rétinol par une ou plusieurs rétinal réductases, qui ne sont toujours pas caractérisées à ce jour. Le rétinol formé à partir des caroténoïdes proVA et celui formé à partir de la VA préformée se lient à la CRBPII et sont estérifiés en esters de rétinol par deux enzymes. D'une part, la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) catalyse environ 90% de la formation de d'esters de rétinol, et d'autre part l'acyl CoA : rétinol acyltransférase, ARAT, catalyse le reste de la formation d'esters de rétinol (*182*, *184*, *365*).

En ce qui concerne la lutéine, une protéine de liaison aux caroténoïdes (CBP) a été retrouvée dans l'intestin du ver à soie *Bombyx mori* (*366–368*) et pourrait faciliter l'absorption de cette xanthophylle par cet insecte (*369*). Chez l'Homme, deux protéines de liaison à la lutéine ont été décrites dans la rétine humaine : la Glutathion S-Transférase P (GSTP1) et la HR-LBP (« Human Retinal Lutein-Binding Protein ») (*367*, *370*), mais pas dans les entérocytes.

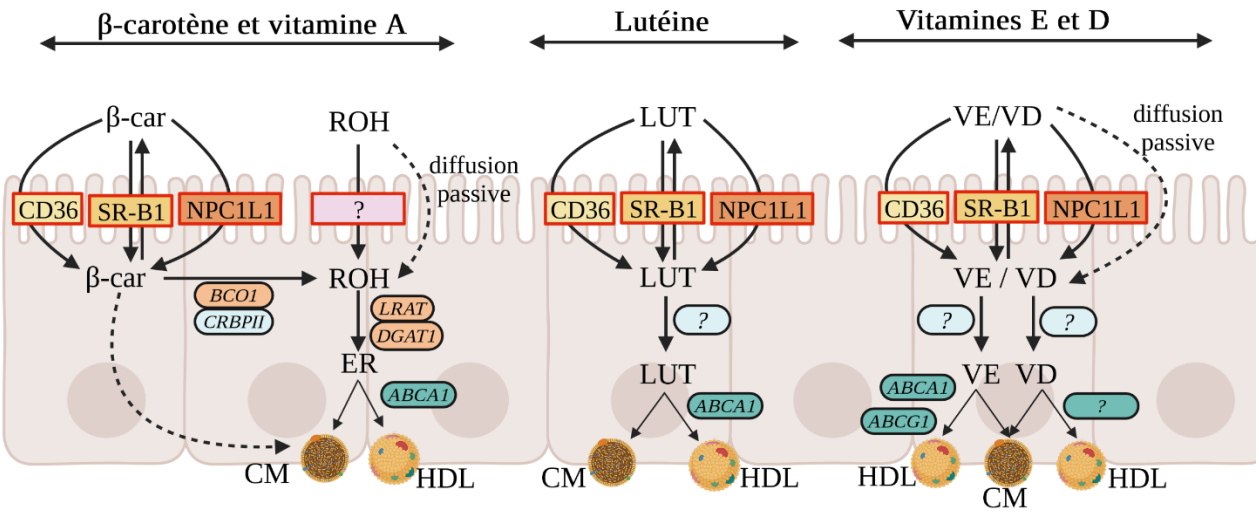
Les tocophérols et le cholécalciférol seraient incorporés dans les chylomicrons sans aucune modification chimique (*371*, *372*). Peu de données existent sur le transport intracellulaire de ces deux vitamines. Concernant la VE, des protéines de liaison, les TAP (« tocopherol associated protein ») ont été retrouvés dans les tissus périphériques et pourraient donc être impliquées dans son transport intracellulaire (*373*, *374*). Pour la VD, une protéine cytosolique de liaison intracellulaire, la cytosol vitamin D metabolite-binding protein (cDBP) serait capable de se lier à la 25(OH)D_3 dans les entérocytes de rats (*375*), mais il n'existe aucune donnée concernant le cholécalciférol.

En plus de ces potentiels transporteurs spécifiques à chaque micronutriment, ce transport intracellulaire pourrait aussi être effectué par les transporteurs de la membrane apicale. Par exemple, SR-BI, a été retrouvé dans les membranes apicales et basolatérales des entérocytes ainsi que dans les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (*358*), CD36 a été observé dans la membrane apicale et dans l'appareil de Golgi (*376*) et enfin NPC1L1 a été observé dans les endosomes, les régions périnucléaires, les lysosomes et les mitochondries des cellules intestinales humaines (*377*, *378*) .

3.2.3 Sécrétion par la membrane basolatérale de l'entérocyte

La sécrétion au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte semble suivre deux voies différentes : une voie dépendante de l'apolipoprotéine B ou apoB (chylomicrons) et une voie non dépendante de l'apoB. La voie de l'apoB serait la voie principale pour la sécrétion basolatérale des vitamines liposolubles. Les pré-chylomicrons sont fabriqués dans le réticulum endoplasmique. Ce sont des lipoprotéines riches en TAG avec un noyau lipidique central, une couche de phospholipides (6-12%), de cholestérol libre (1-3%) et d'apolipoprotéines (1-2%) (*379*). Ces chylomicrons, associés à l'apoB, sont transportés du réticulum endoplasmique lisse vers l'appareil de Golgi où les esters de rétinol, la lutéine et la VD et VE libres sont incorporés dans les chylomicrons. Dans l'appareil de Golgi, les chylomicrons maintenant matures sont concentrés dans des vésicules de sécrétion qui fusionnent avec la membrane plasmique au pôle basolatéral de l'entérocyte pour être libérés dans l'espace extracellulaire et rejoindre la circulation lymphatique.

Outre la voie des chylomicrons, une voie non-apoB semble aussi impliquée dans la sécrétion de certaines vitamines liposolubles au pôle basolatéral. En effet, l'intestin est capable de synthétiser de novo des HDL : cette synthèse impliquerait un transporteur spécifique, l'ATP-binding cassette A1, ABCA1, appartenant à la superfamille des transporteurs ABC et qui est situé au niveau basolatéral des entérocytes (*380–382*). Le transporteur ABCA1 faciliterait l'efflux du cholestérol et des phospholipides vers l'apoA1 afin de former les HDL. Des études ont montré que ABCA1 pourrait être impliqué dans la sécrétion entérocytaire de VE (*383–385*) et de rétinol libre (*342*) (**Figure 18**). De plus, il existerait un autre transporteur exprimé dans la cellule intestinale, ABCG1 (ATP binding cassette G1), facilitant l'efflux du cholestérol et des phospholipides vers l'apoprotéine A1 pour former les HDL (*386*, *387*). Une étude a constaté l'implication du transporteur ABCG1 dans l'efflux de VE dans les cellules (*388*).



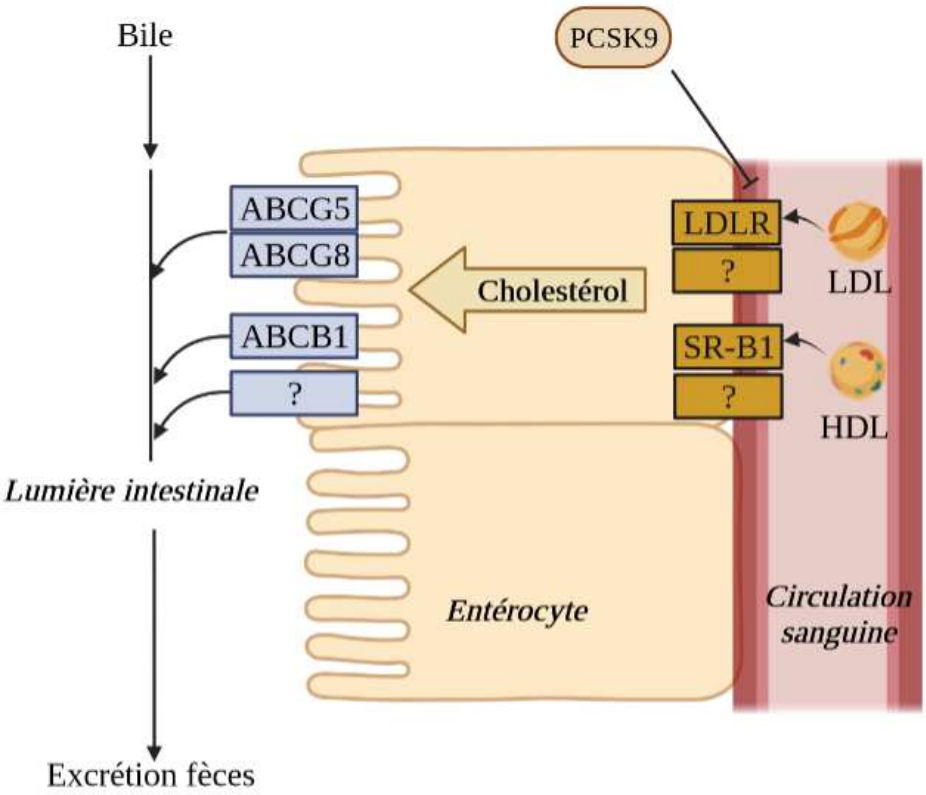
β-car: β-carotene; ABCA1: ATP-binding cassette A1; ABCG1: ATP-binding cassette G1 BCO1: β-carotene oxygenase 1; CM: chylomicrons; CRBPII: cellular retinol-binding protein type II; DGAT1: diacylglycerol O-acyltransferase 1; ER: esters de rétinol; HDL: high density lipoporotein; LRAT: Lecithin retinol acyltransferase; LUT: lutéine; ROH: rétinol; VD: vitamine D; VE: vitamine E.

Figure 18 : Voies d'absorption et de sécrétion des vitamines A, D et E, de la lutéine et du β-carotène à travers l'entérocyte

3.2.4 Excrétion transintestinale des micronutriments liposolubles

Les cellules intestinales pourraient aussi représenter une porte de sortie des micronutriments présents dans notre organisme. Cela a été suggéré suite à l'observation que des lipides absorbés par les entérocytes peuvent être renvoyés vers la lumière intestinale afin de les éliminer (cas des phytostérols) ou de réguler leur absorption.

Concernant l'efflux apical, SR-BI pourrait fonctionner dans les deux sens et donc agir comme une pompe d'efflux du cholestérol (*389*). Il a été montré que SR-B1 était probablement impliqué dans l'efflux de la VE (*349*) et de la VD (*352*). D'autres transporteurs peuvent rentrer en jeu dans cet efflux apical et servir de pompes d'efflux de micronutriments, comme les transporteurs ABCG5 et ABCG8, impliqués dans le transport inverse des stérols, notamment des phytostérols, mais qui pourraient également jouer un rôle dans l'efflux apical de vitamines liposolubles et de caroténoïdes (**Figure 19**) (*331*, *390*, *391*). ABCG5 et ABCG8 fonctionnent sous forme d'un hétérodimère. Des mutations dans les gènes codant pour ces protéines peuvent conduire à la sitostérolémie, qui est une maladie génétique rare dans laquelle les sujets ont des taux circulants de phytostérols très élevés (*392*). Un autre transporteur ABC serait également impliqué dans l'efflux intestinal de vitamines liposolubles, l'ABCB1. Il a été montré que l'ABCB1 est impliqué dans l'efflux intestinal de VD et qu'il contribue également à son excrétion transintestinale. Des études ont aussi montré que lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse, la 25(OH)D_3 peut être refluée vers la lumière intestinale chez des souris et que cet efflux dépendait à la fois des activités de l'ABCB1 et du complexe ABCG5/G8 (*393*, *394*)



HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; LDLR: low density lipoprotein receptor; PCSK9: proprotéine convertase subtilisine/ kexine de type 9

Figure 19 : Acteurs possiblement impliqués dans l'excrétion transintestinale du cholestérol

3.3 Les facteurs influençant la biodisponibilité des micronutriments

La biodisponibilité d'un micronutriment est définie comme la proportion de ce micronutriment ingéré qui se retrouve dans le sang ou dans un tissu de l'organisme. Plusieurs facteurs impactent la biodisponibilité des vitamines et des caroténoïdes. Ils ont été présentés sous l'acronyme SLAMENGHI et chaque lettre représente un facteur :

- S (Species of micronutrients) : l'espèce chimique du micronutriment,
- L (Molecular Linkage) : modifications chimiques potentielles des micronutriments,
- A (Amount of carotenoids in the meal) : quantité de micronutriments ingérée durant un repas,
- M (Matrix) : effet de la matrice alimentaire et de son traitement technologique/culinaire,
- E (Effectors) : autres molécules co-ingérées avec les micronutriments et pouvant moduler leur absorption,
- N (Nutrient status) : statut en micronutriment de l'individu,
- G (Genetics) : facteurs génétiques de l'hôte,
- H (Host related factors) : les caractéristiques physiopathologiques de l'hôte (âge, sexe…),
- I (Interactions) : les interactions entre tous ces facteurs.

3.3.1. Nature, modification chimique et quantité des micronutriments ingérés (S, L, A)

La bioaccessibilité et l'efficacité d'absorption intestinale des vitamines varient selon la nature de la vitamine. Par exemple, dans une première étude, la bioaccessibilité des différentes vitamines liposolubles était significativement différente les unes des autres dans un repas type à base de pommes de terre : VE (≈ 41%) > VD (≈ 37%) > VA (≈ 24%) > β-car (≈ 12%). L'absorption intestinale était aussi significativement différente selon les vitamines: VA (≈15%) > VE (≈11%) > VD (≈10%) > β-car (≈1%) (*395*). Une autre étude, menée sur des rats, a montré que la biodisponibilité des caroténoïdes était inversement corrélée à leur hydrophobie. La biodisponibilité des caroténoïdes était la suivante, du plus au moins biodisponible : astaxanthine > lutéine > β-car > lycopène (*333*). Ainsi, les molécules les plus hydrophobes, comme les carotènes, ont tendance à rester à l'intérieur des gouttelettes d'huile, réduisant leur bioaccessibilité par rapport à celle des xanthophylles, moins hydrophobes (*165*, *331*, *332*).

Plusieurs études ont observé des différences de micellisation selon les formes isomériques de caroténoïdes (*cis* ou *trans*). Par exemple, concernant le β-car, plusieurs études

ont montré une plus grande solubilité dans les micelles des isomères *cis* comparés aux isomères *trans* (*396–398*).

La quantité de micronutriments ingérée est aussi un facteur influençant la biodisponibilité des micronutriments. Peu de données existent sur le sujet. Cependant, il a été montré que l'efficacité de l'absorption intestinale de la VE ne diminuait pas avec l'augmentation des doses de VE (*399*, *400*). Au contraire, il existerait une saturation de la capacité d'absorption des caroténoïdes (*401*). Concernant la VD, il a été montré que l'absorption de la VD_3 était saturable à des concentrations proches de la physiologie mais qu'à des concentrations pharmacologiques, son absorption était linéaire (*352*).

3.3.2. Matrice alimentaire (M)

La biodisponibilité des caroténoïdes est fortement influencée par la matrice alimentaire dans laquelle ils sont incorporés. En effet, avant absorption, les micronutriments doivent être libérés de leur matrice, qui est dégradée dans le tractus intestinal. Les traitements technologiques appliqués aux aliments jouent un rôle crucial en réduisant la taille des particules et en fragilisant les membranes cellulaires, ce qui peut impacter la disponibilité des micronutriments.

Par exemple, pour les caroténoïdes, leur libération de la matrice alimentaire est différente selon qu'ils proviennent de produits animaux ou végétaux. Cela peut être expliqué par le fait que dans les matrices végétales, les caroténoïdes sont probablement piégés par les membranes végétales et les fibres alimentaires (*214*). Au sein des végétaux, la biodisponibilité varie aussi entre fruits et légumes. Les caroténoïdes des fruits présentent une biodisponibilité plus élevée malgré leur teneur relativement plus faible en caroténoïdes, que les caroténoïdes des légumes à feuilles vertes (*402–405*). Cela peut s'expliquer par le fait que les légumes à feuilles vertes stockent les caroténoïdes dans les chloroplastes, qui ne sont pas facilement digestibles pour l'homme, alors que les fruits les stockent dans les chromoplastes, d'où ils sont plus facilement disponibles (*406*). De plus, la biodisponibilité peut différer, parfois fortement, selon le légume consommé. Une étude a évalué la bioaccessibilité de caroténoïdes dans certains légumes : pour la lutéine elle varie de 19% dans les épinards à 98% dans les poivrons et pour le β-car, de 21% dans les poivrons à 54% pour le brocoli (*405*).

Concernant la VE, la bioaccessibilité de l'α- et du γ-TOC dans diverses matrices alimentaires peut être très variée, allant de 0,5 % dans les pommes à environ 100 % dans les bananes, le pain et la laitue (*165*). Une étude a évalué la biodisponibilité de la VE provenant du brocoli : l'α-TOC était faiblement biodisponible à partir de cette matrice végétale (*407*).

Contrairement aux autres micronutriments, la plupart des données suggèrent que la matrice alimentaire n'a pas d'effet marqué sur la biodisponibilité de la VD. Deux études cliniques ont montré que la VD_2 provenant de champignons de Paris irradiés aux UVB avait la même biodisponibilité que celle provenant de compléments alimentaires (*408*, *409*). Cependant, la biodisponibilité de la VD_3 était supérieure dans le lait et l'eau par rapport à sa biodisponibilité dans le jus (*410*).

Les traitements thermiques, mécaniques ou chimiques peuvent diminuer la teneur en caroténoïdes des aliments, mais peuvent en même temps être bénéfiques, du fait de la rupture des matrices alimentaires et de la libération des caroténoïdes de leur matrice, augmentant la biodisponibilité des caroténoïdes. Ainsi, plusieurs études ont montré une plus grande bioaccessibilité des caroténoïdes après un traitement physique (*411–413*).

3.3.3. Autres molécules modulant l'absorption (E)

D'autres molécules, présentes dans le repas peuvent soit favoriser (comme les lipides par exemple) soit inhiber (comme les fibres, phytostérols, etc.) la biodisponibilité des vitamines liposolubles et des caroténoïdes.

3.3.3.a. Lipides et acides gras

Les vitamines A, D, E et caroténoïdes sont liposolubles et, comme vu précédemment, leur digestion suit celle des lipides. Par conséquent, la présence et la nature des lipides au sein du repas peut influencer leur biodisponibilité. Au cours de la digestion, la production et la sécrétion de bile est d'autant plus importante qu'il y a de lipides dans un repas. Cette bile est essentielle à la formation des micelles mixtes. Ainsi, plus il y a de lipides dans un repas, plus il y aura de micelles disponibles pour dissoudre les micronutriments lipidiques (*414*), ce qui facilite leur absorption par les cellules intestinales.

Pour les caroténoïdes, cette meilleure biodisponibilité en présence de lipides alimentaires a été confirmée dans plusieurs études (*415–418*). Cependant, il semblerait qu'il existe une quantité limite de matières grasses au-delà de laquelle la capacité de solubilisation des carotènes dans les micelles est saturée. En effet, une étude a montré qu'une préparation enrichie en caroténoïdes à très faible teneur en matières grasses ajoutée à un repas (3 g de matières grasses/repas) était aussi efficace pour augmenter les concentrations d'α-car et de β-car dans le plasma qu'une préparation enrichie en caroténoïdes à haute teneur en matières grasses (35 g de matières grasses/repas) (*419*). L'absorption optimale de la VE, de l'α- et du β-

car nécessite une quantité limitée de graisses, alors que la quantité de graisses nécessaire à l'absorption intestinale optimale des esters de lutéine est plus élevée (*420*). Il a été établi qu'une ingestion minimum de 5 g/jour de lipides est nécessaire pour une absorption optimale des caroténoïdes (*421–423*). Concernant la VE, l'augmentation de leur absorption en présence de graisses alimentaires a aussi été constatée (*424–426*). Au contraire, des études suggèrent que la quantité de graisse ingérée avec la VD n'a pas d'effet majeur sur la biodisponibilité de cette vitamine (*427–429*).

La quantité de graisses ne semble pas avoir un impact majeur sur la biodisponibilité de la VD mais plusieurs études ont montré un effet de la nature des AG. Il a été montré que les AG libres à longue chaine contenus dans l'huile d'arachide augmentent l'absorption de la VD (*430*) et qu'un régime riche en AGMI améliore le statut VD, comparé à un régime riche en AGPI qui le diminue (*431*). La longueur des chaines d'AG ainsi que leur degré d'insaturation peuvent donc impacter la biodisponibilité des micronutriments : plus la longueur de chaine et le nombre d'insaturations sont élevés, plus la charge des micelles mixtes diminue. Dans une étude réalisée sur des cellules Caco-2, les AGMI et AGPI favorisaient l'absorption de la VE par rapport aux AGS (*432*). La solubilisation de la VE dans les TAG à longue chaîne, contrairement aux TAG à chaîne moyenne, semble diminuer l'efficacité de l'absorption de la VE chez le rat (*433*). Comme pour la VE, la micellisation des caroténoïdes était plus élevée (deux à trois fois plus) avec les graisses alimentaires riches en AGI qu'avec les AGS (*417*). Une autre étude a montré que la bioaccessibilité des caroténoïdes était influencée par le type d'huile utilisé dans le repas, notamment par les AG à longues chaînes (*434*). En effet, l'impact plus important des AG à longues chaînes sur la bioaccessibilité des caroténoïdes, comparé à celui des AG à chaînes moyennes, peut s'expliquer par la plus grande capacité de solubilisation des micelles formées par les AG à longues chaînes.

3.3.3.b. Fibres

Même si la consommation de fibres a de nombreux avantages, celles-ci peuvent avoir un effet négatif sur l'absorption de certains nutriments et micronutriments (*435*). Pasquier *et al.*, 1996 (*436*) ont constaté une réduction de l'activité des lipases pancréatique et gastrique lorsque des fibres alimentaires étaient présentes dans des émulsions, induisant des viscosités élevées. Les fibres alimentaires peuvent aussi réduire l'absorption des micronutriments en les piégeant dans leur structure et en provoquant un changement de viscosité des fluides gastriques, ce qui empêche une distribution adéquate des enzymes digestives et des sels biliaires (*437*, *438*).

Une étude a montré que la consommation de fibres solubles et insolubles diminuait la bioaccessibilité (*439*) et l'absorption de caroténoïdes (incluant lutéine et β-car) (*440*). Cependant, cette étude n'a constaté aucun effet des différents types de fibres (pectine, guar, alginate, cellulose ou son de blé) sur l'augmentation moyenne de la concentration plasmatique d'α-TOC pendant 24 h chez les femmes (*440*), résultats confirmés dans une autre étude (*441*). Concernant la VD, une étude a montré que la présence de chitosane, dérivé de la chitine (présente par ailleurs dans l'exosquelette des insectes) par déacétylation, diminuait la bioaccessibilité de la VD d'environ 37% (*442*).

3.3.3.c. Minéraux

Comme les fibres, les minéraux pourraient aussi impacter la bioaccessibilité des caroténoïdes. Des minéraux diminuent la bioaccessibilité *in vitro* (*443*) de caroténoïdes, comme la lutéine et le β-car, le calcium ayant l'effet le plus prononcé. Ces résultats sont confirmés par une autre étude, montrant une importante diminution (de 83%) de la biodisponibilité du lycopène en présence de calcium (*444*). Il a aussi été montré que des niveaux élevés de calcium réduisaient la bioaccessibilité de la VD, ce qui a été attribué à la formation de savon calcique insoluble (résultat de la saponification des AG libres par les ions *calcium*) dans l'intestin grêle (*445*).

3.3.3.d. Phytostérols

Les phytostérols peuvent être utilisés dans certains produits lactés et margarines et sont connus pour diminuer la cholestérolémie chez l'Homme (*446*). Cette diminution pourrait être expliquée par une compétition avec le cholestérol pour l'incorporation dans les micelles ou pour le captage par les cellules intestinales. Elle pourrait aussi être expliquée par l'activation de transporteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol de la cellule intestinale vers la lumière du tube digestif (*447*). Comme les vitamines liposolubles ont des voies de transport communes avec celles du cholestérol, les phytostérols pourraient aussi inhiber l'absorption de ces vitamines. Ainsi, ils diminuent l'absorption de certains caroténoïdes comme l'α- et le β-car (*448*, *449*) mais aussi l'absorption de l'α-TOC (*449*). Aucun effet n'a été observé sur la biodisponibilité de la β-cryptoxanthine après la consommation d'une boisson aux fruits à base de lait avec ou sans stérols végétaux (*450*). La consommation d'aliments enrichis en phytostérols peut entraîner une diminution de la concentration plasmatique de VE (*451*, *452*), mais ne paraît pas affecter la concentration plasmatique de rétinol (*452*, *453*). De plus, les

phytostérols ont altéré significativement l'incorporation de la VD_3 dans les micelles mixtes (de -16 à -36% en fonction de la composition micellaire en stérols) (*454*).

3.3.3.e. Interactions entre micronutriments

Les interactions entre deux micronutriments au niveau intestinal peuvent réduire l'absorption de l'un ou l'autre de ces composés. La compétition pour l'absorption peut se produire au niveau de l'incorporation micellaire, de l'absorption intestinale, du transport lymphatique ou à plus d'un niveau. Par exemple, deux études chez l'Homme ont montré que le β-car pouvait inhiber l'absorption de la lutéine et vice-versa (*455*, *456*). Une autre étude, sur cellules Caco-2, a constaté que le cholestérol et l'α-TOC ont tous deux diminué l'absorption de la VD_3, suggérant une compétition entre molécules et des voies d'absorption communes pour les trois molécules (*352*). Dans une étude menée sur des cellules Caco-2, il a été observé une réduction de 38% de l'absorption de l'α-TOC en présence de lutéine (*457*).

Au contraire, l'ingestion simultanée de divers micronutriments dont certains antioxydants peut induire un effet protecteur des antioxydants dans le tractus intestinal et donc entraîner des niveaux importants d'absorption des micronutriments protégés. Par exemple, il semble que la VE améliore l'absorption de la VA (*458*).

3.3.4. Facteurs humains (N, G, H)

Plusieurs facteurs humains peuvent agir sur l'absorption des caroténoïdes, comme par exemple le statut nutritionnel de l'individu. En effet, comme les vitamines sont essentielles et que de grandes quantités de vitamines liposolubles peuvent être toxiques, il est supposé que l'absorption des vitamines liposolubles est régulée par le statut vitaminique de l'individu, comme montré pour la VA (*459*, *460*).

Les facteurs génétiques jouent aussi un rôle important dans l'absorption des caroténoïdes et des vitamines. En effet, des variations des allèles du gène *BCO1* peuvent réduire la conversion du β-car en VA de 69% (*461*). Des études ont rapporté des variabilités interindividuelles de la biodisponibilité de caroténoïdes, selon les polymorphismes génétiques : 73 et 69% pour la biodisponibilité de la lutéine et du β-car respectivement (*462*, *463*). Il a été démontré que des polymorphismes d'un seul nucléotide dans SCARB1, le gène codant pour SR-BI, étaient liés au statut plasmatique de l'α- et du γ-TOC suggérant un effet de ces polymorphismes génétiques sur la distribution de l'α-TOC dans l'organisme (*464*).

L'âge, le sexe, le mode de vie ou encore les pathologies, peuvent influencer l'absorption des micronutriments. Ainsi, une étude a montré que les concentrations sériques de rétinol

dépendent du sexe, de l'âge, des saisons et du lieu de résidence. Les concentrations sériques d'α-TOC sont quant à elles légèrement influencées par l'âge, mais davantage par le tabagisme, les saisons, l'apport alimentaire et le lieu de résidence. Les concentrations sériques de β-car dépendent du sexe, de l'âge, du tabagisme, de l'apport alimentaire et du lieu de résidence (*465*). Enfin, des patients souffrant de mucoviscidose, présentaient une altération de l'absorption de la VE (*466*) et de la VD_2 (*467*).

3.3.5. Interactions entre tous ces facteurs (I)

Tous ces facteurs peuvent interagir entre eux, de manière additive, synergique ou antagoniste. Bien qu'aucune donnée ne soit disponible sur les interactions entre facteurs mentionnés ci-dessus, elles pourraient probablement se produire dans certaines circonstances. Par exemple, une interaction pourrait exister entre les facteurs humains et la modification de la molécule chez les sujets souffrant de malabsorption des graisses (facteur lié à l'individu), ceux-ci ayant une activité réduite des estérases intestinales (où le facteur de modification de la molécule peut entrer en jeu) (*248*).

Objectifs de la thèse

Déjà employées en alimentation humaine et animale pour leur teneur importante en protéines, les LMSN pourraient aussi être utilisées pour leur teneur importante en certains micronutriments et phytomicronutriments. En effet, cela permettrait d'augmenter les apports de ces composés dans l'alimentation des animaux d'élevage, ce qui serait bénéfique pour leur santé, mais aussi d'augmenter la teneur en micronutriments et phytomicronutriments des aliments issus de ces animaux et donc, indirectement, d'augmenter la teneur en ces composés dans l'alimentation humaine. Pour que ces larves soient des sources significatives de micronutriments et de phytomicronutriments, deux paramètres doivent être pris en compte : leur capacité à bioaccumuler des concentrations significatives de ces composés, et la biodisponibilité de ces composés quand ils sont incorporés dans la matrice des LMSN. Dans la littérature, peu de données existaient concernant la bioaccumulation de micronutriments et de phytomicronutriments dans les LMSN (*107*, *112*, *468*) et aucune donnée n'avait été publiée au sujet de la biodisponibilité de ces composés quand ils sont incorporés dans la matrice des LMSN.

La carence en VA reste un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays en développement. Un enrichissement durable en VA, ou en proVA des aliments communément consommés dans ces pays, comme les produits laitiers issus des animaux d'élevage, ou la consommation d'insectes enrichis en proVA (ce qui serait envisageable dans ces pays ou l'entomophagie est beaucoup plus fréquente qu'en occident), serait une stratégie complémentaire pour lutter contre cette carence. La bioaccumulation et la bioaccessibilité de caroténoïdes proVA dans les LMSN ayant été précédemment démontrées grâce à une étude *in-vitro* (**Publication n°1**), le premier objectif de cette thèse était de compléter ces résultats avec ceux d'une étude *in-vivo* visant à déterminer la capacité du β-car bioaccumulé dans des LMSN à rétablir un statut déficient en VA chez la gerbille (**Publication n°2**).

La lutéine est, comme précisé précédemment dans ce manuscrit, un caroténoïde souvent utilisé dans l'industrie agroalimentaire comme colorant. Elle semble par ailleurs avoir des fonctions biologiques très intéressantes chez l'Homme, que ce soit au niveau de la fonction visuelle ou de la cognition. Ainsi, utiliser les LMSN comme source additive de lutéine dans l'alimentation animale, et indirectement dans l'alimentation humaine, semble très intéressant. Le deuxième objectif de cette thèse était donc d'évaluer la bioaccumulation, la bioaccessibilité et l'efficacité d'absorption intestinale de la lutéine provenant de LMSN élevées sur des substrats riches en ce caroténoïde (**Publication n°3**).

La VE est un antioxydant naturel utilisé dans l'industrie agroalimentaire et qui est essentiel pour la bonne santé des animaux de rente et, bien évidemment, pour l'Homme. Il y a donc, là encore, de nombreux intérêts à produire des LMSN riches en cette vitamine. Le

troisième objectif de ce travail était donc de mesurer la bioaccumulation des deux principales formes alimentaires de VE, l'α-TOC et le γ-TOC, dans les LMSN à partir de substrats riches en cette vitamine (comme des huiles végétales et des sous-produits tels que son de riz, de blé, etc.). Nous avons aussi évalué la bioaccessibilité et le captage intestinal de ces deux composés lorsqu'ils proviennent de LMSN (**Publication n°4**).

Enfin, une étude de 2018 ayant montré la présence de VD dans des larves de plusieurs espèces d'insectes, y compris des LMSN (*97*), nous avons recherché une méthode permettant d'obtenir des LMSN riches en cette vitamine, essentielle pour la croissance des animaux et souvent insuffisamment consommée chez l'Homme. Cette recherche a été très fructueuse puisque nous avons obtenu des larves extrêmement riches en VD (dépôt en cours d'un brevet par INRAE). Plus précisément, leur concentration en VD était environ 20 fois supérieure à celle de l'huile de foie de morue qui est la source la plus concentrée en cette vitamine.

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Produits chimiques

Les solvants utilisés pour la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) : éthanol, n-hexane, méthanol, dichlorométhane, eau, méthyl tert-butyle éther (MTBE), acétonitrile ont été achetés auprès de Carlo Erba reagents (Peypin, France). Les standards de caroténoïdes (pureté CLHP ≥ 96 %), c'est-à-dire l'α-, le β-carotène, la β-cryptoxanthine, la lutéine et l'échinénone, provenaient de Carotenature GmbH (Müsingen, Suisse). D'autres standards, i.e. le rétinol, le rétinyl palmitate, le rétinyl acétate, l'α-tocophérol acétate, l'ergocalciférol, l'ergostérol, le DL-all-rac-α-tocophérol et le (RRR)-γ-tocophérol (pureté CLHP ≥ 96%), les enzymes utilisées pour les digestions *in vitro* (l'α-amylase (*Bacillus Subtilis*), la pancréatine, la pepsine, la bile et la mucine porcines) ainsi que les produits chimiques utilisés pour le test de cytotoxicité cellulaire (le bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) et le diméthylsulfoxyde (DMSO)) provenaient de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Concernant la culture cellulaire, le milieu de « Dulbecco's modified Eagle Medium » (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, de la trypsine (500mg/L), de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (200mg/L), des acides aminés non essentiels, de la pénicilline/streptomycine et une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) provenaient de Life Technologies (Villebon-sur-Yvette, France). Le sérum de veau fœtal (SVF) était de chez PAA (Vélizy-Villacoublay, France).

1.2. Aliments et substrats d'élevage

Certains des substrats d'élevage (carottes (*Daucus carota subsp. Sativus*), citrouilles (*Cucurbita pepo*), patates douces (*Ipomoea batatas*), clémentines (*Citrus clementina*), persil (*Petroselinum sativum*), chou kale (*Brassica oleracea var. acephala*), endives (*Cichorium intybus var. foliosum*), brocoli (*Brassica oleracea var. asparagoides*), champignons blancs (*Agaricus bisporus*) et huile de colza ainsi que les aliments utilisés pour les digestions *in vitro*, i.e. les pommes de terre, l'huile d'olive et la viande hachée de bœuf à 5% de matières grasses provenaient d'un supermarché local (Casino, France). D'autres substrats, i.e. l'huile de germes de blé (marque Emile Noel), l'huile de maïs (marque La Tourangelle), l'huile de son de riz (marque Saldac), le son de riz (marque Moulin Des Moines) et le son de blé (marque Priméal) ont été commandés sur Internet. Les drêches de brasserie ont été gracieusement offertes par une brasserie locale (Brasserie de la Plaine, Marseille). Les tourteaux de navette, de colza et de

maïs provenaient d'un producteur du Moulin Giraud à Ozan en France. Enfin, les aliments pour volailles (Evialis, Vedène, France) ont été fournis par BioMiMetiC (Boulbon, France).

2. Obtention de larves riches en micronutriments

2.1. Élevage

Le protocole d'élevage a été mis en place et réalisé par BioMiMetiC. Juste avant le début des expérimentations, les substrats utilisés pour l'élevage ont été grossièrement coupés soit à l'aide d'un couteau, soit grâce à un hachoir de cuisine. Selon l'expérimentation, pour chaque condition, l'objectif était d'obtenir de 20 g à 1 kg de LMSN. Ainsi, selon l'humidité et la quantité de substrat, de 35 à 200 mg d'œufs ont été ensemencés sur chaque substrat. La quantité de chaque substrat a été calculée afin de fournir suffisamment de nourriture aux larves tout au long de la période de croissance et d'atteindre une masse larvaire individuelle d'environ 150 mg. Ce calcul a été effectué à la fois en considérant que 340 mg de substrat alimentaire sur une base de matière sèche sont nécessaires pour obtenir approximativement une masse larvaire individuelle de 150 mg (*469*) et en tenant compte de l'humidité relative des substrats alimentaires. Les étapes de la procédure d'élevage étaient les suivantes :

1. **Collecte des œufs :** les œufs de LMSN situés sur un support d'oviposition ont été prélevés et pesés. Les œufs provenaient d'une colonie de mouches soldat noires entretenue par BioMiMetiC (la souche originelle provient de Paradou, 13520, France) et ont été pondus 24 heures avant d'être utilisés dans l'expérience.

2. **Ensemencement :** les substrats coupés grossièrement ont été placés dans des boîtes d'élevage (**Figure 20**). Des supports d'éclosion ont été placés sur chaque substrat, ce qui a permis aux œufs d'éclore à environ 3 cm au-dessus des substrats alimentaires.

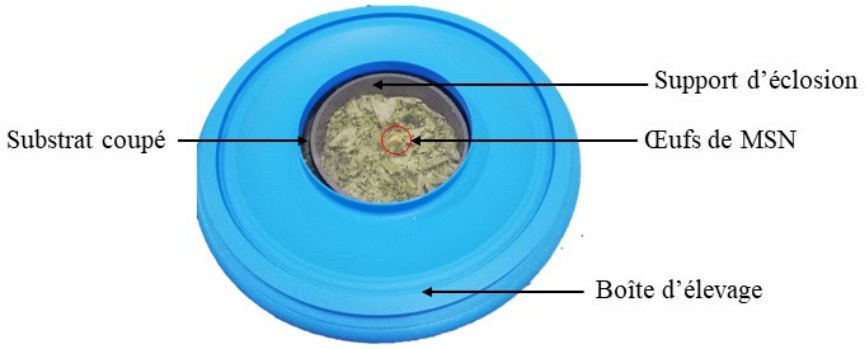


Figure 20 : Phase d'ensemencement des œufs de mouche soldat noire

3. **Période de croissance :** Chaque boîte d'élevage a été placée dans un plateau en plastique plus grand (350 × 418 × 180 mm de haut) **(Figure 21**). Les plateaux ont été recouverts d'une moustiquaire et placés dans un larvarium pendant 14 jours à des conditions de température, d'humidité et de luminosité contrôlées (température : 29 ± 1 °C, humidité relative : 65 ± 5 %, sous des cycles artificiels lumière/obscurité de 14 h :10 h).

Figure 21 : Plateaux d'élevage de LMSN dans un larvarium

4. **Lavage et tamisage :** à la fin de la période d'élevage, les larves ont été séparées de leurs substrats alimentaires par tamisage (mailles de 2 × 2 mm) (**Figure 22**). Elles ont ensuite été lavées à l'eau du robinet et placées dans un bain d'eau à température ambiante avant d'être à nouveau filtrées à travers ce tamis.

Figure 22 : Tamisage des LMSN

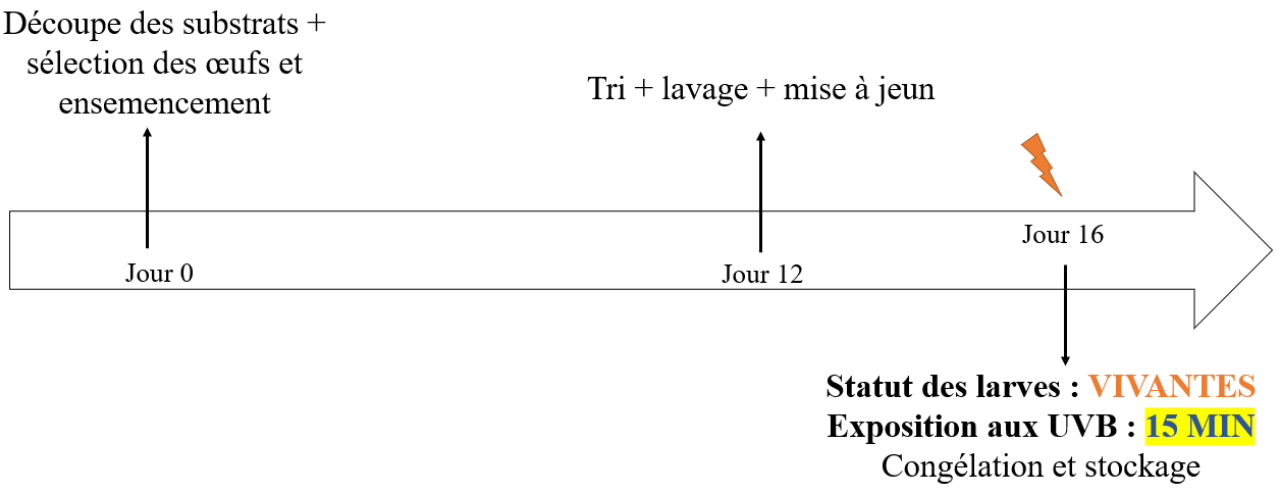
5. **Mise à jeun :** les LMSN ont été transférées dans une boîte en plastique contenant uniquement du papier absorbant (type sopalin) afin d'éliminer l'excès d'humidité, et maintenues pendant 5 jours dans cette boîte afin de vider leur tube digestif de tout substrat restant. **A noter que pour la publication n°2, les LMSN élevées sur des patates douces ont été collectées, stockées juste après cette étape et n'ont pas été mises à jeun.**

6. **Collecte et stockage des LMSN :** les larves ont été séparées de leurs exuvies et de leurs excréments en étant filtrées avec un tamis (mailles de 2 × 2 mm), et lavées à nouveau avec de l'eau du robinet. Les larves ont ensuite été séchées à l'aide de papier absorbant avant d'être congelées à -20 ◦C.

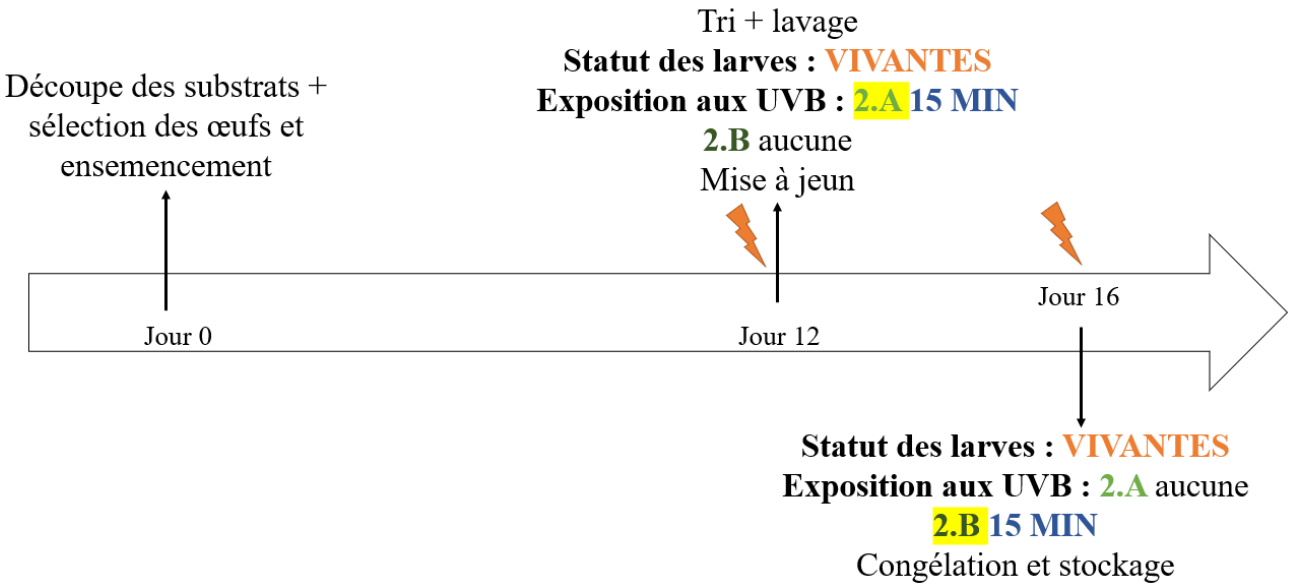
2.2. Cas particulier : LMSN et substrats riches en vitamine D (protocole confidentiel car brevet en cours de rédaction)

Les différents groupes, conditions et temps d'exposition aux UVB ont été les suivants :

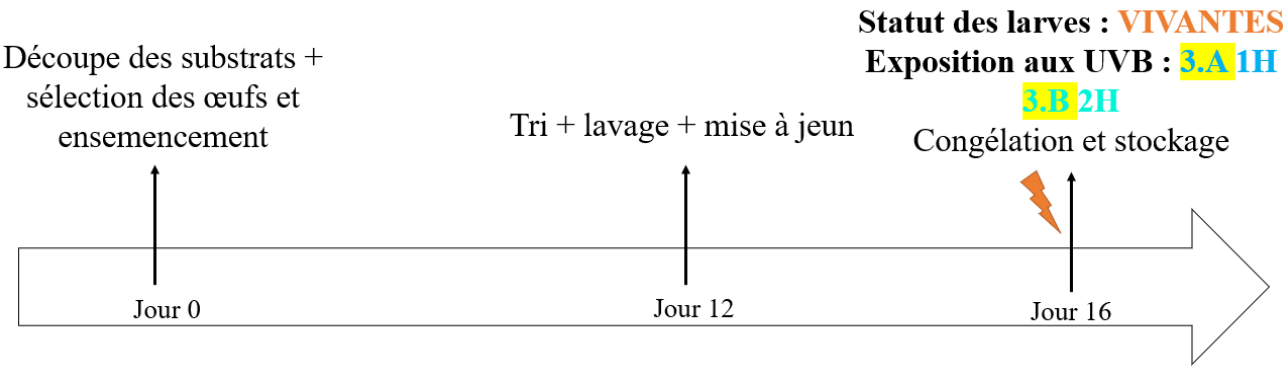
- **Groupe 1** : Substrat **brocoli** avec exposition aux UVB (durée **15 MIN**) des larves **VIVANTES.**



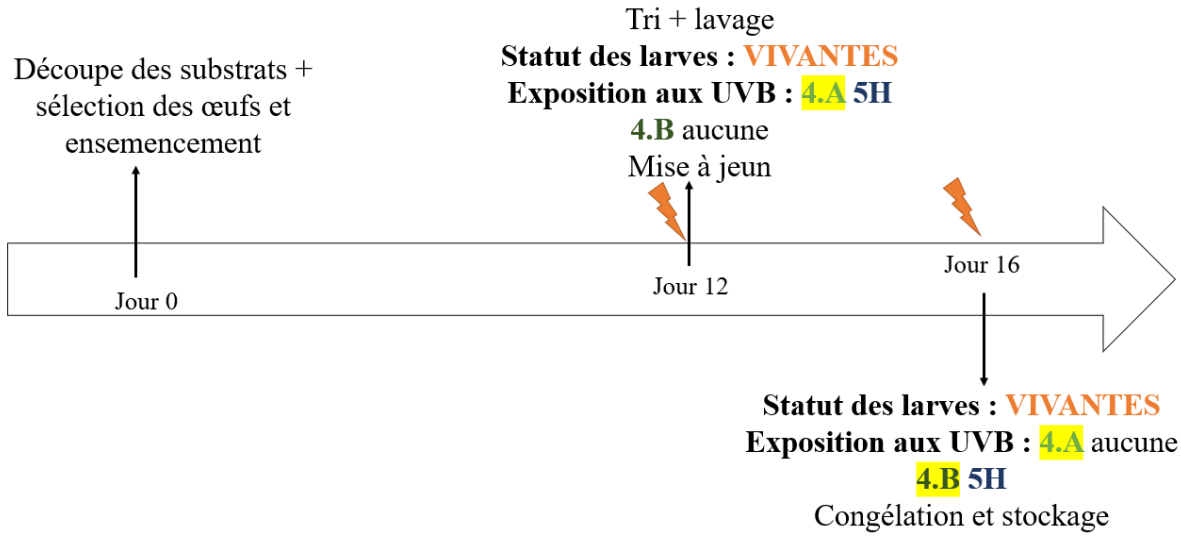
- **Groupe 2 :** Substrat **champignons ou déchets de champignons** avec exposition aux UVB (durée **15 MIN**) des larves **VIVANTES** en **DEBUT (groupe 2.A)** et **FIN (groupe 2.B)** de mise à jeun.



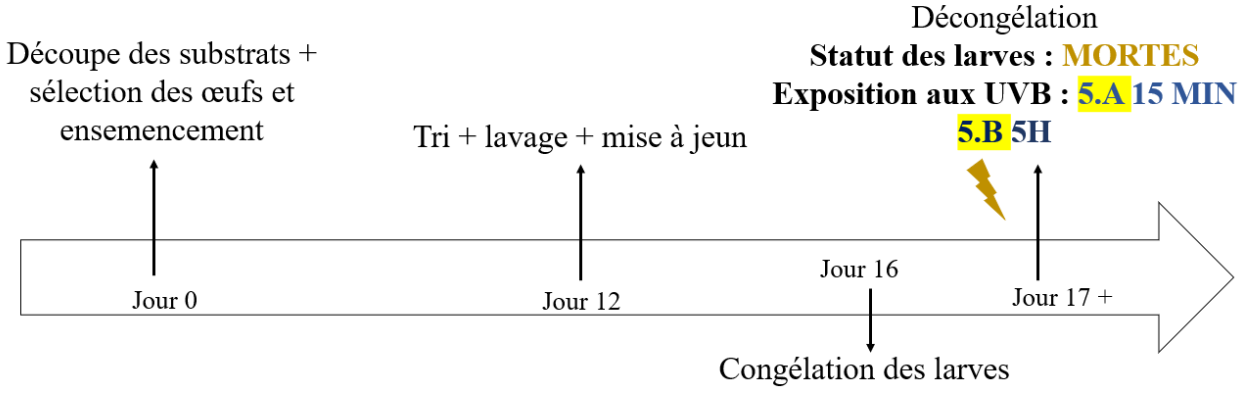
- **Groupe 3 :** Substrat **champignons** avec exposition aux UVB (durées **1H (groupe 3.A)** et **2H (groupe 3.B))** des larves **VIVANTES.**



- **Groupe 4 :** Substrat **champignons** avec exposition aux UVB (durée **5H**) des larves **VIVANTES** en **DEBUT (groupe 4.A)** et **FIN (groupe 4.B)** de mise à jeun.



- **Groupe 5 :** Substrat **champignons** avec exposition aux UVB (durées **15 MIN (groupe 5.A)** et **5H (groupe 5.B**) des larves **MORTES.**



Les LMSN ont été élevées de la même manière que décrite dans la partie précédente, en ajoutant des moments d'expositions aux UVB. Pour cela, la lampe (DSP UVB tube, OSRAM Lumilux HNL, 24 W) a été mise à chauffer pendant 30 minutes avant l'exposition des larves ou des substrats aux UVB. La puissance de la lampe UV a été mesurée à l'aide d'un radiomètre (PMA 2100, Solar Light Inc.) : 2,747 $mW.cm^2/s$. La dose a ensuite été calculée en multipliant la puissance par le temps d'exposition en secondes. Par exemple, pour une exposition aux UVB de 15 minutes, la dose d'UVB sera de (2,747/1000) * (15*60) =2,2 J/cm^2.

3. Modélisation des digestions

3.1. Préparation des aliments et des échantillons destinés à la digestion *in vitro*

Les échantillons de substrats ou de LMSN ont été préalablement broyés à l'aide d'un mortier pour la publication n°1 et à l'azote liquide dans un broyeur à mortier (Pulverisette 2, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Allemagne) pour toutes les autres études. Ensuite, 1 ou 2 g des substrats ou des LMSN broyés ont été placés dans un erlenmeyer de 100 ml et mélangés à un repas type, i.e. un repas apportant des proportions de lipides, de glucides et de protéines habituelles. Ce repas était constitué de 6,7 g de purée de pommes de terre, de 1,2 g de steak de bœuf haché à 5% de matières grasses et de 200 mg d'huile d'olive.

3.2. Simulation de la digestion des substrats d'élevage et des LMSN

La bioaccessibilité des vitamines et des caroténoïdes dans nos échantillons a été évaluée à l'aide d'un modèle de digestion *in vitro*, procédure décrite par Reboul *et al.*, 2006 (*165*). Les étapes de ce procédé (**Figure 23**) sont les suivantes :

1. **Phase orale :** pour mimer le mécanisme de mastication, le mélange repas type/échantillon a été broyé grossièrement pendant 30 s à 22 000 rpm (T18 basic Ultra-Turrax disperser, IKA, Staufen, Allemagne) dans 32 mL d'une solution à 0.9% de NaCl. Puis, 2,5 mL d'une solution de salive artificielle ont été ajoutés et le mélange a été incubé 10 min à 37 °C sous agitation (190 rpm).

2. **Phase gastrique :** le pH a été ajusté à 4 ± 0,02 avec une solution d'HCl 1M, puis 2 mL d'une solution de pepsine à 40 g/L ont été ajoutés avant incubation pendant 30 min à 37 °C sous agitation (190 rpm).
3. **Phase duodénale :** le pH a été ajusté à 6 ± 0,02 avec du $NaHCO_3$ 0,9M, avant l'ajout de 9 mL d'une solution d'extrait de pancréatine et d'extrait de bile à respectivement 3 et 12 g/L, et de 4 mL d'une solution de bile à 10 %. Le mélange a ensuite été incubé pendant 30 minutes à 37 °C sous agitation (190 rpm).

Une partie de la solution obtenue a alors été prélevée et aliquotée. Elle constituait ce que l'on appelle le « digestat ». Celui-ci a ensuite été conservé à -80 °C jusqu'à analyse des micronutriments par CLHP.

4. **Isolation d'une fraction contenant essentiellement des micelles :** le mélange restant a été centrifugé à 1860 × g pendant 1h12 min à 10 °C et a formé deux phases : le culot et le surnageant contenant les micelles mixtes. Le surnageant a été récupéré et filtré grâce à un filtre de 0,8 µm, puis un filtre de 0,22 µm (esters de cellulose ; Millipore, Molsheim, France). Les échantillons obtenus ont été stockés à -80 °C jusqu'à analyse des micronutriments par CLHP.

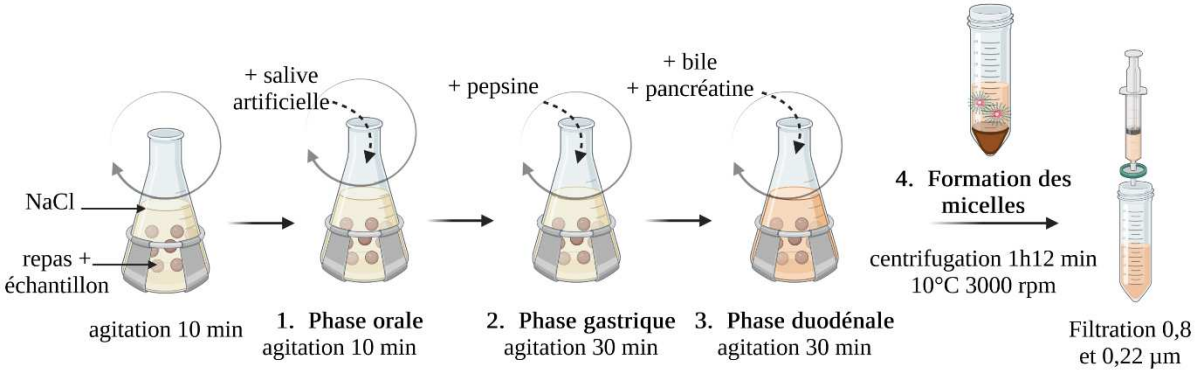


Figure 23 : Etapes de la digestion *in vitro*

3.3. Calcul de la bioaccessibilité

La bioaccessibilité, i.e. la proportion de caroténoïdes ou de vitamines présents dans la matrice alimentaire étudiée et qui est transférée dans les micelles mixtes au cours de la digestion, se calcule comme il suit :

$$\text{Bioaccessibilité (\%)} : \frac{\text{Quantité de vitamines ou de caroténoïdes dans les micelles mixtes}}{\text{Quantité de vitamines ou de caroténoïdes dans le digestat}} \times 100$$

4. Expérimentations sur cellules

4.1. Culture cellulaire

Les cellules de la lignée Caco-2 clone TC7 sont issues d'un adénocarcinome colique humain. Elles peuvent se différencier en cellules intestinales polarisées dont la perméabilité est semblable à celle d'une muqueuse intestinale.

Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 25 cm² (PolyStyrene, Sarstedt, Marnay, France) avec du milieu complet contenant du tampon « dulbecco's modified Eagle medium » (DMEM) à 4,5 g/L de glucose, supplémenté avec 1 % d'acides aminées non-essentiels et 1 % d'antibiotiques : pénicilline et streptomycine (Life Technologies®, Illkirch, France) et 20 % de SVF inactivé à la chaleur (30 min, 56°C) (Dutscher, Brumath, France). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée air /CO_2 (90/10 ; v /v) et le milieu a été renouvelé chaque 48 heures. Les cellules ont été fréquemment observées au microscope et lorsqu'il a été estimé que 80 % de confluence était atteint, les cellules ont été réensemencées avec une densité de 2,5 millions de cellules dans une nouvelle flasque de 25 cm² après traitement à la trypsine-EDTA à 0,25 % (Life Technologie s®, Illkirch, France).

Afin de caractériser le captage des vitamines et des caroténoïdes, ces cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits (24 mm de diamètre, membrane de polycarbonate de 1 µm de diamètre, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Tous les jours pendant les 7 premiers jours et tous les deux jours pendant les 7 jours suivants, 1,5 mL de milieu complet (c'est-à-dire du DMEM supplémenté avec 16% de FBS, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% d'antibiotiques) ont été ajoutés afin d'obtenir des monocouches de cellules confluentes proches des entérocytes humains matures. La veille de l'expérience de captage intestinal, le milieu a été remplacé par un milieu complet sans sérum.

4.2. Test de cytotoxicité au MTT

Un test de cytotoxicité au MTT a été réalisé avant l'expérimentation de captage cellulaire. Le test MTT est un test colorimétrique permettant de déterminer la viabilité cellulaire en évaluant les possibles effets cytotoxiques des composés testés. Le MTT, un tétrazole jaune, est réduit en formazan violet dans les cellules vivantes.

Les cellules Caco-2 TC7 ont été cultivées pendant 5 jours sur des plaques 96 puits et différentes concentrations de micelles issues des digestions in vitro (dilutions 1/2, 1/3,1/4,1/5,1/6 et 1/8) y ont été déposées pendant 4 heures. Ensuite, le milieu de culture a été aspiré et remplacé par une solution de MTT à 0,05 mg/mL permettant une réaction avec les

mitochondries des cellules vivantes. Les plaques ont été incubées pendant 2 heures à 37°C et la solution de MTT a été aspirée avant d'ajouter 100 µL de DMSO dans chaque puit pour solubiliser les cristaux formés. Enfin, l'absorbance a été mesurée à 540 nm et était proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Pour toutes nos expérimentations, les micelles ont été diluées à un ratio de 1/5 (v/v) dans du DMEM avant de réaliser l'étude de captage.

4.3. Etude du captage intestinal par les cellules Caco-2 TC7

Afin d'évaluer l'efficacité de l'absorption par les cellules intestinales des vitamines et de la lutéine contenues dans la fraction micellaire de digestions in vitro de LMSN et de leurs substrats d'élevage, les cellules Caco-2 confluentes ont reçu 1,5 ml de la fraction micellaire diluée 5 fois (voir ci-dessus) avec du DMEM. Les cellules ont été incubées 4 h à 37 ◦C (*470*), le milieu a ensuite été prélevé et les monocouches cellulaires ont été lavées deux fois avec 1 ml de PBS, grattées et collectées dans 500 µL de PBS (**Figure 24**). Les échantillons ont été conservés à - 80 ◦C jusqu'à l'analyse.

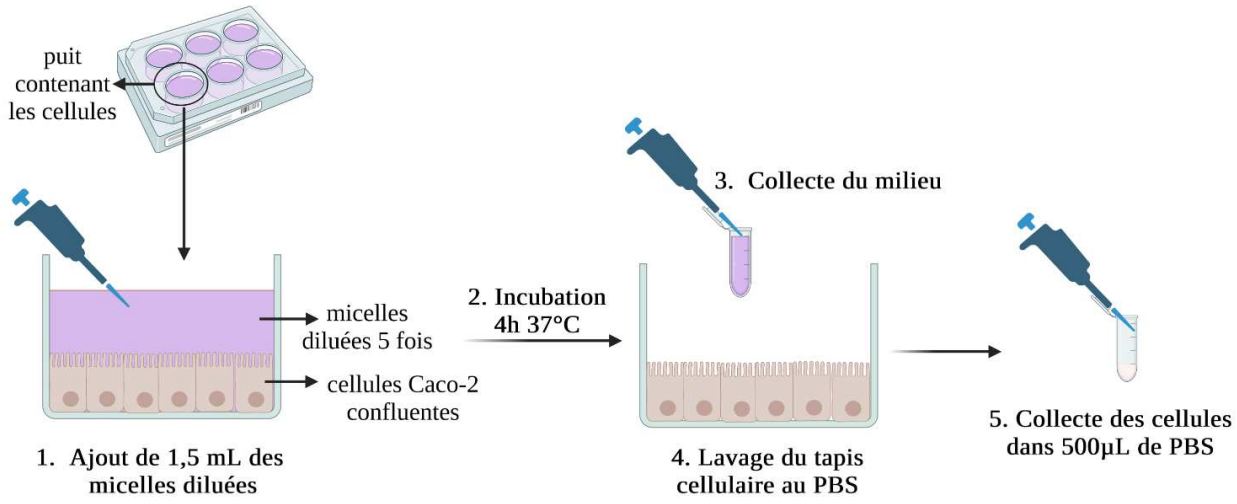


Figure 24 : Schéma de l'expérimentation de captage intestinal par les cellules Caco-2

4.4. Calcul de l'efficacité d'absorption intestinale

L'efficacité d'absorption intestinale des micronutriments a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Captage (\%)} = \frac{\text{Quantité dans les cellules}}{\text{Quantité dans les cellules + quantité dans le milieu après incubation}} \text{ x } 100$$

5. Expérimentation animale

Pour la publication n°2, une étude *in vivo* visant à déterminer la biodisponibilité de la VA chez des gerbilles a été réalisée. **Toute la partie expérimentation animale, de l'entretien des gerbilles à leur mise à mort et à la collecte des échantillons, a été effectuée par Claudie Dhuique-Mayer et un de ses collègues au CIRAD (Qualisud, Montpellier).**

5.1. Les animaux

Des gerbilles de Mongolie mâles (n = 29), âgées de 7 semaines, ont été obtenues auprès de Janvier (St Berthevin, France). Les animaux ont été logés quatre par quatre, ou trois par trois, dans des cages en plexiglas (enrichies de jouets en bois ou en carton) à 22 ± 1 °C, soumis à un cycle lumière/obscurité de 12 h et à un accès libre à l'alimentation et à l'eau. Les animaux et la nourriture ont été pesés trois fois par semaine.

5.2. Comité éthique

Les animaux ont été manipulés conformément aux règles de l'UE et aux directives de l'Institut national de la santé et du Comité de protection des animaux de l'Université de Montpellier (France). L'autorisation du projet par le comité d'éthique a été approuvée en avril 2022 (numéro de référence : 1930-35390).

5.3. Régimes alimentaires

Quatre régimes alimentaires différents ont été utilisés dans cette étude :

1. **Groupe contrôle positif « C + » :** le régime standard de ces animaux, i.e. le régime standard A04 (SAFE : Scientific Animal Food and Engineering ; Augy, France).
2. **Groupe de contrôle négatif « C - » :** le même régime que C +, également fabriqué par SAFE, mais ne contenant pas de VA, ni de proVA.
3. **Groupe patate douce « SP » :** le régime déficient en VA, C - , auquel on a ajouté des patates douces (6,6 %) comme source de proVA.
4. **Groupe LMSN « BSFL » :** le régime déficient en VA, C -, auquel on a ajouté des LMSN (10 %) comme source de proVA.

Pour les groupes SP et BSFL, les patates douces et les LMSN ont été incorporées aux croquettes. Elles ont d'abord été lyophilisées pendant 72 h à l'aide d'un lyophilisateur (Christ

bioblock scientific, Rungis, France), avant d'être broyées à l'aide d'un mortier. L'incorporation de patates douces lyophilisées dans les croquettes du régime standard C - a été réalisée par la société SAFE alors que l'incorporation d'insectes a été effectuée par le service galénique de la Faculté de Pharmacie de Montpellier. L'incorporation a été réalisée de telle sorte que les concentrations en β-car dans les régimes SP et BSFL ne soient pas significativement différentes (respectivement 19,4 ± 2,5 et 19,5 ± 4 mg/kg).

5.4. Schéma expérimental

Pendant la période d'acclimatation (4 jours), les gerbilles ont été nourries avec le régime standard. Ensuite, 23 des 29 gerbilles ont été soumises au régime C- pendant 5 semaines. Les 6 gerbilles restantes ont été nourries avec le régime C + pendant la même période de 5 semaines. Les 23 gerbilles qui se nourrissaient du régime C - ont été divisées au hasard en 3 groupes pour la période de régime expérimental, i.e. 3 semaines : un groupe (n =7) qui continuait à consommer le régime sans VA (C -), un groupe (n= 8) consommant le régime SP, et un groupe consommant le régime BSFL. Enfin, les 6 gerbilles qui avaient consommé le régime standard C + pendant la première période de 5 semaines ont continué à consommer ce régime pendant 3 semaines. A la fin de la période expérimentale, les gerbilles ont été privées de nourriture pendant une nuit.

Avant le prélèvement des échantillons, les animaux ont été placés sous anesthésie générale profonde par injection intrapéritonéale de Kétamine (100 mg/kg) et de Xylazine (10 mg/kg). Des échantillons de sang à jeun ont été prélevés par ponction cardiaque avant l'euthanasie, réalisée par une prise de sang intracardiaque. Les échantillons de sang ont été centrifugés à 2200 g pendant 10 min pour recueillir le plasma, qui a été conservé à - 80 °C. Le foie a quant à lui été prélevé et pesé après avoir été lavé avec une solution saline glacée (0,9 % NaCl, p/v) et immédiatement congelé dans de l'azote liquide et stocké à - 80 °C jusqu'à l'analyse CLHP du β-car et de la VA.

6. Extraction des vitamines et caroténoïdes et quantification par chromatographie liquide à haute performance

6.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de LMSN et les substrats ont été préalablement broyés à l'azote liquide dans un mortier (Pulverisette 2, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Germany). Selon l'échantillon et sa concentration en micronutriments théorique, les LMSN et substrats broyés ont été plus ou moins dilués dans de l'eau distillée. Concernant les foies de gerbilles (**Publication n°2**), 100 mg de ces échantillons ont été mis en suspension dans 1 ml de PBS et broyés à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch, Eragny-sur-Seine) 5 min à 30 rotations/min.

6.2. Extraction des vitamines et caroténoïdes

Les vitamines et les caroténoïdes des différentes matrices ont été extraits grâce à une double extraction hexanique. Leur extraction a été réalisée à partir d'un volume variant de 250 à 500 µL selon la nature de l'échantillon préalablement dilué et complétés si nécessaire par de l'eau distillée (qsp 500 µL). De plus, 500 µL d'une solution éthanolique contenant un étalon interne et 2 mL d'hexane ont ensuite été ajoutés. A la suite d'une agitation de 10 min et d'une centrifugation (1257 g, 10 min, 4°C), la phase hexanique supérieure a été prélevée. L'extraction a été répétée 2 fois. Les deux phases hexaniques ont ensuite été réunies puis évaporées sous azote. L'extrait sec a été repris avec des volumes variant de 200 µL à 2 mL de phase mobile, variant selon la concentration théorique de micronutriments de l'échantillon.

6.3. Quantification des vitamines et caroténoïdes

6.3.1. Caroténoïdes provitaminiques A et lutéine (Publications n°1 et 3)

Les caroténoïdes et l'étalon interne (l'échinénone pour la publication n°1 et le rétinyl acétate pour la publication n°3) des échantillons de LMSN, de substrats d'élevages, ainsi que les digestats et les micelles mixtes provenant de la digestion de ces échantillons et les cellules, ont été séparés et quantifiés après passage en CLHP. Des volumes de 5 à 180 µL ont été injectés selon la nature de l'échantillon.

Le système CLHP était constitué d'une colonne YMC C30, 5µm 250 x 4,6 mm couplée à une pré-colonne YMC C30 (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Allemagne) maintenue à température constante (35°C). Le système comprenait un module de séparation Dionex Summit

(pompe HPLC P680 et injecteur d'échantillons automatisé ASI-100) et un détecteur à photodiodes Dionex UVD340U (Dionex, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). La phase mobile était un mélange de méthanol (A), de méthyl tert-butyle éther (B), et d'eau (C). Le gradient de la phase mobile (A/B/C, v/v/v) été programmé pour débuter à des proportions de 96/2/2 au début de la séquence puis pour évoluer jusqu'à atteindre des proportions de 18/80/2 à 27 min et ensuite revenir à 96/2/2 de 31 à 35 min. Le débit était de 1 mL/min.

Les caroténoïdes et le rétinyl acétate ont été détectés à respectivement 450 et 325 nm. Ces composés ont été identifiés par leur temps de rétention et par leur spectre d'absorption par rapport à ceux de standards purs. Le logiciel Chromeleon (version 6.8 ThermoScientific) a permis de quantifier ces molécules en comparant l'aire du pic à quantifier avec les aires mesurées pour des quantités connues de standards (droites d'étalonnage).

6.3.2. Rétinol, esters de rétinol et β-carotène (Publication n°2)

Le rétinol, les esters de rétinol, le β-car et l'étalon interne (l'α-tocophérol acétate) des échantillons de foies et de plasmas de gerbilles ont été séparés et quantifiés après passage en CLHP. Les volumes d'injection étaient de 25 µL pour les échantillons de foie et de 180 µL pour ceux de plasma.

Les molécules d'intérêt ont été analysées par CLHP en utilisant une colonne Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 µm de 250 x 4,6 nm précédée d'une pré-colonne Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 µm de 12,5 x 4,6 nm (Agilent, Santa Clara, CA, USA) et maintenues à une température constante (35°C). Le système comprenait un module de séparation Prominence Shimadzu (Pompe LC-20ADSP et injecteur automatisé d'échantillon SIL-20CHT) et un détecteur à photodiode Shimadzu SPD-M20A (Shimazu, Marne-la-Vallée, France). La phase mobile était composée d'acétonitrile-dichlorométhane-méthanol (70/20/10 ; v/v/v). Le débit était de 1,8 mL/min.

Les composés ont été détectés à leur longueur d'onde d'absorption maximale, c'est-à-dire à 290 nm pour l'α-tocophérol acétate, 325 nm pour le rétinol et les esters de rétinol et 450 nm pour le β-car. Le rétinol, le β-car et le rétinyl palmitate ont été identifiés par les temps de rétention et les spectres d'absorption par rapport à des solutions de standards purs. Les autres esters de rétinol ont été identifiés par analyse de leur spectre et quantifiés en fonction de leur coefficient d'extinction molaire par rapport au rétinyl palmitate. La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Chromeleon en comparant la surface des pics à la courbe de référence standard.

6.3.3. La vitamine E (Publication n°4)

L'α-, le γ-TOC et l'étalon interne (le rétinyl acétate) des échantillons de LMSN, de substrats d'élevages, ainsi que des digestats et des micelles mixtes provenant de la digestion de ces échantillons, et les cellules, ont été séparés et quantifiés après passage en CLHP. Selon la nature de l'échantillon, des volumes de 25 à 180 µL ont été injectés dans le système.

La colonne utilisée était la même que dans le paragraphe *6.3.2*. La colonne était maintenue à une température constante (40 °C). La phase mobile était entièrement constituée de méthanol, à un débit de 1,5 ml/min. Le système CLHP comprenait un module de séparation UltiMate U3000 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) avec une pompe LPG 3400SD, un détecteur fluorimétrique, et un détecteur à barrettes de diodes (DAD) DAD-3000. Pour l'analyse fluorimétrique des tocophérols, la détection était réglée à 292 nm (excitation) et 325 nm (émission). Le rétinyl acétate était détecté à 325 nm. La quantification était réalisée à l'aide du logiciel Chromeleon (version 7.2.10 ES) en comparant la surface du pic aux courbes de référence standard.

6.3.4. L'ergostérol et la vitamine D (chapitre 4)

Afin de séparer et de quantifier l'ergostérol, l'ergocalciférol, le cholécalciférol et l'étalon interne (le rétinyl acétate) des échantillons de LMSN et de substrats d'élevage, ceux-ci ont été passés en CLHP.

La colonne utilisée était la même que celle mentionnée dans le paragraphe *6.3.2*. La colonne était maintenue à une température constante (40 °C). La phase mobile était un mélange d'acétonitrile, de méthanol et d'eau (60/38/2 ; v/v/v). Le débit était maintenu à 1,5 mL/min. Le système CLHP était le même que celui décrit dans le paragraphe *6.3.3*. L'ergocalciférol et le cholécalciférol étaient quantifiés à 265 nm, l'ergostérol à 282 nm, et le rétinyl acétate à 325 nm. La quantification était réalisée à l'aide du logiciel Chromeleon (version 7.2.10 ES) en comparant la surface du pic aux courbes de référence standard.

7. Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyennes ± SEM ou moyennes ± ET.

Les différences entre les moyennes ont été testées à l'aide soit de tests de Student ou d'ANOVA à 1 ou 2 facteurs. Avant le test de Student ou l'ANOVA, l'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Levene. En cas de variances non homogènes, la correction de Welch a été appliquée au test de Student, tandis que les données ont été log-transformées pour l'ANOVA. Pour évaluer la normalité des données concernant les ANOVA, des graphiques Q-Q des résidus standardisés ont été utilisés. Selon les études, lorsqu'un effet significatif était constaté par ANOVA, la comparaison des moyennes était soit effectuée par des comparaisons par paires en utilisant des t-tests bilatéraux, avec un ajustement de Bonferroni, soit des tests post-hoc de Tukey-Kramer. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme significatives. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de la version 4.1.1 du logiciel R pour Windows (R Core Team, 2021).

Résultats

Chapitre 1 : Bioaccumulation et biodisponibilité de caroténoïdes provitaminiques A dans les larves de mouche soldat noire

Comme précédemment évoquée, la carence en VA est une forme répandue de déficience en micronutriment, affectant plus particulièrement les enfants et les femmes enceintes, et entrainant la mort d'environ 800.000 d'entre eux chaque année dans le monde (*178*). Dues à la croissance démographique importante et à la raréfaction des ressources, des solutions durables doivent être mises en place afin de lutter contre ce problème mondial de déficience en VA. Cette carence est surtout présente en Afrique et en Asie où les espèces d'insectes sont présentes en grand nombre. Ainsi, si les insectes sont capables de bioaccumuler des quantités significatives de caroténoïdes proVA, la consommation d'animaux nourris aux insectes, ou la consommation directe d'insectes, comme les LMSN, seraient bénéfiques pour ces populations.

Le but de ces deux projets était dans un premier temps d'évaluer, via une étude *in vitro*, la bioaccumulation et la bioaccessibilité de caroténoïdes proVA dans les LMSN (**Publication n°1**) et dans un second temps, de déterminer si le β-car bioaccumulé dans ces larves était bien biodisponible. Nous avons pour cela effectué une étude de supplémentation nutritionnelle chez la gerbille, modèle animal approprié pour l'évaluation de la conversion du β-car en VA (*471*), afin de déterminer la capacité des LMSN enrichies en β-car à rétablir un statut déficient en VA (**Publication n°2**).

Food Chemistry 359 (2021) 129911

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste as a sustainable dietary source of provitamin a carotenoids

Patrick Borel [a,*], Faiza Hammaz [a,1], Lisa Morand-Laffargue [a], Benjamin Creton [b], Charlotte Halimi [a], Damien Sabatier [b], Charles Desmarchelier [a]

[a] C2VN, INRAE, Aix-Marseille Univ, INSERM, Marseille, France
[b] BioMiMetiC, Avignon, France

ARTICLE INFO

Keywords:
β-carotene
α-carotene
β-cryptoxanthin
Insect
Vitamin A deficiency
Animal feed
Human food
Entomo-conversion
Hermetia illucens

ABSTRACT

We showed that black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables rich in provitamin A carotenoids can accumulate significant amounts of these vitamin A precursors. Using a simulated gastro-intestinal digestion model, we demonstrated that α- and β-carotene from the larvae are as bioaccessible as from the fruits and vegetables they were reared on. We calculated that provitamin A carotenoid-rich larvae have the capacity to provide more vitamin A than fruits and vegetables rich in these molecules. Remarkably, the incorporation of usual quantities of these larvae in feed could cover the needs of several production animals for this vitamin. Thus, our findings suggest that rearing black soldier fly larvae on by-products or waste rich in provitamin A carotenoids could be a sustainable strategy to recycle a fraction of vitamin A back into the food chain and could represent a new approach to fight against vitamin A deficiency.

1. Introduction

The term vitamin A describes a group of fat-soluble molecules that can be obtained from the diet as preformed vitamin A (mainly retinyl esters) and from provitamin A carotenoids. The former is found in foods of animal origin while the latter are found mainly in vegetables and fruits. There are three main provitamin A carotenoids in the human diet: β-carotene, α-carotene and β-cryptoxanthin. Their capacity to be converted into vitamin A, i.e. their provitamin A activity, is intrinsically different because it depends on the number of β-ionone rings they possess, i.e. 2 for β-carotene and 1 for α-carotene and β-cryptoxanthin. It also depends on a diet-responsive regulatory network that controls their intestinal uptake and their conversion into vitamin A through a negative feedback regulation of *SCARB1* (scavenger receptor class B member 1) and *BCO1* (beta-carotene oxygenase 1) expression via ISX (intestine specific homeobox) in the intestine (Lobo, Amengual, Baus, Shivdasani, Taylor, & von Lintig, 2013). It finally depends on their bioavailability, i.e. on the fraction that is absorbed and available for use by the body, which is highly dependent on the food matrix they are incorporated in (Desmarchelier & Borel, 2017). Although preformed vitamin A or provitamin A carotenoids are present in many foods, vitamin A deficiency is frequent, whether in humans (https://www.who.int/vmnis/database/vitamina/en/. Accessed 31.03.21) or animals, due to both low intakes of vitamin A food sources and to variations in provitamin A carotenoids bioavailability and conversion efficiency. Despite the implementation of numerous programs (Mason, Greiner, Shrimpton, Sanders, & Yukich, 2015), the prevalence of vitamin A deficiency in low income countries has remained high, calling for new and more sustainable strategies to tackle this public health issue. This is all the more relevant considering the context of increasing world population, leading to an increase in vitamin A needs, together with global warming, leading to a probable decrease in yields and area under cultivation. Moreover, breeders often have to add vitamin premixes to their animal feed to meet their nutritional needs for optimal growth and health and many animal production systems would benefit from cheaper and more sustainable vitamin A sources.

There are currently more than 1,900 insects classified as edible (https://www.wur.nl/upload_mm/8/a/6/0fdfc700-3929-4a74-8b69-f02fd35a1696_Worldwide%20list%20of%20edible%20insects%202017.pdf. Accessed 31.03.21). High levels of carotenoids, including provitamin A

* Corresponding author at: UMR C2VN "Center for CardioVascular and Nutrition Research of Marseille", Faculté de Médecine, 27, Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France.
E-mail address: Patrick.Borel@univ-amu.fr (P. Borel).
[1] Co-first author.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129911
Received 30 October 2020; Received in revised form 12 April 2021; Accepted 17 April 2021
Available online 22 April 2021
0308-8146/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

carotenoids, are found in various insect species and high concentrations of retinol and β-carotene were measured in two edible species, *Eublaberus distanti* and *Gromphadorhina portentosa* (Ruth Charrondiere, Stadlmayr, Rittenschober, Mouille, Nilsson, Medhammar, et al., 2013). Furthermore, some insect species were reported to be able to bioaccumulate different lipid molecules from food substrates they were reared on (Liland, Biancarosa, Araujo, Biemans, Bruckner, Waagbo, et al., 2017) and a proof of concept that insects can accumulate provitamin A carotenoids, which are very hydrophobic lipids, is provided by the fact that feeding migratory locusts with carrots increased their β-carotene content (Oonincx & Poel, 2011). We have thus hypothesized that some edible insect species could constitute significant dietary sources of vitamin A for feed and food, either by their natural vitamin A content or by the vitamin A they could accumulate. Although insects are not yet commonly eaten around the world and issues of health safety or cultural acceptance remain (Roma, Palmisano, & De Boni, 2020), they are already used as an complementary source of proteins in food and feed in several countries where vitamin A deficiency still prevails (Kenis, Koné, Chrysostome, Devic, Koko, Clottey, et al., 2014; Xu, Shan, Lin, Miao, Lou, Wang, et al., 2021). Thus, the identification of an insect species rich in vitamin A, either naturally or through enrichment following the choice of adequate rearing substrates, would provide these countries with an additional and sustainable approach to increase vitamin A intakes if used as a food, or even indirectly if used as a feed for livestock.

We used the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as a candidate to investigate whether insects can constitute a significant dietary source of vitamin A for four main reasons. Firstly, this species, which is native to the American continent, is now distributed globally throughout the tropic and temperate zones, likely due to human-mediated transport. Thus, it can be bred in many countries without risk of becoming an invasive species. Secondly, it is the only insect species that has been approved for use as an animal feed in the US (for salmonid fish) and Canada (for salmonid fish and broiler poultry). Therefore, we already have guarantees on the health security of feeding this insect species to certain animals and we can reasonably assume that this edible insect species will also be safe for the diet of other animal species and probably for humans. Thirdly, this insect species is already used to convert many types of organic substrates, e.g. fruits and vegetables or crop wastes, into valuable nutrients, e.g. proteins and lipids, which are already reinjected in the food chain by providing them to livestock (Biasato, Renna, Gai, Dabbou, Meneguz, Perona, et al., 2019) (feed) or potentially to humans (food) (Wang & Shelomi, 2017). Therefore, we can take advantage of the exceptional capacity of this edible insect species to put vitamin A back into the food chain, which is usually lost in plant waste. The fourth reason to study the potential of black soldier fly larvae (BSFL) to accumulate provitamin A carotenoids from fruits and vegetables by-products is the observation that their nutritional composition partly depends on the composition of their feeding substrate (Liland, et al., 2017). Finally, the fact that the fat content of BSFL is high, ranging between about 8% to about 28–29% on a dry mass basis (Liu, Chen, Wang, Yang, Ur Rehman, Li, et al., 2017), together with the observation that BSFL can accumulate lipids, e.g. monounsaturated and omega-3 fatty acids as well as vitamin E (Barroso, Sanchez-Muros, Segura, Morote, Torres, Ramos, et al., 2017; Liland, et al., 2017), make it a very good candidate to study its ability to accumulate significant concentrations of provitamin A carotenoids.

On the basis of the rationale and assumptions set out above, this study first aimed at assessing whether BSFL can accumulate significant amounts of provitamin A carotenoids when they are reared on food substrates rich in these vitamin A precursors. It also aimed to verify whether the provitamin A carotenoids accumulated in the larvae are bioaccessible, using an in vitro model of digestion (Berthelsen, Klitgaard, Rades, & Müllertz, 2019; Dupont, Alric, Blanquet-Diot, Bornhorst, Cueva, Deglaire, et al., 2019). The bioaccessibility of a fat-soluble micronutrient, e.g. fat-soluble vitamins, carotenoids, is the proportion of this compound that is incorporated in mixed micelles during digestion and is acknowledged as a good estimate of its bioavailability (Bohn, Carriere, Day, Deglaire, Egger, Freitas, et al., 2018).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Ethanol, *n*-hexane and HPLC grade dichloromethane, methanol, methyl *tert*-butyl ether and water were purchased from Carlo Erba reagents (Peypin, France). Carotenoid standards (HPLC purity greater than 96%), i.e. α-, β-carotene, β-cryptoxanthin and echinenone, were from Carotenature GmbH (Müsingen, Switzerland). All other chemicals and enzymes were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.2. Experimental foods

Foods used as substrates for BSFL rearing, i.e. white mushrooms and fruits and vegetables rich in provitamin A carotenoids, namely orange carrots (Hammaz, Charles, Kopec, Halimi, Fgaier, Aarrouf, et al., 2021), Cinderella pumpkins, sweet potatoes and clementines, as well as foods used in the in vitro digestion experiments, i.e. potatoes, minced beef meat (with 5% of fat) and olive oil, were purchased from local supermarkets.

2.3. BSFL farming

BSFL were reared either on fruits and vegetables rich in provitamin A carotenoids or on white mushrooms, which served as the control food substrate since they do not contain provitamin A carotenoids. The rearing protocol was implemented and carried out by BioMiMetiC (Avignon, France). The objective was to obtain approximately 200 g of larvae, weighing approximately 150 mg each, on each food substrate. As a result, around 1,300 larvae were deposited on each food substrate. This approximate number of larvae was obtained by sowing 35 ± 5 mg eggs on each substrate. Indeed, the egg mass is about 24 ± 1 μg (Tomberlin, Sheppard, & Joyce, 2002). The amount of each food substrate to add in the rearing boxes was calculated in order to provide enough food to the larvae all along the growth period (i.e. 14 days) and to reach an individual larval mass of around 150 mg. This was calculated both by considering that 340 mg of food substrate on a dry matter basis are needed to obtain approximately an individual larval mass of 150 mg (Diener, Zurbrügg, & Tockner, 2009), and by considering the relative humidity of the food substrates. The rearing procedure was as follows: first, after collecting eggs from an oviposition support, they were placed in a rearing room settled on a temperature of 29 ± 1 °C and a relative humidity of 65 ± 5%. Twenty-four hours later, whole fresh fruits, vegetables and mushrooms recently bought in a local supermarket were cut into small pieces, placed in the rearing trays (clear plastic boxes 267 × 380 × 150 mm high) and coarsely ground using a hand blender. Once the food substrates were prepared, hatching devices were placed on each substrate, allowing eggs to hatch about 3 cm above the food substrates. Eggs were from black soldier fly colony maintained by BioMiMetiC and were laid<24 h before being used in the experiment. Each growing tray was placed in a larger plastic box (350 × 418 × 180 mm high). Boxes were closed with mosquito net and placed in a rearing room. Eggs and larvae from eggs were raised for 14 days at 29 ± 1 °C and 65 ± 5% relative humidity, under 14:10 artificial light/dark cycles. At the end of the rearing period, larvae were separated from their food substrates by sieving (2 × 2 mm). They were then washed using tap water and put in a temperate water bath. They were finally filtered again through a sieve (2 × 2 mm) and transferred to a plastic box containing only absorbent paper in order to remove excess moisture. Larvae were kept for 5 days in this bare box in order to empty their digestive tract from any remaining substrate. After this period, larvae were separated from their exuviae and droppings, and washed again using tap water and a sieve to

Table 1
Characteristics of the larvae collected at the end of the rearing period.

Food substrate	Fresh weight (g)	Lipid mass (mg/g fresh weight)
Orange carrots	98.6	7.5 ± 0.8^{ab}
Pumpkins	87.2	8.4 ± 1.7^{a}
Sweet potatoes	125.7	6.2 ± 2.3^{b}
Clementines	33.1	3.1 ± 4.0^{c}
White mushrooms	47.0	8.3 ± 4.6^{a}

Values of lipid masses represent means ± SEM of 3 measurements. Means bearing different superscript letters were significantly different (ANOVA followed by Tukey-Kramer's test, $p < 0.05$).

eliminate any remaining organic particles. They were finally dried using absorbent paper before being frozen at −20 °C.

2.4. Measurement of the bioaccessibility of provitamin A carotenoids from BSFL and their rearing food substrates

Provitamin A carotenoid bioaccessibility, i.e. the relative amount of provitamin A carotenoids that is transferred to mixed micelles during digestion, was assessed by using an in vitro model (Reboul, Richelle, Perrot, Desmoulins-Malezet, Pirisi, & Borel, 2006), which provides similar estimates of carotenoid bioaccessibility for diverse foods compared to the Infogest model (Rodrigues, Chitchumroonchokchai, Mariutti, Mercadante, & Failla, 2017). In summary, 2 g of sample (BSFL or food substrates coarsely crushed with a mortar), or lipids extracted from 2 g of BSFL, were placed in a 100 mL Erlenmeyer flask and mixed with 6.7 g mashed potatoes, 1.2 g minced meat and 200 mg olive oil and ground for 30 s at 22,000 rpm (T18 basic Ultra-Turrax disperser, IKA, Staufen, Germany). The mixture was homogenized 10 min at 37 °C in a rotating incubator (190 rpm). To mimic the oral phase of digestion, 2.5 mL artificial saliva were then added and the mixture was incubated 10 min at 37 °C in a rotating incubator (190 rpm). To mimic the gastric phase of digestion, the pH was adjusted to 4 ± 0.02 with 1 M HCl and 2 mL pepsin were added to the mixture which was then incubated for 30 min at 37 °C in a rotating incubator (190 rpm). To mimic the duodenal phase of digestion, the pH was adjusted to 6 ± 0.02 with 0.9 M $NaHCO_3$ buffer before addition of 9 mL of a pancreatin-bile extract solution and 4 mL of a bile solution. The mixture was then incubated for 30 min at 37 °C in a rotating incubator (190 rpm). Aliquots of 4 mL of the mixture, thereafter called digestate aliquots, were then collected. The remaining mixture was centrifuged at 1,860 × *g* for 1 h 12 min at 10 °C. The recovered supernatant was filtered through a 0.8 µm filter and then through a 0.22 µm filter (mixed cellulose esters; Millipore, Molsheim, France). The clear aqueous samples obtained, which contain the mixed micelles, were stored at −80 °C until lipid extraction and quantification of provitamin A carotenoids by HPLC.

2.5. Lipid extraction from BSFL

Lipid extraction was carried out according to Bligh and Dyer with slight modifications. BSFL were first crushed with liquid nitrogen as follows: about 3 g of whole larvae were ground for 30 s under liquid nitrogen in a mortar grinder (Pulverisette 2, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Germany) and the larval powder obtained was stored at −80 °C until further analysis. A sample (1 g) of the larval powder was homogenized with 3.75 mL of a solution of trichloromethane/methanol (1:2) that contained 50 µL of 0.05% butylated hydroxytoluene (antioxidant to protect the carotenoids from degradation). The mixture was then vortexed for 2 min before addition of 3.75 mL of trichloromethane. The mixture was vortexed again for 2 min before addition of 3.75 mL of a NaCl solution (9 g/L). After 2 min of vortex, it was centrifuged for 15 min at 1,257 × *g*. The lower fraction of the two liquid phases was gently removed with a Pasteur pipette and transferred directly into a pre-weighed tube. A second extraction of the upper fraction was carried out in the same way by adding 3.75 mL of trichloromethane. After 2 min of vortexing and 15 min of centrifugation at 1,257 × *g*, the lower fraction was added to the first one in the pre-weighed tube. The pooled lower fractions were then evaporated to dryness under nitrogen at 40 °C. Tubes were weighed again to determine the amount of dried lipids (Table 1).

2.6. Provitamin a carotenoid extraction from BSFL and food substrates

For BSFL and food substrates, 2 g of samples finely ground with a mortar were first homogenized in 50 mL of distilled water. Then, a volume of 500 µL was taken, to which 500 µL of ethanol containing echinenone (as internal standard) was added. For in vitro digestion samples, i.e. digestates and mixed micelle-rich aqueous fractions, 2 mL were extracted to which the same volume of ethanol, containing the internal standard, was added. A double extraction with hexane was carried out on all samples. After centrifugation at 1,257 × *g* during 10 min at 4 °C, the hexane phases were recovered and then evaporated under nitrogen until a dry film was obtained, which was then solubilized in 200 µL of methanol/dichloromethane (65/35, v/v).

2.7. Carotenoid quantification

Injection volumes of 50 µL (BSFL and food substrate samples) and 150 µL (mixed micelle samples and digestate samples) were used for HPLC analysis. Carotenoids were separated as previously described (Hammaz, et al., 2021) and quantified at 450 nm. HPLC analyses were carried out in gradient mode on a YMC-Pack YMC C30 column (250 × 4.6 mm; 5 µm) (Crawford Scientific Ltd, Strathaven, UK) preceded by a pre-column (10 × 4 mm; 5 µm) set at 35 °C. The HPLC system comprised a Dionex separation module (P680 HPLC pump and ASI-100 Automated Sample Injector; Dionex, Aix-en-Provence, France), and a Dionex UVD340U photodiode array detector. Carotenoid peaks were identified in the HPLC chromatograms by comparing them to retention times and absorption spectrum of external standards.

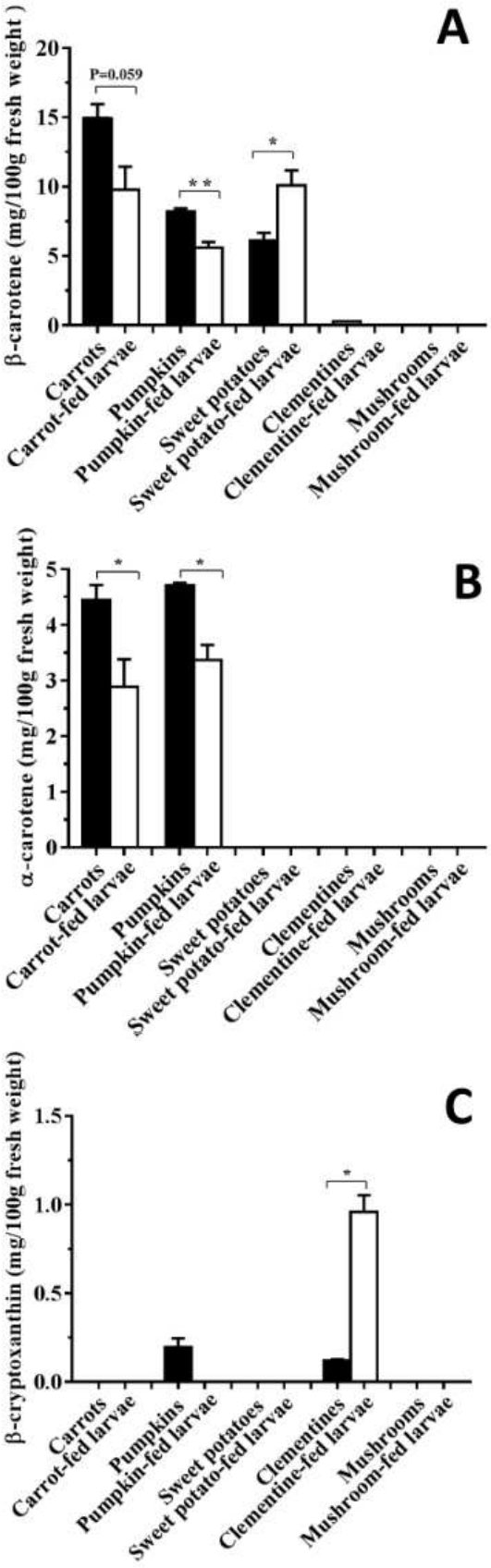
2.8. Calculations and statistics

Data were expressed as means ± SEM. Differences between means were tested using either Student's *t*-test or ANOVA. Prior to Student's *t*-test or ANOVA, homogeneity of variances was checked by Levene's test. In case of inhomogeneous variances, Welch's correction was applied to Student's *t*-test while data were log-transformed for ANOVA. For ANOVA, when Fisher's test was significant, Tukey-Kramer's test, which maintains the family-wise error rate at $\alpha = 0.05$, was used as a post hoc test for pairwise comparisons. For all tests, the bilateral alpha risk was $\alpha = 0.05$. Statistical comparisons were performed using StatView software, version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Effect of the food substrate type on larval growth efficiency and larval lipid mass

This study was not dedicated to compare the effect of the different food substrates on larval growth efficiency, therefore we did not run biological replicates and hence we cannot compute statistical tests. However, the wide-ranging masses of larvae obtained at the end of the rearing period (Table 1), i.e. from 33.1 g with the clementine substrate to 125.7 g with the sweet potato substrate, suggest that BSFL did not develop and grow with the same efficiency on the different food substrates. Furthermore, they did not grow as efficiently on these experimental substrates, which were constituted of only one species of fruits, vegetables or mushrooms, as on the standard food substrate used by BioMiMetiC (complete feed for poultry, Moulin des Hauts Rochers, Saint Grégoire, France). Indeed, this substrate usually provides about 200 g larvae in the same rearing conditions (BioMiMetiC internal data).



(caption on next column)

Fig. 1. Provitamin A carotenoid concentrations in BSFL reared on different food substrates and in their corresponding rearing substrates. Fig. 1**A:** β-carotene concentrations. Fig. 1**B:** α-carotene concentrations. Fig. 1**C:** β-cryptoxanthin concentrations. Bars represent means + SEM (n = 3). For each couple (food substrate)/(food substrate-fed larvae), an asterisk indicates that concentrations are significantly different between the larvae and the food substrate (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$, Student's *t*-test).

Moreover, the fat masses of the larvae reared on the different experimental substrates (Table 1) were markedly lower than that of larvae reared on their standard food substrate, i.e. about 16 g/100 g (Bio-MiMetiC internal data). More precisely, they ranged between 20% (clementines) to 54% (pumpkins) of this fat mass of reference. In summary, the experimental food substrates yielded lower larva masses, which had less fat than larvae reared on their standard food substrate.

3.2. Effect of the food substrate type on BSFL provitamin a carotenoid content

β-Carotene concentrations in BSFL reared on the different food substrates are shown in Fig. 1**A**. The first noteworthy observation is that there was no detectable β-carotene in larvae reared on the control food substrate, i.e. mushrooms, which do not contain this provitamin A carotenoid. Conversely, when β-carotene was present in a food substrate, it was found in the larvae reared on this substrate. More precisely, β-carotene concentrations were 44% and 32% lower in carrot and pumpkin-fed larvae, respectively, and 66% higher in sweet potato-fed larvae than those measured in their respective substrates ($p = 0.059$, $p = 0.005$, and $p = 0.03$, respectively).

Fig. 1**B** shows α-carotene concentrations in the food substrates and in the larvae fed with these substrates. As observed for β-carotene, α-carotene was detected only in larvae reared on food substrates that contained this provitamin A carotenoid, i.e. carrots and pumpkins. α-Carotene concentrations in whole larvae were lower than those found in their rearing food substrate, by 35% and 28% for carrot and pumpkin-fed larvae, respectively ($p = 0.05$ and 0.036, respectively).

β-Cryptoxanthin concentration in the larvae reared on the different food substrates is shown in Fig. 1**C**. As observed for the two other provitamin A carotenoids, when no β-cryptoxanthin was present in the food substrate, i.e. carrots, sweet potatoes and mushrooms, no β-cryptoxanthin was recovered in the larvae. While there was no detectable β-cryptoxanthin in pumpkin-fed larvae, the concentration of β-cryptoxanthin in clementine-fed larvae was 8 times higher than that in the clementines ($p = 0.01$).

3.3. Provitamin A carotenoid concentrations in larval lipids

Provitamin A carotenoid concentrations in larval lipids were systematically higher than those measured in whole larvae (Table 2). They ranged from 3 times higher (β-cryptoxanthin from clementine-fed larvae) to 5 times higher for α-carotene in carrot- and pumpkin-fed larvae. However, these differences were not statistically significant due to the fact that the quantities of lipids extracted from the larvae were very low and only 2 measurements could be made for this fraction. This is due to the fact that the measurements of the concentration of provitamin A carotenoids in larval lipids were not foreseen in our experimental plan. We must therefore consider these data as exploratory.

Knowing the percentage of lipids of the larvae, the concentrations of provitamin A carotenoids in the whole larvae, and the concentrations of provitamin A carotenoids in the lipids of the larvae, we calculated the proportion of each provitamin A carotenoids found in the lipid fraction of the larvae. These calculations show that the proportions of β-carotene, α-carotene and β-cryptoxanthin were approximately 41%, 32% and 11% respectively (data not shown).

Table 2
Provitamin A carotenoid concentration and bioaccessibility in whole larvae and in larval lipid fractions.

Food substrate provided to the BSFL	Provitamin A carotenoid	Provitamin A carotenoid concentration (mg/100 g fresh weight or lipids)		Provitamin A carotenoid bioaccessibility (%)	
		Whole larvae	Larval lipids	Whole larvae	Larval lipids
Orange carrots	α-carotene	2.9 ± 0.5	14.4 ± 6.1	2.6 ± 0.4	44.5 ± 21.8
	β-carotene	9.8 ± 1.7	43.4 ± 19.9	2.4 ± 0.3	24.3 ± 9.0
Pumpkins	α-carotene	3.4 ± 0.3	17.8 ± 2.1	7.0 ± 1.5	1.9 ± 0.3
	β-carotene	5.6 ± 0.4	24.4 ± 6.4	5.9 ± 1.2	1.5 ± 1.2
	β-cryptoxanthin	< LoQ	0.8 ± 0.4	13.2 ± 1.1	< LoQ
Sweet potatoes	β-carotene	10.1 ± 1.1	40.8 ± 17.2	1.7 ± 0.4	0.7 ± 0.3
Clementines	β-carotene	< LoQ	0.3 ± 0.2	< LoQ	< LoQ
	β-cryptoxanthin	1.0 ± 0.9	3.3 ± 1.7	6.4 ± 0.8	20.0 ± 4.5

Values represent means ± SEM of 3 or 4 values for whole larvae and of 2 values for larval lipids. LoQ: limit of quantification.

3.4. Effect of the food substrate type on BSFL preformed vitamin a content

Both retinol and retinyl palmitate were found in larvae reared on the different food substrates. Retinol concentration ranged between 8 and 12 μg/100 g fresh weight and retinyl palmitate ranged between 140 and 200 μg/100 g. Therefore, retinyl palmitate represented about 95% of the vitamin A mass. Furthermore, there was no significant difference between the concentrations of retinol and retinyl palmitate in the different groups (data not shown).

3.5. Bioaccessibility of provitamin a carotenoids in BSFL and food substrates

Fig. 2**A** shows the bioaccessibility of β-carotene from BSFL and from their corresponding food substrates following in vitro digestions. β-Carotene bioaccessibility did not differ in carrot-fed and sweet potato-fed larvae and in their corresponding rearing substrates ($p = 0.153$ and $p = 0.885$, respectively). Conversely, it was significantly higher ($p = 0.013$) in pumpkin-fed larvae than in pumpkins.

The bioaccessibility of α-carotene in carrot-fed larvae did not differ from that measured in carrots ($p = 0.197$) (Fig. 2**B**). Concerning pumpkins, α-carotene bioaccessibility was significantly higher when originating from larvae than from the rearing food substrate ($p = 0.033$).

Fig. 2**C** shows the bioaccessibility of β-cryptoxanthin from the food substrates that contained this carotenoid, i.e. pumpkins and clementines, and from the larvae reared on these substrates. It is noteworthy that β-cryptoxanthin bioaccessibility was high in the substrates, i.e. 82 ± 18% in pumpkins and 68 ± 7% in clementines. Conversely, β-Cryptoxanthin bioaccessibility in pumpkin- and clementine-fed larvae was dramatically lower, about 84% and 91%, than that in pumpkins and clementines respectively ($p = 0.008$ and $p = 0.035$, respectively).

3.6. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in larval lipid fractions

Lipids extracted from the larvae were subjected to in vitro digestion to measure the bioaccessibility of provitamin A carotenoids located in this fraction, which can be added in the diet of certain livestock (Table 2). The bioaccessibility of provitamin A carotenoids from larval lipids seemed to be higher compared to that from whole larvae for BSFL reared on carrots and clementines, whereas it seemed lower in larval lipids than in whole larvae for BSFL reared on pumpkins. The differences were not significant because of the very low number of repetitions due to the low quantity of lipids. As explained above, this is due to the fact that the measurements of provitamin A carotenoids in larval lipids were not foreseen in our experimental plan. We must therefore consider these data as exploratory.

3.7. Theoretical bioaccessible vitamin a amounts provided by provitamin a carotenoid-rich larvae as compared to the substrates they were reared on

In order to estimate the potential of the larvae as a significant dietary source of vitamin A, we calculated the theoretical quantities of bioaccessible vitamin A provided by the larvae reared on the various substrates rich in provitamin A carotenoids, and we compared these with those theoretically brought by the substrates which they were reared on (Table 3). The results of these calculations show that the larvae enriched with provitamin A carotenoids can theoretically provide more bioaccessible vitamin A per unit of fresh weight than the substrates rich in vitamin A which they were reared on. In fact, if we calculate the ratio between the quantity theoretically provided by the larvae and the quantity theoretically provided by the substrates which they were reared on, we observe that the larvae can provide 2 to 12 times more vitamin A than the substrates they were reared on.

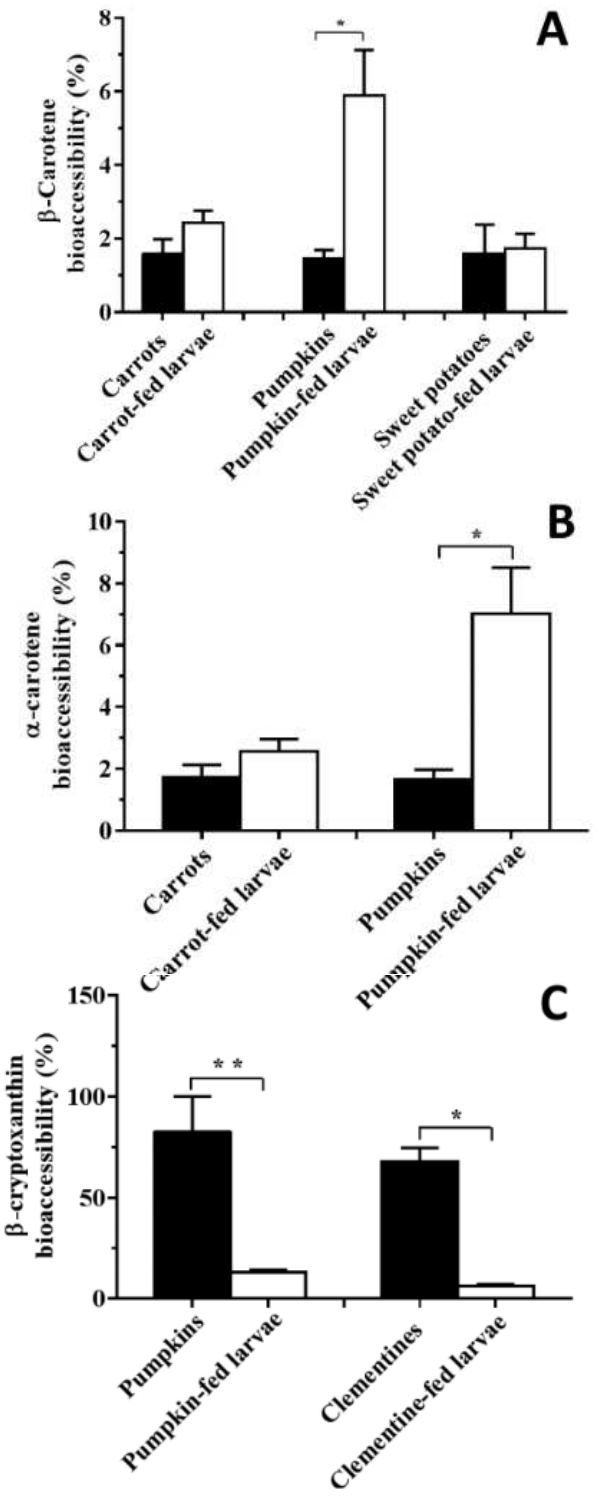
3.8. Proportions of vitamin A requirements provided by the consumption of provitamin A carotenoid-rich BSFL

We then investigated whether incorporating these BSFL, or fractions thereof, into the diet of different production animals could provide significant amounts of vitamin A to these animals (Table 4). Our calculations show that the incorporation of usual quantities of BSFL, or certain fractions thereof, in the diet of several production animal species, could largely meet their vitamin A requirements. With regard to humans, we have calculated the daily quantities of larvae necessary to meet the recommended dietary allowances in vitamin A. Although these quantities seem relatively large (210 g/d for females and 245 g/d for males), a few tens of g/d would nonetheless provide a significant part of the daily intake of vitamin A.

4. Discussion

The first objective of this study was to assess whether BSFL can accumulate significant amounts of provitamin A carotenoids when reared on different food substrate rich in these vitamin A precursors. We chose orange carrots and pumpkins as sources of both α- and β-carotene, and clementines as a source of β-cryptoxanthin. White mushrooms were chosen as the control food substrate since they do not contain carotenoids. Food substrates were provided singly in order to measure their intrinsic capacity to allow the accumulation of provitamin A carotenoids by BSFL. As expected, the growth of larvae provided these nutritionally unbalanced food substrates was less efficient than that of larvae provided a standard food substrate, but this did not affect the study objectives.

Our results clearly show that BSFL reared on food substrates rich in provitamin A carotenoids can accumulate significant amounts of these compounds. To the best of our knowledge, this constitutes the first demonstration thereof (Ruth Charrondière et al., 2013). We put forward that BSFL do not synthesize provitamin A carotenoids and solely obtain them from their food substrate. This hypothesis is supported by two arguments. Firstly, we did not detect any provitamin A carotenoids in larvae that were reared on white mushrooms, which do not contain provitamin A carotenoids. Secondly, provitamin A carotenoid species found in larvae were only those present in the substrates they were reared on. Moreover, although these substrates provided very different amounts of provitamin A carotenoids, the concentration of preformed



(caption on next column)

Fig. 2. Provitamin A carotenoid bioaccessibility in BSFL reared on different food substrates and in their corresponding rearing substrates. Fig. 2**A:** β-carotene bioaccessibility. Fig. 2**B:** α-carotene bioaccessibility. Fig. 2**C:** β-cryptoxanthin bioaccessibility. Provitamin A carotenoid bioaccessibility, i.e. the quantity of provitamin A carotenoids that is transferred to mixed micelles during digestion, was estimated by using an in vitro digestion model (see Material & Methods). Bars represent mean ± SEM (n = 4). For each couple (food substrate)/(food substrate-fed larvae), an asterisk indicates that bioaccessibility values are significantly different between the larvae and the food substrate ($p < 0.05$; Student's *t*-test).

vitamin A, i.e. retinol and retinyl palmitate, which can be converted from provitamin A carotenoids by many animal species (Borel & Desmarchelier, 2017), was not significantly different between BSFL reared on the different food substrates. This suggests that BSFL cannot convert provitamin A carotenoids into vitamin A, i.e. they likely do not possess any active carotene oxygenase (Lobo, Amengual, Palczewski, Babino, & von Lintig, 2012; von Lintig & Vogt, 2004). Interestingly, the concentrations of the accumulated provitamin A carotenoids were fairly high, reaching the same order of magnitude as those in fruits and vegetables known to be rich in these compounds, and even giving a light orange color to the carrot-fed larvae. These concentrations were at least two thirds of those measured in the food substrates and they were sometimes even higher, i.e. β-carotene in sweet potato-fed larvae and β-cryptoxanthin in clementine-fed larvae. This can be partly explained by the fact that larvae are not able to convert provitamin A carotenoids to vitamin A or other metabolites, thus leading to a bioaccumulation of these compounds. Composition of the larval diet, e.g. its lipid content, may also modulate carotenoid bioavailability, and thus bioaccumulation, but further studies are needed to determine the optimal nutrient composition of the diet to maximize carotenoid bioaccumulation.

The higher concentrations of provitamin A carotenoids found in larval lipids as compared to whole larvae, together with the fact that these molecules are very hydrophobic, suggested at first that most provitamin A carotenoids were located in the lipid fraction of the larvae. However, we calculated that only 11% of β-cryptoxanthin and around 40–43% of α- and β-carotene were present in the lipid extracts. Carotenoids, although very hydrophobic, are actually relatively poorly soluble in triglycerides (Borel, Grolier, Armand, Partier, Lafont, Lairon, et al., 1996; Goupy, Genot, Hammaz, Halimi, Caris-Veyrat, & Borel, 2020). In addition, they can associate with proteins (Goupy, Genot, Hammaz, Halimi, Caris-Veyrat, & Borel, 2020; Mensi et al., 2014) as well as with phospholipids (Borel, et al., 1996; Goupy, Genot, Hammaz, Halimi, Caris-Veyrat, & Borel, 2020). Whatever their location in the non-lipid fraction of the larvae, these molecules are distributed in the two fractions of the larvae that are currently used in feed (see examples in Table 4) and that could be used in food according to present legislation in different countries.

Since carotenoids are usually not efficiently absorbed (Desmarchelier & Borel, 2017) and since many dietary factors can impair their absorption (Desmarchelier & Borel, 2017), the second part of this study was dedicated to comparing the bioaccessibility of the provitamin A carotenoids recovered in the larvae, or in their lipid extract, with that of carotenoids present in the fruits and vegetables they were reared on. Indeed, we hypothesized that some compounds present in insects, such as chitin, which is found in BSFL and which could reduce triglyceride absorption (Zacour, Silva, Cecon, Bambirra, & Vieira, 1992), might impair provitamin A carotenoid bioaccessibility. The results obtained suggest that the effects of the larval components on carotenoid bioaccessibility depend on the carotenoid species. Indeed, while the bioaccessibility of α- and β-carotene from larvae were not different, or even significantly higher, compared to that from their food substrates, the bioaccessibility of β-cryptoxanthin from the pumpkin and the clementine-fed larvae was dramatically lower than that from their substrates. β-Cryptoxanthin was mainly located in the non-lipid fraction, i.e. about 89% (see the result paragraph on this topic), possibly because

Table 3
Theoretical bioaccessible vitamin A amounts provided by the consumption of 100 g of the food substrates compared to 100 g of larvae reared on these substrates.

Food substrate	Provitamin A carotenoid	Provitamin A carotenoid concentration[a] (mg/100 g substrate)[b]	Provitamin A carotenoid amount in the micellar fraction (μg/100 g substrate)[c]	Bioaccessibility (%)[a]	Theoretical RAE amount in the micellar fraction (μg/100 g substrate)[d]	Theoretical total RAE amount in the micellar fraction (μg/100 g substrate)[e]
Carrots	α-carotene	4.4 ± 0.3	15.5 ± 4.0	1.7 ± 0.4	8.3 ± 2.1	59.8 ± 18.1
	β-carotene	14.9 ± 1.0	48.3 ± 15.0	1.6 ± 0.4	51.5 ± 16.0	
Pumpkins	α-carotene	4.7 ± 0.0	11.3 ± 2.5	1.6 ± 0.3	6.0 ± 1.3	27.6 ± 5.2
	β-carotene	8.2 ± 0.2	17.0 ± 2.6	1.5 ± 0.2	18.1 ± 2.8	
	β-cryptoxanthin	0.2 ± 0.1	10.7 ± 1.3	82.4 ± 17.6	5.7 ± 0.7	
Sweet potatoes	β-carotene	6.1 ± 0.6	22.5 ± 9.9	1.6 ± 0.8	24.0 ± 10.6	24.0 ± 10.6
Clementines	β-carotene	0.3 ± 0.0	< LoQ	–	–	4.9 ± 1.2
	β-cryptoxanthin	0.1 ± 0.0	9.3 ± 2.3	67.8 ± 6.9	4.9 ± 1.2	

Larvae	Provitamin A carotenoid	Provitamin A carotenoid concentration[a] (mg/100 g substrate[b])	Provitamin A carotenoid amount in the micellar fraction (μg/100 g larvae)[c]	Bioaccessibility (%)[a]	Theoretical RAE amount in the micellar fraction (μg/100 g larvae)[d]	Theoretical total RAE amount in the micellar fraction (μg/100 g larvae)[e]	Enrichment in larvae vs respective substrate
Carrot-fed	α-carotene	2.9 ± 0.5	30.3 ± 1.0	2.6 ± 0.4	16.2 ± 0.5	122.6 ± 5.9	2.1
	β-carotene	9.8 ± 1.7	99.8 ± 5.5	2.4 ± 0.3	106.4 ± 5.9		
Pumpkin-fed	α-carotene	3.4 ± 0.3	174.6 ± 56.9	7.0 ± 1.5	93.1 ± 30.4	367.4 ± 116.1	13.3
	β-carotene	5.6 ± 0.4	251.5 ± 80.1	5.9 ± 1.2	268.4 ± 85.5		
	β-cryptoxanthin	< LoQ	11.0 ± 0.8	13.1 ± 1.1	5.9 ± 0.4		
Sweet potato-fed	β-carotene	10.1 ± 1.1	120.5 ± 38.9	1.7 ± 0.4	128.6 ± 41.5	128.6 ± 41.5	5.4
Clementine-fed	β-carotene	< LoQ	< LoQ	–	–	11.6 ± 1.8	2.4
	β-cryptoxanthin	1.0 ± 0.1	21.8 ± 3.4	6.4 ± 0.8	11.6 ± 1.8		

[a]Measured in this study.
[b]Fresh weight.
[c]Measured in this study per g substrate following *in vitro* digestion and expressed for the consumption of 100g substrate.
[d]Calculated considering 1 molecule of β-carotene yields 2 molecules of retinol while 1 molecule of α-carotene or β-cryptoxanthin yield 1 molecule of retinol upon cleavage by β-carotene oxygenase 1.
[e]Calculated as the sum of the theoretical RAE provided by each provitamin A carotenoid.
RAE: retinol activity equivalent. LoQ: limit of quantification.
Values are means ± SEM (n=3 for provitamin A carotenoid concentrations in substrates and n=4 for bioaccessibility measurements).

it is less apolar than α- and β-carotene. We hypothesize some compounds from this fraction, e.g. proteins, could have impaired its bioaccessibility (Iddir, Dingeo, Porras Yaruro, Hammaz, Borel, Schleeh, et al., 2020). Finally, note that the results of the exploratory experiments on larval lipids suggest that the provitamin A carotenoids located in this fraction are also readily bioaccessible, which was expected as carotenoids solubilized in triglycerides are usually more bioaccessible than carotenoids located in food matrices (Goupy, Genot, Hammaz, Halimi, Caris-Veyrat, & Borel, 2020).

The amount of vitamin A that could be supplied to farm animals or humans by provitamin A carotenoid-rich larvae depends not only on their provitamin A carotenoid content but also on their bioaccessibility

Table 4
Vitamin A amounts provided by the incorporation of provitamin A carotenoid-rich larvae in the diet of livestock and humans.

Species	Vitamin A requirements (mg/kg of diet)	BSFL fraction provided in the diet[a]	Maximum proportion of the BSFL fraction allowed in the diet (weight%)	mg RAE[b] provided by BSFL incorporated at the maximum proportion[c]	Vitamin A adequacy[d]
Rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*)	0.75 (Council, 2011)	Prepupae Partially defatted larvae[e]	50% (St-Hilaire et al., 2007) 40% (Renna et al., 2017)	1.84 1.47	245% 196%
Atlantic salmon (*Salmo salar*)	0.75 (Council, 2011)		100% (Lock, Arsiwalla, & Waagbø, 2016)	3.67	489%
Pig (*Sus scrofa domesticus*) Weanling Finishing	0.66 (Council, 2012) 0.39 (Council, 2012)	Partially deffated larvae Partially deffated larvae	10–21% (piglets) (Biasato, et al., 2019; Neumann, Velten, & Liebert, 2018) 13% (growing pigs) (Neumann et al., 2018)	0.37–0.77 0.48	56–117% 123%
Laying hen (*Gallus gallus domesticus*)	0.9 (Council, 1994)	Partially deffated larvae	24% (Maurer et al., 2016)	0.88	98%
Broiler chicken (*Gallus gallus domesticus*)	0.45 (Council, 1994)	Partially deffated larvae Highly deffated larvae Prepupae	25% (Schiavone, De Marco, Martínez, Dabbou, Renna, Madrid, et al., 2017) 25% (Schiavone, et al., 2017) 15% (Pieterse, Erasmus, Uushona, & Hoffman, 2019)	0.92 0.92 0.55	204% 204% 122%
Human	**RDA**	**Hypothetical BSFL fraction transformed and incorporated in the diet[f]**	**Daily amount needed to provide 100% of RDA**		
Males		Prepupae	245 g	0.90	100%

(continued on next page)

Table 4 (*continued*)

Species	Vitamin A requirements (mg/kg of diet)	BSFL fraction provided in the diet[a]	Maximum proportion of the BSFL fraction allowed in the diet (weight%)	mg RAE[b] provided by BSFL incorporated at the maximum proportion[c]	Vitamin A adequacy[d]
	900 µg (Medicine, 2001)				
Females	700 µg (Medicine, 2001)	Prepupae	210 g	0.77	100%

[a]Depending on national legislations.
[b]RAE: retinol activity equivalent.
[c]These values were calculated by using the larvae that had the higher RAE concentration in this study, i.e. the pumpkin-fed ones.
[d]Calculated as the % of vitamin A requirements covered by BSFL incorporated at the maximum proportion allowed.
[e]Larvae are usually partly deffated by pressing with an oil press. The crude fat concentration decreases from about 26.5 to 11.0 g/100 g fresh matter (Maurer et al., 2016).
[f]For humans, it is only theoretical as there is not yet authorization to incorporate this or that fraction of BSFL in food. Therefore, we hypothesized that prepuae could be incorporated in food after after verifying their food safety and organoleptic constraints. Furthermore, we have made a theoretical calculation on the quantity of larvae rich in provitamin A carotenoids which would be necessary to supply 100% of the recommended dietary allowances (RDA) in vitamin A.

and vitamin A conversion efficiency. We therefore calculated the total bioaccessible retinol activity equivalents 100 g of fresh larvae reared on the different food substrates could provide (Table 3). These calculations suggest that provitamin A carotenoid-rich larvae have the capacity to provide more retinol activity equivalents per unit of fresh weight than the fruits and vegetables they were reared on. More precisely, the retinol activity equivalent (RAE) enrichment in larvae versus their respective substrate ranged from 2.1 to 11.7, which makes these larvae significant dietary vitamin A sources for human and animal species that are able to convert provitamin A carotenoids to vitamin A, i.e. most tame animals except cats. If the quantities of larvae currently used in the diet of certain production animals (mostly as a protein source) were replaced by equivalent quantities of larvae enriched with provitamin A carotenoids, their vitamin A requirements would be met (Table 4). With regard to humans, we calculated that the consumption of about 100 g of larvae per day could provide 50% of female vitamin A RDA, which could be particularly relevant in the fight against vitamin A deficiency (McLean, Klemm, Subramaniam, & Greig, 2020). Importantly, in most countries where vitamin A deficiency is still prevalent, insects have been consumed for a very long time and their consumption thus does not pose socio-cultural problems (Baiano, 2020). The use of edible insects to increase vitamin A intakes therefore seems a feasible and acceptable strategy, as illustrated by the facts edible insects have already been used to fight against iron deficiency in some of these countries (Bauserman, Lokangaka, Gado, Close, Wallace, Kodondi, et al., 2015) and is an acceptable practice for pregnant women in rural Liberia (Coley, Perosky, Nyanplu, Kofa, Anankware, Moyer, et al., 2020).

In summary, the results of this study allow us to suggest that BSFL reared on food substrates rich in provitamin A carotenoids could be used as a source of vitamin A, either in feed or food (Hawkey, Lopez-Viso, Brameld, Parr, & Salter, 2021). The fact that BSFL do not seem to cleave/convert provitamin A carotenoids into vitamin A is not an issue because humans and most production animals are able to convert provitamin A carotenoids into vitamin A (Amengual, Widjaja-Adhi, Rodriguez-Santiago, Hessel, Golczak, Palczewski, et al., 2013; von Lintig & Vogt, 2004). Finally, since BSFL readily grow on fruits and vegetables wastes (da Silva & Hesselberg, 2020; Liu, Wang, & Yao, 2019), we believe that food industry by-products with well controlled food safety could constitute a way to recover provitamin A carotenoids in products intended for disposal. This would also make it possible to add value to plant by-products produced by the food industry (Ojha, Bussler, & Schluter, 2020) and would reduce waste production, which would be beneficial for the environment. Therefore, enrichment of BSFL with provitamin A carotenoids from by-products could be a sustainable strategy to put a fraction of vitamin A back into the food cycle, which would otherwise be irretrievably lost.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129911.

References

Amengual, J., Widjaja-Adhi, M. A. K., Rodriguez-Santiago, S., Hessel, S., Golczak, M., Palczewski, K., & von Lintig, J. (2013). Two Carotenoid Oxygenases Contribute to Mammalian Provitamin A Metabolism. *Journal of Biological Chemistry, 288*(47), 34081–34096.

Baiano, A. (2020). Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. *Trends in Food Science & Technology, 100*, 35–50.

Barroso, F. G., Sánchez-Muros, M.-J., Segura, M., Morote, E., Torres, A., Ramos, R., & Guil, J.-L. (2017). Insects as food: Enrichment of larvae of Hermetia illucens with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *Journal of Food Composition and Analysis, 62*, 8–13.

Bauserman, M., Lokangaka, A., Gado, J., Close, K., Wallace, D., Kodondi, K.-K., Tshefu, A., & Bose, C. (2015). A cluster-randomized trial determining the efficacy of caterpillar cereal as a locally available and sustainable complementary food to prevent stunting and anaemia. *Public Health Nutrition, 18*(10), 1785–1792.

Berthelsen, R., Klitgaard, M., Rades, T., & Müllertz, A. (2019). In vitro digestion models to evaluate lipid based drug delivery systems; present status and current trends. *Advanced Drug Delivery Reviews, 142*, 35–49.

Biasato, I., Renna, M., Gai, F., Dabbou, S., Meneguz, M., Perona, G., Martinez, S., Lajusticia, A. C. B., Bergagna, S., Sardi, L., Capucchio, M. T., Bressan, E., Dama, A., Schiavone, A., & Gasco, L. (2019). Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: Effects on the growth performance, nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features. *J Animal Sci Biotechnol, 10*(1). https://doi.org/10.1186/s40104-019-0325-x.

Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., … Dupont, D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(13), 2239–2261.

Borel, P., & Desmarchelier, C. (2017). Genetic Variations Associated with Vitamin A Status and Vitamin A Bioavailability. Nutrients, 9(3), 246. doi: 210.3390/nu9030246.

Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D., & Azais-Braesco, V. (1996). Carotenoids in biological emulsions: Solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research, 37*(2), 250–261.

Coley, K. M., Perosky, J. E., Nyanplu, A., Kofa, A., Anankware, J. P., Moyer, C. A., & Lori, J. R. (2020). Acceptability and feasibility of insect consumption among pregnant women in Liberia. *Matern Child Nutr, 16*(3). https://doi.org/10.1111/mcn.v16.310.1111/mcn.12990.

Council, N. R. (1994). *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994*. Washington, DC: The National Academies Press.

Council, N. R. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington, DC: The National Academies Press.

Council, N. R. (2012). *Nutrient Requirements of Swine: Eleventh* (Revised Edition). Washington, DC: The National Academies Press.

da Silva, G. D. P., & Hesselberg, T. (2020). A Review of the Use of Black Soldier Fly Larvae, Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae), to Compost Organic Waste in Tropical Regions. *Neotrop Entomol, 49*(2), 151–162.

Desmarchelier, C., & Borel, P. (2017). Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends in Food Science & Technology, 69*, 270–280.

Diener, S., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Manag Res, 27*(6), 603–610.

Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A. R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., & Van den Abbeele, P. (2019). Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59*(10), 1546–1562.

Goupy, P., Genot, C., Hammaz, F., Halimi, C., Caris-Veyrat, C., & Borel, P. (2020). Mechanisms Governing the Transfer of Pure and Plant Matrix Carotenoids Toward Emulsified Triglycerides. Mol Nutr Food Res, 64(7), e1900911.

Hammaz, F., Charles, F., Kopec, R. E., Halimi, C., Fgaier, S., Aarrouf, J., Urban, L., & Borel, P. (2021). Temperature and storage time increase provitamin A carotenoid concentrations and bioaccessibility in post-harvest carrots. *Food Chemistry, 338*, 128004. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128004.

Hawkey, K. J., Lopez-Viso, C., Brameld, J. M., Parr, T., & Salter, A. M. (2021). Insects: A Potential Source of Protein and Other Nutrients for Feed and Food. In H. A. Lewin & R. M. Roberts (Eds.), Annual Review of Animal Biosciences, Vol 9, 2021, vol. 9 (pp. 333-354). Palo Alto: Annual Reviews.

Iddir, M., Dingeo, G., Porras Yaruro, J. F., Hammaz, F., Borel, P., Schleeh, T., Desmarchelier, C., Larondelle, Y., & Bohn, T. (2020). Influence of soy and whey protein, gelatin and sodium caseinate on carotenoid bioaccessibility. *Food & Function, 11*(6), 5446–5459.

Kenis, M., Koné, N., Chrysostome, C. A. A. M., Devic, E., Koko, G. K. D., Clottey, V. A., … Mensah, G. A. (2014). Insects used for animal feed in West Africa. *Entomologia, 2*(2), 107–114.

Liland, N. S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C. G., Waagbo, R., Torstensen, B. E., & Lock, E. J. (2017). Modulation of nutrient composition of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae by feeding seaweed-enriched media. PLoS One, 12(8), e0183188. doi: 0183110.0181371/journal.pone.0183188. eCollection 0182017.

Liu, C., Wang, C., & Yao, H. (2019). Comprehensive Resource Utilization of Waste Using the Black Soldier Fly (Hermetia illucens (L.)) (Diptera: Stratiomyidae). Animals (Basel), 9(6), doi:10.3390/ani9060349.

Liu, X., Chen, X., Wang, H., Yang, Q., Ur Rehman, K., Li, W., Cai, M., Li, Q., Mazza, L., Zhang, J., Yu, Z., & Zheng, L. (2017). Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. PLoS One, 12(8), e0182601. doi: 0182610.0181371/journal.pone.0182601. eCollection 0182017.

Lobo, G. P., Amengual, J., Baus, D., Shivdasani, R. A., Taylor, D., & von Lintig, J. (2013). Genetics and Diet Regulate Vitamin A Production via the Homeobox Transcription Factor ISX. *Journal of Biological Chemistry, 288*(13), 9017–9027.

Lobo, G. P., Amengual, J., Palczewski, G., Babino, D., & von Lintig, J. (2012). Mammalian Carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1821*(1), 78–87.

Lock, E. R., Arsiwalla, T., & Waagbø, R. (2016). Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (Salmo salar) postsmolt. *Aquaculture Nutrition, 22*(6), 1202–1213.

Mason, J., Greiner, T., Shrimpton, R., Sanders, D., & Yukich, J. (2015). Vitamin A policies need rethinking. Int J Epidemiol, 44(1), 283-292.

Maurer, V., Holinger, M., Amsler, Z., Früh, B., Wohlfahrt, J., Stamer, A., & Leiber, F. (2016). Replacement of soybean cake by Hermetia illucens meal in diets for layers. *Journal of Insects as Food and Feed, 2*(2), 83–90.

McLean, E., Klemm, R., Subramaniam, H., & Greig, A. (2020). Refocusing vitamin A supplementation programmes to reach the most vulnerable. *BMJ Glob Health, 5*(7), e001997. https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-001997.

Medicine, I. o. (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC: The National Academies Press.

Mensi, A., Borel, P., Goncalves, A., Nowicki, M., Gleize, B., Roi, S., … Reboul, E. (2014). beta-lactoglobulin as a vector for beta-carotene food fortification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 62*(25), 5916–5924.

Neumann, C., Velten, S., & Liebert, F. (2018). N Balance Studies Emphasize the Superior Protein Quality of Pig Diets at High Inclusion Level of Algae Meal (Spirulina platensis) or Insect Meal (Hermetia illucens) when Adequate Amino Acid Supplementation Is Ensured. Animals (Basel), 8(172), doi:10.3390/ani8100172.

Ojha, S., Bußler, S., & Schlüter, O. K. (2020). Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. *Waste Management, 118*, 600–609.

Oonincx, D., & Poel, A. (2011). Effects of Diet on the Chemical Composition of Migratory Locusts (Locusta migratoria). *Zoo Biology, 30*, 9–16.

Pieterse, E., Erasmus, S. W., Uushona, T., & Hoffman, L. C. (2019). Black soldier fly (Hermetia illucens) pre-pupae meal as a dietary protein source for broiler production ensures a tasty chicken with standard meat quality for every pot : Black soldier fly (Hermetia illucens) pre-pupae meal as a dietary protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 99*(2), 893–903.

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. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 54*(23), 8749–8755.

Renna, M., Schiavone, A., Gai, F., Dabbou, S., Lussiana, C., Malfatto, V., … Gasco, L. (2017). Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (Hermetia illucens L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum) diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology, 8*, 57.

Rodrigues, D. B., Chitchumroonchokchai, C., Mariutti, L. R. B., Mercadante, A. Z., & Failla, M. L. (2017). Comparison of Two Static in Vitro Digestion Methods for Screening the Bioaccessibility of Carotenoids in Fruits, Vegetables, and Animal Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 65*(51), 11220–11228.

Roma, R., Palmisano, G. O., & De Boni, A. (2020). Insects as Novel Food: A Consumer Attitude Analysis through the Dominance-Based Rough Set Approach. *Foods, 9*(387). https://doi.org/10.3390/foods9040387.

Ruth Charrondière, U., Stadlmayr, B., Rittenschober, D., Mouille, B., Nilsson, E., Medhammar, E., Olango, T., Eisenwagen, S., Persijn, D., Ebanks, K., Nowak, V., Du, J., & Burlingame, B. (2013). FAO/INFOODS food composition database for biodiversity. *Food Chemistry, 140*(3), 408–412.

Schiavone, A., De Marco, M., Martínez, S., Dabbou, S., Renna, M., Madrid, J., Hernandez, F., Rotolo, L., Costa, P., Gai, F., & Gasco, L. (2017). Nutritional value of a partially defatted and a highly defatted black soldier fly larvae (Hermetia illucens L.) meal for broiler chickens: apparent nutrient digestibility, apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility. Journal of Animal Science and Biotechnology, 8(51), doi: 10.1186/s40104-40017-40181-40105. eCollection 42017.

St-Hilaire, S., Sheppard, C., Tomberlin, J. K., Irving, S., Newton, L., McGuire, M. A., Mosley, E. E., Hardy, R. W., & Sealey, W. (2007). Fly Prepupae as a Feedstuff for Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss. *Journal of the World Aquaculture Society, 38*(1), 59–67.

Tomberlin, J. K., Sheppard, D. C., & Joyce, J. A. (2002). Selected Life-History Traits of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) Reared on Three Artificial Diets. *an, 95*(3), 379–386.

von Lintig, J., & Vogt, K. (2004). Vitamin A formation in animals: molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. J Nutr, 134(1), 251S-256S.

Wang, Y. S., & Shelomi, M. (2017). Review of Black Soldier Fly (Hermetia illucens) as Animal Feed and Human Food. Foods, 6(10), doi: 10.3390/foods6100091.

Xu, Y., Shan, Y., Lin, X., Miao, Q., Lou, L., Wang, Y., & Ye, J. (2021). Global patterns in vision loss burden due to Vitamin A deficiency from 1990 to 2017. *Public Health Nutrition*, 1–29.

Zacour, A. C., Silva, M. E., Cecon, P. R., Bambirra, E. A., & Vieira, E. C. (1992). EFFECT OF DIETARY CHITIN ON CHOLESTEROL ABSORPTION AND METABOLISM IN RATS. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 38(6), 609-613.

Cette étude est la première à évaluer la bioaccumulation de caroténoïdes proVA dans les LMSN à partir de substrats riches en ces micronutriments : les LMSN ne contenaient pas naturellement de β-car, rejoignant les résultats de Finke *et al.* , 2013 (*107*). Dans notre étude, selon le type de substrat utilisé, la concentration d'α-car dans les LMSN variait entre 66% et 72% de celle présente dans les substrats, tandis que pour le β-car, elle oscillait entre 67% et 165% de celle retrouvée dans les substrats.

C'est aussi la première étude à estimer la bioaccessibilité de la VA provenant de LMSN. Ces résultats montrent que la bioaccessibilité de l'α et du β-car issus de LMSN étaient significativement non différentes ou supérieures à celle de ces composés provenant des substrats. Au contraire, la bioaccessibilité de la β-cryptoxanthine était 6 à 10 fois plus faible lorsqu'elle provenait des LMSN que lorsqu'elle provenait des substrats.

De plus, nous avons pu calculer que l'incorporation de la proportion maximale autorisée de LMSN dans l'alimentation animale, que ce soit pour l'élevage des poissons, des porcins ou des volailles, pourrait apporter 100% des valeurs recommandées en VA pour ces animaux. Ainsi, en plus de représenter une alternative durable aux protéines couramment utilisées, les LMSN pourraient être utilisées pour enrichir en proVA l'alimentation des animaux que nous consommons, et ainsi aider à lutter contre la carence en VA.

Il reste cependant à démontrer que la proVA présente dans les larves est biodisponible et convertie en VA *in vivo*, c'est-à-dire retrouvée dans l'organisme et associée à une amélioration du statut vitaminique A après la consommation de ces larves.

Food Research International 171 (2023) 113064

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Bioaccumulated provitamin A in black soldier fly larvae is bioavailable and capable of improving vitamin A status of gerbils

Lisa Morand-Laffargue [a], Stéphane Delbecq [b], Benjamin Creton [c], Damien Sabatier [c], Marie Papin [a], Claudie Dhuique-Mayer [d,e], Patrick Borel [a,*]

[a] C2VN, INRAE, Aix-Marseille Univ, INSERM, Marseille, France
[b] CBS, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France
[c] BioMiMetiC, Avignon, France
[d] QualiSud, Univ Montpellier, Cirad, Institut Agro, Univ Avignon, Univ La Réunion, Montpellier, France
[e] Cirad, UMR QualiSud, F-34398 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:
β-carotene
Insect
Vitamin A deficiency
Hermetia illucens

ABSTRACT

The aim was to study whether provitamin A (proVA), which can bioaccumulate in black soldier fly larvae (BSFL), is bioavailable and can restore VA status in mammals. A model for studying the metabolism of this vitamin, the gerbil, was either fed a standard diet (C+ group), a diet without VA (C-), a diet in which VA was provided by β-carotene (β-C) from sweet potatoes (SP), or a diet in which VA was provided by β-C from BSFL that had been fed sweet potatoes (BSFL). The animals were killed at the end of the supplementation period and β-C, retinol and retinyl esters were measured in plasma and liver. As expected β-C was not detected in plasma and liver of the C+ and C- groups. β-C concentrations were lower ($p < 0.05$) in plasma and liver of the BSFL group as compared to the SP group. Liver retinol and retinyl ester concentrations were lower in the C- group than in all the other groups ($p < 0.05$). These concentrations were not significantly different in the C+ and SP groups while they were lower in the BSFL group ($p < 0.05$ for retinyl oleate and retinyl linoleate). In total, the liver stock of retinol equivalent was almost twice lower in the BSFL group than in the SP group. Thus, β-C present in the BSFL matrix is bioavailable and capable of improving VA status, but this matrix decreases its effectiveness by a factor of around two compared to the sweet potato matrix.

1. Introduction

Vitamin A (VA) deficiency remains a public health problem in many countries (Sahile et al., 2020; Wolde & Tessema, 2023; Xu et al., 2021), although the richest sources of this vitamin are well known. We also know very well the needs of different groups of the population and we have a lot of data on the factors that influence its bioavailability, in particular that of proVA carotenoids (Bohn et al., 2017; Desmarchelier & Borel, 2017). Finally, we have at our disposal several strategies to combat this deficiency (Bruins & Kraemer, 2013) such as regular supplementation with high doses of VA, or nutritional recommendations aimed at increasing the consumption of local foods richest in this vitamin, such as orange sweet potato (Bechoff & Dhuique-Mayer, 2017; Mulwa, Heck, Maru, Mwema, & Campos, 2022).

The different strategies used to tackle deficiency, although complementary and chosen according to the socio-economic and/or cultural context of the country where the deficiency is rife, are clearly not sufficient. Indeed, the deficiency is still present in many countries (Mason, Greiner, Shrimpton, Sanders, & Yukich, 2015). It is also very likely that this deficiency will increase in the decades to come due to population growth, which will be particularly strong in many countries where this deficiency is already rife, and the scarcity of food resources of VA, due to the climate change and its consequences on agricultural yields (Semba, Askari, Gibson, Bloem, & Kraemer, 2022).

In this context, it is relevant to seek new sources of VA that are sustainable and that can be consumed by populations in which this deficiency still prevails. We recently showed that the black soldier fly (*Hermetia Illucens*), and probably other edible insects, could be a

Abbreviations: BSFL, black soldier fly larvae; VA, vitamin A; β-C, β-carotene.

* Corresponding author at: UMR C2VN "Center for CardioVascular and Nutrition Research of Marseille", Faculté de Médecine, 27, boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France.
E-mail address: Patrick.Borel@univ-amu.fr (P. Borel).

https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113064
Received 8 March 2023; Received in revised form 25 May 2023; Accepted 26 May 2023
Available online 8 June 2023
0963-9969/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

significant source of proVA carotenoids if its larvae feed on a substrate rich in these micronutrients (Borel et al., 2021a). This new source of VA would have the double advantage of providing energy and quality protein to malnourished populations (Baiano, 2020; Dicke, 2018; Jantzen da Silva Lucas, Menegon de Oliveira, da Rocha, & Prentice, 2020), and make it possible to recover plant waste, and recycle energy and VA which is irretrievably lost in this waste (Ojha, Bussler, & Schluter, 2020).

Nevertheless, although we demonstrated that these larvae can become a significant source of proVA, and that this provitamin has a bioaccessibility equivalent to that of the usual plant sources of proVA (Borel et al., 2021a)), it remained to be demonstrated that this provitamin is truly bioavailable *in vivo*, i.e. that it is indeed found in the bloodstream after the assimilation of the insect matrix enriched in proVA. Indeed, it cannot be excluded that the insect matrix contains one or more factors that could inhibit the intestinal uptake of this micronutrient. It also remained to be demonstrated that the proVA provided in the insect matrix can be effectively converted into VA in the body. Again, it must be verified that the insect matrix does not provide an inhibitor of the main enzyme for converting proVA into VA in mammals, i.e. BCO1 (Amengual et al., 2013; Lobo, Amengual, Palczewski, Babino, & von Lintig, 2012).

The purpose of this study was therefore both to compare the bioavailability of proVA when it was provided by an insect matrix or by a plant matrix naturally rich in proVA, and to compare the ability of these two matrices to restore the status in VA from a laboratory animal which is often used as a model for studying the metabolism of this vitamin, the gerbil (Lee, Lederman, Hofmann, & Erdman, 1998, Pollack, Campbell, Potter, & Erdman, 1994).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Solvents used for HPLC (ethanol, *n*-hexane, dichloromethane, methyl-*tert*-butyl-ether, methanol and acetonitrile) were purchased from Carlo Erba reagents (Peypin, France). Retinol, retinyl palmitate, β-carotene (β-C) (HPLC purity > 95%), β-apo-8′-carotenal and α-tocopherol acetate were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.2. BSFL farming

BSFL were reared on chopped sweet potatoes. The rearing protocol was performed by BioMiMetiC in Avignon, France. The rearing procedure was conducted as previously described (Borel et al., 2021a)). To obtain 1 kg of larvae reared on sweet potatoes, approximately 200 mg of eggs were sowed on the substrate. Considering this desired quantity of BSFL and the relative humidity of the food substrates, the amount of substrate required was estimated to be approximately 20 kg of sweet potatoes, which were coarsely cut. Briefly, the rearing procedure was as follows: firstly, after collecting the eggs, the substrate was prepared with hatching devices placed on top of the substrate, already cut, and placed in a rearing room for 14 days at 29 ± 1 °C and 65 ± 5% relative humidity. At the end of this period, larvae were isolated from their food substrates by sieving (2 × 2 mm) and washed using tap water. Finally, the larvae were filtered again through a sieve (2 × 2 mm) and dried using absorbent paper before being frozen at −80 °C.

2.3. Animals, diets and study design

2.3.1. Animals

Male Mongolian SPF gerbils (n = 29), 7 weeks old, were obtained from Janvier (S[t] Berthevin, France). Animals were housed four by four or three by three in plexiglass cages (enriched with wood or cardboard toys) at 22 ± 1 °C, subjected to a 12 h light/dark cycle and free access to food and water. Animals and food were weighed three times a week. Animals were handled in compliance with European Union rules and according to the guidelines of the National Institute of Health and the Committee for Animal Care at the University of Montpellier (France). The project authorization by the Ethics committee has been approved in April 2022 (referral number: 1930–35390).

2.3.2. Diets

Four different diets were used in this study. The first one was the standard diet of these animals, i.e. standard diet A04 (Specific rodent diet) (SAFE: Scientific Animal Food and Engineering; Augy, France), a positive control group called C +. The second diet, also manufactured by SAFE, was the same standard diet but it did not contain VA and proVA. It was called the negative control group (C-). The third diet was the VA deficient diet to which sweet potatoes were added as a source of proVA. It was called the Sweet Potato diet (SP). The fourth diet was the VA deficient diet to which BSFL rich in proVA were added. It was called the BSFL diet (BSFL).

The incorporation of sweet potatoes and insect larvae into the SP and BSFL diets respectively was carried out as follows: boiled sweet potatoes and larvae were freeze-dried during 72 h by a high vacuum line (Christ bioblock scientific, Rungis, France), before being crushed with a mortar. The incorporation of freeze-dried sweet potato in extruded diet was done by society SAFE while the incorporation of insects was done by the galenic service of Faculty of Pharmacy (Montpellier). The apparatus for simulation of compression was the Medelpharm model, Stylone Evolution Lyon. β-C concentrations in the VA deficient diet supplemented with SP or BSFL were 19.4 ± 2.5 and 19.5 ± 4 mg/kg, respectively and were thus non-significantly different. It is important to specify that we chose these concentrations of β-C, and therefore the proportions of sweet potato and BSFL incorporated into the kibbles, so as to provide quantities of proVA that allow its good detection in the tissues of the gerbils (Poulaert et al., 2014).

2.3.3. Study design (Fig. 1)

During the acclimatization period (4 d) the gerbils were fed with the standard diet. Then, 23 of the 29 gerbils were subjected to the C- diet for 5 weeks. The 6 remaining gerbils consumed the C + diet during the same 5-week period. The 23 gerbils depleted of VA were randomly divided into 3 groups for the experimental diet period (3 weeks). One group (n = 7) continued to consume the VA depleted diet (C- group). One group (n = 8) consumed the C + diet supplemented with 6.6% freeze-dried orange-fleshed sweet potatoes (SP group). One group (n = 8) consumed the VA depleted diet supplemented with 10% freeze-dried black soldier fly larvae (BSFL group). Finally, the 6 gerbils that had consumed the standard diet during the first 5-week period continued to consume this standard diet during the experimental diet period (C + group). At the end of the experimental period, the gerbils were deprived of food overnight. Prior to sample collection, the animals were placed under deep general anaesthesia by intraperitoneal injection of Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg) supplied by the animal manager according the drug regulations (cf. referral document cited above). Fasting blood samples were collected by cardiac puncture before euthanasia which was performed by taking an intracardiac blood sample. Blood samples were centrifuged at 2200 g for 10 min to collect plasma which was stored at −80 °C until analysis. Liver was collected and weighted after being washed with ice-cold saline solution (0.9% NaCl, w/v) and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until analysis.

2.4. Extraction procedure for β-C and retinoids to allow their quantification by HPLC

2.4.1. Kibbles containing insects rich in β-C or sweet potatoes

β-C extraction from kibbles, carried out according to Poulaert et al. (Poulaert et al., 2014) has been optimized for insect kibbles. Briefly, 0.5

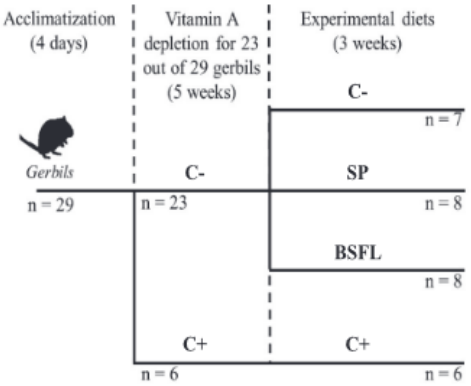


Fig. 1. Diagram of the nutritional intervention on gerbils. C-: VA deficient diet, SP: sweet potato diet providing VA as β-C, BSFL: diet containing BSFL that were fed with sweet potatoes and that had bioaccumulated β-C,C+: standard VA diet.

g of grounded kibbles were mixed with 4 mL of water and 300 µL of ethanol containing β-apo-8′-carotenal as internal standard (stock solution at around 50 µM). Then a volume of hexane was added respecting the ratio hexane/ethanol (700/400; v/v). The mixture was stirred vigorously then the hexane phase was recovered. A second addition of hexane was made and the procedure repeated. The two hexane phases were pooled and the solvent was evaporated under nitrogen. The dry residue was dissolved in 500 µL of dichloromethane and 500 µL of methyl-*tert*-butyl-ether (MTBE)/methanol mixture (4:1, v/v) in an amber vial before injection in HPLC.

2.4.2. Liver and plasma β-C and retinoids

One hundred mg of gerbil livers were suspended in 1 mL of PBS, ground 5 min at 30 rotations/min using two 1 mm-diameter and one 3 mm-diameter stainless steel balls in 2 mL Eppendorf tubes with a MM301 ball mill (Retsch, Eragny sur Oise, France). For their extraction, 500 µL of hepatic samples and 500 µL of a solution containing approximatively 5 ng/µL of α-tocopherol acetate as internal standard were used. Concerning the plasma samples, 400 µL were used. The volume was adjusted to 500 µL with distilled water. Then, 500 µL of the internal standard solution were added. The rest of the extraction procedure is identical to that described previously (Borel et al., 2022).

2.4.3. Quantification of β-C and retinoids by HPLC

Dry extracts of liver and plasma samples were solubilized in 200 µL of acetonitrile/dichloromethane/methanol (70/20/10, v/v/v) and injected into the HPLC system. Injection volumes were established after a first injection and adjusted to obtain signals in the calibration range. Thus, 50 µL of resolubilized kibbles samples, 25 µL of resolubilized hepatic samples and 180 µL of resolubilized blood samples were injected into the HPLC system. The HPLC system and method used (column, mobile phase, flow rate, detection method and spectral analysis software) were the same as previously described (Borel et al., 2022; Borel et al., 2021b)). Retinol, β-C and retinyl palmitate were identified by retention times and absorption spectra coincident with authentic standards. Retinyl linoleate, retinyl oleate and retinyl stearate were identified by spectral analysis and quantified regarding their molar extinction coefficient ratio compared to retinyl palmitate. Chromatograms obtained for a sample of gerbil livers (group SP) are available in the **supplemental figure**.

2.5. Calculation of the conversion rate of β-C into VA

This conversion rate was estimated by calculating the percentage of VA that is found in the form of retinoids (retinol plus retinyl esters) in the liver compared to the total quantity of VA found in the liver, i.e. the sum of retinoids plus that of β-C. This calculation was made by converting each retinoid and β-C into retinol equivalents, i.e. 1 mol of retinyl ester = 1 mol of retinol and 1 mol of β-C = 2 mol of retinol.

2.6. Calculation of bioconversion factors

The bioconversion factors were based on the ratio of total quantity of β-C ingested on total liver retinoid in treatment groups, i.e. SP and BSFL groups, corrected by the negative control group, i.e. the C- group.

2.7. Statistics

Results in the text are expressed as means ± SEM, but note that we have shown the distribution of the data as box plots in the figures to provide additional informations about the symmetry, variance, and potential outliers of the data. Differences between diets for each retinoid or β-C were tested using either one-way ANOVA or Student's *t*-test. The homogeneity of variances ($p > 0.05$) were checked by Levene's test. For ANOVA, in case of heterogeneity of variances, data were log-transformed and for student's test, Welch's correction was applied. Q-Q plots of standardized residuals were used to assess the normality of the data. For ANOVA, when a significant effect was detected, post-hoc Tukey-Kramer tests were used to compare means from the different groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using R version 4.1.1 for Windows.

3. Results

3.1. Food consumption and growth performance.

The daily consumption of gerbils varied from 5.09 ± 0.44 to 5.79 ± 0.59 g kibbles/gerbil (Table 1). Only the gerbils belonging to the SP group had a significant lower consumption but these animals also presented lower body weight and their low consumption were equally noted in depletion phase where gerbils were fed with the same standard diet. The gerbils gained weight during the entire study. The final body weights were homogenous and ranged from 79.86 ± 6.34 g to 84.66 ± 5.87 g. Liver weights were also non-significantly different and varied from 1.9 ± 0.3 to 3.1 ± 0.2 g (data not shown). The experimental protocol did not induce severe changes in food consumption and growth performance.

3.2. Plasma retinol and β-C concentrations

The concentration of retinol in the plasma of gerbils fed with the C-

Table 1
Growth performance and food consumption of the gerbils.

	Experimental diets			
	C-	C+	SP	BSFL
Body weight (g):				
Initial	65.7 ± 6.2	69.3 ± 3.4	67.3 ± 4.3	67.0 ± 1.4
After 60 days	80.0 ± 6.0	83.5 ± 5.4	79.9 ± 6.3	85.0 ± 5.9
**Weight gain (g):*				
After 60 days	14.3 ± 3.9	14.3 ± 5.8	12.5 ± 4.3	17.7 ± 6.0
Food consumption (g/day/gerbil):	5.5 ± 0.5^a	5.7 ± 0.4^a	5.1 ± 0.4^b	5.8 ± 0.6^a

C-: VA deficient diet, C+: standard VA diet, SP: sweet potato diet providing VA as β-C, BSFL: diet containing BSFL that were fed with sweet potatoes and that had bioaccumulated β-C. Values are means ± SEM. N = 7 for the C- group, n = 8 for the BSFL and SP groups, and n = 6 for the C + group. The different groups were compared with each other for each variable with an ANOVA followed by Tukey's HSD test. Means that have different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

(0.77 ± 0.04 μmol/L), BSFL(0.89 ± 0.07 μmol/L), SP (0.83 ± 0.05 μmol/L), or C+ (0.85 ± 0.05 μmol/L) diet did not differ significantly ($p = 0.59$) (Fig. 2**A**). Conversely, the concentrations of β-C in the plasma of gerbils fed with BSFL (0.002 ± 0.0005 μmol/L) and SP (0.02 ± 0.003 μmol/L) diet differed significantly ($p < 0.01$) and there was no detectable β-C in the plasma of the C- and C + groups (Fig. 2**B**).

3.3. Liver retinoids and β-C concentrations

Fig. 3 shows the main chemical species of VA found in the gerbil liver, i.e. retinyl esters, retinol and β-C. It also shows the total VA concentration, i.e. the sum of the VA species expressed in equivalent moles of retinol. The concentration of retinyl esters in gerbil livers did not differ ($p = 1.0$) between SP (0.57 ± 0.06 μmol/g) and C+ (0.55 ± 0.03 μmol/g) diets (Fig. 3**A**). However, the retinyl ester concentration in the livers of C- fed gerbils (0.14 ± 0.01 μmol/g) differed significantly ($p < 0.001$) from that of the other diets, including BSFL-fed gerbils (0.34 ± 0.03 μmol/g). For retinol (Fig. 3**B**), livers from gerbils fed BSFL (0.02 ± 0.001 μmol/g), SP (0.02 ± 0.002 μmol/g) and C+ (0.02 ± 0.001 μmol/g) diets had concentrations that did not differ ($p > 0.4$) but did differ ($p < 0.01$) from those of gerbils fed C- diet (0.009 ± 0.001 μmol/g). β-C was found in the livers of only gerbils consuming sweet potatoes (0.03 ± 0.004 μmol/g) and BSFL (0.005 ± 0.0006 μmol/g) (Fig. 3**C**), furthermore their concentrations differed significantly ($p < 0.001$). Finally, the total liver retinoid concentrations of gerbil fed with the SP (0.66 ± 0.07 μmol/g) and C+ (0.57 ± 0.03 μmol/g) diets did not differ ($p = 0.87$) but differed from the BSFL (0.37 ± 0.03 μmol/g) and C- (0.15 ± 0.01 μmol/g) groups (Fig. 3**D**).

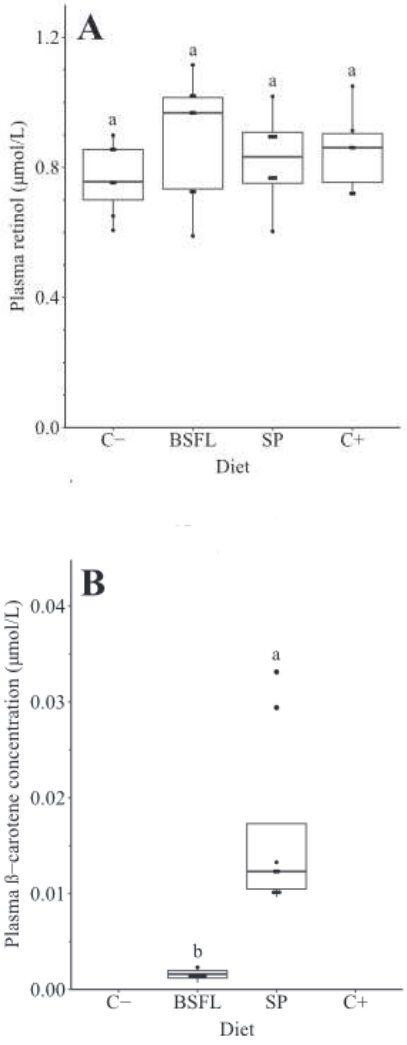


Fig. 2. Plasma retinol (A) and plasma β-C (B) concentrations (μmol/L) of gerbils fed diets containing different sources and concentrations of VA. C-: VA deficient diet, SP: sweet potato diet providing VA as β-C, BSFL: diet containing BSFL that were fed with sweet potatoes and that had bioaccumulated β-C, C+: standard VA diet. For each compound, bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$; Student *t*-test or ANOVA followed by Tukey's HSD test). N = 7 (C- group), n = 8 (BSFL and SP group) and n = 6 (C + group).

Fig. 4 shows the concentrations of the main retinyl esters found in the livers. The main retinyl ester was retinyl palmitate followed by retinyl oleate. The concentration of retinyl palmitate in the livers of gerbils fed the BSFL (0.25 ± 0.02 μmol/g), SP (0.34 ± 0.04 μmol/g), and C+ (0.34 ± 0.02 μmol/g) diets did not differ significantly ($p > 0.1$) (Fig. 4**A**). Conversely it was significantly lower in gerbils fed the C- diet (0.08 ± 0.01 μmol/g; $p < 0.001$). Concerning retinyl oleate (Fig. 4**B**), its liver concentration in gerbils fed the C-(0.03 ± 0.003 μmol/g) and BSFL (0.04 ± 0.004 μmol/g) diets were significantly lower ($p < 0.001$) than those of gerbils fed the SP (0.12 ± 0.01 μmol/g) and C+ (0.11 ± 0.01 μmol/g) diets, which were not significantly different. The concentrations of retinyl stearate (Fig. 4**C**) in the livers of gerbils that had the BSFL (0.04 ± 0.003 μmol/g), SP (0.05 ± 0.005 μmol/g), and C+ diets (0.05 ± 0.004 μmol/g), were not significantly different ($p > 0.1$) but were significantly higher ($p < 0.001$) than that of the C- diet (0.01 ± 0.001 μmol/g). The liver concentrations of retinyl linoleate (Fig. 4**D**) in the C+ (0.04 ± 0.003 μmol/g) and SP (0.04 ± 0.005 μmol/g) diets did not significantly differ ($p = 1$) but were significantly ($p < 0.001$) higher than those of the two other groups. Finally, the retinyl linoleate concentration in the BSFL group (0.02 ± 0.001 μmol/g) was significantly higher than that in the C- group (0.01 ± 0.001 μmol/g).

3.4. Comparison of β-C conversion rate when it was provided by SP or BSFL

The conversion rates were 88.0 ± 0.9 % and 97.5 ± 0.3 % for SP and BSFL diets, respectively (data not shown). These means were significantly different ($p < 0.001$).

3.5. Bioconversion factors

The bioconversion factor was 3.5 μg β-C equivalent to 1 μg of retinol for SP group and was higher for the BSFL group with a value of 7.

4. Discussion

The nutritional intervention was designed to investigate the ability of proVA-enriched BSFLs to restore VA status. We included two control groups: one with a standard VA diet (C+), which provide the amount of VA needed for this animal species, and one with a VA deficient diet (C-) to assess the ability of the two diets that provided VA only as β-C, i.e. the SP and the BSFL diets, to restore the VA status. Note that we adjusted the quantities of sweet potatoes and larvae that were incorporated into the kibbles in order to compare the bioavailability of this proVA according to the matrix in which it was provided, i.e. sweet potatoes or larvae, for the same quantity of β-C provided in the diet. Nevertheless, we found that the SP gerbils consumed significantly less food, and therefore β-C, than the BSFL ones (Table 1), which must be considered when interpreting the results.

The measurement of retinol, retinyl-ester and β-C concentrations in the blood and the liver, which is by far the main storage organ for VA (Borel & Desmarchelier, 2017), gives both an indication of the quantity of VA, or proVA, which was absorbed from the diets, but it also gives a precise indication of the VA status of the animals, the concentration of VA in the liver being considered as the best marker of the VA status (Borel & Desmarchelier, 2017). Finally, it gives an idea of the conversion

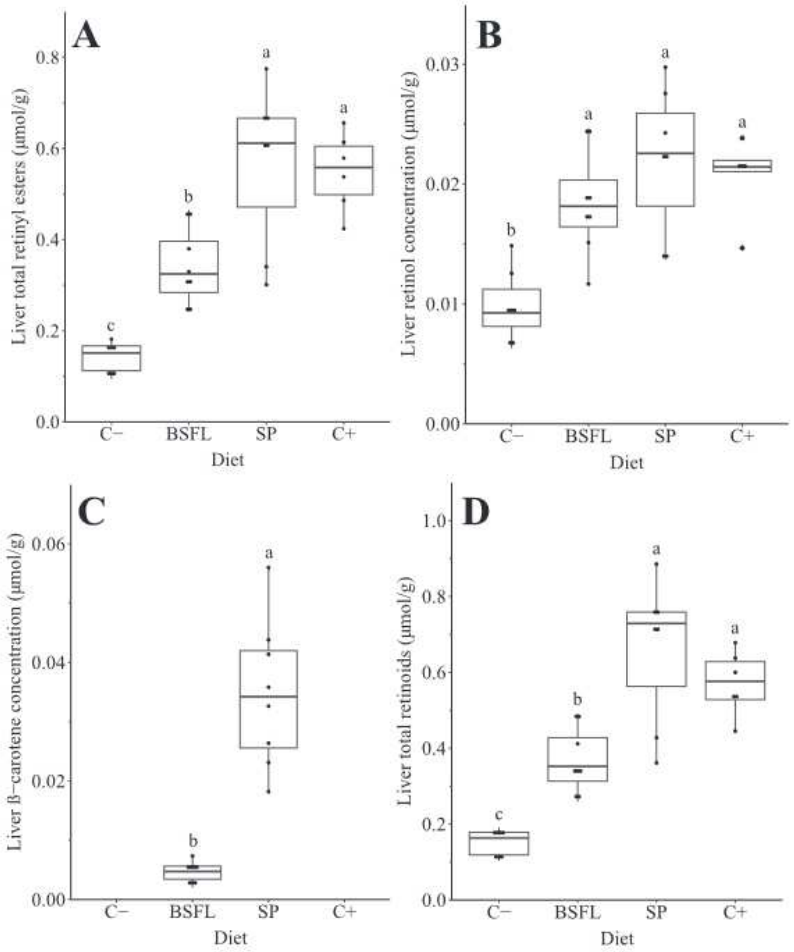


Fig. 3. Liver VA concentrations (µmol/g liver) of gerbils fed diets containing different sources and concentrations of VA. **A:** sum of retinyl esters, **B:** retinol, **C:** β-C, **D:** total retinoids, i.e. sum of retinol equivalents. C-: VA deficient diet, SP: sweet potato diet providing VA as β-C, BSFL: diet containing BSFL that were fed with sweet potatoes and that had bio-accumulated β-C, C+: standard VA diet. For each compound, bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$; Student *t*-test or ANOVA followed by Tukey's HSD test). N = 7 (C- group), n = 8 (BSFL and SP group) and n = 6 (C + group).

rate of β-C in VA by calculating the β-C/(retinol + retinyl-esters + β-C) ratio when the only dietary source of VA is β-C (Borel et al., 2021b). The discussion will therefore consist in interpreting the data obtained in the plasma then in the liver and then in making a synthesis of these observations.

The fact that plasma retinol concentrations were not significantly different between the C+, SP and BSFL groups was not very surprising. Indeed, there was VA or proVA in the diet of all these groups and it is well established that serum retinol is very well regulated and only begins to decline when hepatic VA stores are nearly depleted (Borel et al., 2021b). Thus the fact that plasma retinol concentrations were not significantly lower in the C- group, as compared to the other groups, simply shows that this group was not deficient enough to affect hepatic retinol secretion and hence retinolemia (Borel et al., 2022; Borel et al., 2021b).

With regard to plasma β-C, the first observation is that there was none detectable in the plasma of the C+ and C− groups. This is exactly what was expected since these two diets did not contain this provitamin which is not synthesized by mammals. Concerning the two other groups, the fact that plasma β-C concentration was significantly lower in the BSFL group than in the SP group can be explained by two mechanisms. The first that comes to mind is a lower absorption efficiency of the β-C present in the BSFL matrix than in the sweet potato matrix. Nevertheless, we have shown in a previous study that the bioaccessibility, i.e. the rate of incorporation of β-C in the mixed micelles, was equivalent between these two matrices (Borel et al., 2021a). If there is a difference in absorption efficiency then it may be due to a difference in uptake efficiency by the intestinal cells, but we have no hypothesis that could support this mechanism. The second mechanism that could explain the lower plasma β-C concentration in the BSFL group, as compared to the SP one, may be a difference in the efficiency of intestinal conversion of β-C to VA, with gerbils fed the BSFL diet having a higher β-C conversion efficiency than those fed the SP diet. This hypothesis is supported by the result of the calculation of the β-C conversion efficiency which showed that gerbils fed the BSFL diet had a conversion factor twice as high as those fed the SP diet. We suggest that this was because the amount of β-C absorbed was markedly lower in the gerbils of the BSFL group than in those of the SP group. Indeed, a lower β-C absorption efficiency will lead to a lower VA status in the long term and it has been established that the decrease in VA status increases in the expression of *BCO1* via ISX (Lobo et al., 2013). The increase in the activity of BCO1 at the intestinal level will result in a lower secretion of β-C in the blood and therefore reduce its plasma concentration.

Concerning liver VA, the first key observation is that the C- gerbils had significantly lower concentrations of retinyl esters and retinol than the other groups, and they had no β-C in the liver. This is very reassuring because it shows that the experiment worked very well because we expected to have a lower VA status in this group and not to detect β-C.

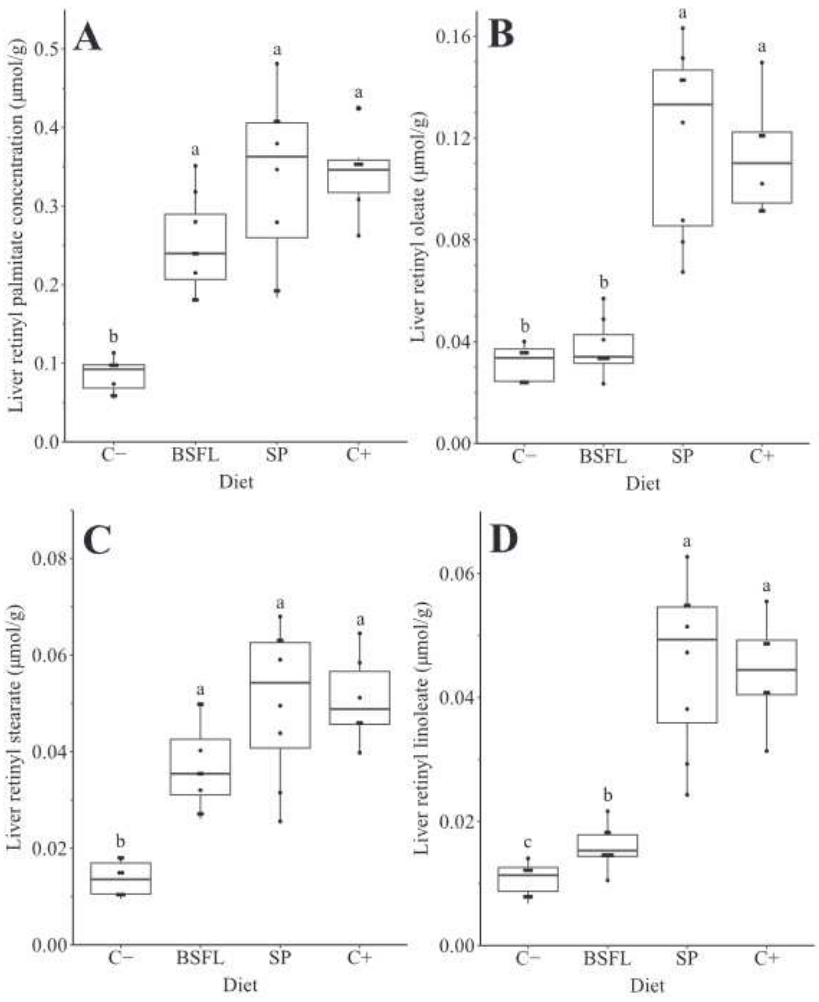


Fig. 4. Concentrations (µmol/g liver) of the main retinyl esters in livers of gerbils fed diets containing different sources and concentrations of VA. A: retinyl palmitate, **B:** retinyl oleate, **C:** retinyl stearate, **D:** retinyl linoleate. **C-:** VA deficient diet, **SP:** sweet potato diet providing VA as β-C, **BSFL:** diet containing BSFL that were fed with sweet potatoes and that had bioaccumulated β-C, **C+:** standard VA diet. For each compound, bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$; Student *t*-test or ANOVA followed by Tukey's HSD test). N = 7 (C group), n = 8 (BSFL and SP group) and n = 6 (C + group).

Concerning the SP gerbils, their liver retinyl esters and retinol concentrations were not significantly different from those of the C+ gerbils, which means that the amount of β-C present in the SP, and which was the only source of VA in this diet, was perfectly able to restore the VA status in this group of gerbils who had previously been VA deficient. The results of the BSFL group are more complex to interpret. They first show that the concentrations of retinol and of the various retinyl esters in the liver of these gerbils were always lower than those observed in the SP and C+ groups, sometimes this was significant, sometimes not. These results also show that the concentration of β-C in the liver was significantly lower in the BSFL group than in the SP group. It can therefore be concluded that the VA status was lower in the BSFL group than in the SP group. More precisely, the total amount of VA present in the liver, which was estimated in retinol equivalent concentration, was significantly lower, by a factor of approximately 2, in the liver of the BSFL group as compared to the SP group. We thus concluded that the capacity of the BSFL matrix enriched in β-C to improve the VA status was half that of the sweet potato matrix. The most likely hypothesis to explain this difference, while the gerbils of the BSFL group have consumed more β-C than the gerbils of the SP group (Table 1), is that β-C present in the insect matrix was less bioavailable than that of the SP matrix. This seems very surprising at first since the insect matrix provided more lipids than the sweet potato matrix and it has been shown that lipids improve the bioavailability of β-C (Jayarajan, Reddy, & Mohanram, 1980; Mokady & Benamotz, 1991). Nevertheless, it seems that a minimal quantity of lipids is necessary to have a good bioavailability of β-C but that higher quantities of lipids do not improve the bioavailability any more (Ribaya-Mercado et al., 2007; Roodenburg, Leenen, Hof, Weststrate, & Tijburg, 2000). Thus, knowing that the basal diet of gerbils already contained lipids, the additional lipids provided by the insect matrix therefore probably did not have a positive effect on the bioavailability of β-C. On the other hand, it is clear that a component of the insect matrix partially impaired the bioavailability of β-C. The first component that comes to mind is chitin since this polysaccharide, which is part of the composition of the exoskeleton of insects, behaves like vegetable dietary fiber in the digestive tract, and it has been observed that dietary fiber inhibits the bioavailability of β-C (Erdman & Fahey, 1986; Riedl, Linseisen, Hoffmann, & Wolfram, 1999; Zanutto, Jordao Junior, Meirelles, Favaro, & Vannucchi, 2002). Nevertheless, no study is available on the effect of chitin on β-C bioavailability. Thus, further experiments must be performed to verify this hypothesis.

In conclusion, this study shows for the first time that the β-C which is present in BSFL is bioavailable and readily converted into VA in the organism. It can therefore be concluded that BSFL enriched in proVA could be a significant source of VA for farm animals and indirectly for humans. Nevertheless, the fact that the bioavailability of β-C from BSFL was at least twice lower than that of β-C present in orange sweet potatoes, if it were to be confirmed in other studies carried out on other

animal models and possibly on humans, should be considered to calculate the quantities of VA provided by this new sustainable source of proVA.

CRediT authorship contribution statement

Lisa Morand-Laffargue: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Writing - original draft. **Stéphane Delbecq:** Methodology. **Benjamin Creton:** Methodology. **Damien Sabatier:** Writing - review & editing. **Marie Papin:** Writing - review & editing. **Claudie Dhuique-Mayer:** Data curation, Funding acquisition, Investigation, Writing - review & editing. **Patrick Borel:** Conceptualization, Formal analysis, Project administration, Supervision, Validation, Writing - original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: BC and DS work in the BioMiMetiC company. This company conducts research and development activities aimed at enhancing the value of insect-based bioconversion of a wide variety of organic materials generated in the area at all levels of the food value chain.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors thank Adrien Aubert (Technical support - Laboratoire de Pharmacie Galénique et Génie Pharmaceutique-ICGM UMR5253 - D1 Chimie et Matériaux Moléculaires) for incorporation of insect larvae in kibbles.

For the purpose of Open Access, a CC-BY public copyright licence (Creative Commons — Attribution 4.0 International — CC BY 4.0) has been applied by the authors to the present document and will be applied to all subsequent versions up to the Author Accepted Manuscript arising from this submission.

.

Appendix A. Supplementary data

The costs of this project were covered equally by the own budget of P. Borel's research team, which came mainly from INRAE endowments, by Cirad C. Dhuique-Mayer'research and by the BioMiMetiC company. Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113064.

References

Amengual, J., Widjaja-Adhi, M. A., Rodriguez-Santiago, S., Hessel, S., Golczak, M., Palczewski, K., & von Lintig, J. (2013). Two carotenoid oxygenases contribute to mammalian provitamin A metabolism. *Journal of Biological Chemistry, 288*(47), 34081–34096.

Baiano, A. (2020). Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. *Trends in Food Science & Technology, 100*, 35–50.

Bechoff, A., & Dhuique-Mayer, C. (2017). Factors influencing micronutrient bioavailability in biofortified crops. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1390*(1), 74–87.

Bohn, T., Desmarchelier, C., Dragsted, L. O., Nielsen, C. S., Stahl, W., Ruhl, R., … Borel, P. (2017). Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Molecular Nutrition & Food Research, 61*(6), 1600685.

Borel, P., & Desmarchelier, C. (2017). Genetic Variations Associated with Vitamin A Status and Vitamin A Bioavailability. *Nutrients, 9* (3), 246. doi: 210.3390/nu9030246.

Borel, P., Hammaz, F., Morand-Laffargue, L., Creton, B., Halimi, C., Sabatier, D., & Desmarchelier, C. (2021a). Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste as a sustainable dietary source of provitamin a carotenoids. *Food Chemistry, 359*, Article 129911.

Borel, P., Troadec, R., Damiani, M., Halimi, C., Nowicki, M., Guichard, P., … Desmarchelier, C. (2022). Vitamin A deficiency during the perinatal period induces changes in vitamin A metabolism in the offspring. The regulation of intestinal vitamin A metabolism via ISX occurs only in male rats severely vitamin A-deficient. *European Journal of Nutrition*.

Borel, P., Troadec, R., Damiani, M., Halimi, C., Nowicki, M., Guichard, P., … Landrier, J. F. (2021b). β-Carotene bioavailability and conversion efficiency are significantly affected by the sex of rats. First observation suggesting a possible hormetic regulation of vitamin A metabolism in female rats. *Molecular Nutrition & Food Research, 65*(22), e2100650.

Bruins, M., & Kraemer, K. (2013). Public health programmes for vitamin A deficiency control. *Community Eye Health, 26*(84), 69–70.

Desmarchelier, C., & Borel, P. (2017). Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends in Food Science & Technology, 69*, 270–280.

Dicke, M. (2018). Insects as feed and the Sustainable Development Goals. *Journal of Insects as Food and Feed, 4*(3), 147–156.

Erdman, J. W., & Fahey, G. C. (1986). Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick. *Journal of Nutrition, 116*, 2415.

da Silva, J., Lucas, A., Menegon de Oliveira, L., da Rocha, M., & Prentice, C. (2020). Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry, 311*, Article 126022.

Jayarajan, P., Reddy, V., & Mohanram, M. (1980). Effect of dietary fat on absorption of β-carotene from green leafy vegetables in children. *Indian Journal of Medical Research, 71*, 53–56.

Lee, C. M., Lederman, J. D., Hofmann, N. E., & Erdman, J. W. (1998). The Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) is an appropriate animal model for evaluation of the conversion of beta-carotene to vitamin A. *Journal of Nutrition, 128*, 280-286 AF JW ErdmanUniv IllinoisDept Food Sci & Human NutrUrbana, IL 61801 USA.

Lobo, G. P., Amengual, J., Baus, D., Shivdasani, R. A., Taylor, D., & von Lintig, J. (2013). Genetics and diet regulate vitamin A production via the homeobox transcription factor ISX. *Journal of Biological Chemistry, 288*, 9017–9027.

Lobo, G. P., Amengual, J., Palczewski, G., Babino, D., & von Lintig, J. (2012). Mammalian carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta, 1821*(1), 78–87.

Mason, J., Greiner, T., Shrimpton, R., Sanders, D., & Yukich, J. (2015). Vitamin A policies need rethinking. *International Journal of Epidemiology, 44*(1), 283–292.

Mokady, S., & Benamotz, A. (1991). Dietary lipid level and the availability of beta-Carotene of dunaliella-bardawil in rats. *Nutrition and Cancer, 15*, 47–52.

Mulwa, C. K., Heck, S., Maru, J., Mwema, J., & Campos, H. (2022). Effect of nutrition awareness on utilization of Orange Fleshed Sweetpotato among vulnerable populations in Kenya. *Food Secur*, 1–13.

Ojha, S., Bussler, S., & Schluter, O. K. (2020). Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. *Waste Management, 118*, 600–609.

Pollack, J., Campbell, J. M., Potter, S. M., & Erdman, J. W. (1994). Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus) absorb beta-carotene intact from test meal. *Journal of Nutrition, 124*, 869-873 AF JW ErdmanUniv IllinoisDiv Nutr SciUrbana, IL 61801 USA.

Poulaert, M., Gunata, Z., During, A., Reboul, E., Laurent, C., Gaillet, S., & Dhuique-Mayer, C. (2014). Hesperidin increases intestinal beta, beta-carotene 15–15' monooxygenase 1 (BCMO1) activity in Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus) fed with beta-carotene-free diet. *Food Chemistry, 159*, 477–485.

Ribaya-Mercado, J. D., Maramag, C. C., Tengco, L. W., Dolnikowski, G. G., Blumberg, J. B., & Solon, F. S. (2007). Carotene-rich plant foods ingested with minimal dietary fat enhance the total-body vitamin A pool size in Filipino schoolchildren as assessed by stable-isotope-dilution methodology. *American Journal of Clinical Nutrition, 85*(4), 1041–1049.

Riedl, J., Linseisen, J., Hoffmann, J., & Wolfram, G. (1999). Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *Journal of Nutrition, 129*(12), 2170–2176.

Roodenburg, A. J. C., Leenen, R., Hof, K. H. V., Weststrate, J. A., & Tijburg, L. B. M. (2000). Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *American Journal of Clinical Nutrition, 71*(5), 1187–1193.

Sahile, Z., Yilma, D., Tezera, R., Bezu, T., Haileselassie, W., Seifu, B., & Ali, J. H. (2020). Prevalence of Vitamin A Deficiency among Preschool Children in Ethiopia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Research International, 2020*, 1–12.

Semba, R. D., Askari, S., Gibson, S., Bloem, M. W., & Kraemer, K. (2022). The Potential Impact of Climate Change on the Micronutrient-Rich Food Supply. *Advances in Nutrition, 13*(1), 80–100.

Wolde, M., & Tessema, Z. T. (2023). Determinants of good vitamin A consumption in the 12 East Africa Countries using recent Demographic and health survey. *PLoS One1, 18* (2), e0281681.

Xu, Y., Shan, Y., Lin, X., Miao, Q., Lou, L., Wang, Y., & Ye, J. (2021). Global patterns in vision loss burden due to Vitamin A deficiency from 1990 to 2017. *Public Health Nutrition*, 1–29.

Zanutto, M. E., Jordao Junior, A. A., Meirelles, M. S., Favaro, R. M., & Vannucchi, H. (2002). Effect of citric pectin on beta-carotene bioavailability in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 72*(4), 199–203.

Cette étude *in vivo* complète l'étude *in vitro* précédente et fournit plusieurs informations importantes : après avoir appauvri le régime alimentaire de gerbilles en VA pendant 5 semaines, (i) un régime alimentaire à base de LMSN enrichies en β-car comme seule source de VA permet de détecter du β-car dans le sang et le foie des animaux, ce qui montre que le β-car des larves est bien biodisponible *in vivo*, (ii) ce régime permet d'augmenter significativement les concentrations de VA dans le foie par rapport au régime déficient en VA, ce qui montre que le β-car des larves est converti en VA et pourrait restaurer un statut déficient en cette vitamine, (iii) pour des apports équivalents de β-car dans les LMSN ou dans des patates douces, il est constaté que l'augmentation de la concentration de rétinoïdes dans le foie des animaux était environ deux fois plus faible dans le groupe nourri avec les larves que dans le groupe nourri avec les patates douces, ce qui suggère que le β-car des LMSN est environ deux fois moins biodisponible que celui des patates douces.

Chapitre 2 : Bioaccumulation, bioaccessibilité et efficacité d'absorption intestinale de la lutéine dans les larves de mouche soldat noire

Le but de cette nouvelle étude était d'estimer la bioaccumulation et la biodisponibilité d'un autre caroténoïde, la lutéine, grâce à une étude couplant un modèle de digestion *in vitro* et une lignée de cellules intestinales humaine en culture, la lignée Caco-2. Les intérêts d'avoir des LMSN enrichies en lutéine sont nombreux. Elle est tout d'abord abondamment utilisée comme additif dans l'alimentation des volailles pour colorer la chair et la peau des poulets, ainsi que le jaune de leurs œufs (*472*, *473*). De plus, l'apport de lutéine améliore les performances de production chez les poissons (*474*) et les performances de reproduction chez les volailles (*475*). Enfin, de nombreuses données suggèrent qu'elle joue un rôle dans la fonction visuelle, qu'elle pourrait diminuer l'incidence de la DMLA, et qu'elle améliore les fonctions cognitives (*476*, *477*). Augmenter la teneur en lutéine des aliments issus des animaux, via l'incorporation de LMSN enrichies en cette xanthophylle dans leur alimentation, pourrait donc indirectement avoir un bénéfice en nutrition humaine.

BRILL
WAGENINGEN
ACADEMIC

JOURNAL OF INSECTS AS FOOD AND FEED (2023) DOI:10.1163/23524588-20230107

Journal of Insects as Food and Feed
brill.com/jiff

RESEARCH ARTICLE

Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) as a sustainable and concentrated source of bioavailable lutein for feed

*L. Morand-Laffargue[1], B. Creton[2], C. Halimi[1], D. Sabatier[2], C. Desmarchelier[1,3] and P. Borel[1]**

[1]C2VN – Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition, INRAE, INSERM, Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université, 13005 Marseille, France; [2]BioMiMetiC, 13150 Boulbon, France; [3]Institut Universitaire de France (IUF), 75231 Paris Cedex 05, France; *patrick.borel@univ-amu.fr

Received 24 May 2023 | Accepted 9 October 2023 | Published online 1 November 2023

Abstract

Black soldier fly larvae (BSFL) are increasingly used to recycle and convert food waste into feed. We attempted to assess whether they can bioaccumulate lutein, a xanthophyll used as a food coloring, and whether it is then sufficiently bioavailable for an economically relevant incorporation of BSFL into feed. Vegetables and larvae lutein concentrations were measured by HPLC. Lutein bioaccessibility was estimated by *in vitro* digestion and lutein absorption efficiency by Caco-2 cells. BSFL were at least as rich, and sometimes richer ($P < 0.05$), in lutein than the vegetables they were reared on. For example, the larvae reared on kale contained 160.2 ± 3.4 mg/kg vs 23.0 ± 3.5 mg/kg of lutein, on a fresh weight basis, for the kale substrate. For the same substrate, lutein bioaccessibility was not statistically different between BSFL and the substrate (respectively, 14.8 ± 1.2% and 16.2 ± 2.8%; $P = 0.7$). Finally, by considering the lutein concentration in BSFL enriched in lutein and in lutein-rich substrates, as well as the bioaccessibility and intestinal absorption efficiency of lutein contained in these matrices, it was estimated that consumption of lutein-enriched larvae would lead to a theoretical amount of absorbed lutein about 2 to 13 times higher compared to that following the consumption of an equal quantity of lutein-rich vegetables. Thus, BSFL can be used as a sustainable and concentrated source of bioavailable lutein for feed and, indirectly, for food.

Keywords

bioaccessibility – circular economy – edible insects – nutritional quality – xanthophyll

1 Introduction

Lutein is a xanthophyll, i.e. an oxygenated carotenoid, which is found in the human diet mainly from green leafy vegetables such as parsley, kale or spinach (Perry *et al.*, 2009) but this phytochemical can also be found in eggs, algae or marigold extracts. It exerts very varied biological effects, whether in photosynthetic plants, where it is involved in photosynthesis (Dall'Osto *et al.*, 2006; Demmig-Adams *et al.*, 2022), in the animal kingdom, where it can participate in the coloring of certain animals (Langi *et al.*, 2018; Nabi *et al.*, 2020), or even in humans, where it seems to be involved in visual function (Feng *et al.*, 2019; Johnson, 2014). Lutein-rich feed ingredients are used to improve egg yolk and broiler meat color (Langi *et al.*, 2018). Lutein is therefore a molecule of interest for the feed and food industry and as a consequence, strategies to obtain it at lower costs are sought after.

Published with license by Koninklijke Brill NV | DOI: 10.1163/23524588-20230107
© L. MORAND-LAFFARGUE *ET AL.*, 2023 | ISSN: 2352-4588 (online)

Nowadays, products used to feed farm animals, such as soy, whose cultivation is one of the main causes of deforestation in the world, or fishmeal produced from wild fish, which further exacerbate overfishing, are contributing to an unsustainable food system. In the context of climate change and the need to find more sustainable nutrient sources, the incorporation of insects into livestock and human diets is recommended by FAO and EFSA (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) *et al.*, 2021; FAO, 2021). Indeed, insect farming has many advantages over traditional animal husbandry, e.g. lower greenhouse gas production and water consumption per kg protein produced (Allegretti *et al.*, 2018; FAO, 2021). Moreover, some insects, such as black soldier fly larvae (BSFL), i.e. *Hermetia illucens*, can also be fed a wide variety of organic wastes (Amrul *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2015). Consequently, black soldier flies (BSF) are increasingly used to recycle and valorize farm waste and/or co-products from feed and food industries (Ites *et al.*, 2020; Siddiqui *et al.*, 2022). The larvae obtained are either used as is or transformed into a defatted meal and oil before being incorporated into the feed of various production animals (Sánchez-Muros *et al.*, 2014; Secci *et al.*, 2018). They are very good sources of protein and fat, but they also contain many micronutrients and phytochemicals, including carotenoids (Borel *et al.*, 2021; Finke, 2013; Van Huis *et al.*, 2013).

Although insects, like other animals, generally cannot synthesize carotenoids, they can concentrate selected carotenoids from their diet into specific tissues with the help of carotenoid binding proteins and active transport mechanisms (Heath *et al.*, 2013). Consequently, several studies, e.g. hemipteran insects, dragonflies or silk moth, have reported accumulation of xanthophylls, such as lutein, astaxanthin or zeaxanthin (Maoka *et al.*, 2020, 2021; Yuasa *et al.*, 2014). Concerning the BSFL, they do not contain provitamin A carotenoids if they are raised on substrates that do not contain any (Borel *et al.*, 2021), and therefore they are not a priori capable of synthesizing them. However, they can bioaccumulate carotenoids when they are raised on substrates that contain them (Borel *et al.*, 2021; Leni *et al.*, 2022).

The aim of this study was first to investigate whether BSFL can be enriched with significant amounts of lutein and potentially later with lutein from plant co-products of the food industry, promoting the circular economy. The second objective of this study was to assess whether this sustainable source of lutein was bioavailable enough in order to provide animals, when incorporated into their feed, with a quantity of lutein adapted to their production needs, e.g. allowing satisfactory coloring of the egg yolk of laying hens. To answer this question, we first measured the bioaccumulation of this pigment in larvae reared on vegetables among the richest in lutein. Secondly, we compared the bioaccessibility of lutein in these larvae with that of lutein in the rearing vegetables with an *in vitro* digestion model. Finally, we compared the intestinal uptake efficiency of lutein in the micelles from the digestion of either the larvae or the rearing substrates using Caco-2 cells. Indeed, the combination of the measurement of bioaccessibility and intestinal uptake efficiency constitute a good estimate of the relative bioavailability of carotenoids in different food matrices.

2 Material and methods

Chemicals

Solvents used for HPLC (ethanol, *n*-hexane, methanol, dichloromethane, water and methyl tert-butyl ether) were purchased from Carlo Erba reagents (Peypin, France). Lutein and echinenone (HPLC purity > 95%) were from CaroteNature GmbH (Münsingen, Switzerland). Other chemicals and enzymes were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), penicillin/streptomycin, non-essential amino acids and phosphate-buffered saline (PBS) were purchased from Life Technologies (Villebon-sur-Yvette, France). Fetal bovine serum (FBS) was from PAA (Vélizy-Villacoublay, France).

Experimental foods

Lutein-rich vegetables (de Azevedo-Meleiro and Rodriguez-Amaya, 2005; Humphries and Khachik, 2003) were chosen as substrates for BSFL rearing: parsley (*Petroselinum sativum*), kale (*Brassica oleracea var. acephala*), endive (*Cichorium intybus var. foliosum*) and broccoli (*Brassica oleracea var. asparagoides*). White mushrooms (*Agaricus bisporus*), which do not contain detectable amounts of lutein (based on literature and verified by HPLC), were used as control substrate. These vegetables and the foods used for the *in vitro* digestion experiments, i.e. potatoes, minced beef meat with 5% fat and olive oil, were bought from a local supermarket.

BSFL farming

BSFL were reared on the above-mentioned substrates, which were ground using a kitchen chopper. The rear-

ing protocol was performed by BioMiMetiC in Boulbon, France. The rearing procedure was conducted as previously described (Borel *et al.*, 2021).

Measurement of dry matter

Larva dry matter was determined by measuring water loss after 72 h of freeze-drying. For the substrates, dry matter values were taken from the Ciqual database (https://ciqual.anses.fr/ Accessed 20.06.22).

In vitro digestions to assess lutein bioaccessibility

The in vitro digestion experiments used to measure lutein bioaccessibility were carried out in quadruplicate as previously described (Borel *et al.*, 2021). Before the experiment, 1 g of substrate or larva sample was ground with liquid nitrogen in a mortar grinder (Pulverisette 2, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Germany) and mixed with 6.7 g mashed potato, 1.2 g minced meat and 200 mg olive oil. The mixture was homogenized for 10 min at 37 °C in a rotary incubator (190 rpm). Then, 2.5 mL of artificial saliva were added and the mixture was once again incubated 10 min at 37 °C. After adjusting the pH to 4 ± 0.02, 2 mL pepsin were added to the mixture, which was incubated for 30 min at 37 °C. Then, pH was adjusted to 6 ± 0.02 prior to the addition of 9 mL pancreatin-bile extract solution and 4 mL bile solution. The mixture was then incubated for 30 minutes at 37 °C and the digestate aliquots were collected. The remaining mixture was centrifuged at 1,860 × *g* for 1 h 12 min at 10 °C. Aliquots of filtered supernatant, containing the mixed micelles were stored at −80 °C until lipid extraction and quantification of lutein by HPLC.

Micelle size and zeta potential analysis

The size, measured by dynamic light scattering, and charge (ζ-potential) of particles in the micellar fraction obtained at the end of *in vitro* digestions were measured using a Zetasizer (NanoZS, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Just before the measurements, the micellar fractions were filtered with a 0.22 µm filter, to eliminate possible agglomerates. Measurements were conducted at 25 °C with a wavelength of 633 nm.

Caco-2 cell culture and lutein uptake efficiency

Caco-2 cells (clone TC7) were a kind gift from Dr. M. Rousset (U178 INSERM, Villejuif, France). Cell culture was adapted from (Desmarchelier *et al.*, 2017). Briefly, 1 mL of complete medium (i.e. DMEM supplemented with 16% FBS, 1% non-essential amino acids and 1% antibiotics) was added on the cells every day during the first 7 days and every other day during the next 7 days to obtain confluent differentiated cell monolayers. The day before the experiment, the medium was replaced by a serum-free complete medium. To measure lutein uptake efficiency, cell monolayers were washed twice with 1 mL of PBS. Then, the micellar fractions obtained at the end of the *in vitro* digestion were diluted 5 times with DMEM and 1.5 mL thereof were added on the cells. The micellar solutions were left in contact with the cells for 4 hours (Liu *et al.*, 2004) at 37 °C. After incubation, the medium was recovered. The cells were then washed twice with PBS and were finally collected in 500 µL PBS and stored at −80 °C prior to lutein extraction and HPLC analysis.

Lutein extraction

Lutein was extracted as described previously for other carotenoids (Borel *et al.*, 2021), using a sample volume of 500 µL. For food substrate and BSFL samples, 1 g was finely crushed with liquid nitrogen and the powders thus obtained were diluted and homogenized in 20 mL distilled water.

Lutein quantification

The lutein-containing extracts, which were previously evaporated and solubilized in methanol/dichloromethane (65/35, v/v), were injected into the HPLC system. Injection volumes were determined after an initial injection and adjusted to obtain signals within the calibration range. Thus, 5 to 50 µL BSFL and substrate samples, 100 to 150 µL micellar fractions, 25 to 150 µL digestate samples and 180 µL cell samples were injected into the HPLC system. The apparatus and method used, i.e. column, mobile phase, flow rate and detection method, were the same as previously described (Borel *et al.*, 2021).

Statistics

Results are expressed as means ± SEM. The homogeneity of variances ($P > 0.05$) was assessed by Levene's test. If the variances were inhomogeneous, data were log-transformed. To assess the normality of the data, Q-Q plots of standardized residuals were used. Differences between groups were tested using several two-way ANOVA. When a significant effect of the matrix in which the lutein was incorporated, i.e. plant or insect, was highlighted by the ANOVA, the comparison of the means between the plant matrix and the insect matrix was carried out by pairwise comparisons using bilateral t-tests, with a Bonferroni adjustment. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using R version 4.1.1 for Windows (R Core Team, 2021).

3 Results

Lutein concentration in larvae reared on lutein-rich substrates and in the corresponding substrates

Figure 1 represents the lutein concentration in larvae reared on lutein-rich substrates and in these substrates. Neither mushrooms nor the larvae reared on these mushrooms contained any detectable amount of lutein while larvae reared on other substrates all contained lutein. What is most striking in Figure 1A (results expressed on a fresh weight basis) is that lutein concentration in larvae was always higher than lutein concentration in the corresponding rearing substrate. Moreover, larvae reared on kale contained 160.2 ± 3.4 mg/kg of lutein while kale contained 23.0 ± 3.5 mg/kg of lutein. Thus, lutein concentration in these larvae was about 7 times higher ($P < 0.001$) than in the corresponding substrate. Note that lutein concentration was still more than 3 times higher ($P < 0.001$) in these larvae than in kale on a dry weight basis (Figure 1B). The larvae reared on parsley contained more than twice as much lutein as the substrate itself on a fresh weight basis (69.8 ± 5.7 mg/kg vs 29.2 ± 1.4 mg/kg; $P < 0.001$). On a dry weight basis however, there was no significant difference ($P = 0.75$). Lutein concentration in endive was 0.2 ± 0.02 mg/kg and the larvae fed with endives contained 15 times more lutein (3.0 ± 0.2 mg/kg) on a fresh weight basis ($P < 0.001$), and still about 3 times more on a dry weight basis ($P < 0.001$). There was a significant difference in lutein concentration in broccoli and in larvae reared on broccoli (1.3 ± 0.07 and 2.4 ± 0.3 mg/kg on a fresh weight basis ($P < 0.05$) and 11.4 ± 0.6 and 7.6 ± 1.1 mg/kg on a dry weight basis ($P < 0.05$), for broccoli and larvae, respectively).

Lutein bioaccessibility in larvae reared on lutein-rich substrates and in the corresponding substrates

Bioaccessibility values are shown in Table 1. For kale and broccoli, lutein bioaccessibility in the substrates and in the larvae was not significantly different. Conversely, lutein bioaccessibility was about 2 times lower ($P < 0.01$) in larvae reared on endive and parsley as compared to the corresponding substrates. Lutein bioaccessibility was not significantly different between the substrates while lutein bioaccessibility in the larvae exhibited some variability according to the substrates, namely it was approximately twice as high in larvae reared on broccoli and kale compared to larvae reared on endive and parsley (means around 14% for the former and 8% for the latter).

Lutein amount in mixed micelles from either digestion of larvae fed with lutein-rich substrates or from digestion of their corresponding substrates

Figure 2 shows the lutein amount in the micelle-rich fractions obtained after *in vitro* digestion of either larvae fed lutein-rich substrates or their corresponding substrates. This amount depends both on lutein concentration in the matrix (larvae or substrates) and on lutein bioaccessibility in the matrix. The amount of lutein in micelles corresponds to the quantity of lutein that is presented to the intestinal cell for its absorption. On a fresh weight basis (Figure 2A), the mixed micelles obtained after digestion of larvae fed on kale contained about 4 times more lutein than those obtained after digestion of kale (21.9 ± 2.5 and 5.4 ± 1.0 mg/kg, respectively; $P < 0.001$). On a dry weight basis (Figure 2B), they still contained more than twice as much lutein as those obtained after kale digestion (72.9 ± 8.5 and 31.7 ± 5.8 mg/kg, respectively; $P < 0.01$). For the other substrates, on a fresh weight basis, no significant difference was observed between larvae and their corresponding substrates. Conversely, on a dry weight basis, the quantity of lutein in micelles that came from the digestion of larvae compared to those that came from the digestion of their corresponding substrates differed significantly for parsley ($P < 0.001$), endive ($P < 0.01$) and broccoli ($P < 0.01$).

Zeta potential of mixed micelles from in vitro digestions

Table 2 shows the zeta potential of the mixed micelles obtained after *in vitro* digestion of larvae fed on lutein-rich substrates and on their corresponding substrates. The zeta potential of micelles from larva digestion was approximately 2 to 4 times higher than that of their substrates ($P < 0.05$). Note that only one population of particles was detected in the mixed micelle rich fractions. Its size was around 9.0 ± 0.4 nm and there was no significant difference between the size of mixed micelles obtained after digestion of larvae and the size of those obtained after digestion of substrates (data not shown).

Uptake efficiency of micellarized lutein by Caco-2 cells

Table 3 shows lutein uptake efficiency from the micellar fraction of digestions of larvae reared on kale and parsley compared to that from the micellar fraction of digestions of the substrates themselves. Note that the results with the other substrates are not shown because the amounts of lutein in the micelles were too low to be able to be correctly measured in the cells (below the quantification limit of 0.02 μg/mL). Lutein in the mixed micelle-rich fraction obtained after digestion of

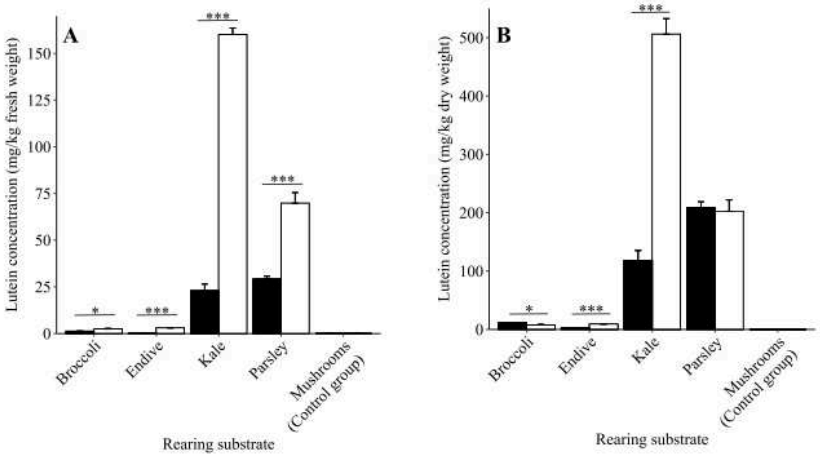


FIGURE 1 Lutein concentration (mg/kg) in rearing substrates (■) and larvae (□). A: Concentration expressed on a fresh weight basis. B: Concentration expressed on a dry weight basis. Bars represent mean ± SEM (n = 4). An asterisk means that concentrations were significantly different between the larvae and the corresponding substrate (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$, two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests).

TABLE 1 Bioaccessibility of lutein* from larvae and their corresponding rearing substrates

	Rearing substrate	Larvae	Substrate vs larvae comparison **P-value
Broccoli	12.1 ± 0.5[a]	13.7 ± 1.2[a]	0.26
Endive	16.9 ± 1.3[a]	8.1 ± 0.9[b]	<0.01
Kale	16.2 ± 2.8[a]	14.8 ± 1.2[a]	0.67
Parsley	14.5 ± 1.1[a]	7.8 ± 0.5[b]	<0.01

*Percent of lutein recovered in the micelle fraction relative to that found in the digestate at the end of the *in vitro* digestion. Values are means ± SEM (n = 4). **P-value of a two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests.

[a,b]In each column, means that bear different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's HSD test).

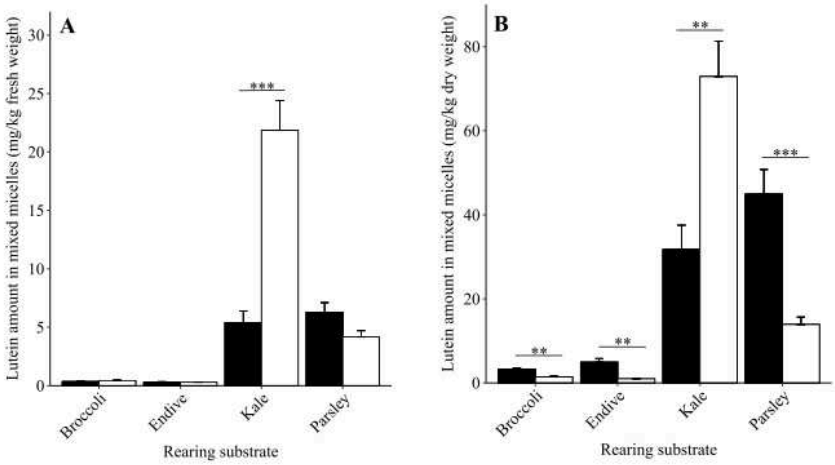


FIGURE 2 Lutein quantity in mixed micelles obtained after *in vitro* digestions of rearing substrates and of larvae. Rearing substrates (■) and larvae (□). A: Quantity expressed on a fresh weight basis. B: Quantity expressed on a dry weight basis. Lutein quantities are expressed in mg of lutein found in the mixed micelles produced by the digestion of 1 kg of larvae or substrate (mg/kg of substrates or larvae). Bars represent mean ± SEM (n = 4). An asterisk means that quantities were significantly different between larvae and their corresponding substrate (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests).

TABLE 2 Zeta potential of micelles from *in vitro* digestion of larvae and substrates

	Zeta potential (mV)		Substrate vs larvae comparison *P-value
	Micellar fraction from rearing substrate digestion	Micellar fraction from larva digestion	
Broccoli	−8.4 ± 0.8	−4.6 ± 1.0	0.039
Endive	−21.0 ± 1.3	−5.6 ± 2.3	<0.01
Kale	−15.4 ± 1.6	−7.0 ± 1.2	<0.01
Parsley	−14.2 ± 1.3	−5.6 ± 0.1	<0.01

Values are means ± SEM (n = 4). *P-value of a two-way ANOVA followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests.

TABLE 3 Lutein uptake efficiency by Caco-2 cells*

	Micellar fraction from rearing substrate digestion	Micellar fraction from larva digestion	Substrate vs larvae comparison **P-value
Kale	9.1 ± 0.3	23.6 ± 0.9	<0.001
Parsley	8.4 ± 0.8	21.0 ± 0.8	<0.001

*Percentage of lutein that was recovered in the Caco-2 cells relative to the quantity of lutein in the medium before incubation of the cell monolayers with mixed micelle-rich fractions for 4 hours at 37 °C. Values are means ± SEM (n = 4). **P-value of a two-way ANOVA followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests.

larvae reared on kale was approximately twice as efficiently taken up compared to lutein from the fraction obtained after digestion of kale ($P < 0.001$). For parsley, cellular uptake was approximately 2 times greater when lutein was supplied by the micellar fraction from larva digestion than by the micellar fraction from substrate digestion ($P < 0.001$).

Figure 3 shows the amount of lutein taken up by Caco-2 cells. This value is very interesting because it depends both on the concentration of lutein in the matrix (plant substrate or larvae), on the bioaccessibility of lutein in this matrix, and on the efficiency of absorption of micellarized lutein by the intestinal cell. It therefore makes it possible to compare the quantity of lutein absorbed by the cells, i.e. bioavailable, for the same quantity of digested matrix. The cells incubated with micelles from the digestion of larvae reared on kale contained around 7 (when normalized to dry weight) to around 13 (when normalized to fresh weight) more lutein than the cells incubated with micelles from the digestion of kale, i.e. 40.2 ± 3.6 vs 5.4 ± 1.1 mg/kg, respectively (dry weight; $P < 0.001$), and 12.1 ± 1.1 vs 0.9 ± 0.2 mg/kg, respectively (fresh weight; $P < 0.001$). Regarding parsley, there was a significant difference ($P = 0.012$) between the cells incubated with micelles from the digestion of larvae reared on parsley (1.9 ± 0.3 mg/kg) and those incubated with micelles from the digestion of parsley (0.9 ± 0.1 mg/kg) on a fresh weight basis, but not on a dry weight basis ($P = 0.3$)

4 Discussion

First of all, the results obtained with the white mushrooms (control substrate that does not contain any detectable amount of lutein) allow us to conclude that BSFL do not naturally contain lutein, just as they do not contain provitamin carotenoids (Borel *et al.*, 2021). Secondly, BSFL bioaccumulate lutein to concentrations more or less proportional to those present in the vegetables on which they were reared. Normalizing the results to dry matter weight attenuated the difference in concentration between larvae and vegetables likely because substrates have a higher water content compared to larvae, but nonetheless, larvae reared on kale still displayed a much higher lutein concentration compared to kale. It is therefore evident that the larvae bioaccumulate lutein. This is probably due to the fact that, unlike vegetables, they are very rich in lipids, which can solubilize lutein, a fat-soluble molecule. Whether this bioaccumulation is due to a specific mechanism allowing the larva to store this carotenoid for future use, for example in adulthood, or whether it is simply due to a "reservoir effect" in which lutein is deposited, remains to be determined. However, the fact that BSFL can also bioaccumu-

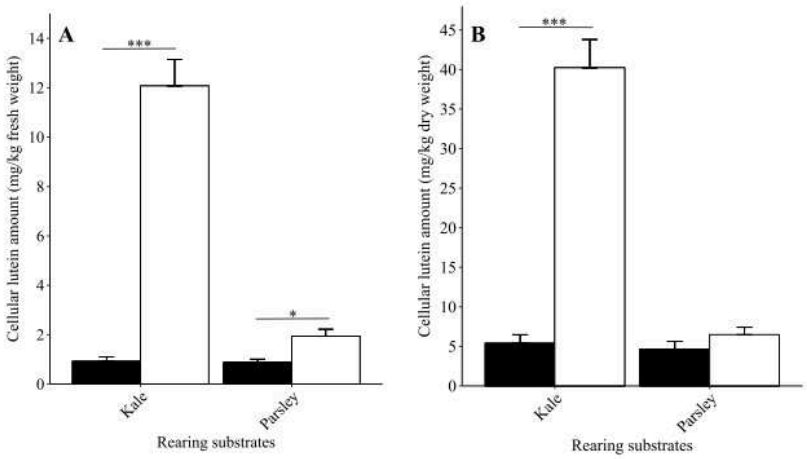


FIGURE 3 Lutein quantity taken up by Caco-2 cells incubated with micelles obtained after *in vitro* digestions of rearing substrates or larvae. Rearing substrates (■) and larvae (□). A: Quantity expressed on a fresh weight basis. B: Quantity expressed on a dry weight basis. Lutein quantities are expressed in mg of lutein found in the cellular compartment in each well relative to the amount of micellar lutein produced by the digestion of 1 kg of larvae or substrate (mg/kg of substrates or larvae). Bars represent mean ± SEM (n = 4). An asterisk means that quantities were significantly different between larvae and their corresponding substrate (***: $P < 0.001$, two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests).

late another xanthophyll, zeaxanthin (data not shown), which was present in the studied vegetables but at much lower concentration than lutein, as well as provitamin A carotenoids (Borel *et al.*, 2021; Leni *et al.*, 2022) and vitamin E (Shumo *et al.*, 2019) suggests that they act as a fat tank having the ability to store various fat-soluble molecules by solubilizing them (Borel *et al.*, 1996; Goupy *et al.*, 2020).

After having shown that BSFL can bioaccumulate high concentrations of lutein, we compared the bioaccessibility of lutein in larvae and in their corresponding rearing substrates. It could not be ruled out that certain molecules, known or unknown, and present in the insect matrix, could not interfere with bioaccessibility. The results obtained show that either there was no difference in lutein bioaccessibility between the larvae and the substrates (broccoli and kale), or the bioaccessibility of lutein from larvae was half as much as that measured from the substrates (endive and parsley). In our previous study (Borel *et al.*, 2021), we found that the bioaccessibility of another xanthophyll, β-cryptoxanthin, was dramatically lower in clementine-fed larvae (6.4%) and in pumpkin-fed larvae (13.1%) as compared to their corresponding substrates (respectively, 67.8 and 82.4%). The synthesis of these results allows us to suggest that the bioaccessibility of xanthophylls is generally lower in larvae than in plant substrates. We hypothesize that this is due to xanthophyll complexing with insect matrix compounds that inhibit their release from this matrix and their transfer to mixed micelles. These compounds could be chitin, or proteins with a particular affinity for xanthophylls. Nevertheless, to explain why the bioaccessibility of lutein from the larvae reared on kale and broccoli was not lower to that observed for the corresponding substrates we hypothesize that kale and broccoli contain one, or several, compound(s) which is/are specific to these vegetables and which improve the bioaccessibility of xanthophylls from larvae. These compounds could be isothiocyanates. Indeed, it has been shown that they cause partial Z-isomerization of carotenoids (Honda *et al.*, 2020a,b), and it has also been shown that xanthophyll Z-isomers are more bioaccessible than corresponding E-isomers (Coral-Hinostroza *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2017). However, this hypothesis remains to be verified in a future study.

Bioaccessibility measures the transfer efficiency of lipid phytochemicals from food matrices to micelles during digestion, which is a key step for bioavailability. Nevertheless, what is important in terms of animal or human nutrition is the absolute quantity of the compound of interest, here lutein, that reaches the intestinal cells in an absorbable form, i.e. micellarized lutein. This quantity depends both on the concentration of lutein in the food matrix and on its bioaccessibility in this matrix, i.e. quantity in the micelles = quantity provided by the matrix multiplied by bioaccessibility. The micellarized lutein quantity measured (Figure 2A) show that the larvae reared on parsley, endive, and broccoli did not provide intestinal cells with significantly different lutein quantities compared with their respective substrates. In other words, consuming 100 g of these substrates or 100 g of larvae having consumed these substrates does not bring different lutein quantity to intestinal cells. However, this figure shows that consuming 100 g of lar-

vae reared on kale provided intestinal cells with about 4 times more lutein than 100 g of kale (Figure 2A). Note that when these data are expressed in dry weight (Figure 2AB), the larvae reared on parsley, endive and broccoli provide significantly less micellarized lutein than their respective substrates. On the other hand, the larvae reared on kale still provide significantly more micellarized lutein than their substrate. And it is also these kale larvae which provide more micellarized lutein than all the other substrates or larvae studied.

Together with bioaccessibility, another key step of lutein bioavailability is its intestinal uptake efficiency. Indeed, whether BSFL digestion releases one or more compounds that could modulate lutein uptake efficiency has never been studied. First of all, it is important to mention that the uptake efficiency of lutein from the micellar fraction of the digestion of the two plant matrices studied (parsley and kale), which was approximately 9%, was quite comparable to what was measured previously, i.e. 10 (Garrett *et al.*, 2000) and 15% (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2004), which supports the validity of our measurements. Secondly, we notice that micellarized lutein was taken up more efficiently, about 2 to 3 times, when it came from larvae than when it came from the corresponding substrates. This suggests that either the larvae do not contain one or more compounds present in the plant substrates which inhibit absorption, e.g. plant fibers (Mamatha and Baskaran, 2011), or, on the contrary, they contain one or several compounds that allow a better uptake of lutein by intestinal cells. One of these compounds could be the lipids brought by the larvae. Indeed, BSFL are very rich in lipids, triglycerides in particular, and it is likely that their hydrolysis by pancreatic lipase during *in vitro* digestion generated fatty acids and monoglycerides that changed the composition of mixed micelles. This enrichment of the micelles with triglyceride hydrolysis products can explain a better uptake of the micelles by the enterocyte by two mechanisms. The first is that these compounds, in particular fatty acids, allow a better interaction with the domains of the lipid rafts where SR-BI and CD36, which have been involved in carotenoid uptake (Reboul and Borel, 2011), are located (Goncalves *et al.*, 2013, 2015). The second is that this enrichment in hydrolysis products has reduced the negative charge of the micelles, which is what we observed, and this reduction has in turn reduced the electrostatic repulsion between the micelles and the apical membrane, which is also negatively charged.

Knowing the absolute quantity of micellarized lutein following the digestion of larvae relative to that following the digestion of the corresponding substrates, and knowing the cellular uptake efficiency of micellar lutein coming from larvae relative to that of micellar lutein coming from the substrates, it can be estimated that larva consumption would lead to a theoretical amount of absorbed lutein about 2 times (case of parsley) to about 13 times (case of kale) higher compared to that following the consumption of an equal quantity of their corresponding rearing substrate. This of course remains to be verified in an *in vivo* study but nevertheless, these promising results suggest that BSFL could constitute a nutritionally relevant source of lutein, what is more by recycling and valorizing lutein-rich vegetable waste.

To show the relevance of using BSFL enriched with lutein in animal nutrition, or even in human nutrition if they were to be authorized, we calculated the quantities of lutein that could be provided to different animal species if we included in their diet the quantity of larvae recommended for each species (Supplementary Table S1). These theoretical calculations show in particular that lutein-rich larvae incorporated in the diet could provide one-third of the maximum recommended lutein intake in broiler chicken. More interestingly, their use could provide laying hens with up to 86% of the lutein amount that is usually added to the diet to obtain adequate yolk color.

In conclusion, this study shows that BSFL can be enriched in lutein at higher concentrations than some of the most lutein-rich vegetables, such as parsley and kale, when the concentrations are expressed in fresh weight. Moreover, the results of the *in vitro* digestion model coupled with Caco-2 cells suggest that the consumption of lutein-enriched larva would lead to higher amount of absorbed lutein compared to the consumption of an equal quantity of lutein-rich vegetables. Finally, our calculations show that the incorporation of lutein-enriched larvae in the feed of several species of farm animals would provide them with quantities of lutein which could sometimes be equivalent to the quantities necessary to satisfy the organoleptic quality criteria of their products. Furthermore, our study shows that the recycling of lutein from food waste containing lutein-rich plants by BSFL is theoretically possible. Indeed, the proteins and oils contained in BSFL are slowly being valorized by the food industry, but this study also shows that micronutrients such as lutein could also be valued from food waste streams, contributing to a circular economy and cleaner production. Finally, these results and those obtained in our previous study (Borel *et al.*, 2021) confirm that the enrichment of BSFL with vitamins or phytochemicals of nutritional

and/or organoleptic interest can lead to the production of BSFL with higher nutritional quality, thus improving most likely their market value.

Acknowledgements

The costs of this project were covered equally by the own budget of P. Borel's research team, which came mainly from INRAE endowments, and by the BioMiMetiC company. For the purpose of Open Access, a CC-BY public copyright licence (Creative Commons – Attribution 4.0 International – CC BY 4.0) has been applied by the authors to the present document and will be applied to all subsequent versions up to the Author Accepted Manuscript arising from this submission.

Conflicts of interest

BC and DS work in the BioMiMetiC company. This company conducts research and development activities aimed at enhancing the value of entomo-conversion on a wide variety of organic materials generated in the area at all levels of the food value chain.

Supplementary material

Supplementary material is available online at: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.24317065

References

Adeoye, A.A., Akegbejo-Samsons, Y., Fawole, F.J. and Davies, S.J., 2020. Preliminary assessment of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larval meal in the diet of African catfish (*Clarias gariepinus*): impact on growth, body index, and hematological parameters. Journal of the World Aquaculture Society 51: 1024-1033. https://doi.org/10.1111/jwas.12691

Allegretti, G., Talamini, E., Schmidt, V., Bogorni, P.C. and Ortega, E., 2018. Insect as feed: an emergy assessment of insect meal as a sustainable protein source for the Brazilian poultry industry. Journal of Cleaner Production 171: 403-412. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.244

Amrul, N.F., Kabir Ahmad, I., Ahmad Basri, N.E., Suja, F., Abdul Jalil, N.A. and Azman, N.A., 2022. A review of organic waste treatment using black soldier fly (*Hermetia illucens*). Sustainability Multidisciplinary Digital Publishing Institute 14: 4565. https://doi.org/10.3390/su14084565

Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D. and Azais-Braesco, V., 1996. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. Journal of Lipid Research 37: 250-261. https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37613-6

Borel, P., Hammaz, F., Morand-Laffargue, L., Creton, B., Halimi, C., Sabatier, D. and Desmarchelier, C., 2021. Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste as a sustainable dietary source of provitamin a carotenoids. Food Chemistry 359: 129911. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129911

Chitchumroonchokchai, C., Schwartz, S.J. and Failla, M.L., 2004. Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. The Journal of Nutrition 134: 2280-2286. https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2280

Coral-Hinostroza, G.N., Ytrestøyl, T., Ruyter, B. and Bjerkeng, B., 2004. Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3'R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 139: 99-110. https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.011

Dall'Osto, L., Lico, C., Alric, J., Giuliano, G., Havaux, M. and Bassi, R., 2006. Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light. BMC Plant Biology BioMed Central 6: 32. https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-32

de Azevedo-Meleiro, C.H. and Rodriguez-Amaya, D.B., 2005. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. Journal of Food Composition and Analysis 18: 845-855. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.006

Demmig-Adams, B., Polutchko, S. and Adams, W., 2022. Structure-function-environment relationship of the isomers zeaxanthin and lutein. Photochem 2: 308-325 https://doi.org/10.3390/photochem2020022

Desmarchelier, C., Margier, M., Prévéraud, D.P., Nowicki, M., Rosilio, V., Borel, P. and Reboul, E., 2017. Comparison of the micellar incorporation and the intestinal cell uptake of cholecalciferol, 25-hydroxycholecalciferol and 1-α-hydroxycholecalciferol. Nutrients 9: E1152. https://doi.org/10.3390/nu9101152

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Bampidis, V., Azimonti, G., de Lourdes Bastos, M., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., Kos Durjava, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos,

F., Sanz, Y., Villa, R.E., Woutersen, R., Bories, G., Costa, L.G., Gropp, J., Lundebye, A.-K., Renshaw, D., Holczknecht, O., Vettori, M.V. and Aquilina, G., 2019. Safety and efficacy of lutein and lutein/zeaxanthin extracts from *Tagetes erecta* for poultry for fattening and laying (except turkeys). EFSA journal. European Food Safety Authority 17: e05698. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5698

EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K.I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., Neuhäuser-Berthold, M., Poulsen, M., Prieto Maradona, M., Schlatter, J.R., van Loveren, H., Ververis, E. and Knutsen, H.K., 2021. Safety of frozen and dried formulations from whole yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. EFSA Journal 19: e06778. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6778

European Commission, 2022. Directorate-General for Agriculture and Rural Development, EU agricultural outlook for markets, income and environment 2021-2031. Publications Office of the European Union. Available at: https://data.europa.eu/doi/10.2762/753688

FAO, 2021. Looking at edible insects from a food safety perspective: challenges and opportunities for the sector. Food and Agriculture Organization of the United States (FAO), Rome, Italy, pp. 108. https://doi.org/10.4060/cb4094en

Feng, L., Nie, K., Jiang, H. and Fan, W., 2019. Effects of lutein supplementation in age-related macular degeneration. PLOS ONE 14: e0227048. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227048

Finke, M.D., 2013. Complete nutrient content of four species of feeder insects: nutrient content of feeder insects. Zoo Biology 32: 27-36. http://doi.wiley.com/10.1002/zoo.21012

Garrett, D.A., Failla, M.L. and Sarama, R.J., 2000. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. The Journal of Nutritional Biochemistry 11: 574-580. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(00)00122-4

Goncalves, A., Gleize, B., Roi, S., Nowicki, M., Dhaussy, A., Huertas, A., Amiot, M.-J. and Reboul, E., 2013. Fatty acids affect micellar properties and modulate vitamin D uptake and basolateral efflux in Caco-2 cells. The Journal of Nutritional Biochemistry 24: 1751-1757. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.03.004

Goncalves, A., Gontero, B., Nowicki, M., Margier, M., Masset, G., Amiot, M.-J. and Reboul, E., 2015. Micellar lipid composition affects micelle interaction with class B scavenger receptor extracellular loops. Journal of Lipid Research 56: 1123-1133. https://doi.org/10.1194/jlr.M057612

Goupy, P., Genot, C., Hammaz, F., Halimi, C., Caris-Veyrat, C. and Borel, P., 2020. Mechanisms governing the transfer of pure and plant matrix carotenoids toward emulsified triglycerides. Molecular Nutrition & Food Research 64: 1900911. https://doi.org/10.1002/mnfr.201900911

Heath, J., Cipollini, D. and Stireman, J., 2013. The role of carotenoids and their derivatives in mediating interactions between insects and their environment. Arthropod-Plant Interactions 7: 1-20. https://doi.org/10.1007/s11829-012-9239-7

Hien, T.T.T., Loc, T.V., Tu, T.L.C., Phu, T.M., Duc, P.M., Nhan, H.T. and Liem, P.T., 2022. Dietary effects of carotenoid on growth performance and pigmentation in bighead catfish (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864). Fishes Multidisciplinary Digital Publishing Institute 7: 37. https://doi.org/10.3390/fishes7010037

Honda, M., Kageyama, H., Hibino, T., Ichihashi, K., Takada, W. and Goto, M., 2020a. Isomerization of commercially important carotenoids (lycopene, β-carotene, and astaxanthin) by natural catalysts: isothiocyanates and polysulfides. Journal of Agricultural and Food Chemistry American Chemical Society 68: 3228-3237. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00316

Honda, M., Kageyama, H., Hibino, T., Sowa, T. and Kawashima, Y., 2020b. Efficient and environmentally friendly method for carotenoid extraction from *Paracoccus carotinifaciens* utilizing naturally occurring Z-isomerization-accelerating catalysts. Process Biochemistry 89: 146-154. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.005

Humphries, J.M. and Khachik, F., 2003. Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 1322-1327. https://doi.org/10.1021/jf026073e

Ites, S., Smetana, S., Toepfl, S. and Heinz, V., 2020. Modularity of insect production and processing as a path to efficient and sustainable food waste treatment. Journal of Cleaner Production 248: 119248. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119248

Johnson, E.J., 2014. Role of lutein and zeaxanthin in visual and cognitive function throughout the lifespan. Nutrition Reviews 72: 605-612. https://doi.org/10.1111/nure.12133

Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T. and Proestos, C., 2018. Carotenoids: from plants to food and feed industries: methods and protocols. In: Barreiro, C. and Barredo, JL. (eds.) Methods in molecular biology. Humana Press, New York, NY, USA, pp. 57-71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_3

Leni, G., Maistrello, L., Pinotti, G., Sforza, S. and Caligiani, A., 2022. Production of carotenoid-rich *Hermetia illucens* larvae using specific agri-food by-products. Journal of

Insects as Food and Feed 9: 171-181. https://doi.org/10.3920/JIFF2022.0016

Liu, C.-S., Glahn, R.P. and Liu, R.H., 2004. Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4330-4337. https://doi.org/10.1021/jf040028k

Lokaewmanee, K., Yamauchi, K., Komori, T. and Saito, K., 2011. Enhancement of yolk color in raw and boiled egg yolk with lutein from marigold flower meal and marigold flower extract. The Journal of Poultry Science 48: 25-32. https://doi.org/10.2141/jpsa.010059

Mamatha, B.S. and Baskaran, V., 2011. Effect of micellar lipids, dietary fiber and β-carotene on lutein bioavailability in aged rats with lutein deficiency. Nutrition 27: 960-966. https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.10.011

Maoka, T., Kawase, N., Hironaka, M. and Nishida, R., 2021. Carotenoids of hemipteran insects, from the perspective of chemo-systematic and chemical ecological studies. Biochemical Systematics and Ecology 95: 104241. https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104241

Maoka, T., Kawase, N., Ueda, T. and Nishida, R., 2020. Carotenoids of dragonflies, from the perspective of comparative biochemical and chemical ecological studies. Biochemical Systematics and Ecology 89: 104001. https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104001

Nabi, F., Arain, M.A., Rajput, N., Alagawany, M., Soomro, J., Umer, M., Soomro, F., Wang, Z., Ye, R. and Liu, J., 2020. Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: a review. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 104: 1809-1818. https://doi-org.lama.univ-amu.fr/10.1111/jpn.13375

Nguyen, T.T.X., Tomberlin, J.K. and Vanlaerhoven, S., 2015. Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. Environmental Entomology 44: 406-410. https://doi.org/10.1093/ee/nvv002

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. and Thurnham, D.I., 2001. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. The British Journal of Nutrition 85: 499-507. https://doi.org/10.1079/BJN2000284

Patterson, P.H., Acar, N., Ferguson, A.D., Trimble, L.D., Sciubba, H.B. and Koutsos, E.A., 2021. The impact of dietary black soldier fly larvae oil and meal on laying hen performance and egg quality. Poultry Science 100: 101272. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101272

Perry, A., Rasmussen, H. and Johnson, E.J., 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. Journal of Food Composition and Analysis 22: 9-15. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.006

Reboul, E. and Borel, P., 2011. Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. Progress in Lipid Research 50: 388-402. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.07.001

Reis, E.C., Galuch, M.B., da Silveira, R., dos Santos, H.M.C., Sary, C., Magon, T.F.S., Figueiredo, I.L., Ribeiro, R.P., Visentainer, J.V. and Santos, O.O., 2018. Fatty acid composition and carotenoids in raw and grilled tilapia GIFT fillets supplemented with lycopene, β-carotene and lutein. Journal of the Brazilian Chemical Society Sociedade Brasileira de Química 29: 1742-1750. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180049

Sánchez-Muros, M.-J., Barroso, F.G. and Manzano-Agugliaro, F., 2014. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. Journal of Cleaner Production 65: 16-27. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068

Secci, G., Bovera, F., Nizza, S., Baronti, N., Gasco, L., Conte, G., Serra, A., Bonelli, A. and Parisi, G., 2018. Quality of eggs from Lohmann Brown Classic laying hens fed black soldier fly meal as substitute for soya bean. Animal: An International Journal of Animal Bioscience 12: 2191-2197. https://doi.org/10.1017/S1751731117003603

Shumo, M., Osuga, I.M., Khamis, F.M., Tanga, C.M., Fiaboe, K.K.M., Subramanian, S., Ekesi, S., van Huis, A. and Borgemeister, C., 2019. The nutritive value of black soldier fly larvae reared on common organic waste streams in Kenya. Scientific Reports 9: 10110. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46603-z

Siddiqui, S.A., Ristow, B., Rahayu, T., Putra, N.S., Widya Yuwono, N., Nisa', K., Mategeko, B., Smetana, S., Saki, M., Nawaz, A. and Nagdalian, A., 2022. Black soldier fly larvae (BSFL) and their affinity for organic waste processing. Waste Management 140: 1-13. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.12.044

Song, X., Li, X., Chen, Z.-Z., Wang, L., Huan, D. and Leng, X., 2017. Effect of dietary xanthophyll on the growth and body color of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Journal of Fisheries of China 41: 566-572. https://doi.org/10.11964/jfc.20160710484

Taufek, N.M., Lim, J.Z.Y. and Abu Bakar, N.H., 2021. Comparative evaluation of *Hermetia illucens* larvae reared on different substrates for red tilapia diet: effect on growth and body composition. Journal of Insects as Food and Feed 7: 79-88. https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0058

The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research Group*, 2013. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye

Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. JAMA 309: 2005-2015. https://doi.org/10.1001/jama.2013.4997

The European Commission, 2021. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/420 of 9 March 2021 correcting Implementing Regulation (EU) 2020/1097 concerning the authorisation of lutein-rich and lutein/zeaxanthin extracts from Tagetes erecta as feed additives for poultry (except turkeys) for fattening and laying and for minor poultry species for fattening and laying. Official Journal of the European Union. Available at: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R0420&from=EN

Tu, N.P.C., Ha, N.N., Linh, N.T.T. and Tri, N.N., 2022. Effect of astaxanthin and spirulina levels in black soldier fly larvae meal-based diets on growth performance and skin pigmentation in discus fish, Symphysodon sp. Aquaculture 553: 738048. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738048

Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. and Vantomme, P., 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. FAO forestry paper no. 171. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, pp. 187. Available at: http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf

Yang, C., Zhang, H., Liu, R., Zhu, H., Zhang, L. and Tsao, R., 2017. Bioaccessibility, cellular iptake, and transport of astaxanthin isomers and their antioxidative effects in human intestinal epithelial Caco-2 cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry American Chemical Society 65: 10223-10232. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04254

Yuasa, M., Kitamura, A., Maoka, T., Sakudoh, T., Shimada, T. and Tsuchida, K., 2014. Astaxanthin and lutein compete for accumulation into the middle silk gland via *Yellow cocoon* gene (*C*)-dependent control and produce a red cocoon of *Bombyx mori*. The Japanese Society of Sericultural Science. Available at: https://doi.org/10.11416/jibs.83.1_001

Research article

Black soldier fly larvae (*Hermetia Illucens*) as a sustainable and concentrated source of bioavailable lutein for feed

L. Morand-Laffargue[1], B. Creton[2], C. Halimi[1], D. Sabatier[2], C. Desmarchelier[1,3] and P. Borel[1*]

[1]C2VN – Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition, INRAE, INSERM, Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université, 13005 Marseille, France; [2]BioMiMetiC, 13150 Boulbon, France ; [3]Institut Universitaire de France (IUF), 75231 Paris Cedex 05, France; *patrick.borel@univ-amu.fr

Supplementary material

TABLE S1 Concentrations of lutein added to the diets of some farm animals (for organoleptic reasons in particular) and proportion of lutein which could be added to these diets by incorporating recommended proportions of larvae into these different diets*

Species	Concentration added (mg/kg of diet)	BSFL fraction provided in the diet	Recommended proportion of the BSFL fraction added in the diet (weight%)	mg of lutein** provided by BSFL incorporated at the recommended proportion	% of the concentration that is usually added
Broiler chicken *(Gallus gallus domesticus)*	Maximum 80 (The European Commission, 2021)	Partially defatted larvae or Highly defatted larvae	16% (Patterson *et al.*, 2021)	26	32
	Mean amount added to colour the egg yolk: 30-40 (Lokaewmanee *et al.*, 2011)				65-86
	80 mg has the potential to color skin (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) *et al.*, 2019)				32
Bighead catfish *(Clarias macrocephalus)*	75 (Hien *et al.*, 2022)	Defatted larvae	50% (Adeoye *et al.*, 2020)	80	106
Discus fish *(Symphysodon aequifasciata)*	200-300 (Song *et al.*, 2017)	Prepupae	50% (Tu *et al.*, 2022)	80	27-40
Red Tilapia *(Oreochromis niloticus)*	100 (Reis *et al.*, 2018)	Prepupae	50% (Taufek *et al.*, 2021)	80	80

Species	Recommended Daily Intake (mg/day)	Hypothetical BSFL fraction provided in the diet	Daily amount (g) of BSFL needed to provide 100% of RDA	Hypothetical quantity (g) of BSFL consumed per day***	mg of lutein** provided by BSFL incorporated at the maximum proportion	% of the Recommended Daily Intake reached
Human**** (*Homo sapiens sapiens*)	10 (The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research Group, 2013)	Prepupae	62	200	32	320
	Average consumption of lutein in France (mg/day)	Hypothetical BSFL fraction provided in the diet	Quantities of BSFL needed to reach the average consumption of lutein in France (g/day)			
	2.5 (O'Neill *et al.*, 2001)	Prepupae	16			

* In the case of men, these are the quantities recommended to reduce the risk of developing age-related macular degeneration or the quantities usually consumed in France.
**Using the theoretical lutein content of BSFL reared on kale (on a dry weight basis or fresh weight basis).
***Using the average quantity of meat eaten by a person per day (European Commission. Directorate General for Agriculture and Rural Development., 2021).
****BSFL are not currently allowed for human nutrition but might be in the future.

3

Les résultats de cette étude montrent tout d'abord une importante bioaccumulation de lutéine dans les LMSN. En effet, celles-ci contiennent de 2 à 15 fois plus lutéine que dans leurs substrats respectifs. En ce qui concerne la bioaccessibilité de la lutéine provenant des LMSN, selon les substrats d'élevage, elle est significativement non différente ou inférieure à celle des substrats. Au contraire, l'efficacité d'absorption intestinale de la lutéine issue des micelles de digestions *in vitro* de LMSN est significativement supérieure à celle issue des substrats d'élevage. Enfin, en prenant en compte tous ces paramètres, il a été possible d'estimer la quantité de lutéine qui pourrait être absorbée par l'organisme si on consommait des quantités équivalentes de LMSN enrichies en lutéine ou les substrats végétaux ayant servis à enrichir ces larves. Ainsi, consommer une quantité donnée de LMSN élevées sur du chou Kale apporterait environ 13 fois plus de lutéine que consommer la même quantité de chou Kale.

Ainsi, des LMSN enrichies en lutéine représentent une véritable opportunité pour la nutrition avicole puisque nous avons pu calculer que, pour l'alimentation des poulets, le remplacement d'un quart de leur régime alimentaire par des LMSN élevées sur chou kale apporterait 32 à 86% des quantités recommandées pour colorer la chair et le jaune d'œuf des poulets en jaune.

Chapitre 3 : Bioaccumulation, bioaccessibilité et efficacité d'absorption intestinale de la vitamine E dans les larves de mouche soldat noire

Certaines études avaient déjà quantifié la VE dans les LMSN (*107*, *468*) et avaient montré que sa concentration pouvait être modulée selon leur substrat d'élevage (*28*). Néanmoins ces études n'étaient pas dédiées à l'étude de la bioaccumulation de la VE par ces larves, elles n'ont pas comparé la bioaccumulation quand cette vitamine était apportée par différents substrats riches en VE et n'ont bien sûr pas étudié la biodisponibilité de cette vitamine dans les larves. Notre but dans cette étude était donc de répondre à ces interrogations. Pour cette étude, nous avons utilisé les mêmes approches que pour les études précédentes et nous avons donc élevé les LMSN sur des substrats riches en VE. Du fait de la diversité des sources alimentaires riches en VE et de notre volonté d'utiliser des substrats riches en α et en ɣ-TOC, les substrats employés pour l'élevage de LMSN étaient très diversifiés allant d'huiles végétales à des co-produits comme les tourteaux, issus de l'extraction des huiles, ou encore des sons.

La supplémentation en VE dans l'alimentation animale est essentielle quand les aliments n'en contiennent pas suffisamment. Cette vitamine a de nombreux bienfaits pour les animaux d'élevage, e.g. soutien du système immunitaire, santé reproductive, croissance musculaire. Les aliments pour animaux d'élevage sont aussi enrichis en VE pour améliorer la qualité de la viande. En effet, de par ses propriétés antioxydantes elle contribue à prévenir l'oxydation des graisses dans les tissus musculaires, ce qui permet de préserver la couleur, la saveur et la tendreté de la viande (*272*, *478*, *479*). Enfin, et comme dit précédemment pour la VA et la lutéine, augmenter la teneur en VE des animaux d'élevage, via des LMSN enrichies en cette vitamine, pourrait indirectement augmenter les apports en cette vitamine chez l'Homme qui consommerait les produits alimentaires issus de ces animaux.

BRILL
WAGENINGEN
ACADEMIC

JOURNAL OF INSECTS AS FOOD AND FEED (2023) DOI:10.1163/23524588-20230183B

Journal of Insects as Food and Feed
brill.com/jiff

RESEARCH ARTICLE

Ability of black soldier fly larvae to bioaccumulate tocopherols from different substrates and measurement of larval tocopherol bioavailability *in vitro*

*L. Morand-Laffargue[1], D. Vairo[1], C. Halimi[1], E. Chiarello[2], B. Creton[3], D. Sabatier[3] and P. Borel[1]**

[1]UMR C2VN "Center for CardioVascular and Nutrition Research of Marseille", Faculté de Médecine, INRAE, Aix-Marseille Univ, INSERM, 27, boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France; [2]Department of Agri-Food Sciences and Technologies (DISTAL), University of Bologna, 47521 Cesena, Italy; [3]BioMiMetiC, 13150 Boulbon, France; *patrick.borel@univ-amu.fr

Received 18 August 2023 | Accepted 20 October 2023 | Published online 14 November 2023

Abstract

Edible insects are an emerging approach to provide sustainable proteins in feed. Black soldier fly larvae (BSFL) can also bioaccumulate micronutrients from various substrates. The purpose of this study was to assess whether BSFL can bioaccumulate significant concentrations of bioavailable α and γ-tocopherol (TOC) from vitamin E (VE) rich substrates. BSFL were reared on VE rich substrates, e.g. wheat germ oil, bran, etc. α and γ-tocopherol were quantified in larvae and substrates by HPLC. VE bioaccessibility was estimated using an *in vitro* model of digestion. Uptake efficiency of micellarized VE by intestinal cell was estimated using Caco-2 cells. BSFL were at least as rich in α-TOC, but not γ-TOC, as their rearing substrates. VE bioaccessibility was almost always significantly lower in BSFL than in corresponding substrates. Conversely, VE uptake efficiency was either not significantly different or significantly higher in BSFLs than in substrates. Thus, VE enrichment of BSFL from VE rich substrates, in particular co-products such as brans and oil cakes, could be an innovative way to recycle VE and to provide significant amounts of sustainable VE in farm animal feed.

Keywords

bioaccessibility – co-products – insect – tocopherol

1 Introduction

Vitamin E (VE) is a vital micronutrient that plays an important role in the health and well-being of both humans and animals. It is a powerful antioxidant that helps to protect cells from damages caused by free radicals and oxidative stress. In addition, it is important for immune function, vision, reproduction, and skin health. In human it is supposed to play a preventive role with respect to cardiovascular risk, immunomodulation, neuroprotection and hepatoprotection (Fata *et al.*, 2014; Galli *et al.*, 2017; Gupta and Suh, 2016; Sozen *et al.*, 2019). When it comes to animal nutrition, it is particularly important for livestock, poultry, and aquaculture. In livestock, VE supplementation can improve fertility, reduce the incidence of mastitis in dairy cows (Politis, 2012), and enhance the immune response (Pinelli-Saavedra, 2003). It can also improve meat quality by reducing lipid oxidation (Monahan *et al.*, 1992; Rey *et al.*, 2001) which can result in a longer shelf life and

Published with license by Koninklijke Brill NV | DOI: 10.1163/23524588-20230183B
© L. MORAND-LAFFARGUE *ET AL.*, 2023 | ISSN: 2352-4588 (online)

improved flavor. In poultry, it is important for immune function, reproductive performance (Surai, 1999), and egg quality (Cherian *et al.*, 1996). It is particularly important in aquaculture systems where fish and shrimp are fed diets high in polyunsaturated fatty acids, which are prone to oxidation. In addition to its benefits for animal health, VE is also important for food production. It is a key ingredient in many food products, including baked goods, cereals, and oils. VE is often added to these products as a natural preservative, as it helps prevent oxidation and spoilage. Overall, the interest of VE for food and feed is clear. It plays a vital role in both human and animals and it has additional interests in food and feed by promoting animal health and productivity and by improving food quality.

VE is a fat-soluble vitamin gathering two families which are the tocopherols (TOCs) (α, β, γ and δ) and the tocotrienols (α, β, γ and δ as well). Nevertheless, the main forms of VE present in our diet are α-and γ-TOCs. The first is the most consumed in Europe while the second is the most consumed in the US (Wagner *et al.*, 2004). One of the primary differences between these two TOCs is their ability to scavenge free radicals. While α-TOC is considered to be the most potent lipid antioxidant in our diet and in our body (Niki, 2014), γ-TOC has been shown to have anti-inflammatory effects that are not observed with α-TOC (Jiang *et al.*, 2000; Jiang, 2014). Therefore, each TOC could be of interest depending on the biological effect targeted.

α and γ-TOCs are mainly found in plant foods containing high concentrations of unsaturated fatty acids, such as nuts, oilseeds and other common edible oils (de Camargo *et al.*, 2019; Shahidi *et al.*, 2021). They are also abundant in the by-products of these plant foods, e.g. in brans and oil cakes. A completely innovative way of adding VE to farm animal feed could be to provide it via edible insects containing significant amounts of this vitamin. An advantage of this new way of providing this vitamin would be to provide a more sustainable form of this vitamin and to be able to recycle in the food chain VE that would be lost in waste or co-products rich in this vitamin and little or not used. Among the edible insects used in animal feed, the black soldier fly (BSF, *Hermetia Illucens*) is of particular interest. It has the ability to grow on a wide variety of organic substrates and it has been shown that it can bioaccumulate high concentrations of another fat-soluble vitamin, i.e. provitamin A (Borel *et al.*, 2021). It is therefore a perfect candidate for testing the possibility of having a larva enriched in this vitamin by cultivating it on substrates rich in this vitamin but which can be very different, e.g. vegetable oils, bran and oil cakes.

Although it has already been shown that BSF larvae (BSFL) contain α-TOC (Finke, 2013; Liu *et al.*, 2017; Shumo *et al.*, 2019), and can be enriched with α-TOC if it is added to their diet (Liland *et al.*, 2017; Oonincx and Finke, 2021), it is not known whether there is an effect of the substrate matrix in which VE is provided to the larvae on the efficiency of the larvae to bioaccumulate this vitamin. It is also not known if the larvae have the same capacity to bioaccumulate α and γ-TOC and if these two forms of VE are bioavailable when they are incorporated into the insect matrix. To answer these many questions, we first raised different groups of BSFL on substrates rich in α and/or γ-TOC. Then, the concentrations of these two forms of VE were measured and compared in the larvae and in substrates they were reared on. Finally, by using an *in-vitro* digestion model coupled with Caco-2 cell monolayers, we compared the bioaccessibility and intestinal cell uptake efficiency of these two forms of VE whether they came from the larval matrix or from the rearing substrate matrix.

2 Material and methods

Chemicals

Ethanol, *n*-hexane and methanol were purchased from Carlo Erba reagents (Peypin, France). The TOC standards used to identify and quantify TOCs by HPLC, i.e. DL-all-rac-α-TOC and (RRR)-γ-TOC (HPLC purity ≥ 96%), the internal standard used to calculate extraction yield, i.e. retinyl acetate, and the enzymes and the chemicals used for the *in vitro* digestions were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). For cell culture, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), non-essential amino acids, penicillin/streptomycin, and phosphate-buffered saline (PBS) were purchased from Life Technologies (Villebon-sur-Yvette, France). Finally, fetal bovine serum (FBS) was from PAA (Vélizy-Villacoublay, France).

Experimental food

We first chose a series of substrates among the richest in α and/or γ-TOC according to food tables and data from the literature (Table 1). Then we chose co-products rich in these two forms of VE because we had put forward the hypothesis that these co-products could be valorized via their VE supply for the larvae. This led us to work on a total of 10 vitamin E-rich

TABLE 1 Amount of α and γ-TOC (mg/kg) in the rearing substrates selected in the study

	α-TOC	γ-TOC	Source
Rapeseed oil	181.0	383.5	(Wen *et al.*, 2020)
	189-240	370-510	(de Camargo *et al.*, 2019)
	202.9 ± 38.5	131.6 ± 24.2	Measured in this study
Corn oil	180-257	440-752	(de Camargo *et al.*, 2019)
	183.9	623.9	(Wen *et al.*, 2020)
	208.9 ± 27.0	339.9 ± 25.6	Measured in this study
Rice bran oil	151.8	64.4	(Wen *et al.*, 2020)
	7.3-159	2.6-80	(de Camargo *et al.*, 2019)
	91.2 ± 4.1	24.9 ± 2.7	Measured in this study
Wheat germ oil	1510-1920	traces – 523	(de Camargo *et al.*, 2019)
	1622.4	912.6	(Kumar and Krishna, 2015)
	1166.6 ± 343.0	152.9 ± 49.2	Measured in this study
Brewer's spent grain (BSG)	8.8-11.0*	1.4-4.6*	(Badea *et al.*, 2018)
	1.7	3.6	(Bouillon, 2016)
	0.6 ± 0.05	0.2 ± 0.05	Measured in this study
Corn oil cake	12.9 ± 0.7	25.4 ± 1.5	Measured in this study
Poultry feed	7.0 ± 2.8	6.9 ± 1.3	Measured in this study
Rice bran	7-55*	4-23*	(Górnaś *et al.*, 2016)
	26.4-35.0*	20.9-41.0*	(Aguilar-Garcia *et al.*, 2007)
	27.4 ± 7.9	1.1 ± 0.2	Measured in this study
Turnip rapeseed cake	6.6 ± 0.3	12.6 ± 2.0	Measured in this study
Wheat bran	6-31*	0-1*	(Górnaś *et al.*, 2016)
	1.3-21.3*	0.9-6.9*	(Zhou *et al.*, 2004)
	n.d.	0.1 ± 0.02	Measured in this study
Mushrooms	0.75 ± 0.04	n.d.	(Barros *et al.*, 2008)
	n.d.*	n.d.*	(Glamočlija *et al.*, 2015)
	n.d.	n.d.	Measured in this study

Data are means ± SD. n.d. = not detected.
Data are expressed in fresh weight except when there is an asterisk which means that they are expressed in dry weight.

substrates, and more specifically on two main types of different substrates, oils, e.g. corn oil, and solid substrates, e.g. rice bran. Some of these substrates, wheat germ oil (Emile Noel, Pont-Saint-Esprit, France), corn oil (La Tourangelle, Allonnes, France), rice bran oil (Saldac, Montélimar, France), rice bran (Moulin Des Moines, Krautwiller, France) and wheat bran (Priméal, Peaugres, France) were ordered via the internet. The brewer's spent grains were a kind gift from a local brewery (Brasserie de la Plaine, Marseille, France). The turnip rapeseed and corn oil cakes came from a local producer (Moulin Giraud, Ozan, France). Poultry feed (broiler grower, Evialis, Vedène, France) was provided by BioMiMetiC (Boulbon, France) that used it to rear their BSFL and thus which was considered as a positive control. The other rearing substrates, i.e. rapeseed oil and white mushrooms (which were used as a negative control because they do not contain detectable amount of α and γ-TOC), as well as foods used in the *in vitro* digestion experiments, i.e. potatoes, minced beef meat (with 5% of fat) and olive oil, were bought from local supermarkets.

BSFL farming

As mentioned above, the BSFL were reared on either oils or solid substrates. As the larvae could not be reared in oil we previously mixed the studied vegetable oils with hydrated standard poultry feed to reach 10% of the total mass. For the by-products, only brewer's spent grains did not need to be hydrated with water. The other substrates

were hydrated so that the relative humidity ranged from 60 to 70%, the ideal relative humidity for BSFL growth (Dzepe *et al.*, 2020). The rearing procedure was carried out at the BioMiMetiC company in Boulbon (France) as was described in detail in one of our previous studies (Borel *et al.*, 2021). Following a 5-day fasting period, the larvae were collected and stored at −80 °C.

Assessment of the bioaccessibility of VE in rearing substrates and BSFL

Before the experiment, 2 g of substrate or larva sample was ground with liquid nitrogen in a mortar grinder (Pulverisette 2, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Germany). The bioaccessibility of α and γ-TOC was measured using an *in vitro* digestion model, as was described in detail in one of our previous studies (Borel *et al.*, 2021). Briefly, samples were mixed with 6.7 g mashed potato, 1.2 g minced meat and 200 mg olive oil. The mixture was homogenized for 10 min at 37 °C in a rotary incubator (190 rpm) before adding 2.5 mL of artificial saliva and the mixture was once again incubated 10 min at 37 °C. After adjusting the pH to 4 ± 0.02, 2 mL pepsin were added to the mixture before incubation during 30 min. Then, pH was adjusted to 6 ± 0.02 prior to the addition of 9 mL pancreatin-bile extract solution and 4 mL bile solution. The mixture was then incubated for 30 minutes and the digestate aliquots were collected. The remaining mixture was centrifuged at 1,860 × *g* for 1 h 12 min at 10 °C. Aliquots of filtered supernatant, containing the mixed micelles were stored at 80 °C until lipid extraction and quantification of vitamin E by HPLC.

Cell culture of Caco-2 and method for measuring the efficiency of uptake of VE by these cells

The cell culture protocol, as well as the cytotoxicity assay were the same as previously described (Morand-Laffargue *et al.*, 2023). Regarding the measurement of the uptake efficiency of VE from the micellar fraction by Caco-2 clone TC7 cells, 1.5 mL of the micellar fractions obtained at the end of the *in vitro* digestion, previously diluted 5 times with DMEM to avoid the toxicity of bile salts towards the cells, were added on the cells. Solutions containing micellarized VE were incubated for 4 hours (Liu *et al.*, 2004) at 37 °C.

VE extraction

For the rearing substrates and the BSFL, 250 mg of samples finely ground with liquid nitrogen in a mortar grinder (Pulverisette 2, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Germany) were first homogenized in 250 µL of distilled water and 500 µL of an ethanol solution containing retinyl acetate (as internal standard) at a concentration of 0.4 mg/L. In the case of *in vitro* digestion samples, i.e. digestates and mixed micelles, and for the recovered medium and scrapped cells, 500 µL were added to 500 µL of the same internal standard solution. Then a double extraction with hexane was performed as described previously (Borel *et al.*, 2021). Finally, the dry film was resolubilized in 200 to 2,000 µL of methanol, based on the theoretical VE concentration of the sample.

VE quantification

The resolubilized extracts rich in VE were injected, the same day of their extraction, into the HPLC system. After an initial injection, injection volumes were adjusted to obtain signals within the calibration range. Injection volumes of 50 to 100 µL for BSFL and rearing substrate samples, 25 to 50 µL for digestate samples, 50 to 100 µL for micellar fractions and 180 µL for recovered apical cell medium as well as scrapped cells were injected into the HPLC system. All the analyses were performed using a 250 × 4.6 nm ZORBAX Eclipse XDB-C18 5-µm column and the corresponding analytical guard column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The column was maintained at a constant temperature (40 °C). VE analysis was conducted with a 100% methanol mobile phase and flow rate was 1.5 mL/min.

The HPLC system included an UltiMate 3000 system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) and a fluorimetric detector. For fluorimetric analysis of TOCs, detection was set at 292 nm (excitation) and 325 nm (emission). Quantification was performed using Chromeleon software comparing peak area with the curves of the TOC standards.

Calculations

VE bioaccessibility and uptake efficiency were calculated as:

Bioaccessibility (%):

$$\frac{\text{amount of } \alpha \text{ or } \gamma \text{ TOC recovered in mixed micelles}}{\text{amount of } \alpha \text{ or } \gamma \text{ TOC recovered from the digesta}}$$

Uptake efficiency (%):

$$\frac{\text{(amount of } \alpha \text{ or } \gamma \text{ TOC recovered in cells)}}{\text{((amount of } \alpha \text{ or } \gamma \text{ TOC recovered in cells)} + \text{(amount of } \alpha \text{ or } \gamma \text{ TOC in apical medium))}}$$

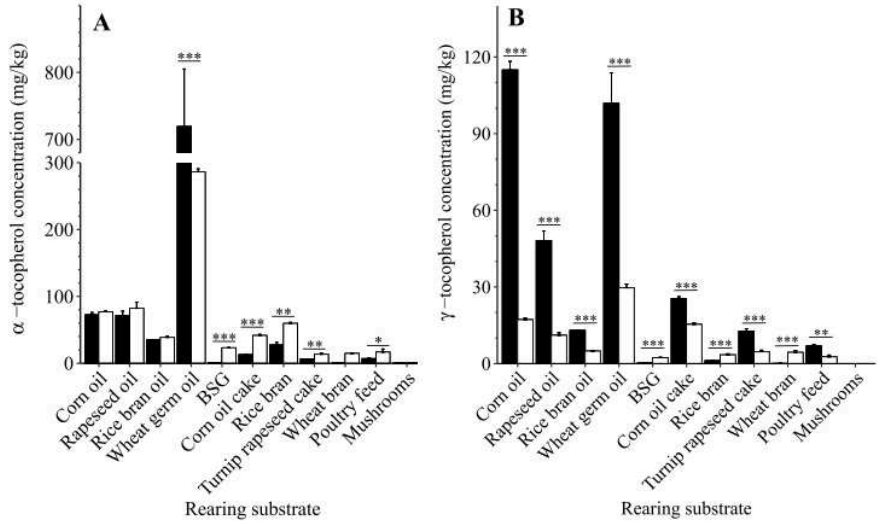


FIGURE 1 **VE concentrations in rearing substrates and in larvae (mg/kg fresh weight).** (■): rearing substrates, (□): larvae. **A:** α-TOC **B:** γ-TOC. Bars represent mean ± SEM (n = 4). An asterisk means that concentrations are significantly different between the larvae and the corresponding substrate (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests). BSG: Brewer's spent grains.

Statistics

Results are expressed as means ± SD or SEM. The homogeneity of variances ($P > 0.05$) was assessed by the Levene's test. In the case of variance heterogeneity, the data were log-transformed. Departures from normality were assessed using Q-Q plots of standardized residuals. Differences between groups were tested using several two-way ANOVA. When a significant effect of either the substrate matrix or the insect matrix was found by ANOVA, the comparison of means between the two matrices was carried out by pairwise comparisons using bilateral t-tests, with a Bonferroni adjustment. To compare the bioaccessibility of VE among the substrate groups or among the larval groups and to compare the VE amount in the micelles of larvae reared on the different substrates, one-way ANOVA were performed. Tukey-Kramer's test was used as a post hoc test for pairwise comparisons. Pearson's correlation coefficients were calculated with 95% confidence intervals (CI) to assess possible correlations between certain variables. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using R version 4.1.1 for Windows (R Core Team, 2021). The different ANOVA were performed using the "anova_test" function in the rstatix package v.0.7.2.

3 Results

Concentrations of α- and γ-TOC in VE rich substrates and in larvae reared on these substrates

Figure 1 shows the different concentrations of α- (Figure 1A) and γ-TOC (Figure 1B), on a fresh weight basis, in substrates rich in these compounds and in BSFL reared on these substrates. Firstly, note that both the mushrooms and the larvae reared on this substrate did not contain detectable amounts of α- and γ-TOC. Looking at the graphs from left to right, we first see that for the corn oil, rapeseed oil and rice bran oil groups, α-TOC concentrations were not significantly different ($P > 0.3$) between the substrates and the larvae (72.4 ± 3.5, 71.7 ± 6.3 and 34.9 ± 0.5 mg/kg versus 76.9 ± 1.9, 82.1 ± 9.2 and 38.7 ± 1.6 mg/kg, respectively). Conversely, for the same groups, γ-TOC concentrations were significantly ($P < 0.001$) lower in the larvae than in the substrates (17.2 ± 0.6, 11.1 ± 1.0 and 4.9 ± 0.2 mg/kg versus 114.9 ± 3.3, 48.1 ± 3.4 and 13.0 ± 0.3 mg/kg, respectively). The α- and γ-TOC concentrations of the wheat germ oil substrate (719.1 ± 86.1 and 101.8 ± 12.0 mg/kg, respectively) were significantly ($P < 0.001$) higher than those of the larvae reared on this substrate (286.1 ± 4.6 and 29.6 ± 1.4 mg/kg, respectively). Larvae reared on brewer's spent grains (BSG) contained significantly ($P < 0.001$) more α- (23.2 ± 0.3 mg/kg) and γ-TOC (2.3 ± 0.2 mg/kg) than the brewer's spent grains (0.6 ± 0.02 and 0.2 ± 0.02 mg/kg, respectively). The α-TOC concentrations of corn oil cake and turnip rapeseed cake (12.9 ± 0.4 and 6.6 ± 0.1 mg/kg, respectively) were significantly lower than those of lar-

vae reared on these cakes (41.5 ± 1.7 and 13.4 ± 1.7 mg/kg, respectively). However, the opposite was observed for the γ-TOC concentration, since corn oil cake (25.4 ± 1.7 mg/kg) and turnip rapeseed cake (12.6 ± 1.0 mg/kg) contained significantly ($P < 0.001$) more γ-TOC than the larvae reared on these cakes (15.3 ± 0.8 and 4.6 ± 0.6 mg/kg, respectively). Larvae reared on rice bran (59.6 ± 1.7 mg/kg) contained significantly ($P < 0.001$) more α-TOC than rice bran (27.4 ± 4.0 mg/kg). The concentration of α-TOC in wheat bran was not detectable but the concentration in wheat bran fed larvae was 4.4 ± 0.7 mg/kg. The γ-TOC concentrations of rice (1.1 ± 0.1 mg/kg) and wheat (0.1 ± 0.01 mg/kg) brans were significantly lower than those of larvae fed the same brans (3.4 ± 0.4 and 4.4 ± 0.7 mg/kg, respectively). The poultry feed contained significantly more γ-TOC but less α-TOC than the larvae that consumed it (for γ-TOC: 6.9 ± 0.6 versus 2.6 ± 0.7 mg/kg, respectively, and for α-TOC: 7.0 ± 1.4 versus 16.7 ± 4.8 mg/kg, respectively). Finally, positive correlations have been highlighted between the α-TOC and γ-TOC concentrations of the substrates and those of the BSFL (Pearson's correlation coefficients = +0.98 (CIr (95% Confidence Interval of r): [0.91-0.99]) and +0.85 (CIr: [0.47-0.96]), respectively, $P < 0.01$). Supplementary Figure S1A and B show α-TOC and γ-TOC concentrations on a dry weight basis.

Bioaccessibility of α- and γ-TOC from VE rich substrates and larvae reared on these substrates

Tables 2A and 2B, respectively, represent the bioaccessibility of α- and γ-TOC from the selected substrates and from the larvae fed on these substrates. Three types of comparisons are available: comparison of the bioaccessibility of each form of VE in different substrates, comparison of the bioaccessibility of each form of VE in larvae reared on different substrates, and comparison of the bioaccessibility of each form of VE when present in larvae versus when present in their corresponding substrate.

The first comparison shows that the bioaccessibility of these two forms of VE was significantly different between certain substrates. The maximum amplitude being 7 times for α-TOC (wheat bran vs corn oil), and 14 times for ɣ-TOC (rice bran vs corn oil). It is also interesting to note that the bioaccessibility of these two forms of VE was the highest in rice bran and wheat bran, and the lowest in oils, with the exception of wheat germ oil.

The comparison of the bioaccessibility of the two forms of VE in the larvae also shows significant differences. The maximum amplitude being about 35 times for α-TOC (larvae reared on rice bran vs larvae reared on corn oil), and 36 times for ɣ-TOC (larvae reared on rice bran vs larvae reared on corn oil as well).

The last comparison is that of the bioaccessibility of VE when it was present in the larvae and in their corresponding substrates. A striking overall observation is that the bioaccessibility of α and ɣ-TOC in the larvae was almost always significantly lower in the larvae than in their corresponding substrates, with an amplitude of up to about 34 times for α-TOC provided in wheat germ, and up to about 11 times for ɣ-TOC provide in wheat germ as well. There are however two exceptions: the turnip rapeseed cake for which the bioaccessibility of the two forms of VE was not significantly different between the larvae and the substrate, and the corn oil cake for which the bioaccessibility of the two forms of VE was significantly higher in the larvae than in the substrate.

Uptake efficiency of micellarized VE by Caco-2 cells

Table 3 shows the absorption efficiency of α- and γ-TOC contained in the mixed micelle fractions which were obtained after the *in vitro* digestions. The absorption efficiency of α-TOC from micelles of larvae reared on wheat germ oil was about twice as high as that from micelles from this substrate. In the case of rice bran, the absorption efficiency of α-TOC from micelles of larvae was not significantly different from that of the substrate. The absorption efficiencies of γ-TOC from *in vitro* digestions of larvae reared on wheat germ oil or rice bran were not significantly different from their corresponding substrates, but note that the means were higher in larvae than in the substrates (about +50%).

Figure 2 shows the VE amount absorbed by the Caco-2 cells on a fresh weight basis. This value is of great interest to compare the theoretical amount of VE that each matrix can bring to the intestinal cell because, in addition to considering the cell uptake efficiency, it also considers the bioaccessibility of VE in the substrate or the larvae. The cellular amount of VE after digestion and cell uptake of micelles from wheat germ oil was significantly higher than that of larvae reared on wheat germ oil (for α-TOC (Figure 2A), 30.3 ± 7.8 μg and 3.3 ± 0.5 μg, respectively, and for γ-TOC (Figure 2B) 3.7 ± 1.2 μg and 0.2 ± 0.04 μg, respectively). Conversely to what was observed for wheat germ oil, cells incubated with micelles from digestion of larvae reared on rice bran had higher concentrations of α and ɣ-TOC than cells incubated with micelles from digestion of rice bran, although this was not significantly different ($P = 0.08$ for α-TOC and $P = 0.3$ for ɣ-TOC). Supplemen-

TABLE 2A Bioaccessibility of α-TOC[1] from larvae and their corresponding rearing substrates

Substrate	Bioaccess in substrates	Bioaccess in larvae	*P*-value**
Corn oil	8.8 ± 2.1^{d}	1.3 ± 0.4^{c}	0.002
Rapeseed oil	16.6 ± 5.3^{cd}	1.4 ± 0.3^{c}	<0.001
Rice bran oil	9.2 ± 2.3^{d}	1.7 ± 0.4^{c}	0.003
Wheat germ oil	58.1 ± 6.9^{a}	1.7 ± 0.1^{c}	<0.001
Brewers' spent grain	21.2 ± 3.6^{bc}	2.2 ± 0.6^{c}	<0.001
Corn oil cake	28.9 ± 1.9^{ac}	41.0 ± 0.9^{a}	0.002
Rice bran	59.7 ± 0.8^{a}	45.1 ± 3.5^{a}	0.008
Turnip rapeseed cake	42.4 ± 4.1^{ab}	37.1 ± 5.1^{a}	0.4
Wheat bran	61.9 ± 1.0^{a}	7.6 ± 0.2^{b}	<0.001
Poultry feed	40.6 ± 8.5^{ab}	18.6 ± 2.0^{ab}	0.02

[1]Percent of α-TOC recovered in the micelle fraction relative to the quantity of these compounds found in the digestate at the end of the *in vitro* digestion. Values are means ± SEM (n = 4). **P*-value of a two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests. In each column, means that bear different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's HSD test).

TABLE 2B Bioaccessibility of γ-TOC[1] from larvae and their corresponding rearing substrates

Substrate	Bioaccess in substrates	Bioaccess in larvae	*P*-value**
Corn oil	3.6 ± 0.5^{c}	1.3 ± 0.4^{f}	0.009
Rapeseed oil	5.3 ± 1.4^{c}	1.8 ± 0.4^{ef}	0.01
Rice bran oil	5.3 ± 0.7^{c}	2.9 ± 0.4^{de}	0.02
Wheat germ oil	25.1 ± 4.2^{b}	2.2 ± 0.4^{ef}	<0.001
Brewers' spent grain	16.8 ± 2.6^{b}	2.6 ± 0.7^{df}	0.002
Corn oil cake	26.4 ± 2.1^{ab}	38.2 ± 1.9^{ab}	0.009
Rice bran	52.0 ± 1.3^{a}	46.9 ± 3.6^{ab}	0.2
Turnip rapeseed cake	36.0 ± 2.7^{ab}	37.0 ± 5.1^{a}	1.0
Wheat bran	49.1 ± 1.6^{ab}	8.2 ± 0.3^{c}	<0.001
Poultry feed	36.9 ± 7.3^{ab}	19.0 ± 1.8^{bc}	0.04

[1]Percent of γ-TOC recovered in the micelle fraction relative to the quantity of these compounds found in the digestate at the end of the *in vitro* digestion. Values are means ± SEM (n = 4). **P*-value of a two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests. In each column, means that bear different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's HSD test).

tary Figure S2A and B show α-TOC and γ-TOC cellular concentrations on a dry weight basis.

4 Discussion

The first objective of this study was to assess the ability of BSFL to bioaccumulate α- and γ-TOC from substrates rich in these compounds but made up of very different matrices (de Camargo *et al.*, 2019; Franke *et al.*, 2010; Shahidi *et al.*, 2021). Indeed, these substrates were either solid, e.g. bran or cake, or liquid, i.e. vegetable oils. The first interesting result of this study is the fact that when BSFL were grown on white mushrooms, they did not contain VE. This result not only suggests that BSFL reared on a substrate without VE can apparently grow like larvae that have access to VE, but also shows that BSFL do not have the ability to synthesize VE. With regard to the substrates rich in VE, the first observation is that the contents of α and ɣ-TOC that we measured agreed with the data in the literature, except in wheat bran where we found no α-TOC and a very low concentration of ɣ-TOC compared to what has been reported in the literature (Table 1). This suggests that our extraction protocol was not adapted for this substrate. Regarding α-TOC concentrations measured in the BSFL, they differed strongly depending on the rearing substrate, since they ranged from 18.1 ± 2.3 mg/kg for BSFL reared on turnip rapeseed cake to 286.1 ± 4.6 mg/kg for BSFL reared on wheat germ oil. This very high concentration, which

TABLE 3 VE uptake efficiency (%) by Caco-2 cells[1]

	Micellar fraction from rearing substrate digestion	Micellar fraction from larva digestion	Substrate vs larvae comparison **P-value
α-TOC			
Wheat germ oil	16.2 ± 2.1	34.2 ± 3.6	0.005
Rice bran	24.1 ± 1.3	28.8 ± 3.8	0.29
γ-TOC			
Wheat germ oil	12.4 ± 2.3	19.7 ± 5.0	n.s***
Rice bran	20.3 ± 2.0	30.1 ± 5.6	n.s

[1]Percentage of α- or γ-TOC that was recovered in the Caco-2 cells relative to the quantity of these compounds in the mixed micelle-rich fractions deposited on the cells before incubation for 4 hours at 37 °C. Values are means ± SEM (n = 4). **For α-TOC, p-value of a two-way ANOVA followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests. ***For γ-TOC, the result of the two-way ANOVA was non-significant (P = 0.7) thus post-hoc tests were not carried out.

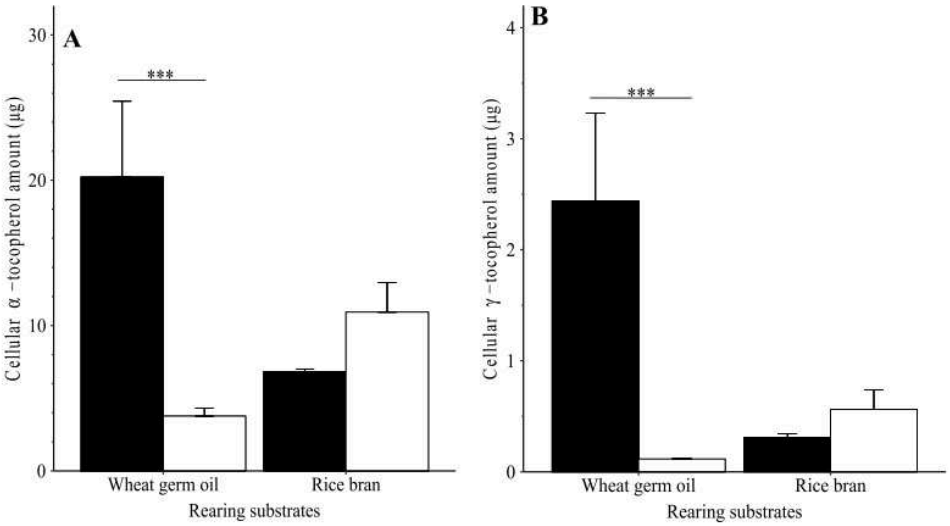


FIGURE 2 Amounts of VE taken up by Caco-2 cells incubated with micelle-rich fractions obtained after *in vitro* digestions of rearing substrates or larvae. These amounts are expressed in µg α- or γ-TOC found in the cellular compartment of each well after a fraction rich in micelles corresponding to the digestion of 1 g of substrate or larvae (expressed in fresh weight) had been deposited on the cells. (■): rearing substrates, (□): larvae. **A**: α-TOC. **B**: γ-TOC. Bars represent mean ± SEM (n = 4). An asterisk means that the amount of VE are significantly different between the larvae and the corresponding substrate (***: $p < 0.001$, two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests).

is moreover largely higher than the α-TOC concentration of all the VE-rich substrates, with the exception of wheat germ, has never been observed. Indeed, what has been reported in whole larvae is 9.6 mg/kg if reared on chicken manure and 19.3 mg/kg if reared on spent grain (Shumo *et al.*, 2019).

If we now compare the concentrations of α-TOC in the larvae and in the substrates on which they were raised, we see that they are always higher in the larvae than in the substrates, sometimes significantly, with the exception of the larvae raised on the wheat germ oil. To explain this exception, we hypothesize that the very high amount of α-TOC provided by wheat germ oil led the larvae to reach the maximum concentration of α-TOC they can reach. Concerning γ-TOC, what was immediately striking was that the concentrations in the larvae are, 7 times out of 10, lower than in their corresponding substrate. In fact, it is likely that the result should have been the same with the 3 other substrates, made of bran, because we deduced that our method of extracting the two VE species from these substrates was not very effective which must have led to underestimating their VE content. To support this hypothesis, we rely on the results of bioaccessibility which show that we can detect α and ɣ-TOC in the micelles resulting from the digestion of wheat bran (Table 2) whereas we do not detect α-TOC, and we detect very low concentration of ɣ-TOC, in wheat bran when we

have extracted this substrate with organic solvents (Figure 1), even though wheat bran contains both forms of VE (Table 1). This difference in bioaccumulation of these two forms of VE in BSFL is quite remarkable. The most likely hypothesis is that, as has been described in Drosophila, which is a dipteran like BSF, this is due to a preferential degradation of ɣ-TOC, as compared to α-TOC, by cytochrome P450 TOC-ω-hydroxylase (Parker and McCormick, 2005). If this hypothesis is true, this suggests that α-TOC has an essential function in the BSF and that it is important to provide it in its diet during its breeding, as is the case for other production animals.

After demonstrating that larvae can bioaccumulate very high concentrations of α-TOC and that they can also be enriched in ɣ-TOC, the question arose of the bioavailability of these two forms of VE in the insect matrix. The first key step in the bioavailability of lipid molecules is their incorporation into the micelles during digestion. The rate of incorporation is called bioaccessibility. When we look at Table 2 we can clearly see that, with one exception which is corn oil cake, the bioaccessibility of the two forms of VE was significantly lower when they were in the insect matrix than when they were in the plant matrix. We do not know the mechanism but we can propose two hypotheses. The first is that, as the insect's cuticle/exoskeleton contains a variety of compounds, e.g. chitin, proteins and lipids (Kramer *et al.*, 1995), it is possible that a fraction of the VE was associated with one or several of these compounds and is therefore not bioaccessible. The second hypothesis, knowing that all these substrates contain not only VE but also phytosterols, which are well known to inhibit the micellization of cholesterol and fat-soluble vitamins (Fardet *et al.*, 2017), is that the phytosterols have strongly bioaccumulated in the larvae and/or are much more bioaccessible in the larvae than in their corresponding substrates. This effect of phytosterols could also explain why the bioaccessibility of VE in the oils was significantly lower than in the solid matrices. It can indeed be assumed that the bioaccessibility of phytosterols present in oils is greater than that of these compounds when they are present in plant matrices in which they can interact with dietary fibers. These hypotheses obviously need to be verified by dedicated studies.

Bioaccessibility gives an idea of the extractability of a bioactive from a matrix in which it is present. But, from a nutritional point of view, it is important to consider both this parameter and the content of bioactive of interest in the matrix. It is therefore relevant to compare the VE concentrations in the micelles which come from the digestions of the larvae having been reared on the different substrates (Supplementary Figures S3 and S4). This comparison clearly shows that the larvae which give the highest amount of α and ɣ-TOC in micelles are the two cakes, the rice bran and the chicken feed, substrates which were not the richest in VE.

The amount of VE in micelles is obviously a very important parameter of bioavailability, but we know that everything that is present in micelles is not necessarily absorbed by the intestinal cells, or it can be absorbed and then resecreted in the digestive lumen and is therefore not bioavailable to the body, as is the case for phytosterols (Ling and Jones, 1995). To get a better idea of what the *in vivo* bioavailability might be it is therefore essential to measure the absorption efficiency of VE present in micelles. And that's what was done with the Caco-2 model by choosing the oil and the solid substrate giving the greatest amount of α-TOC in the micelles (Table 3). When we look at this table we see that the only significant difference was that the VE uptake efficiency was twice as high from the micelles resulting from the digestion of larvae reared on the substrate containing wheat germ oil than from the micelles resulting from the digestion of this same substrate. Unfortunately, we do not have a solid hypothesis to explain this difference. But what is important from a nutritional point of view is the quantity of VE which is found in the cells, i.e. which is actually bioavailable. This quantity depends on the absorption efficiency by the cells but also on the amount of VE present in the micelles. When we look at these data (Figure 2A and B) we can clearly see that the amounts of VE found in the cells which have been incubated with micelles from the digestion of larvae which have been reared on the substrate containing wheat germ oil was 3 to 4 times lower than the amount of VE found in cells that were incubated with micelles from larvae reared on rice bran. This suggests that rice bran is a better source of bioavailable VE than wheat germ oil, although the latter was the richest source of VE among all the studied substrates.

Finally, in order to get an overview of the capacity of VE-rich BSFL to be used in the animal feed industry as a significant source of VE, the amount of VE that could potentially be provided by VE-rich BSFL to different livestock was calculated according to the VE needs of the different animal species and to the recommended quantities of BSFL that are usually incorporated in their diet (Table 4). This table suggests that these vitamin-rich larvae would be of particular interest in poultry as they could cover all the vitamin requirements of laying hens, broilers and turkeys.

TABLE 4 Proportion of the recommended VE dose that could come from the incorporation of VE-rich larvae in animal feed

Species	VE concentration that was added in the diet (mg/kg)	BSFL fraction provided in the diet	Recommended proportion of the BSFL fraction added in the diet (weight%)	mg of VE* provided by BSFL incorporated at the recommended proportion	VE % provided by BSFL
Broiler chicken (*Gallus gallus domesticus*)	7 (National Research Council, 1994)	Prepupae	15% (Pieterse *et al.*, 2019)	9	128
Laying hens (*Gallus gallus domesticus*)	3 (National Research Council, 1994)	Prepupae	20% (Tahamtani *et al.*, 2021)	12	400
Salmon (*Salmo salar*)	40 (National Research Council, 1993)	Prepupae	50% (Sealey *et al.*, 2011)	30	75
Tilapia (*Oreochromis niloticus*)	40 (National Research Council, 1993)	Prepupae	50% (Taufek *et al.*, 2021)	30	75
Turkey (*Meleagris gallopavo*)	7 (National Research Council, 1994)	Prepupae	50% (Chia *et al.*, 2021)	30	428
Dog (*Canis lupus familiaris*)	20 (National Research Council, 2006)	Partially defatted black soldier fly	20% (Freel *et al.*, 2021)	12	60

*Using the theoretical α-TOC content of BSFL reared on rice bran, the BSFL group that provided the highest amount of α-TOC in micelles.

In conclusion, this study first shows that BSFL can bioaccumulate both α- and γ-TOC from VE-rich substrates. Larvae α-toc concentrations are mostly equal to or higher than those of their rearing substrates. Conversely larvae ɣ-toc concentrations are generally lower than those of their substrates suggesting a different metabolism of these two forms of VE in the larvae. Regarding VE bioaccessibility it was generally lower in the insect matrix than in the corresponding plant matrices. Nevertheless, most BSFL reared on by-products (brans and press oil cakes) contained significant amounts of micellarized VE, which could lead to a sustainable VE valorization of these by-products. Finally, adding VE rich BSFL in the diet of some farm animals could provide a significant proportion of the needs of these animals in this vitamin. The enrichment of larvae with VE could make it possible to recycle part of the VE present in waste or co-products, it would make it possible to provide the natural forms of this vitamin and would increase the economic value of these larvae.

Supplementary material

Supplementary material is available online at: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.24421615

Abbreviations

BSFL	black soldier fly larvae
TOC	tocopherol
VE	vitamin E

Conflicts of interest

BC and DS work in the BioMiMetiC company. This company conducts research and development activities aimed at enhancing the value of entomo-conversion on a wide variety of organic materials generated in the area at all levels of the food value chain. All other authors have no conflict of interest to declare.

Supporting information

The costs of this project were covered equally by the own budget of P. Borel's research team, which came mainly from INRAE endowments, and by the BioMiMetiC company.

For the purpose of Open Access, a CC-BY public copyright licence (Creative Commons – Attribution 4.0 International – CC BY 4.0) has been applied by the authors to the present document and will be applied to all subsequent versions up to the Author Accepted Manuscript arising from this submission.

References

Aguilar-Garcia, C., Gavino, G., Baragaño-Mosqueda, M., Hevia, P. and Gavino, V.C., 2007. Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ-oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. Food Chemistry 102: 1228-1232. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.012

Badea, A., Carter, A., Legge, W.G., Swallow, K., Johnston, S.P. and Izydorczyk, M.S., 2018. Tocols and oil content in whole grain, brewer's spent grain, and pearling fractions of malting, feed, and food barley genotypes. Cereal Chemistry 95: 779-789. https://doi.org/10.1002/cche.10093

Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M. and Ferreira, I.C.F.R., 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. Food and Chemical Toxicology 46: 2742-2747. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.030

Borel, P., Hammaz, F., Morand-Laffargue, L., Creton, B., Halimi, C., Sabatier, D. and Desmarchelier, C., 2021a. Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste as a sustainable dietary source of provitamin a carotenoids. Food Chemistry 359: 129911. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129911

Bouillon, M., 2016. Brewers spent grain: its chemical composition, potential applications and source of value-added products. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31341.82400

Cherian, G., Wolfe, F.W. and Sim, J.S., 1996. Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. Poultry Science 75: 423-431. https://doi.org/10.3382/ps.0750423

Chia, S.Y., Tanga, C., Osuga, I., Alaru, P., Mwangi, D.M., Githinji, M., Dubois, T., Ekesi, S., van Loon, J. and Dicke, M., 2021. Black soldier fly larval meal in feed enhances growth performance, carcass yield and meat quality of finishing pigs. Journal of Insects as Food and Feed 7: 1-16. https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0072

de Camargo, A.C., Franchin, M. and Shahidi, F., 2019. Tocopherols and tocotrienols: sources, analytical methods, and effects in food and biological systems. In: Encyclopedia of food chemistry. Elsevier, pp. 561-570. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22358-5

Dzepe, D., Nana, P., Fotso, A., Tchuinkam, T. and Djouaka, R., 2020. Influence of larval density, substrate moisture content and feedstock ratio on life history traits of black soldier fly larvae. Journal of Insects as Food and Feed 6: 133-140. https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0034

Fardet, A., Morise, A., Kalonji, E., Margaritis, I. and Mariotti, F., 2017. Influence of phytosterol and phytostanol food supplementation on plasma liposoluble vitamins and provitamin a carotenoid levels in humans: an updated review of the evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Taylor & Francis, 57: 1906-1921. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1033611

Fata, G.L., Weber, P. and Mohajeri, M.H., 2014. Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in Alzheimer's disease. Nutrients Multidisciplinary Digital Publishing Institute 6: 5453-5472. https://doi.org/10.3390/nu6125453

Finke, M.D., 2013. Complete nutrient content of four species of feeder insects: nutrient content of feeder insects. Zoo Biology 32: 27-36. https://doi.org/10.1002/zoo.21012

Franke, S., Fröhlich, K., Werner, S., Böhm, V. and Schöne, F., 2010. Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils. European Journal of Lipid Science and Technology 112: 1122-1129. https://doi.org/10.1002/ejlt.20090025

Freel, T.A., McComb, A. and Koutsos, E.A., 2021. Digestibility and safety of dry black soldier fly larvae meal and black soldier fly larvae oil in dogs. Journal of Animal Science 99: skab047. https://doi.org/10.1093/jas/skab047

Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J.M., Eggersdorfer, M., Frank, J., Cruciani, G., Lorkowski, S. and Özer, N.K., 2017. Vitamin E: emerging aspects and new directions. Free Radical Biology & Medicine 102: 16-36. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017

Glamočlija, J., Stojković, D., Nikolić, M., Ćirić, A., Reis, F.S., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R. and Soković, M., 2015. A comparative study on edible Agaricus mushrooms as functional foods. Food & Function 6: 1900-1910. https://doi.org/10.1039/c4fo01135j

Górnaś, P., Radenkovs, V., Pugajeva, I., Soliven, A., Needs, P.W. and Kroon, P.A., 2016. Varied composition of tocochromanols in different types of bran: rye, wheat, oat, spelt, buckwheat, corn, and rice. International Journal of Food Properties Taylor & Francis, 19: 1757-1764. https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1107843

Gupta, S.D. and Suh, N., 2016. Tocopherols in cancer: an update. Molecular nutrition & food research 60: 1354-1363. https://doi.org/10.1002/mnfr.201500847

Jiang, Q., 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. Free Radical Biology and Medicine 72: 76-90. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035

Jiang, Q., Elson-Schwab, I., Courtemanche, C. and Ames, B.N., 2000. Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 11494-11499. https://doi.org/10.1073/pnas.200357097

Kramer, K.J., Hopkins, T.L. and Schaefer, J., 1995. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. Insect Biochemistry and Molecular Biology 25: 1067-1080. https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00053-4

Kumar, G.S. and Krishna, A.G.G., 2015. Studies on the nutraceuticals composition of wheat derived oils wheat bran oil and wheat germ oil. Journal of Food Science and Technology 52: 1145-1151. https://doi.org/10.1007/s13197-013-1119-3

Liland, N.S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C.G., Waagbø, R., Torstensen, B.E. and Lock, E.-J., 2017. Modulation of nutrient composition of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae by feeding seaweed-enriched media. PLOS ONE Public Library of Science 12: e0183188. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183188

Ling, W.H. and Jones, P.J., 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. Life Sciences 57: 195-206. https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00263-6

Liu, C.-S., Glahn, R.P. and Liu, R.H., 2004. Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an *in vitro* digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4330-4337. https://doi.org/10.1021/jf040028k

Liu, X., Chen, X., Wang, H., Yang, Q., Ur Rehman, K., Li, W., Cai, M., Li, Q., Mazza, L., Zhang, J., Yu, Z. and Zheng, L., 2017. Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. PLOS ONE 12: e0182601. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182601

Monahan, F.J., Buckley, D.J., Morrissey, P.A., Lynch, P.B. and Gray, J.I., 1992. Influence of dietary fat and α-tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. Meat Science 31: 229-241. https://doi.org/10.1016/0309-1740(92)90042-3

Morand-Laffargue, L., Hirschberg, J., Halimi, C., Desmarchelier, C. and Borel, P., 2023. The zeaxanthin present in a tomato line rich in this carotenoid is as bioavailable as that present in the food sources richest in this xanthophyll. Food Research International 168: 112751. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112751

National Research Council, 1993. Nutrient requirements of fish. National Academies Press, 132 pp. https://doi.org/10.17226/2115

National Research Council, 1994. Nutrient requirements of poultry. National Academies Press, 174 pp. https://doi.org/10.17226/2114

National Research Council, 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press, Washington, D.C. https://doi.org/10.17226/10668

Niki, E., 2014. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxyl radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence. Free Radical Biology & Medicine 66: 3-12. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022

Oonincx, D.G.A.B. and Finke, M.D., 2021. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. Journal of Insects as Food and Feed Wageningen Academic Publishers 7: 639-659. https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0050

Parker, R.S. and McCormick, C.C., 2005. Selective accumulation of α-tocopherol in Drosophila is associated with cytochrome P450 tocopherol-ω-hydroxylase activity but not α-tocopherol transfer protein. Biochemical and Biophysical Research Communications 338: 1537-1541. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.124

Pieterse, E., Erasmus, S.W., Uushona, T. and Hoffman, L.C., 2019. Black soldier fly (Hermetia illucens) pre-pupae meal as a dietary protein source for broiler production ensures a tasty chicken with standard meat quality for every pot. Journal of the Science of Food and Agriculture 99: 893-903. https://doi.org/10.1002/jsfa.9261

Pinelli-Saavedra, A., 2003. Vitamin E in immunity and reproductive performance in pigs. Reproduction, Nutrition, Development 43: 397-408. https://doi.org/10.1051/rnd:2003034

Politis, I., 2012. Reevaluation of vitamin E supplementation of dairy cows: bioavailability, animal health and milk quality. Animal 6: 1427-1434. https://doi.org/10.1017/S1751731112000225

Rey, A.I., Kerry, J.P., Lynch, P.B., López-Bote, C.J., Buckley, D.J. and Morrissey, P.A., 2001. Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. Journal of Animal Science 79: 1201-1208. https://doi.org/10.2527/2001.7951201x

Sealey, W., Gaylord, G., Barrows, F., Tomberlin, J., Mcguire, M., Ross, C. and St-Hilaire, S., 2011. Sensory analysis of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, fed enriched black soldier fly prepupae, Hermetia illucens. Journal of the World Aquaculture Society 42 https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00441.x

Shahidi, F., Pinaffi-Langley, A.C.C., Fuentes, J., Speisky, H. and de Camargo, A.C., 2021. Vitamin E as an essential micronutrient for human health: common, novel, and unexplored dietary sources. Free Radical Biology and Medicine 176: 312-321. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.025

Shumo, M., Osuga, I.M., Khamis, F.M., Tanga, C.M., Fiaboe, K.K.M., Subramanian, S., Ekesi, S., van Huis, A. and Borgemeister, C., 2019b. The nutritive value of black soldier fly larvae reared on common organic waste streams in Kenya. Scientific Reports 9: 10110. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46603-z

Sozen, E., Demirel, T. and Ozer, N.K., 2019. Vitamin E: regulatory role in the cardiovascular system. IUBMB Life 71: 507-515. https://doi.org/10.1002/iub.2020

Surai, P.F., 1999. Vitamin E and avian reproduction. Poultry and avian biology reviews 10: 3-60. ISSN: 1357-048X.

Tahamtani, F., Ivarsson, E., Wiklicky, V., Lalander, C., Wall, H., Rodenburg, B., Tuyttens, F. and Hernandez, C., 2021. Feeding live black soldier fly larvae (Hermetia illucens) to laying hens: effects on feed consumption, hen health, hen behavior, and egg quality. Poultry Science 100: 101400. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101400

Taufek, N., Lim, J. and Bakar, N., 2021. Comparative evaluation of Hermetia illucens larvae reared on different substrates for red tilapia diet: effect on growth and body composition. Journal of Insects as Food and Feed Wageningen Academic Publishers 7: 79-88. https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0058

Wagner, K.-H., Kamal-Eldin, A. and Elmadfa, I., 2004. Gamma-tocopherol – an underestimated vitamin? Annals of Nutrition and Metabolism Karger Publishers 48: 169-188. https://doi.org/10.1159/000079555

Wen, Y., Xu, L., Xue, C., Jiang, X. and Wei, Z., 2020. Assessing the impact of oil types and grades on tocopherol and tocotrienol contents in vegetable oils with chemometric methods. Molecules 25: 5076. https://doi.org/10.3390/molecules25215076

Zhou, K., Su, L. and Yu, L. (Lucy), 2004. Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. Journal of Agricultural and Food Chemistry American Chemical Society 52: 6108-6114. https://doi.org/10.1021/jf049214g

Journal of Insects as Food and Feed

Ability of black soldier fly larvae to bioaccumulate tocopherols from different substrates and measurement of larval tocopherol bioavailability *in vitro*

L. Morand-Laffargue[1], D. Vairo[1], C. Halimi[1], E. Chiarello[2], B. Creton[3], D. Sabatier[3] and P. Borel[1]*

[1]UMR C2VN "Center for CardioVascular and Nutrition Research of Marseille", Faculté de Médecine, INRAE, Aix-Marseille Univ, INSERM, 27, boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France; [2]Department of Agri-Food Sciences and Technologies (DISTAL), University of Bologna, 47521 Cesena, Italy; [3]BioMiMetiC, 13150 Boulbon, France; *patrick.borel@univ-amu.fr

Supplementary material

Figure S1

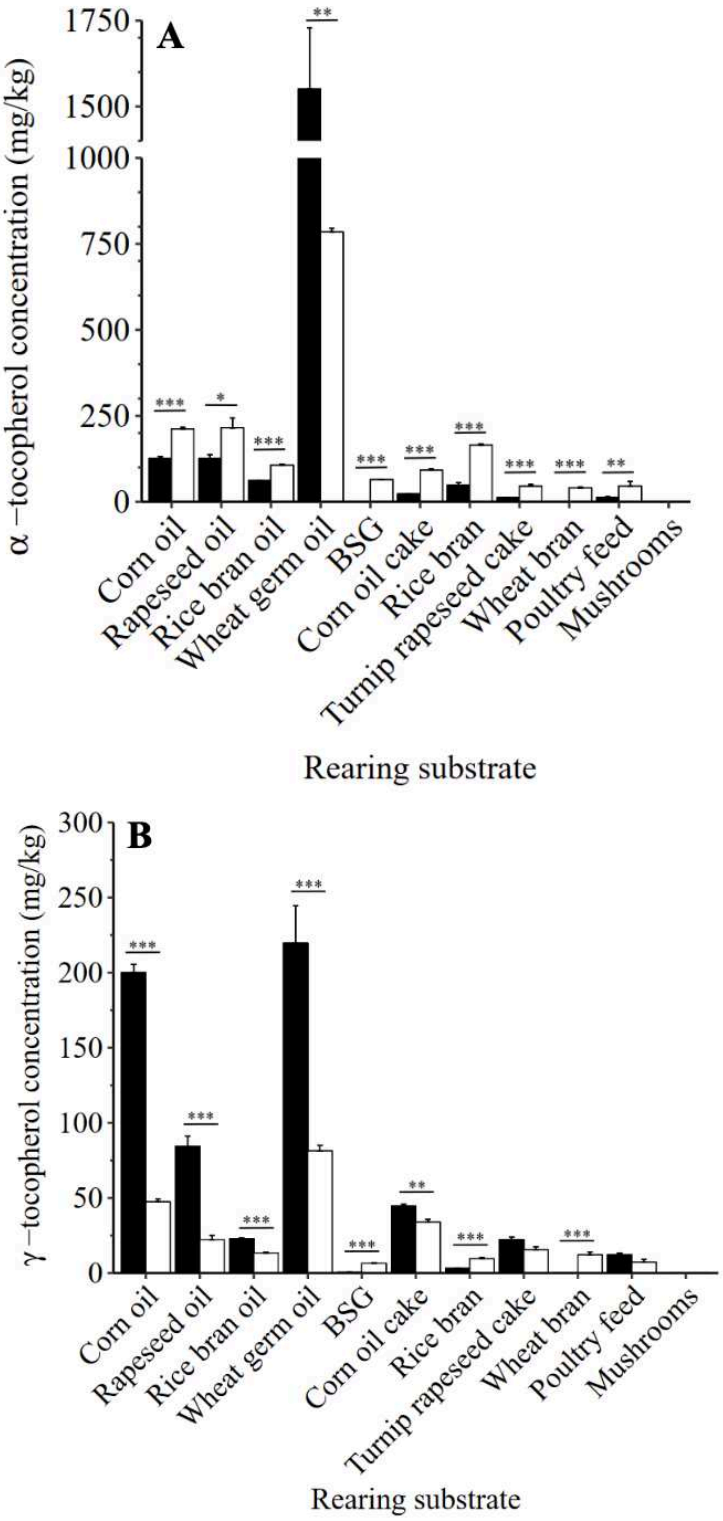


Figure S1. VE concentrations in rearing substrates and in larvae (mg/kg dry weight). (■): rearing substrates, (□): larvae. **A**: α-TOC **B**: γ-TOC. Bars represent mean ± SEM (n = 4). An asterisk means that concentrations are significantly different between the larvae and the corresponding substrate (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$, two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests). BSG: Brewer's spent grains.

Figure S2

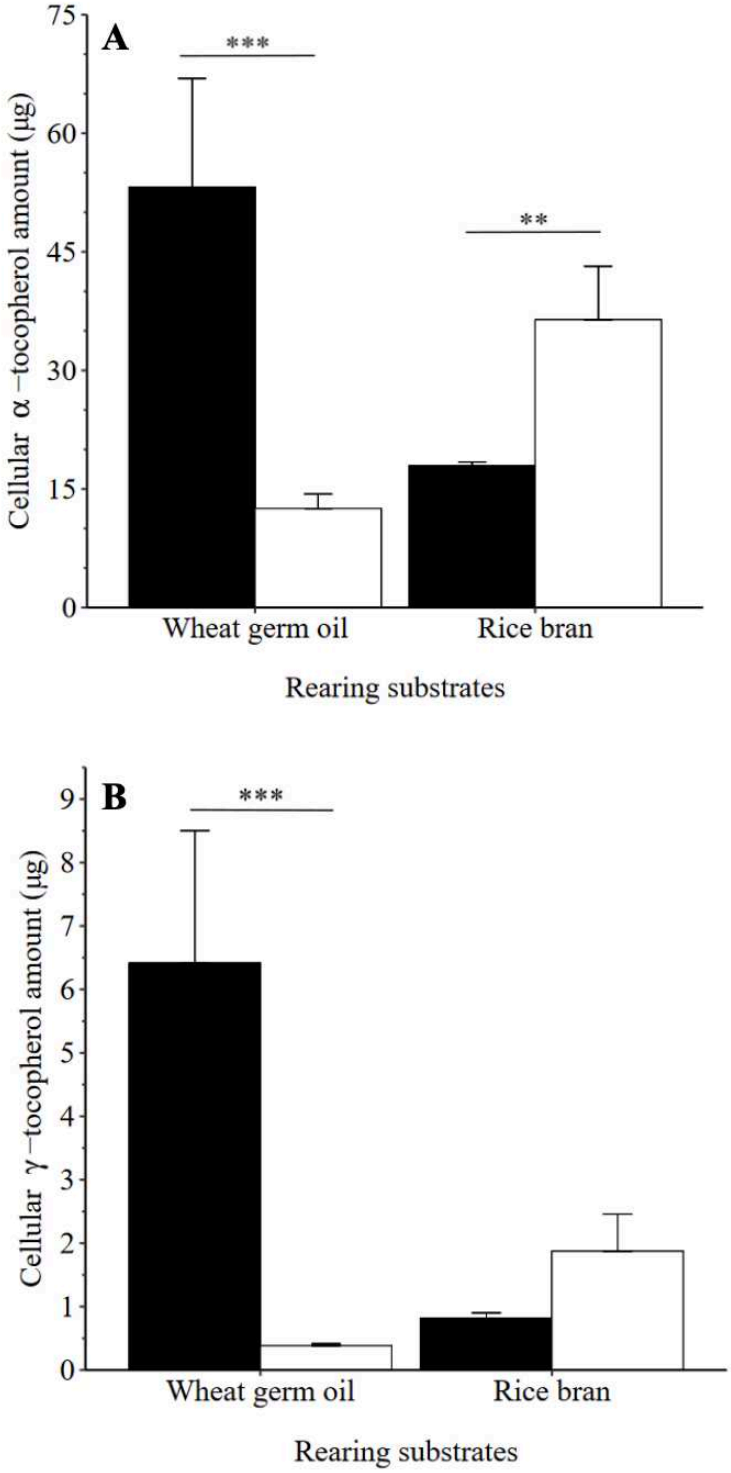


Figure S2. These amounts are expressed in µg α- or γ-TOC found in the cellular comAmounts of VE taken up by Caco-2 cells incubated with micelle-rich fractions obtained after *in vitro* digestions of rearing substrates or larvae. partment of each well after a fraction rich in micelles corresponding to the digestion of 1 g of substrate or larvae (expressed in **dry weight**) had been deposited on the cells. (■): rearing substrates, (□): larvae. **A**: α-TOC. **B**: γ-TOC. Bars represent mean ± SEM (n = 4). An asterisk means that the amount of VE are significantly different between the larvae and the corresponding substrate (***$P < 0.001$, two-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using bilateral t-tests).

Figure S3

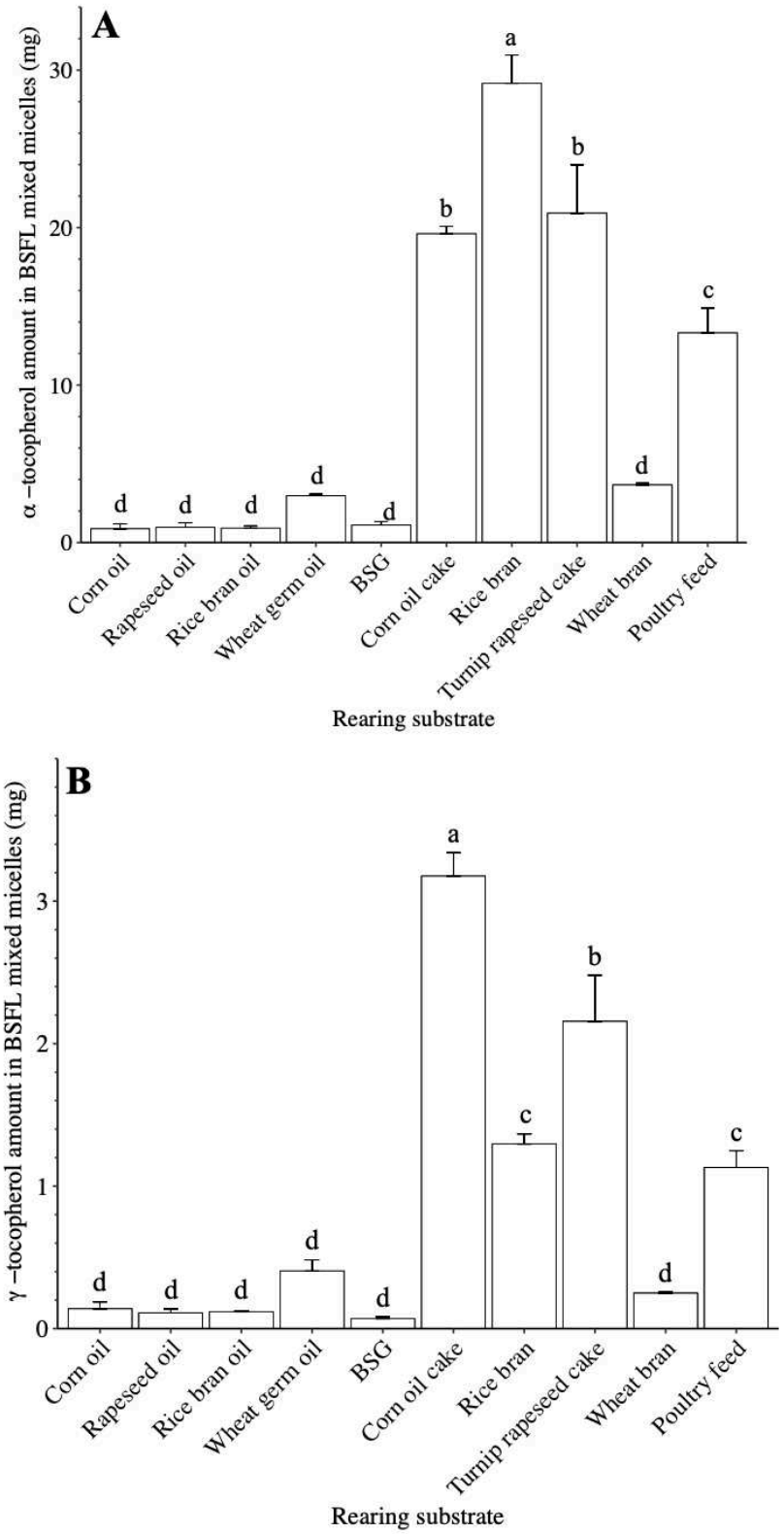


Figure S3. Amounts of VE in micelles obtained after *in vitro* digestions of larvae reared on VE-rich substrates. Amounts are expressed in mg α- or γ-TOC corresponding to the digestion of 1 Kg of larvae (expressed in **fresh weight**). **A**: α-TOC. **B**: γ-TOC. Bars represent mean ± SEM (n = 4). Bars that bear different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's HSD test). BSG: Brewer's spent grains.

Figure S4

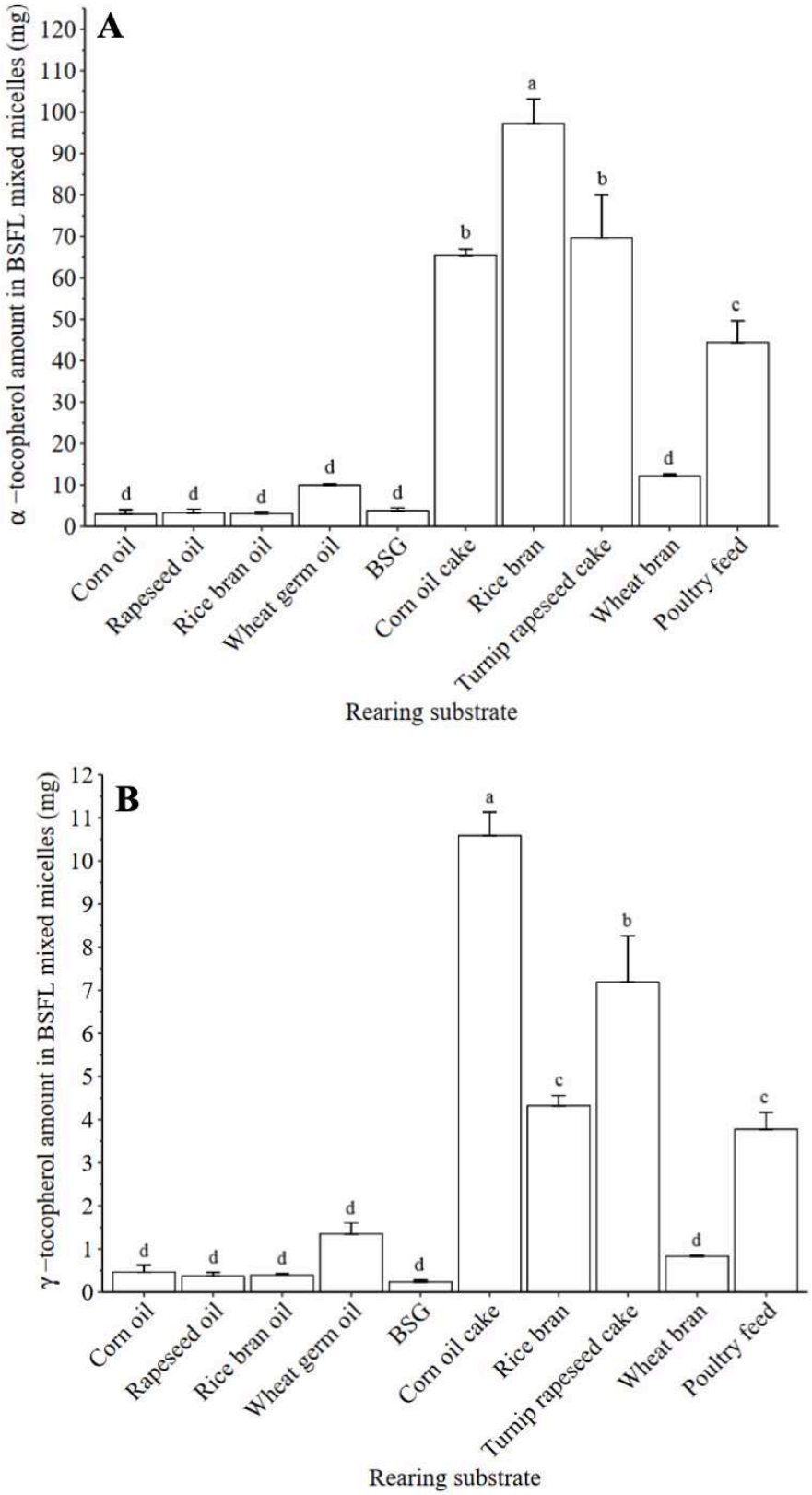


Figure S4. Amounts of VE in micelles obtained after *in vitro* digestions of larvae reared on VE-rich substrates. Amounts are expressed in mg α- or γ-TOC corresponding to the digestion of 1 Kg of larvae (expressed in **dry weight**). **A**: α-TOC. **B**: γ-TOC. Bars represent mean ± SEM (n = 4). Bars that bear different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's HSD test). BSG: Brewer's spent grains.

Chapitre 4 : Optimisation de la teneur en vitamine D_2 de larves de mouche soldat noire après élevage sur un substrat riche en ergostérol et exposition à des UVB.

Une étude a évalué la synthèse des VD_2 et VD_3 dans différentes espèces d'insectes. Pour cela, les larves ont été élevées sur un substrat classique, avant d'être exposées à des rayonnements UVB (*97*).

Le but de notre étude était d'optimiser et de maximiser la teneur en VD_2 chez les LMSN en les élevant sur des champignons, riches en ergostérol, le précurseur de la VD_2 puis en les exposant à un rayonnement UVB. En jouant sur plusieurs paramètres que sont : le moment de l'exposition aux UVB (avant ou après mise à jeun), l'état des LMSN (vivantes ou mortes durant l'exposition), et la durée d'exposition, il a été possible d'obtenir des larves extrêmement riches en VD_2.

Cette étude fait actuellement l'objet d'un dépôt d'un brevet par l'INRAE et les résultats présentés ici sont donc confidentiels.

Le but de notre première expérimentation était de déterminer la dose d'UVB qui permettait de maximiser la teneur en VD_2 des champignons dans nos conditions expérimentales. En effet, notre étude consistait à appliquer cette même dose aux larves enrichies en ergostérol de façon à comparer l'efficacité de conversion dans les larves et dans les champignons. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : Concentration de vitamine D_2 (en mg/kg de poids frais) dans des champignons exposés à différentes doses d'UVB

Dose d'exposition aux UVB	**Vitamine D_2 (mg/kg)**
Témoin (pas d'exposition)	0
1J/cm^2 1 face*	6.76 ± 0.26^{a}
1J/cm^2 dos	9.58 ± 0.98^{ab}
1J/cm^2 2 faces	10.41 ± 0.66^{b}
2J/cm^2 1 face	$\mathbf{9.37 \pm 0.18^{ab}}$
4J/cm^2 1 face	9.67 ± 0.70^{ab}
8J/cm^2 1 face	14.06 ± 0.20^{c}

^{a,b,c} : les moyennes portant des lettres différentes en exposant sont significativement différentes (p<0,05 ; ANOVA suivi du test de Tukey).
*les champignons ont été exposés aux UVB soit sur une seule face, soit sur leurs deux faces.

Suite à ces résultats il a tout d'abord été décidé de ne pas choisir la dose de 8J/cm^2, bien qu'elle donne la plus forte concentration de VD_2, car il a été constaté que cette dose entrainait une dégradation de l'aspect visuel des champignons. Il a donc été choisi la dose de **2J/cm^2**, qui correspond à une durée d'exposition de 15 min avec la lampe utilisée et à la distance

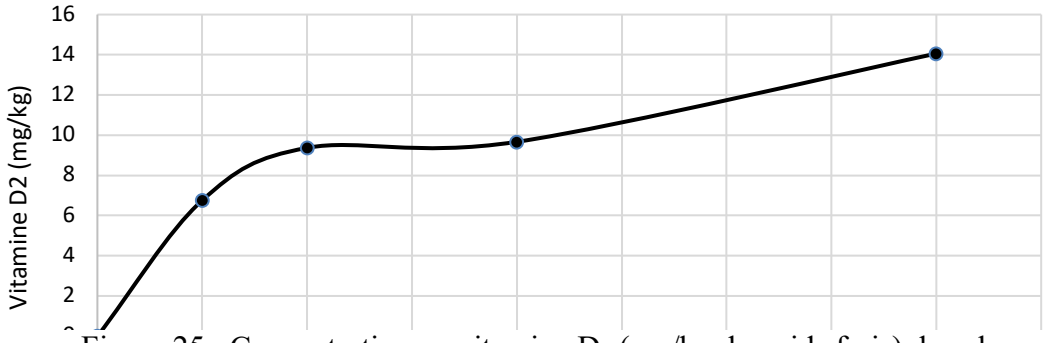


Figure 25 : Concentration en vitamine D_2 (mg/kg de poids frais) dans les champignons selon la dose d'exposition aux UVB

d'exposition utilisée, car elle n'est pas significativement différente de la dose 4J/cm2, et elle est proche de celle utilisée dans la littérature, située entre 1 et 1,5 J/cm^2 (*409*, *480*, *481*).

Après avoir choisi la dose optimale d'exposition aux UVB pour les champignons, une deuxième expérimentation visant à évaluer l'effet du temps d'exposition des larves aux UVB sur leur teneur en VD_2 a été effectuée. Pour cela, des LMSN vivantes, et qui avaient été élevées sur des champignons (donc qui étaient riches en ergostérol) ont été exposées à des UVB, après mise à jeun, à des temps différents : 15 minutes, 1 heure, 2 heures et 5 heures. Les résultats sont les suivants :

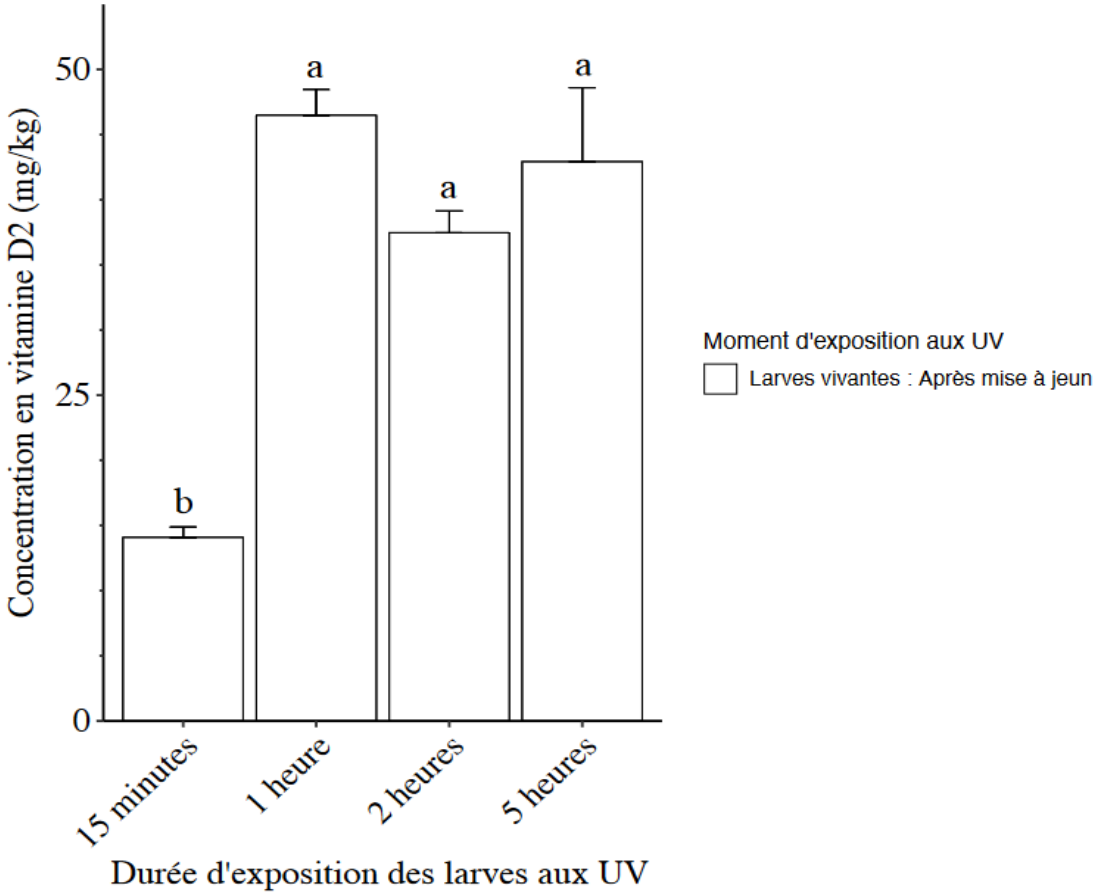


Figure 26 : Concentration en vitamine D_2 (en mg/kg) dans des LMSN selon la durée d'exposition aux UVB

Les barres représentent des moyennes ± SEM (n = 4).
^{a,b,c} : les barres surmontées de lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05 ; ANOVA suivi du test de Tukey).

Ces résultats montrent que la concentration en VD_2 était significativement différente (p<0,01) pour les LMSN exposées 15 min (14,1 ± 0,8 mg/kg) et celles exposées 1 heure (46,5 ± 2,0 mg/kg), 2 heures (37,5 ± 1,7 mg/kg) et 5 heures (42,9 ± 5,7 mg/kg). Il existe donc un seuil

à partir duquel les LMSN sont saturées en VD_2 et ce seuil est situé entre les durées d'exposition 15 minutes (2,2 J/cm^2) et 1 heure (8,9 J/cm^2).

Dans une troisième expérience, il a été décidé de comparer les concentrations de VD_2 obtenues suivant le moment d'exposition aux UVB : c'est-à-dire avant mise à jeun, après mise à jeun ou après mort des LMSN. Cette expérience a été effectuée en anticipant les besoins des industriels qui pourraient trouver trop contraignant de mettre les larves à jeun ou qui souhaiteraient savoir si la conversion fonctionne aussi sur des larves mortes. Les résultats sont les suivants :

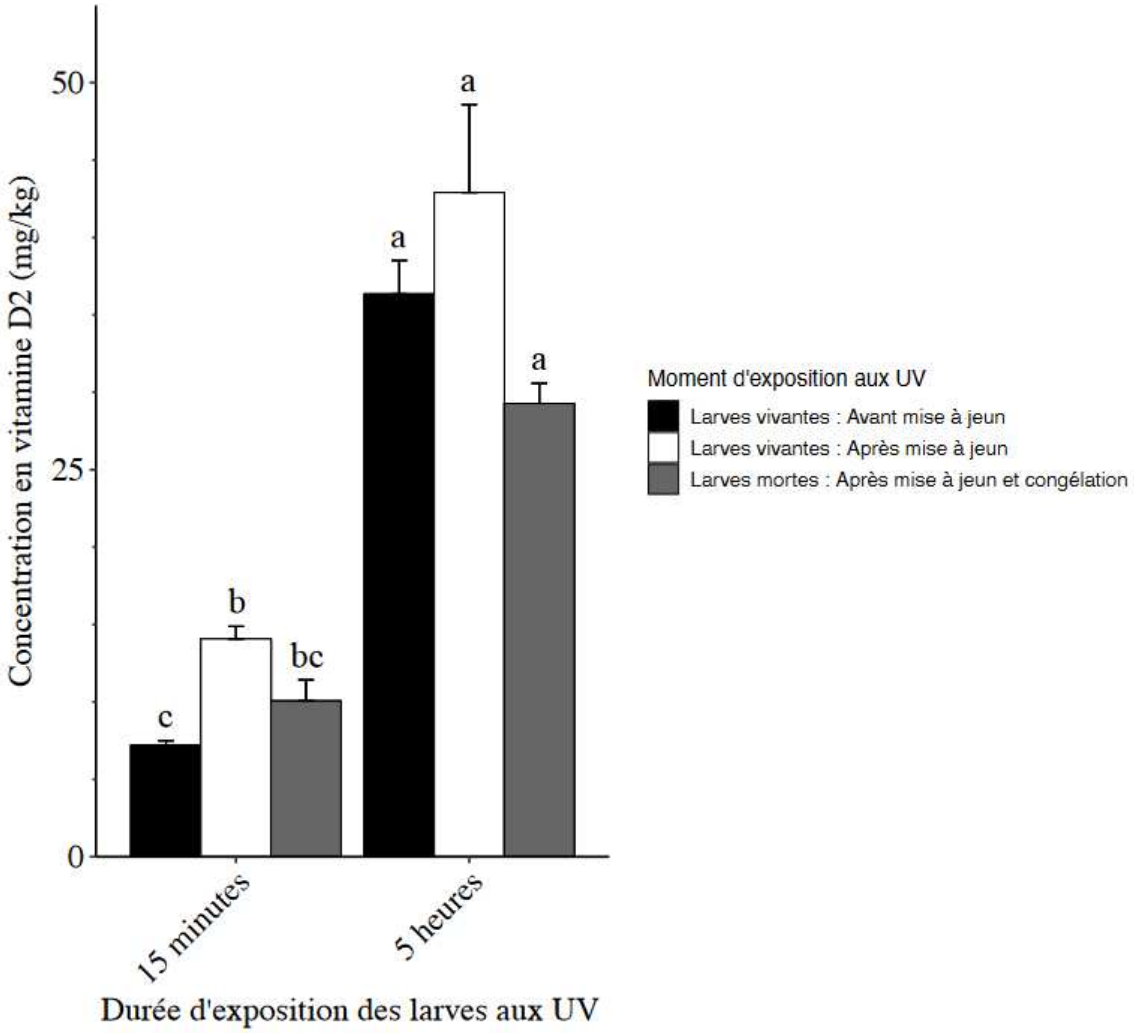


Figure 27 : Concentration en vitamine D_2 (en mg/kg) dans des LMSN selon le moment d'exposition aux UVB

Les barres représentent des moyennes ± SEM (n = 4).
[a,b,c] : pour un même temps d'exposition les barres surmontées de lettres différentes sont

significativement différentes (p<0,05 ; ANOVA à deux facteurs suivie de comparaisons par paires à l'aide de t-tests bilatéraux).

Pour une durée d'exposition de 15 min, il est constaté une différence significative entre la concentration en VD_2 avant (7,2 ± 0,3 mg/kg) et après mise à jeun (14,1 ± 0,8 mg/kg). Les larves mises à jeun et exposées aux UVB après leur mort présentaient une concentration intermédiaire (10,1 ± 1,4 mg/kg). Pour une durée d'exposition aux UVB de 5 heures, les concentrations en VD_2 sont nettement supérieures à celles observées après 15 min d'exposition, mais il n'y a pas de différence significative entre les différentes conditions, i.e. avant mise à jeun (36,3 ± 2,2 mg/kg), après mise à jeun (42,9 ± 5,7 mg/kg) et après mise à jeun et mort des LMSN (29,3 ± 1,3 mg/kg). Ces résultats suggèrent que l'ergostérol des LMSN est plus efficacement converti en VD_2 lorsque les larves sont à jeun que lorsqu'elles ne sont pas à jeun. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La première étant que les larves ont maigri lors de la mise à jeun et que, par conséquent, la concentration en VD_2 a artificiellement augmenté dans les larves. La deuxième c'est que l'ergostérol a été plus efficacement converti dans les larves mise à jeun que dans les larves non mises à jeun. Pour expliquer cette hypothèse, nous supposons que, le fait de mettre les larves à jeun pendant 5 jours a augmenté la quantité d'ergostérol qui a été bioaccumulée dans leurs tissus (le gras notamment), et la conversion en VD_2 de l'ergostérol a été plus efficace lorsqu'il était localisé dans les tissus de la larve que lorsqu'il était dans la matrice champignon présente dans le tube digestif de la larve.

Si la concentration en VD_2 dans les LMSN exposées pendant 1 heure (i.e. la durée d'exposition maximisant la concentration de VD_2 dans les larves) est comparée à celle des champignons exposés aux UVB pendant 15 minutes (i.e. la durée d'exposition maximisant la concentration de VD_2 dans les champignons, sans les dégrader), les résultats sont les suivants :

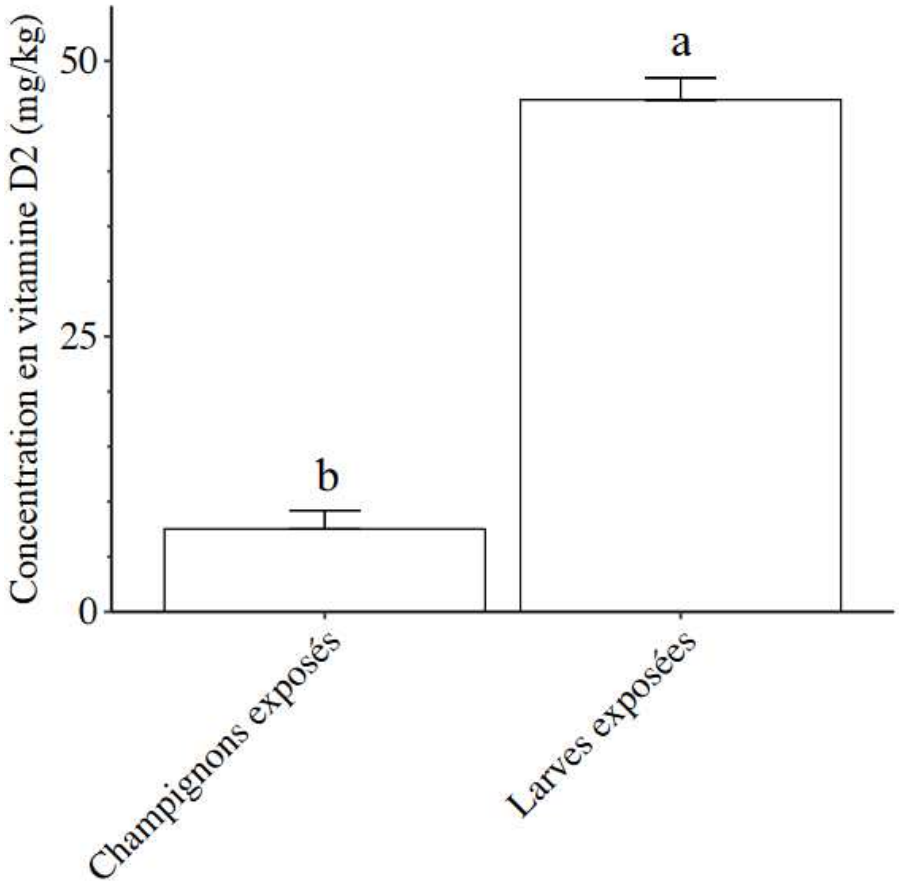


Figure 28 : Concentration en vitamine D_2 (en mg/kg) dans des champignons et des LMSN exposés à des doses optimales d'UVB

Les barres représentent des moyennes ± SEM (n = 4).
[a,b] : les barres surmontées de lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05 ; t-test).

A leurs doses optimales d'exposition aux UVB, la concentration de VD_2 dans les LMSN était de 46,5 ± 2,0 mg/kg, alors qu'elle n'était que de 7,5 ± 1,7 mg/kg dans les champignons, soit 6 fois moins. Nous avons obtenu des larves dont la concentration en VD était environ 20 fois plus forte que la concentration en VD dans la source alimentaire connue comme étant la plus riche en cette vitamine, i.e. l'huile de foie de morue, dont la concentration en VD est d'environ 2,5 mg/kg.

En conclusion, ce procédé permet d'obtenir des larves extrêmement riches en VD, sans les élever sur un substrat riche en cette vitamine, ce qui a un énorme intérêt. En effet, les aliments riches en VD, qui sont des produits d'origine animale et notamment les poissons gras, ne sont pas autorisés en tant que substrat des insectes comestibles en Europe, que ce soit pour des insectes destinés à l'alimentation humaine ou animale. De plus, le procédé utilisé ici pour maximiser la teneur en VD_2 des LMSN est relativement facile à mettre en œuvre au niveau industriel et l'exposition à un rayonnement UV de champignons est déjà utilisée pour les enrichir en VD. De plus, ces LMSN riches en VD pourraient contribuer à une économie circulaire puisque des résultats similaires à ceux exposés ci-dessus sont obtenus en élevant des LMSN sur des déchets (des pieds plus exactement) de champignons qui sont des coproduits des transformations technologiques de champignon par un industriel (données non exposées). Enfin, nous pensons que ce procédé pourrait être appliqué à d'autres insectes comestibles pour peu qu'ils puissent consommer un substrat riche en ergostérol, champignon ou autre, et bioaccumuler ce précurseur de la VD_2. En effet, la conversion de l'ergostérol en ergocalciférol est un procédé chimique qui est indépendant du métabolisme de l'être vivant dans lequel il est présent et il est donc raisonnable de penser que cette conversion peut se faire dans une autre espèce d'insecte, que ce soit à l'état larvaire ou adulte.

Discussion générale

Les insectes comestibles sont d'ores et déjà utilisés comme source de protéines pour des animaux d'élevage traditionnellement consommés dans notre société (*482–485*). Avant cette thèse, très peu de données étaient disponibles sur l'accumulation de vitamines et de caroténoïdes dans les insectes comestibles et aucune donnée n'avait été publiée concernant la biodisponibilité de micronutriments liposolubles dans ces derniers.

Durant cette thèse, nous avons montré que les LMSN pouvaient bioaccumuler des quantités importantes de caroténoïdes proVA, de lutéine, de VE mais aussi de VD. Quantifier la bioaccumulation de micronutriments liposolubles dans les LMSN est une donnée importante mais, pour déterminer la capacité des LMSN à être de bonnes sources d'enrichissement de micronutriments pour l'alimentation animale, il est nécessaire d'évaluer la biodisponibilité de ces composés provenant des LMSN.

Dans cette discussion, nous tenterons d'expliquer les différences de bioaccumulation selon les substrats mais aussi au sein des différents micronutriments étudiés. Ensuite, dans une deuxième partie, nous nous concentrerons sur l'aspect biodisponibilité et les éléments, répertoriés dans l'acronyme SLAMENGHI (*309*), pouvant l'influencer. Dans une troisième partie, nous listerons les intérêts d'incorporer ces LMSN enrichies dans l'alimentation animale puis, dans une quatrième partie, dans l'alimentation humaine. Enfin, la cinquième et dernière partie abordera les différents avantages de recycler ces composés quand ils sont présents dans les coproduits végétaux issus de l'industrie agroalimentaire.

1. Bioaccumulation des vitamines liposolubles et de la lutéine dans les LMSN

Les travaux menés durant cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles données concernant la bioaccumulation de vitamines liposolubles et de lutéine dans les LMSN. Les données existant avant ces travaux étaient peu nombreuses. Plusieurs études ont dosé la VA ou le β-car dans différentes espèces d'insectes. La plupart de ces études font état d'une absence ou d'une quantité très faible de VA dans plusieurs espèces d'insectes (*102*, *486–488*) y compris dans les LMSN (*105*, *107*). Au contraire, quelques études ont rapporté des teneurs intéressantes en VA et β-car chez des termites et des espèces de lépidoptères (*489–491*), les larves de lépidoptères ayant probablement la capacité de convertir le β-car en VA préformée (*488*). Ces études sont caractérisées par le fait que les dosages de ces molécules ont été effectués, soit sur des insectes capturés dans la nature et dont l'alimentation n'était pas contrôlée, soit sur des

insectes élevés industriellement mais dont la teneur en VA et/ou en β-car du substrat d'élevage n'avait pas été mesurée. Il était donc impossible d'évaluer la capacité de bioaccumulation de ces molécules dans les espèces d'insectes étudiées. Notre première étude (**Publication n°1**) a mis en évidence une bioaccumulation de caroténoïdes proVA (α-, β-car et β-cryptoxanthine) dans des LMSN élevées sur des substrats riches en ces micronutriments, première étude du genre. Une autre étude, publiée l'année suivante, a confirmé nos résultats en démontrant aussi une bioaccumulation d'α- et de β-car dans les LMSN après élevage sur des déchets végétaux (*112*).

Des études ont identifié et quantifié de la lutéine dans des espèces de l'ordre des coléoptères, des lépidoptères (*492*), des hémiptères mais aussi des odonates (*111*). La lutéine a aussi été dosée dans certains vers, criquets mais aussi dans la LMSN (*102*, *107*). Leni *et al.*, 2022 (*112*) ont quantifié la bioaccumulation de la lutéine et de la zéaxanthine conjointement, dans les LMSN, à partir de coproduits végétaux de l'industrie agroalimentaire. Nos travaux ont aussi montré une bioaccumulation de lutéine mais cette fois-ci à partir de substrats végétaux spécialement choisis car faisant partie des plus riches en cette xanthophylle (**Publication n°3**).

Un peu plus de données sont disponibles sur la quantité de VE dans les insectes (*102*, *488*, *493*), y compris dans les LMSN (*28*, *34*, *107*, *468*). En particulier, Shumo *et al.*, 2019 (*468*) ont dosé l'α- et le γ-TOC des LMSN en fonction de leurs substrats d'élevage. Cependant, leur étude ne se focalisant pas particulièrement sur la bioaccumulation de VE dans ces larves, les substrats d'élevage n'étaient pas spécialement choisis pour leur richesse en VE. Dans notre étude (**Publication n°4**), les substrats choisis étaient non seulement des huiles végétales riches en VE mais aussi des coproduits de l'industrie agroalimentaire riches en cette vitamine. De plus, notre étude a comparé, pour la première fois, la bioaccumulation de l'α- et du γ-TOC dans les LMSN et a permis de mettre en évidence une moins bonne bioaccumulation de ce dernier, que nous avons attribué à un catabolisme préférentiel de ce vitamère, comparé à celui de l'α-TOC.

La bioaccumulation de VD dans les LMSN n'a pas été directement étudiée, puisque les substrats autorisés dans l'UE n'en contiennent pas, ou en très petite quantité (champignons plus ou moins exposés aux UV). Cependant, grâce à une invention qui fait l'objet d'un dépôt de brevet par INRAE, des LMSN très riches en cette vitamine ont été obtenues.

Quels sont les facteurs qui pourraient expliquer les différences de bioaccumulation d'un même phytomicronutriment selon les substrats ?

Comme rapporté dans nos résultats, la matrice alimentaire dans laquelle les phytomicronutriments sont incorporés affecte de façon plus ou moins importante le taux de bioaccumulation des composés que nous avons étudiés. En effet, par exemple pour l'α-TOC, les taux de bioaccumulation varient de 0,4 dans le substrat huile de germes de blé, à une valeur de 40 dans le substrat drêches de brasserie. La question qui se pose alors est la suivante : à quoi est dû cette très forte variabilité de bioaccumulation ? Il a bien évidemment été supposé que cette variabilité était due à la concentration de ces composés dans les substrats mais aussi à des différences de composition de ces différents substrats. Pour identifier les différents facteurs impliqués, des corrélations ont été évaluées entre les concentrations de différents composés des substrats et le taux de bioaccumulation des phytomicronutriments.

Le premier facteur venant à l'esprit concernant la modulation de la bioaccumulation des phytomicronutriments liposolubles dans les larves, est la concentration de ces composés dans le substrat d'élevage. En effet, il peut être supposé que plus la concentration sera élevée dans le substrat, plus les larves en contiendront, corrélation qui a été observée pour la VE, que ce soit en poids frais ou en poids sec (**tableau 13**). Cette corrélation a d'ailleurs été observée dans une étude mesurant la bioaccumulation de caroténoïdes totaux provenant de substrats végétaux dans les LMSN (*112*). Cependant, dans notre étude, cette corrélation n'a pas été retrouvée pour le β-car, ni pour la lutéine : cela pourrait être dû au manque de robustesse du test de corrélation pour ces deux caroténoïdes (5 et 4 points seulement pour respectivement le β-car et la lutéine, contre 10 points pour la VE). Aussi, dans le cas du β-car, cela pourrait résulter du fait que les larves convertissent une partie du β-car en VA (rétinol), et que le taux de conversion dépend de leur statut en VA (*494*), affectant ainsi la corrélation. Enfin, une dernière observation semble suggérer que la concentration maximale d'α-TOC dans les larves est d'environ 300 mg/Kg de poids frais. En effet, alors que la concentration d'α-TOC dans les larves était toujours supérieure ou égale à celle mesurée dans les substrats d'élevage, cette concentration était environ deux fois inférieure dans les larves élevées sur l'huile de germe de blé qui était de très loin le substrat le plus riche en α-TOC (**Publication n°4**). Une hypothèse serait que les larves ne peuvent pas bioaccumuler plus que cette concentration d'α-TOC. Il est aussi supposé qu'il existe une concentration maximale des autres phytomicronutriments que peuvent bioaccumuler les LMSN, mais pour la connaitre il faudrait que la dose de ces composés dans les substrats dépasse cette concentration maximale.

Le second facteur pouvant moduler la bioaccumulation des phytomicronutriments dans les larves est la teneur en énergie du substrat, et donc sa teneur en macronutriments énergétiques, i.e. glucides, lipides et protéines. En effet, comme précisé précédemment (partie 1.3.2), la composition nutritionnelle du substrat influence la croissance des LMSN mais aussi leur propre composition en macronutriments. Les lipides sont le principal composant du corps gras des insectes, tissu analogue au foie, au tissu adipeux blanc et au système immunitaire des mammifères (*495*). Plus de 90 % des lipides qui y sont stockés sont des TAG (*496*, *497*). Les TAG sont synthétisés à partir des glucides alimentaires, des AG ou des protéines. Les glucides sont convertis en lipides dans le corps gras et l'accumulation de lipides est donc aussi modulée par la présence de glucides dans leur alimentation (*498–500*). Cependant, selon le **tableau 13**, il n'existe aucun lien entre teneur en glucides du substrat et taux de bioaccumulation des phytomicronutriments étudiés dans les LMSN.

Nous nous attendions à ce que la présence de lipides dans les substrats augmente la bioaccumulation des vitamines liposolubles et des caroténoïdes, qui sont eux aussi liposolubles, dans les larves et c'est bien ce qui a été observé pour le β-car (en poids frais) et pour la lutéine (en poids sec). Néanmoins, cette corrélation n'est pas constatée dans le cas de la VE. Ces différences de corrélations concernant la concentration en lipides des LMSN (corrélation positive pour β-car, lutéine et pas de corrélation pour la VE), pourraient être dues à des différences de concentrations en lipides des substrats contenant les composés. En effet, les substrats contenant des caroténoïdes proVA (**Publication n°1**) contenaient très peu de lipides comparés aux substrats dans lesquels la VE était présente (**Publication n°4**). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant la bioaccumulation de caroténoïdes avec des doses croissantes de lipides dans l'alimentation des larves.

Le corps gras des insectes est principalement composé de trophocytes, qui sont riches en gouttelettes lipidiques mais aussi en granules de protéines. Ainsi, les protéines présentes dans l'alimentation des LMSN pourraient avoir un impact sur l'accumulation des phytomicronutriments dans les LMSN. Un niveau élevé de ces réserves nutritives peut moduler le taux de croissance des larves, de la métamorphose et de la production d'œufs chez l'insecte adulte. Une étude, visant à étudier les modifications du corps gras selon l'apport alimentaire de LMSN, a démontré qu'un régime pauvre en protéines affectait à la fois l'accumulation de lipides et de protéines dans les cellules du corps gras ainsi que l'expression des gènes clés impliqués dans ces processus métaboliques (*501*). Toujours selon cette étude, une faible teneur en protéines dans l'alimentation entraînait une moindre abondance de granules de protéines et des gouttelettes lipidiques plus grandes et plus abondantes dans le corps gras. Cependant, selon les

données de la **publication n°1**, il n'existe aucune corrélation entre la quantité de protéines (données provenant de la base de données du Ciqual) dans le substrat et la masse de lipides contenus dans les LMSN (coefficient de corrélation de Pearson = 0,52 (Intervalle de confiance de 95% : [-0,75 : 0,94]), *p-value* = 0,52). Ces résultats vont dans le sens de ceux du **tableau 13**, confirmant qu'il n'existe pas de corrélation entre teneurs en protéines du substrat et taux de bioaccumulation des phytomicronutriments liposolubles.

La valeur énergétique du substrat, dépendant donc de sa teneur en lipides, glucides et protéines est aussi à prendre en compte. Selon les résultats du **tableau 13**, il n'existe pas de corrélation entre bioaccumulation de β-car et de lutéine et valeur énergétique de leur substrat. Cependant, plus le substrat a une valeur énergétique faible et plus la bioaccumulation de VE est importante. Une hypothèse serait que plus la valeur énergétique du substrat est basse et plus les LMSN en consomment, pour combler leurs besoins énergétiques. Ainsi, en consommant plus de substrat, la bioaccumulation de la VE serait plus importante. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer la quantité ingérée d'aliment par les LMSN par cycle pour chaque substrat.

Un autre élément présent dans les substrats, et qui pourrait moduler la bioaccumulation de micronutriments liposolubles dans les LMSN, est le calcium. En effet, il a été montré que l'augmentation des niveaux d'ions calcium cytosolique dans les adipocytes entraînait une réduction des réserves de graisse chez une mouche, *Drosophila melanogaster*, tandis qu'une diminution de ces ions entraînait une augmentation de ces réserves (*502*). Si la lipogenèse est influencée par les apports en calcium chez l'insecte, nous pouvons supposer que la bioaccumulation des phytomicronutriments liposolubles dans la graisse des larves l'est probablement aussi. Néanmoins, comme le montre le **tableau 13**, nous rejetons cette hypothèse, pour les micronutriments que nous avons étudiés, car nous n'avons observé aucune corrélation entre le taux de bioaccumulation de ces composés et la concentration en calcium du substrat.

D'autres composés présents dans les substrats, comme les phytostérols, pourraient influencer la bioaccumulation des molécules liposolubles dans les larves. En effet, ces stérols végétaux sont bien connus pour entrer en compétition avec le cholestérol et les vitamines liposolubles vis-à-vis de leur incorporation dans les micelles et par conséquent de diminuer leur assimilation (*449*, *503*, *504*). Il est supposé que plus le substrat contient de phytostérols et moins la bioaccumulation des phytomicronutriments liposolubles dans les larves sera efficace. Par ailleurs, les tissus d'insectes peuvent accumuler des phytostérols (*505*, *506*) : ils sont donc capables de les absorber. Néanmoins, comme pour le calcium, le **tableau 13** ne démontre aucun

lien entre le taux de bioaccumulation des composés étudiés et la quantité théorique de phytostérols dans les substrats.

Tableau 13 : Corrélations entre les taux de bioaccumulation** des phytomicronutriments étudiés dans les LMSN (colonnes) et différents paramètres, de composition ou de valeur énergétique***, des substrats étudiés (lignes)

		β-car	Lutéine	α-TOC	γ-TOC
Concentration du phytomicronutriment dans le substrat*	Poids frais	NS	NS	*p*<0,001 IC : [0,91:0,99] Coef = **0,98**	*p*<0,001 IC : [0,57:0,97] Coef = **0,87**
	Poids sec			*p*<0,001 IC : [0,91:0,99] Coef = **0,98**	*p*<0,001 IC : [0,75:0,98] Coef = **0,93**
Glucides	Poids frais ou sec	NS	NS	NS	NS
Lipides	Poids frais	*p*=0,03 IC : [0,19:0,99] Coef= **0,92**	NS	NS	NS
	Poids sec	NS	*p*=0,006 IC : [0,74:0,99] Coef = **0,99**		
Protéines	Poids frais ou sec	NS	NS	NS	NS
Valeur énergétique	Poids frais	NS	NS	*p*=0,033 IC : [-0,91:-0,07] Coef = **-0,67**	NS
	Poids sec			NS	*p*=0,049 IC : [-0,88:-0,01] Coef = **-0,60**
Calcium	Poids frais ou sec	NS	NS	NS	NS
Phytostérols	Poids frais ou sec	NS	NS	NS	NS

NS : corrélation non significative car *p*>0,05 ; IC : intervalle de confiance de 95% ; Coef : Coefficient de corrélation de Pearson .

*corrélation entre concentration en phytomicronutriment des LMSN et concentration en

phytomicronutriment des substrats.
**le taux de bioaccumulation est calculé comme il suit : taux de bioaccumulation = (concentration du composé dans les LMSN) / (concentration du composé dans le substrat).
***la composition et la valeur nutritionnelle des substrats sont issues de la table Ciqual et des références (*507–518*).

Quels sont les facteurs qui pourraient expliquer les différences de bioaccumulation selon les molécules étudiées ?

Les données obtenues sur la bioaccumulation de différentes molécules dans les LMSN montrent clairement des différences de bioaccumulation entre ces molécules. Ces différences sont observées non seulement entre les différentes vitamines, mais également entre les différents types de caroténoïdes. Il serait intéressant d'identifier les facteurs qui expliquent ces différences pour essayer de prédire quelle serait la bioaccumulation de phytomicronutriments liposolubles que nous n'avons pas étudiés.

La première hypothèse est que ces différences pourraient être expliquées par les différences de propriétés moléculaires de ces molécules, comme leur hydrophobicité ou leur température de fusion. Des corrélations entre des propriétés moléculaires de ces molécules et leur concentration dans les LMSN ont été évaluées. Seulement une corrélation significative a été observée, qui s'est avérée être positive (**tableau 14**). Cette corrélation entre température de fusion et concentration en phytomicronutriments des LMSN a déjà été observée par Sy *et al.*, 2012 (*333*) (corrélation positive entre efficacité d'incorporation des caroténoïdes dans des micelles mixtes et leur point de fusion). Ainsi, il semble que plus la cristallinité des molécules est élevée, plus leur incorporation dans les micelles, i.e. leur bioaccessibilité, est importante et plus leur bioaccumulation dans les tissus des LMSN est importante. La corrélation avec le Log P était attendue car elle avait déjà été mise en évidence par les mêmes auteurs (*333*). Le Log P reflète la lipophilie d'un composé qui peut être évaluée en mesurant son coefficient de partage octanol/eau, déterminé en mesurant la distribution d'une substance chimique entre deux phases non miscibles : l'octanol (un solvant organique simulant la phase lipidique) et l'eau (un solvant aqueux). Ainsi, plus la valeur de log *P* d'une molécule est élevée et plus l'affinité de ce composé pour les lipides est importante. D'après nos données, l'hydrophobicité des vitamines et caroténoïdes étudiés (mesurée via ce paramètre) n'est pas corrélée à la concentration en vitamines et caroténoïdes dans les LMSN, tout comme pour la densité, la masse molaire, la surface polaire et la température d'ébullition du composé.

Tableau 14 : Corrélations entre propriétés moléculaires* des phytomicronutriments étudiés et concentrations en ces phytomicronutriments** dans les LMSN

Propriété moléculaire	*Corrélations de Pearson*
Densité (g/cm^3)	NS
Log *P*	NS
Masse molaire (g/mol)	NS
Surface polaire (*A*°2)	NS
Température d'ébullition (°C)	NS
Température de fusion (°C)	*p* = 0,046 IC : [0,01:0,58] Coef = **0,32**

* les propriétés moléculaires sont issues de la base de données ChemSpider (chemSpider.com).
**α- et β-carotène, β-cryptoxanthine, lutéine, α- et γ-tocophérol, ergostérol et ergocalciférol.
NS : corrélation non significative car *p*>0,05 ; IC : intervalle de confiance à 95% ; Coef : Coefficient de corrélation de Pearson .

Une deuxième hypothèse pouvant expliquer les différences de bioaccumulation des composés que nous avons étudiés dans les LMSN est que celles-ci métabolisent préférentiellement certains micronutriments. Cette hypothèse pourrait expliquer la très forte différence de bioaccumulation de l'α- et du ɣ-TOC dans les larves. Différence qui ne peut pas s'expliquer par les différences mineures de propriétés moléculaires de ces deux molécules, mais qui pourrait être expliquée par une dégradation préférentielle du ɣ-TOC, par rapport à l'α-TOC, par le cytochrome P450 TOC-ω-hydroxylase, comme cela a été décrit chez *Drosophila melanogaster* (*519*).

Cette deuxième hypothèse pourrait aussi expliquer la meilleure bioaccumulation des xanthophylles que des carotènes dans les LMSN. Nos données montrent un taux de bioaccumulation moyen de 0,7 et de 1,3 pour respectivement les deux carotènes α- et β-car, contre 8,1 et 10 pour respectivement les deux xanthophylles lutéine et β-cryptoxanthine. En effet, chez de nombreuses espèces d'insectes, l'absorption des caroténoïdes est sélective, avec une préférence pour les carotènes chez les orthoptères et les phasmes, et pour les xanthophylles chez les lépidoptères (comme le ver à soie) (*520*). Une étude a démontré l'existence d'une protéine de liaison spécifique à la lutéine, présente notamment dans les tissus de l'intestin moyen, du corps gras et des glandes séricigènes du ver à soie (*520*). Cette protéine est impliquée dans l'absorption de la lutéine tout au long des stades de développement larvaire. Après

absorption dans l'intestin moyen, la lutéine présente dans le ver à soie est associée à la lipophorine de haute densité (HDLp) dans l'hémolymphe (*521*). La lipophorine est la lipoprotéine majoritaire circulant dans l'hémolymphe et transportant en son noyau les caroténoïdes jusqu'aux tissus périphériques (*522*, *523*). Tsuchida and Sakudoh, 2015, (*524*) ont dosé la même quantité de lutéine et de β-car dans la lipophorine (4 µg/mg). Cependant, dans les glandes séricigènes (produisant la soie), la quantité de lutéine est 28 fois plus importante que celle du β-car et, dans le cocon, cette quantité est 280 fois plus importante. Nous faisons l'hypothèse qu'après transport par la lipophorine d'une même quantité de carotènes et de xanthophylles, un ou des récepteur(s) présents à la surface des tissus périphériques ont une affinité plus importante pour les xanthophylles que pour les carotènes. En effet, certains récepteurs spécifiques existent. Chez le ver à soie, deux gènes codent deux récepteurs différents : un récepteur HDL-2 (Cameo2) et un récepteur de classe B membre 15 (SCRB15). Ces récepteurs présentent une affinité spécifique pour deux types de molécules différentes : les xanthophylles pour le récepteur HDL-2 et les carotènes pour le récepteur de classe B membre 15 (*524*). Chez la drosophile un gène, *nina*D, code pour un récepteur scavenger dont la séquence est similaire à celle des récepteurs scavenger des mammifères SR-BI et CD36, et son inactivation provoque une cécité (*525*). Une des isoformes codée par *nina*D, NinaD-I, est localisée dans la membrane plasmique et pourrait assurer la médiation de l'absorption cellulaire des caroténoïdes à partir des micelles. Il a été montré que l'absorption de NinaD-1 était préférentielle pour la zéaxanthine, qui est un xanthophylle comme la lutéine par rapport au β-car (*526*), ce qui pourrait être le cas aussi chez la LMSN qui est un diptère, tout comme la drosophile. De plus, dans cette même étude, il a été rapporté que cette absorption des caroténoïdes était dépendante de la concentration en caroténoïdes et saturable. Les auteurs suggèrent aussi un rôle de NinaD-I dans le métabolisme du tocophérol (*526*). Ces résultats pourraient expliquer ceux de notre étude sur la bioaccumulation d'α-TOC dans les LMSN où un seuil existe au-delà duquel les LMSN sont saturées (**Publication n°4**). On peut faire l'hypothèse que le maximum de solubilité de l'α-TOC dans le corps gras des LMSN a été atteint.

2. Biodisponibilité des vitamines liposolubles et de la lutéine provenant des LMSN

Nous avons décidé d'étudier la biodisponibilité des vitamines liposolubles et de la lutéine provenant des LMSN car celle-ci est un facteur clé pour estimer l'apport en micronutriments à partir d'une matrice alimentaire donnée (ici, matrice insecte). La biodisponibilité de vitamines ou de caroténoïdes présents dans des insectes comestibles n'avait jamais été étudiée, que ce soit via des études *in vitro* ou *in vivo*. La matrice insecte contient des composés plus ou moins connus, dont certains pourraient moduler la biodisponibilité des micronutriments que nous avons étudiés. Parmi les composés de la matrice insecte qui pourraient moduler la biodisponibilité, l'un a suscité notre intérêt, il s'agit de la chitine. En effet, ce polymère glucidique qui constitue l'exosquelette des insectes n'est pas digestible dans le haut du tube digestif humain et est assimilé à une fibre alimentaire, tout comme les fibres végétales, e.g. cellulose, pectine. Or, plusieurs études ont montré que les fibres alimentaires peuvent diminuer la biodisponibilité de certains micronutriments lipidiques (*395*, *440*, *442*). Un composé inconnu dans la matrice des LMSN pourrait aussi être responsable d'une augmentation ou d'une diminution de la bioaccessibilité et/ou de l'absorption intestinale des micronutriments. Ainsi, il était intéressant d'évaluer la biodisponibilité de différents micronutriments à partir d'une « nouvelle » matrice, les LMSN.

Existe-t-il un ou des facteurs impactant la biodisponibilité de composés liposolubles dans les LMSN ?

L'acronyme SLAMENGHI est utilisé comme moyen mnémotechnique pour se rappeler des principaux facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité de micronutriments. Dans cette partie, nous passerons en revue les facteurs qui peuvent entrer en jeu lors de nos expérimentations concernant la digestion et l'absorption intestinale de vitamines et caroténoïdes provenant de LMSN.

- **S et L** : « Species » et « Molecular linkage » : espèce moléculaire et modification chimique de la molécule

En raison de la variabilité des matrices dans lesquelles ils sont incorporés, l'étude de l'effet des espèces chimiques de caroténoïdes sur leur biodisponibilité n'est pas une tâche aisée. Pour différencier ces effets, il est nécessaire soit de mesurer la biodisponibilité des vitamines et caroténoïdes purs, soit de comparer la biodisponibilité de ces composés dans une même matrice. Par exemple, la bioaccessibilité de la lutéine pure est plus élevée que celle du β-car pur, mais leur efficacité d'absorption intestinale est non significativement différente (*333*). Une étude visant à déterminer la bioaccessibilité de caroténoïdes différents dans des poivrons montre aussi une importante différence entre bioaccessibilité de xanthophylles (de 30 à 100%), la β-cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine, et celle d'un carotène (<15%), le β-car (*527*). Ces mêmes résultats ont été constatés par Reboul *et al.,* 2006 (*165*) mais aussi dans nos études (**Publications n°1 et 3**). La bioaccessibilité plus élevée de la lutéine peut d'abord s'expliquer par sa structure et sa polarité : les xanthophylles sont plus polaires, ce qui se traduit par une plus grande incorporation dans les micelles que les carotènes. Aussi, du fait de leur polarité, les membranes des entérocytes peuvent plus facilement absorber les xanthophylles, ce qui augmente leur biodisponibilité (*4*, *314*). De plus, les micronutriments les plus hydrophobes ont tendance à rester à l'intérieur des gouttelettes d'huile, ce qui réduit leur bioaccessibilité. Par exemple, les composés les moins hydrophobes, comme la VD_3 sont localisés plus près de l'interface huile/eau, ce qui permet une incorporation de la VD_3 plus simple que celle du β-car, qui est localisé plus au centre des gouttelettes lipidiques (*528*). De plus, l'α-car, légèrement plus hydrophile que le β-car est aussi légèrement plus bioaccessible que celui-ci (*529*).

Concernant la biodisponibilité relative des isomères de la VE, des études n'ont pas observé de différence entre la biodisponibilité de l' α- et du γ-TOC chez l'Homme (*530*, *531*). Une autre étude, menée sur des rats, a montré que l'absorption de l'α-TOC était plus efficace que celle du γ- et du δ-TOC (*532*).

Des corrélations entre quelques propriétés moléculaires des micronutriments (densité, logP, masse molaire, surface polaire, température de fusion et d'ébullition) et leur bioaccessibilité dans les LMSN ont été effectuées selon nos données. Aucune corrélation n'était significative (p>0,05).

La bioaccessibilité des micronutriments peut aussi dépendre de l'isomérisation, de l'estérification ou de la conjugaison de ces composés. Par exemple, pour le β-car, les isomères all-*trans* sont moins bioaccessibles que les isomères *cis* (*398*, *533*). Cependant, pour notre étude *in vivo* (**Publication n°2**), nous avions trouvé les mêmes quantités de all-*trans*-β-car et de 13-*cis*-β-car dans les croquettes à base de LMSN et dans les croquettes à partir de patates douces. Pourtant, la biodisponibilité du β-car était deux fois plus faible chez les gerbilles ayant

consommé les croquettes à base de LMSN, montrant que cette différence n'était pas due à une différence d'isomérisation du β-car. En ce qui concerne la lutéine et la VE, elles peuvent être présentes sous forme estérifiée dans l'alimentation (dans les suppléments notamment). Néanmoins elles n'étaient présentes que sous formes libres dans les substrats que nous avons utilisés et donc ce paramètre ne peut pas expliquer les différences de biodisponibilité observées.

- **A** : « Amount consumed in a meal » : quantité de micronutriments dans le repas

La quantité de micronutriments dans le repas est un facteur pouvant influencer leur bioaccessibilité. Par exemple, l'efficacité d'absorption des caroténoïdes resterait constante pour des quantités allant jusqu'à 20-30 mg. Au-delà de ces quantités, l'absorption pourrait diminuer et/ou atteindre un seuil limite du fait notamment d'une capacité limitée des micelles mixtes à solubiliser les caroténoïdes (*214*). D'après nos données, il n'y a pas de corrélation entre concentrations de vitamines et phytomicronutriments dans les LMSN et concentrations en ces composés dans les micelles mixtes provenant des LMSN ($p = 0,32$). Il n'existe pas non plus de corrélation entre les concentrations dans les micelles issues de digestions de LMSN et les taux d'absorption intestinale (évalués avec les Caco-2) des phytomicronutriments issus des micelles de LMSN ($p = 0,91$). Ces résultats complètent ceux de notre étude *in vivo* (**Publication n°2**). En effet, les gerbilles des différents groupes ont pratiquement ingéré la même quantité de nourriture (et donc de β-car) mais la biodisponibilité de la VA était plus faible dans les groupes de gerbilles ayant consommé des LMSN. Cela implique le fait qu'à dose équivalente, un autre facteur paraît affecter la biodisponibilité, comme celui de la matrice par exemple.

- **M** : « Matrix » : matrice dans laquelle les phytomicronutriments sont incorporés

La matrice contenant les caroténoïdes est considérée comme le facteur influençant le plus leur biodisponibilité. Par exemple la faible biodisponibilité des caroténoïdes des végétaux à feuilles vertes serait liée à la difficulté de libération des caroténoïdes présents dans les chloroplastes (*534*).

Dans les végétaux, les caroténoïdes sont localisés à l'intérieur des tissus, au sein de structures cellulaires, donc généralement moins bioaccessibles que dans les produits animaux. Chez les insectes, les micronutriments lipidiques sont, à priori, majoritairement localisés dans le corps gras. Il y avait donc de fortes raisons de supposer que la biodisponibilité de ces micronutriments était différente entre les matrices végétales et la matrice insecte.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons effectué une ANOVA à deux facteurs (effet matrice : végétale ou insecte et effet micronutriment : α-, β-car, lutéine, etc.) en regroupant toutes nos données de bioaccessibilité. Cette analyse a montré un effet significatif du type de matrice alimentaire (végétale ou insecte) sur la bioaccessibilité des micronutriments (p<0,001). Plus précisément, les bioaccessibilités étaient significativement différentes entre LMSN et substrats pour le β-car, l'α-TOC, le γ-TOC et la β-cryptoxanthine, mais pas pour la lutéine, ni l'α-car. Certaines molécules sont donc plus affectées que d'autres par la nature de la matrice (végétale ou insecte). Les molécules pour lesquelles les différences entre substrats et LMSN sont les plus significatives sont, dans l'ordre décroissant : α-TOC > β-cryptoxanthine > γ-TOC > β-car.

Comment expliquer cette différence de biodisponibilité entre la matrice insecte et la matrice végétale ? On sait tout d'abord que les LMSN sont des matrices animales et que, généralement, la bioaccessibilité des caroténoïdes présents dans ces matrices est plus importante que celle provenant de végétaux (*535*) et cela pour deux raisons principales : la présence de lipides, qui favorisent la biodisponibilité des micronutriments lipidiques, et l'absence de fibres alimentaires, qui diminuent cette biodisponibilité.

En ce qui concerne les lipides, les LMSN étant riches en lipides, ceux-ci pourraient impacter positivement la bioaccessibilité des micronutriments dans les LMSN, comparés aux végétaux, pauvres en lipides. En effet, l'extraction des vitamines liposolubles et des caroténoïdes de la matrice alimentaire est logiquement facilitée s'ils sont solubilisés dans une phase hydrophobe. Une étude a d'ailleurs constaté une meilleure biodisponibilité de l'astaxanthine issue de saumons d'élevage (contenant 17,3 % de lipides) que celle issue de saumons sauvages (contenant 6,5 % de lipides) (*536*). Les lipides stimulent la sécrétion biliaire et donc la formation de micelles permettant de solubiliser les micronutriments lipidiques. De plus, les AG et les monoglycérides, produits de la digestion des TAG, participent à la formation des micelles. Enfin, les TAG favorisent la sécrétion des chylomicrons et augmentent la sécrétion de vitamines à l'extérieur de l'entérocyte, augmentant leur absorption (*214*). Le type d'AG des TAG influence aussi la bioaccessibilité des micronutriments. Une étude a suggéré que le beurre et l'huile de palme, riches en AGS (tout comme les LMSN) améliorent la biodisponibilité des xanthophylles par rapport aux huiles d'olive, de tournesol ou de poisson, riches en AGPI (*537*). Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que cet effet était dû à la taille réduite des micelles produites en présence d'AGS. Cependant, la bioaccessibilité des micronutriments provenant des LMSN est, pour la plupart des molécules, plus faible que celle provenant des substrats végétaux. Ainsi, si les lipides présents dans la matrice larvaire ou le

type d'AG impactent positivement leur bioaccessibilité, d'autres mécanismes pourraient aussi être impliqués, tels qu'un effet inhibiteur possible de certains composés présents dans la matrice larvaire.

En ce qui concerne les fibres alimentaires, elles sont généralement présentes dans les matrices végétales et absentes dans les matrices animales. Néanmoins, la matrice insecte est un cas particulier de matrice animale car elle contient une molécule, la chitine, qui est le constituant principal de l'exosquelette des insectes, et qui est assimilée à une fibre alimentaire car elle n'est pas digérée dans le haut du tube digestif humain. Il a été montré que des fibres alimentaires pouvaient diminuer la bioaccessibilité de caroténoïdes (*440*, *538*), mais pas celle de la VE (*440*, *441*). De plus, une étude a montré que la présence de chitosane, dérivé de la chitine par déacétylation et soluble dans l'eau, diminuait la bioaccessibilité de la VD d'environ 37% (*442*). La présence de chitine pourrait entraver l'émulsification des lipides, la lipolyse des TAG et la formation de micelles. Elle pourrait aussi augmenter la viscosité du chyme et par conséquent limiter la diffusion des micelles transportant les micronutriments lipidiques vers les entérocytes (*539*). La teneur en chitine des LMSN varie très faiblement selon le substrat d'élevage (*35*). Ainsi, si la chitine de la matrice insecte avait un effet inhibiteur supérieur aux fibres végétales présentes dans les substrats sur la bioaccessibilité des micronutriments, toutes les LMSN élevées sur des substrats différents auraient une bioaccessibilité plus faible comparée à leurs substrats respectifs, ce qui n'est pas le cas. D'autres composés de la matrice végétale ou de la matrice insecte sont donc impliqués, par exemple des composés présents en quantités variables dans les substrats et bioaccumulés par les LMSN en même temps que les vitamines et caroténoïdes.

Parmi ces composés, nous pensons tout d'abord aux phytostérols. En effet, ces stérols végétaux ont la capacité de réduire le taux de cholestérol dans le sang en réduisant son absorption par l'intestin. Il a par ailleurs été observé que des phytostérols diminuent l'absorption de l'α-TOC, du β-car, de l'α-car, de la lutéine (*448*, *449*) et de la VD (*454*), mais pas de la β-cryptoxanthine (*450*). La bioaccessibilité de la VE contenue dans la plupart des substrats huileux, et des LMSN élevées sur ces substrats étant généralement plus faible que celle contenue dans des substrats moins riches en phytostérols (*540*, *541*), il peut être supposé que ce facteur a impacté négativement cette bioaccessibilité.

- **E** : « *effectors of absorption* » : effecteurs d'absorption, **N** : « *nutrient status of the host* » : statut de l'individu en micronutriments, **G** : « *genetic factors* » : facteurs génétiques, **H** : « *host-related factors* » : facteurs liés à l'individu : âge, sexe...

Au vu de nos différentes expérimentations, nous ne pouvons pas discuter de l'influence de ces facteurs.

- **I** : « *mathematical interactions* » : intéractions entre tous ces facteurs

Ce facteur représente la probable synergie ou antagonisme entre plusieurs facteurs qui ont été précédemment étudiés. Plusieurs des facteurs mentionnés précédemment peuvent interagir ensemble. De potentielles interactions pourraient par exemple exister entre effet positif des lipides contenus dans les LMSN et effet négatif de la chitine des LMSN ou effet négatif des phytostérols dans certains substrats riches en ces molécules, etc. Il est extrêmement complexe de déterminer l'impact de ces interactions du fait de la complexité des mécanismes en jeu et de la grande diversité des facteurs impliqués.

3. Intérêt de l'enrichissement en micronutriments des LMSN pour la nutrition animale

Les aliments pour animaux d'élevage sont, la plupart du temps, supplémentés en de nombreuses vitamines, pour de multiples raisons : meilleure croissance, réduction des infections, maintien du métabolisme osseux, amélioration de leurs capacités à se reproduire, protection contre l'oxydation des lipides de la viande, etc. Les LMSN sont déjà utilisées en alimentation animale comme source de protéines et de lipides notamment. Ainsi, apporter des LMSN enrichies en vitamines ou en d'autres phytomicronutriments d'intérêt, par exemple la lutéine qui permet de colorer la chair des poulets de chair, augmenterait la valeur économique de ces larves en réduisant la nécessité d'ajouter ces composés dans l'alimentation des animaux d'élevage. D'après nos données, il a été calculé qu'en introduisant des quantités de LMSN n'impactant pas la croissance et la qualité optimale de la viande des animaux d'élevage, il serait possible d'atteindre des taux intéressants de micronutriments, voire de répondre à la totalité des recommandations nutritionnelles pour certaines vitamines dans certaines espèces d'animaux d'élevage. Plus précisément, nous avons calculé que l'inclusion de LMSN riches en VA et/ou en VD dans l'alimentation des animaux d'élevage étudiés pourrait satisfaire l'ensemble de leurs

besoins en ces vitamines. En ce qui concerne la vitamine E, c'est également le cas, à l'exception des poissons (75%). Les LMSN riches en VE présentent un intérêt tout particulier pour les poissons d'élevage, notamment le saumon ou le Tilapia, qui est le poisson d'élevage le plus consommé au monde. Quant aux LMSN riches en lutéine, leur incorporation dans le régime alimentaire des animaux permettrait un apport de lutéine de 32 à 86% pour les volailles et de 27 à 100% pour différents poissons.

L'incorporation de LMSN riches en vitamines et/ou en phytomicronutriments dans l'alimentation animale aurait un autre intérêt, celui d'apporter des formes naturelles de ces composés, à la différence des suppléments vitaminiques habituellement utilisés qui contiennent souvent des formes synthétiques de vitamines. Par exemple, l'all-rac-α-tocophérol pourrait être remplacé par du RRR-α-tocophérol (l'isomère naturel), ou un mélange de all-trans et d'isomères cis du β-car pourrait être utilisé à la place du all-trans-β-carotène (forme synthétique). Certaines études prônent la supériorité nutritionnelle des vitamines naturelles par rapport aux vitamines synthétiques. Par exemple, il a été constaté que la VE naturelle était plus biodisponible (et donc mieux absorbée) que la VE synthétique (*531*, *542*, *543*). L'utilisation des LMSN est aussi un argument marketing car les consommateurs sont de plus en plus à la recherche de simplicité et de naturalité dans leurs assiettes, en particulier en ce qui concerne les animaux que nous consommons. En effet, de plus en plus de labels apparaissent, mettant en avant la naturalité de produits tels que des produits issus de l'agriculture biologique, les produits dits « clean-label » ou encore les produits portant des allégations du type « sans » (sans antibiotique, sans additif, sans conservateur de synthèse). Selon l'institut de sondage français TNS, en 2012, 80 % des consommateurs se déclarent intéressés par la recherche de naturalité dans le domaine agroalimentaire. De plus, plusieurs animaux que nous consommons traditionnellement consomment déjà des insectes naturellement, hors élevage. Par exemple, les volailles élevées en plein air consomment déjà naturellement des formes adultes et larvaires d'insectes. Les insectes sont aussi une source de nourriture naturelle pour les espèces de poissons, y compris le tilapia (*544*, *545*).

Enfin, l'utilisation de LMSN et d'insectes en général dans l'alimentation animale pourrait aussi avoir un intérêt économique. En 2014, le prix de la farine de soja était de 0,57 €/kg (*546*). En 2019, le prix moyen de la farine de poisson était d'environ 1,48 €/kg (*547*). Le prix de la farine d'insectes dépend de plusieurs caractéristiques telles que l'espèce d'insecte, le stade de croissance (larves, adultes, nymphes, etc.) ou encore le format de traitement (séché, congelé, etc.). Ainsi, le prix des LMSN peut varier de 2 €/kg à 9,35 €/kg et le prix des vers de farine de 15 €/kg à 32,33 €/kg (*548*). Arru *et al.,* 2019 (*547*) avaient estimé que le prix des

protéines dérivées d'insectes pourrait devenir compétitif par rapport à celui de la farine de poisson d'ici 2023 du fait d'une industrie en forte expansion. En effet, en 2019, l'élevage d'insectes n'en était qu'à ses débuts et ne dépassait pas les 500 tonnes par an, mais d'ici 2030, elle devrait atteindre les 250 000 tonnes par an en UE (*549*). De ce fait, le prix des produits à base d'insectes tels que les farines et huiles diminuera progressivement et leur disponibilité augmentera, ce qui popularisera l'utilisation de matières premières dérivées d'insectes dans l'alimentation des animaux d'élevage.

Cependant, lorsqu'il s'agit de consommer des produits d'origine animale, comme les insectes, il est important de considérer les risques potentiels tels que la contamination biologique, chimique et les risques allergéniques. Ces aspects doivent être pris en compte afin de garantir la sécurité alimentaire et la prévention de problèmes de santé éventuels.

4. Intérêt de l'enrichissement en micronutriments des LMSN pour la nutrition humaine

L'incorporation de LMSN enrichies en vitamines ou phytomicronutriments dans l'alimentation des animaux d'élevage serait une nouvelle façon d'apporter ces composés dans notre alimentation. En effet, étant donné que les animaux d'élevage ne synthétisent pas davantage les vitamines que l'Homme, la consommation de certaines LMSN riches en ces composés pourrait apporter une quantité plus élevée de vitamines que les sources alimentaires habituelles. Par conséquent, la consommation de ces LMSN contribuerait à augmenter notre apport en ces composés.

Pour l'instant, les LMSN ne sont pas autorisées en alimentation humaine. Cependant, au vu des données de la littérature ne montrant pas de différences majeures de bioaccumulation de certains micronutriments entre différentes espèces d'insectes comestibles (*107*), il est raisonnable de supposer, bien que cela reste à vérifier, que l'enrichissement en vitamines et phytomicronutriments lipidiques est aussi possible pour certaines espèces d'insectes déjà autorisées en alimentation humaine, c'est-à-dire le ver de farine, le ver Buffalo, le criquet migrateur et le grillon domestique. En regroupant nos données, nous constatons que les quantités de LMSN qui seraient nécessaires pour atteindre les recommandations nutritionnelles pour l'homme et la femme adulte en termes de vitamines sont de 200 à 250 g/j pour la VA et la VE, de 16 g/j pour la lutéine et de seulement 0,32 g/j pour la VD. Ces quantités sont tout à fait raisonnables en ce qui concerne la lutéine et la VD. Les LMSN pourraient être un jour acceptées

en tant qu'aliment pour l'Homme (cette année, de nouveaux aliments à base d'insectes comestibles, dont la LMSN sont en cours d'évaluation par l'EFSA) et pourraient être utilisées sous forme d'huile par exemple, ce qui pourrait augmenter leur concentration en ces micronutriments. Les LMSN enrichies en proVA pourraient aussi être particulièrement intéressantes pour lutter contre la carence en VA dans certains pays en développement ou cette carence est toujours un problème majeur de santé publique. En effet, dans de nombreux pays d'Asie et d'Afrique, les populations sont entomophages et la consommation de nombreuses espèces d'insectes y est autorisée.

5. Intérêt des LMSN pour recycler des micronutriments de déchets végétaux

Durant cette thèse, pour chaque expérimentation, les LMSN ont été élevées soit sur des substrats comestibles comme des fruits (clémentines), des légumes (chou Kale, champignons, patates douces, etc.), et des huiles (huile de colza, de maïs, de son de riz, etc.), soit sur certains coproduits (sons, pieds de champignons, …). Les LMSN bioaccumulent les micronutriments à partir des différents substrats que nous avons utilisés. Pour la VE, la plupart des LMSN élevées sur des coproduits (sons et tourteaux de presse) contenaient des quantités de VE micellarisées plus importantes que celles des LMSN élevées sur des huiles, ce qui pourrait conduire à une valorisation durable de la VE de ces coproduits. Au vu de nos résultats probants concernant l'enrichissement des LMSN à partir de coproduits végétaux et la diversité des substrats sur lesquels elles peuvent se développer, nous pourrions aussi enrichir des LMSN en micronutriments grâce à des déchets végétaux autorisés : écarts et excédents de production des agriculteurs et coproduits de l'industrie agroalimentaire notamment. Le recyclage de ces déchets par entomoconversion fournirait une forme plus durable de ces micronutriments en permettant de recycler dans la chaîne alimentaire une partie des micronutriments qui sont habituellement perdus dans ces déchets.

Conclusion et perspectives

Durant cette thèse, nous avons pu démontrer la bioaccumulation de plusieurs vitamines liposolubles et de caroténoïdes dans les LMSN. Les taux de bioaccumulation sont différents selon les molécules mais aussi selon les substrats d'élevage utilisés. Afin d'enrichir ces résultats et pour déterminer la capacité des LMSN à être des sources significatives de micronutriments, i.e. des sources de micronutriments biodisponibles, nous avons, grâce à un modèle de digestion *in vitro* couplé à de la culture cellulaire, réussi à estimer pour la première fois la bioaccessibilité et l'absorption intestinale de vitamines et caroténoïdes provenant de LMSN. Ces résultats ont été complétés avec ceux d'une étude *in vivo* visant à déterminer la capacité du β-car bioaccumulé dans des LMSN à rétablir un statut déficient en VA chez la gerbille. Les vitamines et certains caroténoïdes sont indispensables, notamment pour la bonne croissance des animaux d'élevage. Des LMSN élevées sur des substrats bien spécifiques et riches en ces composés pourraient, en plus d'apporter des protéines de haute valeur biologique, être une source supplémentaire de ces composés dans l'alimentation des animaux d'élevage et, indirectement, dans l'alimentation humaine. La **figure 29** récapitule les principales données obtenues des études *in vitro* menées durant cette thèse.

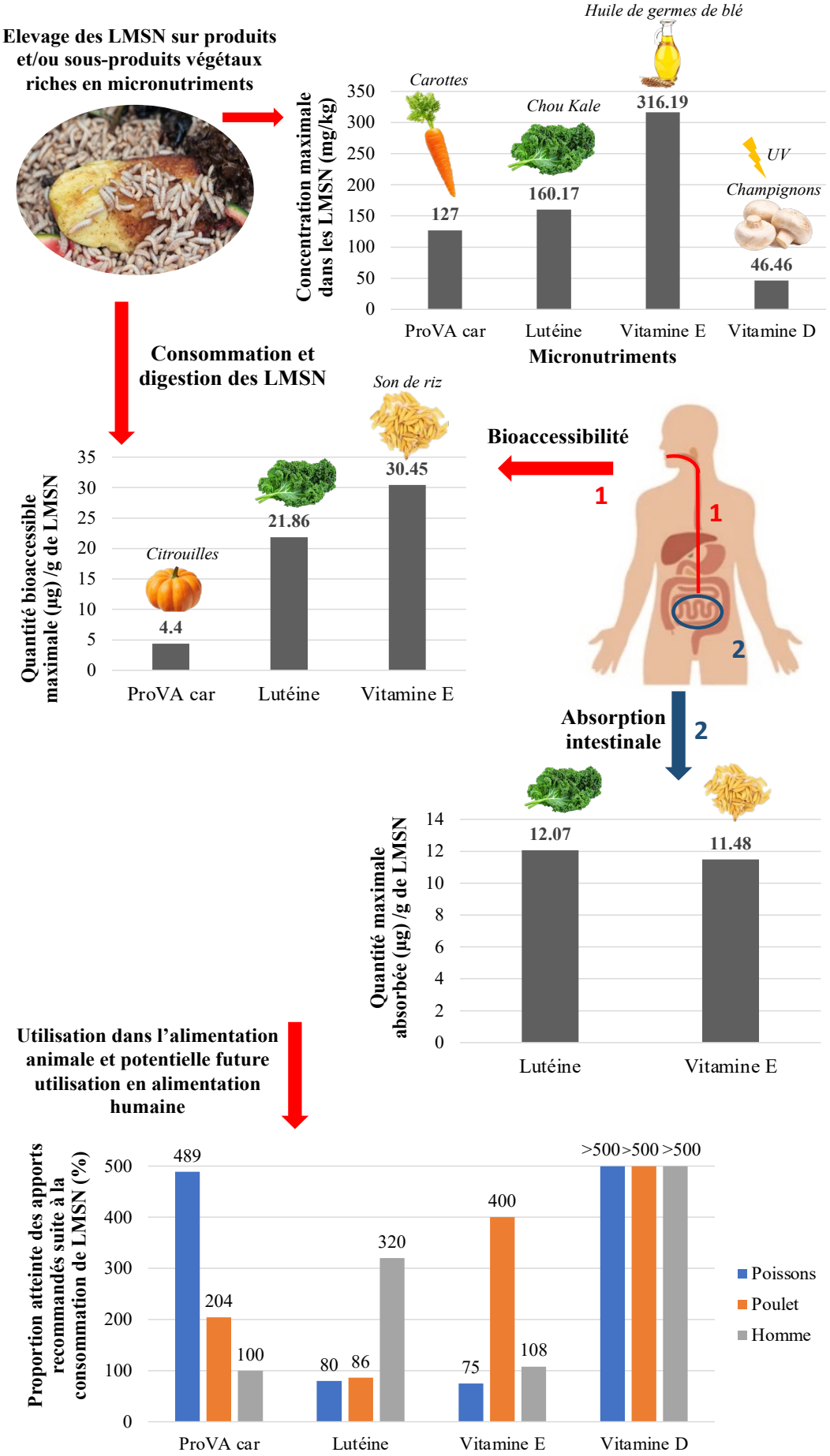


Figure 29 : Récapitulatif de certaines données obtenues durant cette thèse

Nous avons travaillé sur une seule souche de LMSN (originaire de Paradou, 13520, France), mais il en existe plusieurs. Au vu du développement et des taux de conversion des déchets différents selon la population de MSN (*550*), nous pouvons faire l'hypothèse que les taux de bioaccumulation varient selon la souche de LMSN. Il serait alors possible de déterminer celles pour lesquelles la bioaccumulation est la plus forte.

Nous avons concentré nos recherches sur la MSN. Cependant, il serait également possible d'enrichir d'autres insectes comme le ver de farine, le criquet migrateur, etc. qui sont déjà autorisés à la consommation humaine en UE. Le grillon domestique par exemple contient déjà des vitamines, telles que de la VA en petites quantités (0,35 µg/g), ou de plus importantes teneurs pour la VE (331 µg/g) (*551*). Néanmoins il s'agit de valeurs mesurées après son élevage sur un substrat standard, pas particulièrement riche en ces vitamines, et nous ne savons pas quelles seraient ces valeurs sur un substrat enrichi en ces vitamines ou en d'autres micronutriments. Ainsi, dans une autre étude sur le grillon , l'utilisation de carottes comme substrat d'élevage a permis d'obtenir des concentrations plus élevées en β-car et en rétinol (*552*). Il serait intéressant d'évaluer et de comparer les capacités de différentes espèces d'insectes à bioaccumuler les vitamines et caroténoïdes. De plus, certaines espèces bioaccumulent préférentiellement certains micronutriments, comme le suggèrent nos résultats montrant que les LMSN accumulent préférentiellement l'α-TOC en comparaison du γ-TOC, et des données de la littérature montrant que certains insectes bioaccumulent mieux les xanthophylles que les carotènes.

Si les LMSN peuvent être enrichies en vitamines et caroténoïdes, alors elles pourraient aussi bioaccumuler d'autres molécules d'intérêt, comme des polyphénols par exemple. Les aliments d'origine végétale contiennent naturellement des polyphénols. Ceux-ci pourraient intervenir dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives, le cancer et le diabète (*553–556*). Chez les animaux d'élevage, les polyphénols pourraient combattre le stress oxydatif et les processus inflammatoires (*557*, *558*), mais aussi améliorer la qualité de la viande (*559–561*). Ainsi, des insectes enrichis en polyphénols pourraient par exemple être employés pour remplacer les antioxydants synthétiques utilisés par l'industrie agro-alimentaire, comme le BHQT (E319) ou encore le BHA (E320), très utilisé dans les aliments transformés et classé cancérigène possible par le Centre international de recherche sur le cancer. D'autres vitamines, cette fois-ci hydrosolubles pourraient aussi être bioaccumulées et valorisées par les insectes. Les insectes sont reconnus pour leurs teneurs, notamment en vitamine B_{12} puisque le ver de farine en contient 1,08 µg/100 g, le grillon 2,88 µg/100 g, la sauterelle 0,84 µg/100 g et 13,2 µg/100 g pour la blatte (*101*). A noter que ces chiffres peuvent être surévalués du fait de la présence de pseudo-vitamine B_{12}

dans les insectes, analogue structurel de la vitamine B_{12} biologiquement inactif pour l'Homme. La carence alimentaire en vitamine B_{12} est un problème grave dans le sous-continent indien, au Mexique, en Amérique centrale, en Amérique du Sud mais aussi dans certains pays d'Afrique (*562*). Ainsi, les zones où cette carence est la plus fréquente sont aussi des zones où l'entomophagie est courante, ce qui pourrait rendre l'utilisation des insectes riches en vitamine B_{12} très intéressante dans ces régions.

Cependant, si les insectes peuvent bioaccumuler des micronutriments hydrosolubles ou liposolubles, ils pourraient aussi bioaccumuler des contaminants chimiques ou transmettre des contaminants biologiques (bactéries, virus). La manipulation d'insectes vivants avec celle des déchets organiques peut représenter un défi en termes de contrôle des maladies et de l'hygiène, c'est pour cela que des normes strictes ont été établies pour éviter une contamination bactérienne par exemple. Il n'existe quasiment aucune donnée concernant certains contaminants biologiques, comme les champignons, les virus et les protozoaires. Comme pour tout produit alimentaire, la traçabilité et la sécurité alimentaire sont des préoccupations majeures. Suivre la provenance des insectes et garantir leur qualité et leur innocuité tout au long de la chaîne d'approvisionnement n'est pas une tâche aisée. L'évaluation des bénéfices et des risques de l'entomoconversion de déchets urbains et péri-urbains par la LMSN, en se focalisant sur la bioaccumulation de micronutriments et de contaminants chimiques (PCB, microplastiques…), est le but principal d'une doctorante, Marie Papin, en thèse dans mon équipe depuis décembre 2022. La thèse de Marie permettra l'obtention de nouvelles données concernant l'utilisation de substrats non autorisés actuellement pour l'élevage des insectes, comme les déchets de cantine scolaire et de grandes et moyennes surfaces.

Enfin, il serait aussi intéressant de quantifier les micronutriments dans les produits issus d'insectes, comme les protéines et l'huile d'insectes, qui sont déjà utilisées en alimentation animale, notamment en aquaculture. L'impact des différents traitements technologiques utilisés pour transformer les insectes en farine ou en huile n'est pas connu. En effet, une étude a constaté une diminution de 4 à 51% des lipides de LMSN selon le traitement technologique (grillage, séchage, etc.) (*563*), impliquant une éventuelle perte de vitamines liposolubles. Il serait aussi judicieux d'évaluer la biodisponibilité des vitamines et des caroténoïdes provenant de ces produits.

Bibliographie

1. Ritchie, H., Rosado, P., Roser, M., Environmental Impacts of Food Production. *Our World Data* (2022).

2. Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P., Edible insects - future prospects for food and feed security, *FAO Forestry* (2013), vol. 171.

3. Van Huis, A., Oonincx, D. G. A. B., The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **37**, 43 (2017).

4. Zaripheh, S., Erdman, J. W., Jr., Factors That Influence the Bioavailablity of Xanthophylls. *J. Nutr.* **132**, 531S-534S (2002).

5. Desmarchelier, C., Borel, P., Bioavailability of Vitamin E, *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (2018), pp. 1181–1196.

6. Jongema, Y., List of Edible Insect Species of the World (2017), (available at https://www.wur.nl/en/research-results/chair-groups/plant-sciences/laboratory-of-entomology/edible-insects/worldwide-species-list.htm).

7. Smith, M. R., Stull, V. J., Patz, J. A., Myers, S. S., Nutritional and environmental benefits of increasing insect consumption in Africa and Asia. *Environ. Res. Lett.* **16**, 065001 (2021).

8. Wang, Y.-S., Shelomi, M., Review of Black Soldier Fly (Hermetia illucens) as Animal Feed and Human Food. *Foods*. **6**, 91 (2017).

9. Rozkosný, R., A biosystematics study of the European Stratiomyidae (Diptera), *Series Entomologica* (1983).

10. Maquart, P.-O., Richard, D., Willems, J., First record of the Black Soldier Fly, Hermetia illucens, in the Western regions of France (Vendée, Loire-Atlantique, Ille-et-Vilaine) with notes on its worldwide repartition (Diptera, Stratiomyidae). *Bull. Société Entomol. Fr.* **125**, 13–18 (2020).

11. Aubert, J.-F., Un diptère bien acclimaté en France : Hermetia illucens (L.) (Stratiomyidae). *Bull. Société Entomol. Mulhouse* (1964), pp. 19–20.

12. Benelli, G., Canale, A., Raspi, A., Fornaciari, G., The death scenario of an Italian Renaissance princess can shed light on a zoological dilemma: did the black soldier fly reach Europe with Columbus? *J. Archaeol. Sci.* **49**, 203–205 (2014).

13. Tomberlin, J. K., Sheppard, D. C., Joyce, J. A., Selected Life-History Traits of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) Reared on Three Artificial Diets. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **95**, 379–386 (2002).

14. Tomberlin, J. K., Sheppard, D. C., Lekking Behavior of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). *Fla. Entomol.* **84**, 729 (2001).

15. Tomberlin, J. K., Sheppard, D. C., Factors Influencing Mating and Oviposition of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) in a Colony. *J. Entomol. Sci.* **37**, 345–352 (2002).

16. Olivier, P. A., Kaspers, B., Disposal apparatus and method for efficiently bio-converting putrescent wastes, patent n° US 6,780,637 B2 (2004).

17. Caruso, D., Devic, E., Subamia, I. W., Talamond, P., Baras, E., Technical handbook of domestication and production of Diptera Black Soldier Fly (BSF), Hermetia illucens, Stratiomyidae, (2014).

18. Amrul, N. F., Kabir Ahmad, I., Ahmad Basri, N. E., Suja, F., Abdul Jalil, N. A., Azman, N. A., A Review of Organic Waste Treatment Using Black Soldier Fly (Hermetia illucens). *Sustainability*. **14**, 4565 (2022).

19. Van Huis, A., K. Tomberlin, J., Eds., *Insects as food and feed from production to consumption* (Wageningen Academic Publishers., 2017).

20. Dzepe, D., Nana, P., Kuietche, H. M., Kuate, A. F., Tchuinkam, T., Djouaka, R., Role of pupation substrate on post-feeding development of black soldier fly larvae, Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae). *J. Entomol. Zool. Stud.*, 6 (2020).

21. Lima, E. A. B. F., Ferreira, C. P., Bernardes, A. M., Godoy, W. A. C., Neighborhood Interactions and Larval Dispersal Behavior in Blowflies. *J. Insect Behav.* **22**, 245–255 (2009).

22. Dortmans, B., Diener, S., Verstappen, B., Zurbrügg, C., *Black Soldier Fly Biowaste Processing* (Eawag – Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, 2017).

23. De Smet, J., Wynants, E., Cos, P., Van Campenhout, L., Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (Hermetia illucens) and Impact on Exploitation Potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e02722-17 (2018).

24. Kim, C.-H., Ryu, J., Lee, J., Ko, K., Lee, J., Park, K. Y., Chung, H., Use of Black Soldier Fly Larvae for Food Waste Treatment and Energy Production in Asian Countries: A Review. *Processes*. **9**, 161 (2021).

25. Kouřimská, L., Adámková, A., Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS J.* **4** (2016).

26. Ewald, N., Vidakovic, A., Langeland, M., Kiessling, A., Sampels, S., Lalander, C., Fatty acid composition of black soldier fly larvae (Hermetia illucens) – Possibilities and limitations for modification through diet. *Waste Manag.* **102**, 40–47 (2020).

27. Fitriana, E. L., Laconi, E. B., Jayanegara, A., Influence of various organic wastes on growth performance and nutrient composition of black soldier fly larvae (Hermetia illucens): A meta-analysis. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **788**, 012051 (2021).

28. Liland, N. S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C. G., Waagbø, R., Torstensen, B. E., Lock, E.-J., Modulation of nutrient composition of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLOS ONE*. **12**, e0183188 (2017).

29. Galassi, G., Jucker, C., Parma, P., Lupi, D., Crovetto, G. M., Savoldelli, S., Colombini, S., Impact of Agro-industrial Byproducts on Bioconversion, Chemical Composition, in vitro Digestibility, and Microbiota of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. *J. Insect Sci.* **21** (2021).

30. Campbell, M., Ortuño, J., Stratakos, A. Ch., Linton, M., Corcionivoschi, N., Elliott, T., Koidis, A., Theodoridou, K., Impact of Thermal and High-Pressure Treatments on the

Microbiological Quality and In Vitro Digestibility of Black Soldier Fly (Hermetia illucens) Larvae. *Animals*. **10**, 682 (2020).

31. Spranghers, T., Ottoboni, M., Klootwijk, C., Ovyn, A., Deboosere, S., De Meulenaer, B., Michiels, J., Eeckhout, M., De Clercq, P., De Smet, S., Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates: Nutritional composition of black soldier fly. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 2594–2600 (2017).

32. Liu, Z., Minor, M., Morel, P. C. H., Najar-Rodriguez, A. J., Bioconversion of Three Organic Wastes by Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. *Environ. Entomol.* **47**, 1609–1617 (2018).

33. Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kierończyk, B., Józefiak, D., Black Soldier Fly Full-Fat Larvae Meal as an Alternative to Fish Meal and Fish Oil in Siberian Sturgeon Nutrition: The Effects on Physical Properties of the Feed, Animal Growth Performance, and Feed Acceptance and Utilization. *Animals*. **10** (2020).

34. Liu, X., Chen, X., Wang, H., Yang, Q., ur Rehman, K., Li, W., Cai, M., Li, Q., Mazza, L., Zhang, J., Yu, Z., Zheng, L., Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *PLOS ONE*. **12**, e0182601 (2017).

35. Ravi, H. K., Degrou, A., Costil, J., Trespeuch, C., Chemat, F., Vian, M. A., Larvae Mediated Valorization of Industrial, Agriculture and Food Wastes: Biorefinery Concept through Bioconversion, Processes, Procedures, and Products. *Processes*. **8**, 857 (2020).

36. Chia, S. Y., Tanga, C. M., Osuga, I. M., Cheseto, X., Ekesi, S., Dicke, M., van Loon, J. J. A., Nutritional composition of black soldier fly larvae feeding on agro-industrial by-products. *Entomol. Exp. Appl.* **168**, 472–481 (2020).

37. Ong, S.-Q., Lee, B.-B., Tan, G.-P., Maniam, S., Capacity of black soldier fly and house fly larvae in treating the wasted rice in Malaysia. *Malays. J. Sustain. Agric.* **1**, 08–10 (2017).

38. Tippayadara, N., Dawood, M. A. O., Krutmuang, P., Hoseinifar, S. H., Doan, H. V., Paolucci, M., Replacement of Fish Meal by Black Soldier Fly (Hermetia illucens) Larvae Meal: Effects on Growth, Haematology, and Skin Mucus Immunity of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus. *Animals*. **11**, 193 (2021).

39. Cammack, J., Tomberlin, J., The Impact of Diet Protein and Carbohydrate on Select Life-History Traits of The Black Soldier Fly Hermetia illucens (L.) (Diptera: Stratiomyidae). *Insects*. **8**, 56 (2017).

40. Jucker, C., Lupi, D., Moore, C. D., Leonardi, M. G., Savoldelli, S., Nutrient Recapture from Insect Farm Waste: Bioconversion with Hermetia illucens (L.) (Diptera: Stratiomyidae). *Sustainability*. **12**, 1–14 (2020).

41. Smets, R., Verbinnen, B., Van de Voorde, I., Aerts, G., Claes, J., Van Der Borght, M., Sequential Extraction and Characterisation of Lipids, Proteins, and Chitin from Black Soldier Fly (Hermetia illucens) Larvae, Prepupae, and Pupae. *Waste Biomass Valorization* (2020).

42. Orkusz, A., Edible Insects versus Meat-Nutritional Comparison: Knowledge of Their Composition Is the Key to Good Health. *Nutrients*. **13**, 1207 (2021).

43. Payne, C. L. R., Scarborough, P., Rayner, M., Nonaka, K., Are edible insects more or less 'healthy' than commonly consumed meats? A comparison using two nutrient profiling models developed to combat over- and undernutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* **70**, 285–291 (2016).

44. XiaoMing, C., Ying, F., Hong, Z., ZhiYong, C., Review of the nutritive value of edible insects. *For. Insects Food Hum. Bite Back Proc. Workshop Asia-Pac. Resour. Their Potential Dev. Chiang Mai Thail*, 85–92 (2010).

45. Mertz, E. T., Beeson, W. M., Jackson, H. D., Classification of essential amino acids for the weanling pig. *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 121–128 (1952).

46. Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., Tiwari, R., Yatoo, Mohd. I., Karthik, K., Michalak, I., Dhama, K., Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health – a comprehensive review. *Vet. Q.* **41**, 1–29 (2021).

47. Kim, J.-E., Lee, H.-G., Amino Acids Supplementation for the Milk and Milk Protein Production of Dairy Cows. *Anim. Open Access J. MDPI.* **11**, 2118 (2021).

48. Wang, S. Y., Wu, L., Li, B., Zhang, D., Reproductive Potential and Nutritional Composition of Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae) Prepupae Reared on Different Organic Wastes. *J. Econ. Entomol.* **113**, 527–537 (2020).

49. Kawasaki, K., Hashimoto, Y., Hori, A., Kawasaki, T., Hirayasu, H., Iwase, S., Hashizume, A., Ido, A., Miura, C., Miura, T., Nakamura, S., Seyama, T., Matsumoto, Y., Kasai, K., Fujitani, Y., Evaluation of Black Soldier Fly (Hermetia illucens) Larvae and Pre-Pupae Raised on Household Organic Waste, as Potential Ingredients for Poultry Feed. *Animals*. **9**, 98 (2019).

50. Do, S., Koutsos, L., Utterback, P. L., Parsons, C. M., de Godoy, M. R. C., Swanson, K. S., Nutrient and AA digestibility of black soldier fly larvae differing in age using the precision-fed cecectomized rooster assay1. *J. Anim. Sci.* **98**, skz363 (2020).

51. Matthäus, B., Piofczyk, T., Katz, H., Pudel, F., Renewable Resources from Insects: Exploitation, Properties, and Refining of Fat Obtained by Cold-Pressing from *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) Larvae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **121**, 1800376 (2019).

52. Elwert, C., Knips, I., Katz, P., A novel protein source: Maggot meal of the Black Soldier fly (Hermetia illucens) in broiler feed (2010).

53. Traksele, L., Speiciene, V., Smicius, R., Alencikiene, G., Salaseviciene, A., Garmiene, G., Zigmantaite, V., Grigaleviciute, R., Kucinskas, A., Investigation of in vitro and in vivo digestibility of black soldier fly (Hermetia illucens L.) larvae protein. *J. Funct. Foods*. **79**, 104402 (2021).

54. Karlsen, Ø., Amlund, H., Berg, A., Olsen, R. E., The effect of dietary chitin on growth and nutrient digestibility in farmed Atlantic cod, Atlantic salmon and Atlantic halibut. *Aquac. Res.* **48**, 123–133 (2017).

55. De Marco, M., Martínez, S., Hernandez, F., Madrid, J., Gai, F., Rotolo, L., Belforti, M., Bergero, D., Katz, H., Dabbou, S., Kovitvadhi, A., Zoccarato, I., Gasco, L., Schiavone, A., Nutritional value of two insect larval meals (Tenebrio molitor and Hermetia illucens)

for broiler chickens: Apparent nutrient digestibility, apparent ileal amino acid digestibility and apparent metabolizable energy. *Anim. Feed Sci. Technol.* **209**, 211–218 (2015).

56. Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, W., Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poult. Sci.* **78**, 699–706 (1999).

57. Ravindran, V., Hew, L., Ravindran, G., Bryden, W., Apparent ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broiler chickens. *Anim. Sci.* **81**, 85–97 (2005).

58. Womeni, H. M., Linder, M., Tiencheu, B., Mbiapo, F. T., Villeneuve, P., Fanni, J., Parmentier, M., Oils of insects and larvae consumed in Africa: potential sources of polyunsaturated fatty acids. *OCL - Ol. Corps Gras Lipides*. **16**, 230–235 (2009).

59. Hasnol, S., Kiatkittipong, K., Kiatkittipong, W., Wong, C. Y., Khe, C. S., Lam, M. K., Show, P. L., Oh, W. D., Chew, T. L., Lim, J. W., A Review on Insights for Green Production of Unconventional Protein and Energy Sources Derived from the Larval Biomass of Black Soldier Fly. *Processes*. **8**, 523 (2020).

60. Ebeneezar, S., D., L. P., C.S., T., N.S., J., R., S., S., C., P., S., P., V., Nutritional evaluation, bioconversion performance and phylogenetic assessment of black soldier fly (Hermetia illucens, Linn. 1758) larvae valorized from food waste. *Environ. Technol. Innov.* **23**, 101783 (2021).

61. Hoc, B., Genva, M., Fauconnier, M.-L., Lognay, G., Francis, F., Caparros Megido, R., About lipid metabolism in Hermetia illucens (L. 1758): on the origin of fatty acids in prepupae. *Sci. Rep.* **10**, 11916 (2020).

62. Opatovsky, I., Vitenberg, T., Jonas-Levi, A., Gutman, R., Does Consumption of Baker's Yeast (Saccharomyces cerevisiae) by Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Affect Their Fatty Acid Composition? *J. Insect Sci.* **21** (2021), doi:10.1093/jisesa/ieab031.

63. DeLany, J. P., Windhauser, M. M., Champagne, C. M., Bray, G. A., Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 905–911 (2000).

64. Yang, H.-T., Chen, J.-W., Rathod, J., Jiang, Y.-Z., Tsai, P.-J., Hung, Y.-P., Ko, W.-C., Paredes-Sabja, D., Huang, I.-H., Lauric Acid Is an Inhibitor of Clostridium difficile Growth in Vitro and Reduces Inflammation in a Mouse Infection Model. *Front. Microbiol.* **8**, 2635 (2018).

65. Fortuoso, B. F., dos Reis, J. H., Gebert, R. R., Barreta, M., Griss, L. G., Casagrande, R. A., de Cristo, T. G., Santiani, F., Campigotto, G., Rampazzo, L., Stefani, L. M., Boiago, M. M., Lopes, L. Q., Santos, R. C. V., Baldissera, M. D., Zanette, R. A., Tomasi, T., Da Silva, A. S., Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. *Microb. Pathog.* **129**, 161–167 (2019).

66. Lalouckova, K., Skrivanova, E., Rondevaldova, J., Frankova, A., Soukup, J., Kokoska, L., In vitro antagonistic inhibitory effects of palm seed crude oils and their main

constituent, lauric acid, with oxacillin in Staphylococcus aureus. *Sci. Rep.* **11**, 177 (2021).

67. McGaw, L. J., Jäger, A. K., van Staden, J., Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South Afr. J. Bot.* **68**, 417–423 (2002).

68. Chen, X., Zhao, X., Deng, Y., Bu, X., Ye, H., Guo, N., Antimicrobial potential of myristic acid against Listeria monocytogenes in milk. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **72**, 1 (2019).

69. Matsue, M., Mori, Y., Nagase, S., Sugiyama, Y., Hirano, R., Ogai, K., Ogura, K., Kurihara, S., Okamoto, S., Measuring the Antimicrobial Activity of Lauric Acid against Various Bacteria in Human Gut Microbiota Using a New Method. *Cell Transplant.* **28**, 1528–1541 (2019).

70. Zeiger, K., Popp, J., Becker, A., Hankel, J., Visscher, C., Klein, G., Meemken, D., Lauric acid as feed additive – An approach to reducing Campylobacter spp. in broiler meat. *PLoS ONE*. **12**, e0175693 (2017).

71. Malcicka, M., Visser, B., Ellers, J., An Evolutionary Perspective on Linoleic Acid Synthesis in Animals. *Evol. Biol.* **45**, 15–26 (2018).

72. Jeppesen, P. B., Høy, C. E., Mortensen, P. B., Essential fatty acid deficiency in patients receiving home parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 126–133 (1998).

73. Bézard, J., Blond, J. P., Bernard, A., Clouet, P., The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod. Nutr. Dev.* **34**, 539–568 (1994).

74. Patterson, P. H., Acar, N., Ferguson, A. D., Trimble, L. D., Sciubba, H. B., Koutsos, E. A., The impact of dietary Black Soldier Fly larvae oil and meal on laying hen performance and egg quality. *Poult. Sci.* **100**, 101272 (2021).

75. St-Hilaire, S., Sheppard, C., Tomberlin, J. K., Irving, S., Newton, L., McGuire, M. A., Mosley, E. E., Hardy, R. W., Sealey, W., Fly Prepupae as a Feedstuff for Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss. *J. World Aquac. Soc.* **38**, 59–67 (2007).

76. De Souza Vilela, J., Alvarenga, T., Andrew, N., McPhee, M., Kolakshyapati, M., Hopkins, D., Ruhnke, I., Technological Quality, Amino Acid and Fatty Acid Profile of Broiler Meat Enhanced by Dietary Inclusion of Black Soldier Fly Larvae. *Foods*. **10** (2021).

77. Bourre, J. M., Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: what is actually useful ? *J. Nutr. Health Aging*. **9**, 232–242 (2005).

78. St-Hilaire, S., Cranfill, K., McGuire, M. A., Mosley, E. E., Tomberlin, J. K., Newton, L., Sealey, W., Sheppard, C., Irving, S., Fish Offal Recycling by the Black Soldier Fly Produces a Foodstuff High in Omega-3 Fatty Acids. *J. World Aquac. Soc.* **38**, 309–313 (2007).

79. Erbland, P., Alyokhin, A., Perkins, L. B., Peterson, M., Dose-Dependent Retention of Omega-3 Fatty Acids by Black Soldier Fly Larvae (Diptera: Stratiomyidae). *J. Econ. Entomol.* **113**, 1221–1226 (2020).

80. Putra, R. E., Fatmalasari, Y., Permana, A. D., Kinasih, I., Rosmiati, M., Omega-3 content of black soldier fly prepupa (Hermetia illucens) fed with combination of marine fish offal and tofu dreg. *BIOTROPIA - Southeast Asian J. Trop. Biol.* **28** (2021).

81. Li, S., Ji, H., Zhang, B., Tian, J., Zhou, J., Yu, H., Influence of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae oil on growth performance, body composition, tissue fatty acid composition and lipid deposition in juvenile Jian carp (Cyprinus carpio var. Jian). *Aquaculture*. **465**, 43–52 (2016).

82. Kierończyk, B., Rawski, M., Mikołajczak, Z., Leciejewska, N., Józefiak, D., *Hermetia illucens* fat affects the gastrointestinal tract selected microbial populations, their activity, and the immune status of broiler chickens. *Ann. Anim. Sci.* **22**, 663–675 (2022).

83. Jeong, S., Choi, S., Kim, K., Kim, S. M., Lee, G., Park, S. Y., Kim, Y., Son, J. S., Yun, J., Park, S. M., Effect of Change in Total Cholesterol Levels on Cardiovascular Disease Among Young Adults. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, e008819 (2018).

84. Klag, M. J., Ford, D. E., Mead, L. A., He, J., Whelton, P. K., Liang, K.-Y., Levine, D. M., Serum Cholesterol in Young Men and Subsequent Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **328**, 313–318 (1993).

85. Dinh, T. T. N., Thompson, L. D., Galyean, M. L., Brooks, J. C., Patterson, K. Y., Boylan, L. M., Cholesterol Content and Methods for Cholesterol Determination in Meat and Poultry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **10**, 269–289 (2011).

86. Caligiani, A., Marseglia, A., Sorci, A., Bonzanini, F., Lolli, V., Maistrello, L., Sforza, S., Influence of the killing method of the black soldier fly on its lipid composition. *Food Res. Int.* **116**, 276–282 (2019).

87. Boukid, F., Riudavets, J., del Arco, L., Castellari, M., Impact of Diets Including Agro-Industrial By-Products on the Fatty Acid and Sterol Profiles of Larvae Biomass from Ephestia kuehniella, Tenebrio molitor and Hermetia illucens. *Insects*. **12**, 672 (2021).

88. Rehman, K. U., Cai, M., Xiao, X., Zheng, L., Wang, H., Soomro, A. A., Zhou, Y., Li, W., Yu, Z., Zhang, J., Cellulose decomposition and larval biomass production from the co-digestion of dairy manure and chicken manure by mini-livestock (Hermetia illucens L.). *J. Environ. Manage.* **196**, 458–465 (2017).

89. Cohn, Z., Latty, T., Abbas, A., Understanding dietary carbohydrates in black soldier fly larvae treatment of organic waste in the circular economy. *Waste Manag.* **137**, 9–19 (2022).

90. Isibika, A., Vinnerås, B., Kibazohi, O., Zurbrügg, C., Lalander, C., Pre-treatment of banana peel to improve composting by black soldier fly (Hermetia illucens (L.), Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Waste Manag.* **100**, 151–160 (2019).

91. Wang, H., Rehman, K. ur, Feng, W., Yang, D., Rehman, R. ur, Cai, M., Zhang, J., Yu, Z., Zheng, L., Physicochemical structure of chitin in the developing stages of black soldier fly. *Int. J. Biol. Macromol.* **149**, 901–907 (2020).

92. Bailey, R. L., Jr, K. P. W., Black, R. E., The Epidemiology of Global Micronutrient Deficiencies. *Ann. Nutr. Metab.* **66**, 22–33 (2015).

93. Soares Araújo, R. R., dos Santos Benfica, T. A. R., Ferraz, V. P., Moreira Santos, E., Nutritional composition of insects Gryllus assimilis and Zophobas morio: Potential foods harvested in Brazil. *J. Food Compos. Anal.* **76**, 22–26 (2019).

94. Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune, M., Gleerup, A., Bioavailability in Man of Iron in Human Milk and Cow's Milk in Relation to Their Calcium Contents. *Pediatr. Res.* **31**, 524–527 (1992).

95. Pandey, G., Role of calcium in human and animal health. **5**, 61–65 (2011).

96. An, S. H., Kim, D. W., An, B. K., Effects of Dietary Calcium Levels on Productive Performance, Eggshell Quality and Overall Calcium Status in Aged Laying Hens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **29**, 1477–1482 (2016).

97. Oonincx, D. G. a. B., van Keulen, P., Finke, M. D., Baines, F. M., Vermeulen, M., Bosch, G., Evidence of vitamin D synthesis in insects exposed to UVb light. *Sci. Rep.* **8**, 10807 (2018).

98. Zhou, Y., Wang, D., Zhou, S., Duan, H., Guo, J., Yan, W., Nutritional Composition, Health Benefits, and Application Value of Edible Insects: A Review. *Foods*. **11**, 3961 (2022).

99. Rumpold, B. A., Schlüter, O. K., Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 802–823 (2013).

100. Mason, J. B., Black, R., Booth, S. L., Brentano, A., Broadbent, B., Connolly, P., Finley, J., Goldin, J., Griffin, T., Hagen, K., Lesnik, J., Lewis, G., Pan, Z., Ramos, J. M., Ranalli, M., Rojas, G., Shockley, M., Stull, V. J., Swietlik, D., Fostering Strategies to Expand the Consumption of Edible Insects: The Value of a Tripartite Coalition between Academia, Industry, and Government. *Curr. Dev. Nutr.* **2**, (2018).

101. Schmidt, A., Call, L.-M., Macheiner, L., Mayer, H. K., Determination of vitamin B12 in four edible insect species by immunoaffinity and ultra-high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* **281**, 124–129 (2019).

102. Finke, M. D., Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biol.* **34**, 554–564 (2015).

103. Pennino, M., Dierenfeld, E. S., Behler, J. L., Retinol, α-tocopherol and proximate nutrient composition of invertebrates used as feed. *Int. Zoo Yearb.* **30**, 143–149 (1991).

104. Oonincx, D. G. A. B., Finke, M. D., Insects as a complete nutritional source. *J. Insects Food Feed*. **9**, 541–543 (2023).

105. Zulkifli, N., Yong, A. S. K., Lim, L.-S., Mustafa, S., Kim, Y.-S., Shapawi, R., Nutritional value of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae processed by different methods. *PLOS ONE*. **17**, e0263924 (2022).

106. Matte, J. J., L'importance de certaines vitamines du complexe B chez le porc. *Journ. Rech. Porc.* **38**, 303–312 (2006).

107. Finke, M. D., Complete Nutrient Content of Four Species of Feeder Insects: Nutrient Content of Feeder Insects. *Zoo Biol.* **32**, 27–36 (2013).

108. Oonincx, D. g. a. b., Finke, M. d., Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. *J. Insects Food Feed*. **7**, 639–659 (2021).

109. Walter, M. H., Strack, D., Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 663–692 (2011).

110. Heath, J., Cipollini, D., Stireman, J., The role of carotenoids and their derivatives in mediating interactions between insects and their environment. *Arthropod-Plant Interact.* **7** (2013).

111. Maoka, T., Kawase, N., Ueda, T., Nishida, R., Carotenoids of dragonflies, from the perspective of comparative biochemical and chemical ecological studies. *Biochem. Syst. Ecol.* **89**, 104001 (2020).

112. Leni, G., Maistrello, L., Pinotti, G., Sforza, S., Caligiani, A., Production of carotenoid-rich Hermetia illucens larvae using specific agri-food by-products. *J. Insects Food Feed*, 1–12 (2022).

113. Nyakeri, E. M., Ogola, H. J., Ayieko, M. A., Amimo, F. A., An open system for farming black soldier fly larvae as a source of proteins for smallscale poultry and fish production. *J. Insects Food Feed*. **3**, 51–56 (2017).

114. FAO, *Looking at edible insects from a food safety perspective: Challenges and opportunities for the sector* (FAO, Rome, Italy, 2021; https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb4094en).

115. Nakamura, S., Ichiki, R. T., Shimoda, M., Morioka, S., Small-scale rearing of the black soldier fly, Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. *Appl. Entomol. Zool.* **51**, 161–166 (2016).

116. Boaru, A., Víg, A., Ladoși, D., Păpuc, T., Struţi, D., Georgescu, B., The use of various oviposition structures for the black soldier fly, Hermetia illucens L. (Diptera: Stratiomydae) in improving the reproductive process in captivity, *Animal Biology & Animal Husbandry,* **11**, 12-20 (2019).

117. Chia, S. Y., Tanga, C., Khamis, F., Mohamed, S., Salifu, D., Sevgan, S., Fiaboe, K., Niassy, S., Loon, J. V. van, Dicke, M., Ekesi, S., Threshold temperatures and thermal requirements of black soldier fly Hermetia illucens: Implications for mass production. *PLoS One,* 13(11): e0206097 (2018).

118. Tomberlin, J. K., Adler, P. H., Myers, H. M., Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environ. Entomol.* **38**, 930–934 (2009).

119. Holmes, L., Vanlaerhoven, S., Tomberlin, J., Relative Humidity Effects on the Life History of Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae). *Environ. Entomology*, **41**, 971–978, (2012).

120. Zhang, J., Huang, L., He, J., Tomberlin, J. K., Li, J., Lei, C., Sun, M., Liu, Z., Yu, Z., An Artificial Light Source Influences Mating and Oviposition of Black Soldier Flies, Hermetia illucens. *J. Insect Sci.* **10**, 202 (2010).

121. Bekker, N., Heidelbach, S., Vestergaard, S., Nielsen, M. E., Riisgaard-Jensen, M., Zeuner, E., Bahrndorff, S., Eriksen, N., Impact of substrate moisture content on growth and metabolic performance of black soldier fly larvae. *Waste Manag.* **127**, 73–79 (2021).

122. Dzepe, D., Nana, P., Fotso, A., Tchuinkam, T., Djouaka, R., Influence of larval density, substrate moisture content and feedstock ratio on life history traits of black soldier fly larvae. *J. Insects Food Feed*. **6**, 133–140 (2020).

123. van Broekhoven, S., Oonincx, D. G. A. B., van Huis, A., van Loon, J. J. A., Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. *J. Insect Physiol.* **73**, 1–10 (2015).

124. Alves, A. V., Sanjinez-Argandoña, E. J., Linzmeier, A. M., Cardoso, C. A. L., Macedo, M. L. R., Food Value of Mealworm Grown on Acrocomia aculeata Pulp Flour. *PLOS ONE*. **11**, e0151275 (2016).

125. Tschirner, M., Simon, A., Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *J. Insects Food Feed*. **1**, 249–259 (2015).

126. Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Kelstrup, H. C., Emery, V., Self-Selection of Agricultural By-Products and Food Ingredients by Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) and Impact on Food Utilization and Nutrient Intake. *Insects*. **11**, 827 (2020).

127. Nakagaki, B. J., Defoliart, G. R., Comparison of Diets for Mass-Rearing Acheta domesticus (Orthoptera: Gryllidae) as a Novelty Food, and Comparison of Food Conversion Efficiency with Values Reported for Livestock. *J. Econ. Entomol.* **84**, 891–896 (1991).

128. Siddiqui, S. A., Ristow, B., Rahayu, T., Putra, N. S., Widya Yuwono, N., Nisa', K., Mategeko, B., Smetana, S., Saki, M., Nawaz, A., Nagdalian, A., Black soldier fly larvae (BSFL) and their affinity for organic waste processing. *Waste Manag.* **140**, 1–13 (2022).

129. Oonincx, D., Broekhoven, S., Huis, A., van Loon, J., Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. *PloS One*. **10**, e0144601 (2015).

130. FAO, *Water for sustainable food and agriculture* (FAO, Rome, Italy, 2016; https://www.fao.org/documents/card/en/c/6dce4e64-43ab-4728-ab18-59379a887e0a/).

131. Miglietta, P. P., De Leo, F., Ruberti, M., Massari, S., Mealworms for Food: A Water Footprint Perspective. *Water*. **7**, 6190–6203 (2015).

132. FAO, *Land use statistics and indicators statistics. Global, regional and country trends 1990– 2019.* (FAOSTAT Analytical Brief Series No 28., 2021; https://www.fao.org/publications/card/fr/c/CB6033EN/).

133. Oonincx, D. G. A. B., de Boer, I. J. M., Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans – A Life Cycle Assessment. *PLoS ONE*. **7**, e51145 (2012).

134. FAO and UNEP, *The State of the World's Forests 2020: Forests, biodiversity and people* (FAO and UNEP, Rome, Italy, 2020; https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca8642en), *The State of the World's Forests (SOFO)*.

135. Heuel, M., Sandrock, C., Leiber, F., Mathys, A., Gold, M., Zurbrügg, C., Gangnat, I. D. M., Kreuzer, M., Terranova, M., Black soldier fly larvae meal and fat can completely replace soybean cake and oil in diets for laying hens. *Poult. Sci.* **100**, 101034 (2021).

136. Lynch, J., Cain, M., Frame, D., Pierrehumbert, R., Agriculture's Contribution to Climate Change and Role in Mitigation Is Distinct From Predominantly Fossil CO2-Emitting Sectors. *Front. Sustain. Food Syst.* **4** (2021).

137. Van Huis, A., Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 563–583 (2013).

138. Lardé, G., Recycling of coffee pulp by Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Biol. Wastes*. **33**, 307–310 (1990).

139. Veldkamp, T., Duinkerken, G. van, Huis, A. van, Lakemond, C. M. M., Ottevanger, E., Bosch, G., Boekel, T. van, Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets: a feasibility study, Wageningen UR Livestock Research, (2012).

140. Baiano, A., Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. *Trends Food Sci. Technol.* **100**, 35–50 (2020).

141. Hlongwane, Z. T., Slotow, R., Munyai, T. C., The Role of Edible Insects in Rural Livelihoods, and Identified Challenges in Vhembe District, Limpopo, South Africa. *Resources*. **10**, 123 (2021).

142. Macombe, C., Le Feon, S., Aubin, J., Maillard, F., Marketing and social effects of industrial scale insect value chains in Europe: case of mealworm for feed in France. *J. Insects Food Feed*. **5**, 215–224 (2019).

143. Niyonsaba, H. H., Höhler, J., Kooistra, J., Van der Fels-Klerx, H. J., Meuwissen, M. P. M., Profitability of insect farms. *J. Insects Food Feed*. **7**, 923–934 (2021).

144. Raheem, D., Carrascosa, C., Oluwole, O. B., Nieuwland, M., Saraiva, A., Millán, R., Raposo, A., Traditional consumption of and rearing edible insects in Africa, Asia and Europe. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 2169–2188 (2019).

145. Lambert, H., Elwin, A., D'Cruze, N., Wouldn't hurt a fly? A review of insect cognition and sentience in relation to their use as food and feed. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **243**, 105432 (2021).

146. de Gier, S., Verhoeckx, K., Insect (food) allergy and allergens. *Mol. Immunol.* **100**, 82–106 (2018).

147. Ribeiro, J. c., Sousa-Pinto, B., Fonseca, J., Fonseca, S. C., Cunha, L. m., Edible insects and food safety: allergy. *J. Insects Food Feed*. **7**, 833–847 (2021).

148. Vandeweyer, D., De Smet, J., Van Looveren, N., Van Campenhout, L., Biological contaminants in insects as food and feed. *J. Insects Food Feed*. **7**, 807–822 (2021).

149. Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., Jäger, H., Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on the growth performance and composition of black soldier fly larvae (Hermetia illucens) for use in the feed and food value chain. *Food Addit. Contam. Part A*. **34**, 1410–1420 (2017).

150. Lievens, S., Poma, G., De Smet, J., Van Campenhout, L., Covaci, A., Van Der Borght, M., Chemical safety of black soldier fly larvae (Hermetia illucens), knowledge gaps and recommendations for future research: a critical review. *J. Insects Food Feed*. **7**, 383–396 (2021).

151. Gao, Z., Wang, W., Lu, X., Zhu, F., Liu, W., Wang, X., Lei, C., Bioconversion performance and life table of black soldier fly (Hermetia illucens) on fermented maize straw. *J. Clean. Prod.* **230**, 974–980 (2019).

152. Cummins, V., Rawles, S., Thompson, K., Velasquez, A., Kobayashi, Y., Hager, J., Webster, C., Evaluation of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae meal as partial or total replacement of marine fish meal in practical diets for Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Aquaculture*. **473**, 337–344 (2017).

153. Aisyah, H. N., Athirah, Z. A. R., Hanani, W. R., Arshad, S. S., Hassim, H. A., Nazarudin, M. F., Ina-Salwany, M. Y., The effect of feeding black soldier fly larvae on growth performance, protein, and fat content of red hybrid tilapia (Oreochromis spp.). *Vet. World*, 2453–2457 (2022).

154. IPIFF, Guide on Good Hygiene Practices for European Union (EU) producers of insects as food and feed. (2022), (available at https://ipiff.org/good-hygiene-practices/).

155. The European Commission, Commission Implementing Regulation (EU) 2023/58 (2023), (available at http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2023/58/oj/eng).

156. The European Commission, Commission Implementing Regulation (EU) 2023/5 (2023), (available at http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2023/5/oj/eng).

157. The European Commission, Commission Implementing Regulation (EU) 2022/188 (2022), (available at http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2022/188/oj/eng).

158. The European Commission, Commission Implementing Regulation (EU) 2022/169 (2022), (available at http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2022/169/oj/eng).

159. The European Commission, Commission Implementing Regulation (EU) 2021/1975 (2021), (available at http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/1975/oj/eng).

160. The European Commission, Commission Implementing Regulation (EU) 2021/882 (2021), (available at http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/882/oj/eng).

161. IPIFF, Info sheet - Commercialisation of edible insects in the EU. (2023).

162. Choi, Y.-C., Choi, J.-Y., Kim, J., Kim, M., Kim, W., Park, K., Bae, S., Jeong, G., Potential Usage of Food Waste as a Natural Fertilizer after Digestion by Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae). *Int. J. Ind. Entomol.* (2009).

163. Khayrova, A., Lopatin, S., Varlamov, V., Black Soldier Fly Hermetia illucens as a Novel Source of Chitin and Chitosan. *Int. J. Sci.* **8**, 81–86 (2019).

164. Shenkin, A., The key role of micronutrients. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **25**, 1–13 (2006).

165. Reboul, E., Richelle, M., Perrot, E., Desmoulins-Malezet, C., Pirisi, V., Borel, P., Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E from Their Main Dietary Sources. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8749–8755 (2006).

166. Carazo, A., Macáková, K., Matoušová, K., Krčmová, L. K., Protti, M., Mladěnka, P., Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. *Nutrients*. **13**, 1703 (2021).

167. O'Byrne, S. M., Blaner, W. S., Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J. Lipid Res.* **54**, 1731–1743 (2013).

168. Huang, S.-M., Li, H.-J., Liu, Y.-C., Kuo, C.-H., Shieh, C.-J., An Efficient Approach for Lipase-Catalyzed Synthesis of Retinyl Laurate Nutraceutical by Combining Ultrasound Assistance and Artificial Neural Network Optimization. *Molecules*. **22**, 1972 (2017).

169. Debelo, H., Novotny, J. A., Ferruzzi, M. G., Vitamin A. *Adv. Nutr.* **8**, 992–994 (2017).

170. Li, L. H., Lee, J. C.-Y., Leung, H. H., Lam, W. C., Fu, Z., Lo, A. C. Y., Lutein Supplementation for Eye Diseases. *Nutrients*. **12**, 1721 (2020).

171. Genç, Y., Bardakcı, H., Yücel, Ç., Şeker Karatoprak, G., Barak, T. H., Sobarzo-Sanchez, E., Oxidative Stress and Marine Carotenoids: Application by Using Nanoformulations. *Mar. Drugs*. **18**, 423 (2020).

172. Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A. C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S., Biesalski, H. K., β-Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans. *J. Nutr.* **140**, 2268S-2285S (2010).

173. Oruch, R., Pryme, I., The biological significance of vitamin A in humans: A review of nutritional aspects and clinical considerations. *ScienceJet*. **1**, 1–13 (2012).

174. ANSES, Les références nutritionnelles en vitamines et minéraux - Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective (2021), (available at https://www.anses.fr/fr/content/les-r%C3%A9f%C3%A9rences-nutritionnelles-en-vitamines-et-min%C3%A9raux).

175. ANSES, Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3), Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective (2017), (available at https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0234Ra.pdf).

176. Olson, J. M., Ameer, M. A., Goyal, A., Vitamin A Toxicity, *StatPearls* (2023).

177. Rothman, K. J., Moore, L. L., Singer, M. R., Nguyen, U.-S. D. T., Mannino, S., Milunsky, A., Teratogenicity of High Vitamin A Intake. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1369–1373 (1995).

178. Ezzati, M., Comparative Quantification of Health Risks: Sexual and reproductive health, World Health Organization (2004).

179. Abebe, Z., Haki, G. D., Schweigert, F. J., Henkel, I. M., Baye, K., Low breastmilk vitamin A concentration is prevalent in rural Ethiopia. *Eur. J. Clin. Nutr.* **73**, 1110–1116 (2019).

180. Wiseman, E. M., Bar-El Dadon, S., Reifen, R., The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 3703–3714 (2017).

181. Imdad, A., Mayo-Wilson, E., Haykal, M. R., Regan, A., Sidhu, J., Smith, A., Bhutta, Z. A., Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from six months to five years of age. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2022).

182. D'Ambrosio, D. N., Clugston, R. D., Blaner, W. S., Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*. **3**, 63–103 (2011).

183. Haaker, M., Vaandrager, A., Helms, J., Retinoids in health and disease: A role for hepatic stellate cells in affecting retinoid levels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*. **1865**, 158674 (2020).

184. Sauvant, P., Mekki, N., Charbonnier, M., Portugal, H., Lairon, D., Borel, P., Amounts and types of fatty acids in meals affect the pattern of retinoids secreted in human chylomicrons after a high-dose preformed vitamin A intake. *Metabolism*. **52**, 514–519 (2003).

185. Berry, D. C., Croniger, C. M., Ghyselinck, N. B., Noy, N., Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3851–3859 (2012).

186. Kelly, M., von Lintig, J., STRA6: role in cellular retinol uptake and efflux. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **4**, 229–242 (2015).

187. Zhong, M., Kawaguchi, R., Kassai, M., Sun, H., Retina, Retinol, Retinal and the Natural History of Vitamin A as a Light Sensor. *Nutrients*. **4**, 2069–2096 (2012).

188. Dowling, J. E., Wald, G., Vitamin A deficiency and night blindness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 648–661 (1958).

189. Melia, T. J., Cowan, C. W., Angleson, J. K., Wensel, T. G., A comparison of the efficiency of G protein activation by ligand-free and light-activated forms of rhodopsin. *Biophys. J.* **73**, 3182–3191 (1997).

190. Pino-Lagos, K., Benson, M. J., Noelle, R. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, in press, (2008).

191. Ertesvag, A., Engedal, N., Naderi, S., Blomhoff, H. K., Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. **169**, 5555–5563 (2002).

192. Kuwata, T., Wang, I. M., Tamura, T., Ponnamperuma, R. M., Levine, R., Holmes, K. L., Morse, H. C., De Luca, L. M., Ozato, K., Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood*. **95**, 3349–3356 (2000).

193. Liu, Y., Chen, H., Mu, D., Li, D., Zhong, Y., Jiang, N., Zhang, Y., Xia, M., Association of Serum Retinoic Acid With Risk of Mortality in Patients With Coronary Artery Disease. *Circ. Res.* **119**, 557–563 (2016).

194. Zhou, W., Lin, J., Chen, H., Wang, J., Liu, Y., Xia, M., Retinoic acid induces macrophage cholesterol efflux and inhibits atherosclerotic plaque formation in apoE-deficient mice. *Br. J. Nutr.* **114**, 509–518 (2015).

195. Moon, R., Mehta, R., Rao, K., Retinoids and cancer in experimental animals (1994), pp. 573–595.

196. Lotan, R., Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.* **10**, 1031–1039 (1996).

197. Hansen, L. A., Sigman, C. C., Andreola, F., Ross, S. A., Kelloff, G. J., De Luca, L. M., Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis*. **21**, 1271–1279 (2000).

198. Holick, C. N., Michaud, D. S., Stolzenberg-Solomon, R., Mayne, S. T., Pietinen, P., Taylor, P. R., Virtamo, J., Albanes, D., Dietary Carotenoids, Serum β-Carotene, and Retinol and Risk of Lung Cancer in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 536–547 (2002).

199. Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1029–1035 (1994).

200. Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Meyskens, F. L., Omenn, G. S., Valanis, B., Williams, J. H., The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1743–1750 (2004).

201. Pu, Y., Wang, Z., Bian, Y., Zhang, F., Yang, P., Li, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Fang, F., Cao, H., Zhang, X., All-trans retinoic acid improves goat oocyte nuclear maturation and reduces apoptotic cumulus cells during in vitro maturation. *Anim. Sci. J. Nihon Chikusan Gakkaiho*. **85**, 833–839 (2014).

202. Gad, A., Abu Hamed, S., Khalifa, M., Amin, A., El-Sayed, A., Swiefy, S. A., El-Assal, S., Retinoic acid improves maturation rate and upregulates the expression of antioxidant-related genes in in vitro matured buffalo (Bubalus bubalis) oocytes. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **6**, 279–285 (2018).

203. Saadeldin, I. M., Swelum, A. A.-A., Elsafadi, M., Mahmood, A., Yaqoob, S. H., Alfayez, M., Alowaimer, A. N., Effects of all-trans retinoic acid on the in vitro maturation of camel (Camelus dromedarius) cumulus-oocyte complexes. *J. Reprod. Dev.* **65**, 215–221 (2019).

204. Demmig-Adams, B., Polutchko, S., Adams, W., Structure-Function-Environment Relationship of the Isomers Zeaxanthin and Lutein. *Photochem*. **2**, 308–325 (2022).

205. Abdel-Aal, E.-S., Akhtar, H., Zaheer, K., Ali, R., Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health. *Nutrients*. **5**, 1169–1185 (2013).

206. Ochoa Becerra, M., Mojica Contreras, L., Hsieh Lo, M., Mateos Díaz, J., Castillo Herrera, G., Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. *J. Funct. Foods*. **66**, 103771 (2020).

207. 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., A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br. J. Nutr.* **85**, 499–507 (2001).

208. Perry, A., Rasmussen, H., Johnson, E. J., Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *J. Food Compos. Anal.* **22**, 9–15 (2009).

209. Gliszczyńska-Swigło, A., Ciska, E., Pawlak-Lemańska, K., Chmielewski, J., Borkowski, T., Tyrakowska, B., Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Addit. Contam.* **23**, 1088–1098 (2006).

210. Monsen, E. R., Dietary Reference Intakes for the antioxidant nutrients: Vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *J. Am. Diet. Assoc.* **100**, 637–637 (2000).

211. The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research Group*, Lutein + Zeaxanthin and Omega-3 Fatty Acids for Age-Related Macular Degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Randomized Clinical Trial. *JAMA*. **309**, (2013).

212. Shao, A., Hathcock, J. N., Risk assessment for the carotenoid's lutein and lycopene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **45**, 289–298 (2006).

213. Giordano, E., Quadro, L., Lutein, zeaxanthin and mammalian development: Metabolism, functions and implications for health. *Arch. Biochem. Biophys.* **647**, 33–40 (2018).

214. Desmarchelier, C., Borel, P., Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends Food Sci. Technol.* **69**, 270–280 (2017).

215. Khachik, F., de Moura, F. F., Zhao, D.-Y., Aebischer, C.-P., Bernstein, P. S., Transformations of Selected Carotenoids in Plasma, Liver, and Ocular Tissues of Humans and in Nonprimate Animal Models. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 3383–3392 (2002).

216. Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E., von Lintig, J., Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* **276**, 14110–14116 (2001).

217. Hu, K.-Q., Liu, C., Ernst, H., Krinsky, N. I., Russell, R. M., Wang, X.-D., The Biochemical Characterization of Ferret Carotene-9′, 10′-Monooxygenase Catalyzing Cleavage of Carotenoids in Vitro and in Vivo*. *J. Biol. Chem.* **281**, 19327–19338 (2006).

218. Palczewski, G., Amengual, J., Hoppel, C. L., von Lintig, J., Evidence for compartmentalization of mammalian carotenoid metabolism. *FASEB J.* **28**, 4457–4469 (2014).

219. Amengual, J., Lobo, G. P., Golczak, M., Li, H. N. M., Klimova, T., Hoppel, C. L., Wyss, A., Palczewski, K., von Lintig, J., A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. *FASEB J.* **25**, 948–959 (2011).

220. Kotake-Nara, E., Nagao, A., Absorption and Metabolism of Xanthophylls. *Mar. Drugs*. **9**, 1024–37 (2011).

221. Li, B., Vachali, P. P., Shen, Z., Gorusupudi, A., Nelson, K., Besch, B. M., Bartschi, A., Longo, S., Mattinson, T., Shihab, S., Polyakov, N. E., Suntsova, L. P., Dushkin, A. V., Bernstein, P. S., Retinal accumulation of zeaxanthin, lutein, and β-carotene in mice deficient in carotenoid cleavage enzymes. *Exp. Eye Res.* **159**, 123–131 (2017).

222. Johnson, E. J., Role of lutein and zeaxanthin in visual and cognitive function throughout the lifespan. *Nutr. Rev.* **72**, 605–612 (2014).

223. Hammond, B. R., Wooten, B. R., Snodderly, D. M., Preservation of visual sensitivity of older subjects: association with macular pigment density. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 397–406 (1998).

224. Dawczynski, J., Jentsch, S., Schweitzer, D., Hammer, M., Lang, G. E., Strobel, J., Long term effects of lutein, zeaxanthin and omega-3-LCPUFAs supplementation on optical density of macular pigment in AMD patients: the LUTEGA study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **251**, 2711–2723 (2013).

225. Chew, E. Y., Clemons, T. E., SanGiovanni, J. P., Danis, R. P., Ferris, F. L., Elman, M. J., Antoszyk, A., Ruby, A., Orth, D., Bressler, S. B., Fish, G., Hubbard, B., Klein, M., Chandra, S., Blodi, B., Domalpally, A., Friberg, T., Wong, W., Rosenfeld, P., Agron, E., Toth, C., Bernstein, P., Sperduto, R., Secondary Analyses of the Effects of Lutein/Zeaxanthin on Age-Related Macular Degeneration Progression AREDS2 Report No.3. *JAMA Ophthalmol.* **132**, 142–149 (2014).

226. Johra, F. T., Bepari, A. K., Bristy, A. T., Reza, H. M., A Mechanistic Review of β-Carotene, Lutein, and Zeaxanthin in Eye Health and Disease. *Antioxidants*. **9**, 1046 (2020).

227. Krinsky, N. I., Landrum, J. T., Bone, R. A., Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu. Rev. Nutr.* **23**, 171–201 (2003).

228. Subczynski, W. K., Wisniewska, A., Widomska, J., Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **504**, 61–66 (2010).

229. Johnson, E. J., A Biological Role of Lutein. *Food Rev. Int.* **20**, 1–16 (2004).

230. Barker, F. M., II, Snodderly, D. M., Johnson, E. J., Schalch, W., Koepcke, W., Gerss, J., Neuringer, M., Nutritional Manipulation of Primate Retinas, V: Effects of Lutein, Zeaxanthin, and n–3 Fatty Acids on Retinal Sensitivity to Blue-Light–Induced Damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 3934–3942 (2011).

231. Dwyer, J. H., Navab, M., Dwyer, K. M., Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T., Merz, C. N. B., Fogelman, A. M., Oxygenated Carotenoid Lutein and Progression of Early Atherosclerosis. *Circulation*. **103**, 2922–2927 (2001).

232. Zou, Z., Xu, X., Huang, Y., Xiao, X., Ma, L., Sun, T., Dong, P., Wang, X., Lin, X., High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: The Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis*. **219**, 789–793 (2011).

233. Xu, X.-R., Zou, Z.-Y., Xiao, X., Huang, Y.-M., Wang, X., Lin, X.-M., Effects of Lutein Supplement on Serum Inflammatory Cytokines, ApoE and Lipid Profiles in Early Atherosclerosis Population. *J. Atheroscler. Thromb.* **20**, 170–177 (2013).

234. Lo, H.-M., Tsai, Y.-J., Du, W.-Y., Tsou, C.-J., Wu, W.-B., A naturally occurring carotenoid, lutein, reduces PDGF and H2O2 signaling and compromises migration in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biomed. Sci.* **19**, 18 (2012).

235. Hajizadeh-Sharafabad, F., Ghoreishi, Z., Maleki, V., Tarighat-Esfanjani, A., Mechanistic insights into the effect of lutein on atherosclerosis, vascular dysfunction, and related risk factors: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Pharmacol. Res.* **149**, 104477 (2019).

236. Gong, X., Smith, J. R., Swanson, H. M., Rubin, L. P., Carotenoid Lutein Selectively Inhibits Breast Cancer Cell Growth and Potentiates the Effect of Chemotherapeutic Agents through ROS-Mediated Mechanisms. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **23**, 905 (2018).

237. Kavalappa, Y. P., Gopal, S. S., Ponesakki, G., Lutein inhibits breast cancer cell growth by suppressing antioxidant and cell survival signals and induces apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **236**, 1798–1809 (2021).

238. Eom, J., Lim, J. W., Kim, H., Lutein Induces Apoptosis of Gastric Cancer Cells by Producing Reactive Oxygen Species via NADPH Oxidase Activation. *Curr. Dev. Nutr.* **6**, 58 (2022).

239. Rafi, M. M., Kanakasabai, S., Gokarn, S. V., Krueger, E. G., Bright, J. J., Dietary Lutein Modulates Growth and Survival Genes in Prostate Cancer Cells. *J. Med. Food*. **18**, 173–181 (2015).

240. Tanumihardjo, S. A., Carotenoids: Health Effects, *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*, pp. 292–297, (2013).

241. Xu, C. Z., Wang, H. F., Yang, J. Y., Wang, J. H., Duan, Z. Y., Wang, C., Liu, J. X., Lao, Y., Effects of feeding lutein on production performance, antioxidative status, and milk quality of high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* **97**, 7144–7150 (2014).

242. Wang, S., Zhang, L., Li, J., Cong, J., Gao, F., Zhou, G., Effects of dietary marigold extract supplementation on growth performance, pigmentation, antioxidant capacity and meat quality in broiler chickens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **30**, 71–77 (2017).

243. Cook-Mills, J. M., Averill, S. H., Lajiness, J. D., Asthma, allergy and vitamin E: Current and future perspectives. *Free Radic. Biol. Med.* **179**, 388–402 (2022).

244. Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., Mahdi, F., The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **14**, e157–e165 (2014).

245. Zaaboul, F., Liu, Y., Vitamin E in foodstuff: Nutritional, analytical, and food technology aspects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **21** (2022).

246. European Food Safety Authority, Europäische Kommission, Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, Eds., Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals (2006).

247. Wagner, K.-H., Kamal-Eldin, A., Elmadfa, I., Gamma-Tocopherol – An Underestimated Vitamin? *Ann. Nutr. Metab.* **48**, 169–188 (2004).

248. Borel, P., Preveraud, D., Desmarchelier, C., Bioavailability of vitamin E in humans: an update. *Nutr. Rev.* **71**, 319–331 (2013).

249. Jiang, Q., Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **72**, 76–90 (2014).

250. Hacquebard, M., Carpentier, Y. A., Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. **8**, 133–138 (2005).

251. Traber, M. G., Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J. Lipid Res.* **54**, 2295–2306 (2013).

252. La Rue, A., Koehler, K. M., Wayne, S. J., Chiulli, S. J., Haaland, K. Y., Garry, P. J., Nutritional status and cognitive functioning in a normally aging sample: a 6-y reassessment. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 20–29 (1997).

253. Ortega, R. M., Requejo, A. M., López-Sobaler, A. M., Andrés, P., Navia, B., Perea, J. M., Robles, F., Cognitive Function in Elderly People Is Influenced by Vitamin E Status. *J. Nutr.* **132**, 2065–2068 (2002).

254. Mangialasche, F., Solomon, A., Kåreholt, I., Hooshmand, B., Cecchetti, R., Fratiglioni, L., Soininen, H., Laatikainen, T., Mecocci, P., Kivipelto, M., Serum levels of vitamin E forms and risk of cognitive impairment in a Finnish cohort of older adults. *Exp. Gerontol.* **48**, 1428–1435 (2013).

255. Dysken, M. W., Sano, M., Asthana, S., Vertrees, J. E., Pallaki, M., Llorente, M., Love, S., Schellenberg, G. D., McCarten, J. R., Malphurs, J., Prieto, S., Chen, P., Loreck, D. J., Trapp, G., Bakshi, R. S., Mintzer, J. E., Heidebrink, J. L., Vidal-Cardona, A., Arroyo, L. M., Cruz, A. R., Zachariah, S., Kowall, N. W., Chopra, M. P., Craft, S., Thielke, S., Turvey, C. L., Woodman, C., Monnell, K. A., Gordon, K., Tomaska, J., Segal, Y., Peduzzi, P. N., Guarino, P. D., Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. *JAMA*. **311**, 33–44 (2014).

256. Kang, J. H., Cook, N., Manson, J., Buring, J. E., Grodstein, F., A Randomized Trial of Vitamin E Supplementation and Cognitive Function in Women. *Arch. Intern. Med.* **166**, 2462–2468 (2006).

257. Petersen, R. C., Thomas, R. G., Grundman, M., Bennett, D., Doody, R., Ferris, S., Galasko, D., Jin, S., Kaye, J., Levey, A., Pfeiffer, E., Sano, M., van Dyck, C. H., Thal, L. J., Vitamin E and Donepezil for the Treatment of Mild Cognitive Impairment. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2379–2388 (2005).

258. Jialal, I., Fuller, C. J., Huet, B. A., The Effect of α-Tocopherol Supplementation on LDL Oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 190–198 (1995).

259. Boushehri, S., Yusof, R. M., Nasir Mohammad Taib, M., Mirzaei, K., Yazdekhasti, N., Akbarzadeh, S., Effect of Vitamin Supplementation on Serum Oxidized Low-Density Lipoprotein Levels in Male Subjects with Cardiovascular Disease Risk Factors. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **15**, 958–964 (2012).

260. Stephens, N. G., Parsons, A., Brown, M. J., Schofield, P. M., Kelly, F., Cheeseman, K., Mitchinson, M., Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *The Lancet*. **347**, 781–786 (1996).

261. Nakhoul, F. M., Miller-Lotan, R., Awad, H., Asleh, R., Jad, K., Nakhoul, N., Asaf, R., Abu-Saleh, N., Levy, A. P., Pharmacogenomic effect of vitamin E on kidney structure and function in transgenic mice with the haptoglobin 2-2 genotype and diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **296**, F830–F838 (2009).

262. Blum, S., Vardi, M., Brown, J. B., Russell, A., Milman, U., Shapira, C., Levy, N. S., Miller-Lotan, R., Asleh, R., Levy, A. P., Vitamin E reduces cardiovascular disease in individuals with diabetes mellitus and the haptoglobin 2-2 genotype. *Pharmacogenomics*. **11**, 675–684 (2010).

263. Menkes, M. S., Comstock, G. W., Vuilleumier, J. P., Helsing, K. J., Rider, A. A., Brookmeyer, R., Serum Beta-Carotene, Vitamins a and E, Selenium, and the Risk of Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **315**, 1250–1254 (1986).

264. Alkhenizan, A., Hafez, K., The role of vitamin E in the prevention of cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann. Saudi Med.* **27**, 409–414 (2007).

265. Weinstein, S. J., Wright, M. E., Lawson, K. A., Snyder, K., Männistö, S., Taylor, P. R., Virtamo, J., Albanes, D., Serum and Dietary Vitamin E in Relation to Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **16**, 1253–1259 (2007).

266. Campbell, S. E., Musich, P. R., Whaley, S. G., Stimmel, J. B., Leesnitzer, L. M., Dessus-Babus, S., Duffourc, M., Stone, W., Newman, R. A., Yang, P., Krishnan, K., Gamma Tocopherol Upregulates the Expression of 15-S-HETE and Induces Growth Arrest Through a PPAR Gamma-Dependent Mechanism in PC-3 Human Prostate Cancer Cells. *Nutr. Cancer*. **61**, 649–662 (2009).

267. Li, G. X., Lee, M.-J., Liu, A. B., Yang, Z., Lin, Y., Shih, W. J., Yang, C. S., δ-Tocopherol Is More Active than α- or γ-Tocopherol in Inhibiting Lung Tumorigenesis In Vivo. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa*. **4**, 404–413 (2011).

268. Hidiroglou, N., Cave, N., Atwall, A. S., Farnworth, E. R., McDowell, L. R., Comparative vitamin E requirements and metabolism in livestock. *Ann. Rech. Veterinaires Ann. Vet. Res.* **23**, 337–359 (1992).

269. Weiss, W. P., Hogan, J. S., Todhunter, D. A., Smith, K. L., Effect of Vitamin E Supplementation in Diets with a Low Concentration of Selenium on Mammary Gland Health of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **80**, 1728–1737 (1997).

270. Politis, I., Theodorou, G., Lampidonis, A. D., Kominakis, A., Baldi, A., Short communication: Oxidative status and incidence of mastitis relative to blood α-tocopherol concentrations in the postpartum period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **95**, 7331–7335 (2012).

271. Singh, A. K., Bhakat, C., Kumari, T., Mandal, D. K., Chatterjee, A., Karunakaran, M., Dutta, T. K., Influence of pre and postpartum alpha-tocopherol supplementation on milk yield, milk quality, and udder health of Jersey crossbred cows at tropical lower Gangetic region. *Vet. World*. **13**, 2006–2011 (2020).

272. Nassu, R. T., Dugan, M. E. R., Juárez, M., Basarab, J. A., Baron, V. S., Aalhus, J. L., Effect of α-tocopherol tissue levels on beef quality. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* **5**, 2010–2018 (2011).

273. Sirajudeen, S., Shah, Al Menhali, A., A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3832 (2019).

274. Dominguez, L. J., Farruggia, M., Veronese, N., Barbagallo, M., Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. *Metabolites*. **11**, 255 (2021).

275. Borel, P., Caillaud, D., Cano, N., Vitamin D Bioavailability: State of the Art. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55** (2013).

276. Chen, Tai. C., Chimeh, F., Lu, Z., Mathieu, J., Person, K. S., Zhang, A., Kohn, N., Martinello, S., Berkowitz, R., Holick, M. F., Factors that Influence the Cutaneous Synthesis and Dietary Sources of Vitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* **460**, 213–217 (2007).

277. O'Mahony, L., Stepien, M., Gibney, M. J., Nugent, A. P., Brennan, L., The Potential Role of Vitamin D Enhanced Foods in Improving Vitamin D Status. *Nutrients*. **3**, 1023–1041 (2011).

278. Vernay, M., Sponga, M., Salanave, B., Oleko, A., Deschamps, V., Malon, A., Castetbon, K., Statut en vitamine D de la population adulte en France : l'Etude nationale nutrition santé (ENNS, 2006-2007), Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, n°. 16-17, p. 189-94, (2012).

279. Ladhani, S., Srinivasan, L., Buchanan, C., Allgrove, J., Presentation of vitamin D deficiency. *Arch. Dis. Child.* **89**, 781–784 (2004).

280. Prentice, A., Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr. Rev.* **66**, S153–S164 (2008).

281. Pearce, S. H., Cheetham, T. D., Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ*. **340**, b5664 (2010).

282. Lips, P., Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* **22**, 477–501 (2001).

283. Bischoff-Ferrari, H. A., Giovannucci, E., Willett, W. C., Dietrich, T., Dawson-Hughes, B., Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 18–28 (2006).

284. Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Schauber, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D. L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U., Gallo, R. L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B. W., Adams, J. S., Bloom, B. R., Modlin, R. L., Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. **311**, 1770–1773 (2006).

285. Bikle, D. D., Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem. Biol.* **21**, 319–329 (2014).

286. Esterle, L., Rothenbuhler, A., Linglart, A., Rôle de la vitamine D et risque de maladies auto-immunes/cancers. *OCL*. **21**, D309 (2014).

287. Keane, J., Elangovan, H., Stokes, R., Gunton, J., Vitamin D and the Liver—Correlation or Cause? *Nutrients*. **10**, 496 (2018).

288. Obi, Y., Hamano, T., Isaka, Y., Prevalence and Prognostic Implications of Vitamin D Deficiency in Chronic Kidney Disease. *Dis. Markers*. **2015**, 1–9 (2015).

289. Wintermeyer, E., Ihle, C., Ehnert, S., Stöckle, U., Ochs, G., De Zwart, P., Flesch, I., Bahrs, C., Nussler, A., Crucial Role of Vitamin D in the Musculoskeletal System. *Nutrients*. **8**, 319 (2016).

290. Christakos, S., Hewison, M., Gardner, D. G., Wagner, C. L., Sergeev, I. N., Rutten, E., Pittas, A. G., Boland, R., Ferrucci, L., Bikle, D. D., Vitamin D: beyond bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1287**, 45–58 (2013).

291. Turrubiates-Hernández, F., Sánchez Zuno, G., González-Estevez, G., Hernández-Bello, J., Macedo, G., Muñoz-Valle, J., Potential immunomodulatory effects of vitamin D in the prevention of severe coronavirus disease 2019: An ally for Latin America. *Int. J. Mol. Med.* **47** (2021).

292. Krela-Kaźmierczak, I., Szymczak, A., Łykowska-Szuber, L., Eder, P., Stawczyk-Eder, K., Klimczak, K., Linke, K., Horst-Sikorska, W., The importance of vitamin D in the pathology of bone metabolism in inflammatory bowel diseases. *Arch. Med. Sci. AMS*. **11**, 1028–1032 (2015).

293. Holick, M. F., Vitamin D and Health: Evolution, Biologic Functions, and Recommended Dietary Intakes for Vitamin D. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **7**, 2–19 (2009).

294. Talat, N., Perry, S., Parsonnet, J., Dawood, G., Hussain, R., Vitamin D Deficiency and Tuberculosis Progression. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 853–855 (2010).

295. Kearns, M. D., Tangpricha, V., The role of vitamin D in tuberculosis. *J. Clin. Transl. Endocrinol.* **1**, 167–169 (2014).

296. Griffin, M. D., Lutz, W., Phan, V. A., Bachman, L. A., McKean, D. J., Kumar, R., Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6800–6805 (2001).

297. Almerighi, C., Sinistro, A., Cavazza, A., Ciaprini, C., Rocchi, G., Bergamini, A., 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine*. **45**, 190–197 (2009).

298. Li, Y. C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z.-F., Liu, S. Q., Cao, L.-P., 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* **110**, 229–238 (2002).

299. Zhou, C., Lu, F., Cao, K., Xu, D., Goltzman, D., Miao, D., Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1α-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* **74**, 170–179 (2008).

300. Kestenbaum, B., Katz, R., de Boer, I., Hoofnagle, A., Sarnak, M. J., Shlipak, M. G., Jenny, N. S., Siscovick, D. S., Vitamin D, Parathyroid Hormone, and Cardiovascular Events Among Older Adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 1433–1441 (2011).

301. Colston, K., Colstan, M. J., Feldman, D., 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology*. **108**, 1083–1086 (1981).

302. Lu, X., Farmer, P., Rubin, J., Nanes, M. S., Integration of the NfkappaB p65 subunit into the vitamin D receptor transcriptional complex: identification of p65 domains that inhibit 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated transcription. *J. Cell. Biochem.* **92**, 833–848 (2004).

303. Szeto, F. L., Sun, J., Kong, J., Duan, Y., Liao, A., Madara, J. L., Li, Y. C., Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF-kappaB activity in fibroblasts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **103**, 563–566 (2007).

304. Niedermaier, T., Gredner, T., Kuznia, S., Schöttker, B., Mons, U., Lakerveld, J., Ahrens, W., Brenner, H., Vitamin D food fortification in European countries: the underused potential to prevent cancer deaths. *Eur. J. Epidemiol.* **37**, 1–12 (2022).

305. Julien, W. E., Conrad, H. R., Hibbs, J. W., Crist, W. L., Milk Fever in Dairy Cows. VIII. Effect of Injected Vitamin D3 and Calcium and Phosphorus Intake on Incidence1. *J. Dairy Sci.* **60**, 431–436 (1977).

306. Hove, K., Kristiansen, T., Prevention of Parturient Hypocalcemia: Effect of a Single Oral Dose of 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *J. Dairy Sci.* **65**, 1934–1940 (1982).

307. Duffy, S. K., Kelly, A. K., Rajauria, G., Jakobsen, J., Clarke, L. C., Monahan, F. J., Dowling, K. G., Hull, G., Galvin, K., Cashman, K. D., Hayes, A., O'Doherty, J. V., The use of synthetic and natural vitamin D sources in pig diets to improve meat quality and vitamin D content. *Meat Sci.* **143**, 60–68 (2018).

308. Sun, Z. W., Yan, L., G, Y. Y., Zhao, J. P., Lin, H., Guo, Y. M., Increasing dietary vitamin D3 improves the walking ability and welfare status of broiler chickens reared at high stocking densities. *Poult. Sci.* **92**, 3071–3079 (2013).

309. West, C. E., Castenmiller, J. J., Quantification of the "SLAMENGHI" factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **68**, 371–377 (1998).

310. Moreau, H., Gargouri, Y., Lecat, D., Junien, J. L., Verger, R., Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **959**, 247–252 (1988).

311. McClements, D. J., The biophysics of digestion: lipids. *Curr. Opin. Food Sci.* **21**, 1–6 (2018).

312. Bauer, E., Jakob, S., Mosenthin, R., Principles of Physiology of Lipid Digestion. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **18**, 282–295 (2005).

313. Borel, P., Pasquier, B., Armand, M., Tyssandier, V., Grolier, P., Alexandre-Gouabau, M.-C., Andre, M., Senft, M., Peyrot, J., Jaussan, V., Lairon, D., Azais-Braesco, V., Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G95–G103 (2001).

314. Tyssandier, V., Lyan, B., Borel, P., Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochim. Biophys. Acta*. **1533**, 285–292 (2001).

315. Carriere, F., Barrowman, J. A., Verger, R., René, L., Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*. **105**, 876–888 (1993).

316. Armand, M., Pasquier, B., André, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V., Lairon, D., Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 1096–1106 (1999).

317. McClements, D. J., Li, Y., Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct.* **1**, 32–59 (2010).

318. Patricia, J. J., Dhamoon, A. S., Physiology, Digestion, *StatPearls* (2023).

319. Borgström, B., Dahlqvist, A., Lundh, G., Sjövall, J., Studies of Intestinal Digestion and Absorption in the Human. *J. Clin. Invest.* **36**, 1521–1536 (1957).

320. Liao, T. H., Hamosh, P., Hamosh, M., Fat Digestion by Lingual Lipase: Mechanism of Lipolysis in the Stomach and Upper Small Intestine. *Pediatr. Res.* **18**, 402–409 (1984).

321. Jackson, A. D., McLaughlin, J., Digestion and absorption. *Surg. Oxf.* **27**, 231–236 (2009).

322. Acevedo-Fani, A., Singh, H., Biophysical insights into modulating lipid digestion in food emulsions. *Prog. Lipid Res.* **85**, 101129 (2022).

323. Breithaupt, D. E., Bamedi, A., Wirt, U., Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **132**, 721–728 (2002).

324. Van Bennekum, A. M., Li, L., Piantedosi, R., Shamir, R., Vogel, S., Fisher, E. A., Blaner, W. S., Harrison, E. H., Carboxyl Ester Lipase Overexpression in Rat Hepatoma Cells and CEL Deficiency in Mice Have No Impact on Hepatic Uptake or Metabolism of Chylomicron-Retinyl Ester. *Biochemistry*. **38**, 4150–4156 (1999).

325. Weng, W., Li, L., van Bennekum, A. M., Potter, S. H., Harrison, E. H., Blaner, W. S., Breslow, J. L., Fisher, E. A., Intestinal Absorption of Dietary Cholesteryl Ester Is Decreased but Retinyl Ester Absorption Is Normal in Carboxyl Ester Lipase Knockout Mice. *Biochemistry*. **38**, 4143–4149 (1999).

326. Van Bennekum, A. M., Fisher, E. A., Blaner, W. S., Harrison, E. H., Hydrolysis of Retinyl Esters by Pancreatic Triglyceride Lipase. *Biochemistry*. **39**, 4900–4906 (2000).

327. Reboul, E., Berton, A., Moussa, M., Kreuzer, C., Crenon, I., Borel, P., Pancreatic lipase and pancreatic lipase-related protein 2, but not pancreatic lipase-related protein 1, hydrolyze retinyl palmitate in physiological conditions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*. **1761**, 4–10 (2006).

328. Gilham, D., Labonté, E. D., Rojas, J. C., Jandacek, R. J., Howles, P. N., Hui, D. Y., Carboxyl Ester Lipase Deficiency Exacerbates Dietary Lipid Absorption Abnormalities and Resistance to Diet-induced Obesity in Pancreatic Triglyceride Lipase Knockout Mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 24642–24649 (2007).

329. Lombardo, D., Guy, O., Studies on the substrate specificity of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. II. Action on cholesterol esters and lipid-soluble vitamin esters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **611**, 147–155 (1980).

330. Lauridsen, C., Hedemann, M. S., Jensen, S. K., Hydrolysis of tocopheryl and retinyl esters by porcine carboxyl ester hydrolase is affected by their carboxylate moiety and bile acids. *J. Nutr. Biochem.* **12**, 219–224 (2001).

331. Mapelli-Brahm, P., Corte-Real, J., Meléndez-Martínez, A. J., Bohn, T., Bioaccessibility of phytoene and phytofluene is superior to other carotenoids from selected fruit and vegetable juices. *Food Chem.* **229**, 304–311 (2017).

332. Do Nascimento, T. C., Pinheiro, P. N., Fernandes, A. S., Murador, D. C., Neves, B. V., de Menezes, C. R., de Rosso, V. V., Jacob-Lopes, E., Zepka, L. Q., Bioaccessibility and intestinal uptake of carotenoids from microalgae Scenedesmus obliquus. *LWT*. **140**, 110780 (2021).

333. Sy, C., Gleize, B., Dangles, O., Landrier, J.-F., Veyrat, C. C., Borel, P., Effects of physicochemical properties of carotenoids on their bioaccessibility, intestinal cell uptake, and blood and tissue concentrations. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 1385–1397 (2012).

334. Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., McClements, D. J., Influence of particle size on lipid digestion and β-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chem.* **141**, 1472–1480 (2013).

335. Tan, Y., Zhou, H., Zhang, Z., McClements, D. J., Bioaccessibility of oil-soluble vitamins (A, D, E) in plant-based emulsions: impact of oil droplet size. *Food Funct.* **12**, 3883–3897 (2021).

336. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., Krieger, M., Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science*. **271**, 518–520 (1996).

337. Calvo, D., Gómez-Coronado, D., Suárez, Y., Lasunción, M. A., Vega, M. A., Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* **39**, 777–788 (1998).

338. Krieger, M., Charting the Fate of the "Good Cholesterol": Identification and Characterization of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 523–558 (1999).

339. Altmann, S. W., Davis, H. R., Zhu, L., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P. N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., Graziano, M. P., Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science*. **303**, 1201–1204 (2004).

340. Davis, H. R., Zhu, L., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S. P. N., Lam, M.-H., Lund, E. G., Detmers, P. A., Graziano, M. P., Altmann, S. W., Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) Is the Intestinal Phytosterol and Cholesterol Transporter and a Key Modulator of Whole-body Cholesterol Homeostasis *. *J. Biol. Chem.* **279**, 33586–33592 (2004).

341. Temel, R. E., Tang, W., Ma, Y., Rudel, L. L., Willingham, M. C., Ioannou, Y. A., Davies, J. P., Nilsson, L.-M., Yu, L., Hepatic Niemann-Pick C1–like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J. Clin. Invest.* **117**, 1968–1978 (2007).

342. During, A., Harrison, E. H., Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* **48**, 2283–2294 (2007).

343. Borel, P., Lietz, G., Goncalves, A., Szabo de Edelenyi, F., Lecompte, S., Curtis, P., Goumidi, L., Caslake, M. J., Miles, E. A., Packard, C., Calder, P. C., Mathers, J. C., Minihane, A. M., Tourniaire, F., Kesse-Guyot, E., Galan, P., Hercberg, S., Breidenassel, C., González Gross, M., Moussa, M., Meirhaeghe, A., Reboul, E., CD36 and SR-BI are involved in cellular uptake of provitamin A carotenoids by Caco-2 and HEK cells, and some of their genetic variants are associated with plasma concentrations of these micronutrients in humans. *J. Nutr.* **143**, 448–456 (2013).

344. Harrison, E. H., Hussain, M. M., Mechanisms Involved in the Intestinal Digestion and Absorption of Dietary Vitamin A. *J. Nutr.* **131**, 1405–1408 (2001).

345. During, A., Dawson, H. D., Harrison, E. H., 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 (2005).

346. 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., Class B Scavenger Receptor-Mediated Intestinal Absorption of Dietary β-Carotene and Cholesterol. *Biochemistry*. **44**, 4517–4525 (2005).

347. Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., André, M., Portugal, H., Jourdheuil-Rahmani, D., Amiot, M.-J., Lairon, D., Borel, P., Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occur partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem. J.* **387**, 455–461 (2005).

348. Sato, Y., Suzuki, R., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Noda, T., Mizuno, S., Sugawara, M., Iseki, K., Involvement of Cholesterol Membrane Transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in the Intestinal Absorption of Lutein. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **15**, 256–264 (2012).

349. Reboul, E., Klein, A., Bietrix, F., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Schneider, M., Margotat, A., Lagrost, L., Collet, X., Borel, P., Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J. Biol. Chem.* **281**, 4739–4745 (2006).

350. Narushima, K., Takada, T., Yamanashi, Y., Suzuki, H., Niemann-Pick C1-Like 1 Mediates α-Tocopherol Transport. *Mol. Pharmacol.* **74**, 42–49 (2008).

351. Abuasal, B., Sylvester, P. W., Kaddoumi, A., Intestinal Absorption of γ-Tocotrienol Is Mediated by Niemann-Pick C1-Like 1: In Situ Rat Intestinal Perfusion Studies. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 939–945 (2010).

352. Reboul, E., Goncalves, A., Comera, C., Bott, R., Nowicki, M., Landrier, J.-F., Jourdheuil-Rahmani, D., Dufour, C., Collet, X., Borel, P., Vitamin D intestinal

absorption is not a simple passive diffusion: Evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 691–702 (2011).

353. Kiourtzidis, M., Kühn, J., Brandsch, C., Stangl, G. I., Vitamin D Status of Mice Deficient in Scavenger Receptor Class B Type 1, Cluster Determinant 36 and ATP-Binding Cassette Proteins G5/G8. *Nutrients*. **12**, 2169 (2020).

354. Kiourtzidis, M., Kühn, J., Schutkowski, A., Baur, A. C., Hirche, F., Stangl, G. I., Inhibition of Niemann-Pick C1-like protein 1 by ezetimibe reduces uptake of deuterium-labeled vitamin D in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **197**, 105504 (2020).

355. Neculai, D., Schwake, M., Ravichandran, M., Zunke, F., Collins, R. F., Peters, J., Neculai, M., Plumb, J., Loppnau, P., Pizarro, J. C., Seitova, A., Trimble, W. S., Saftig, P., Grinstein, S., Dhe-Paganon, S., Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature*. **504**, 172–176 (2013).

356. Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., Stremmel, W., Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*. **1761**, 416–423 (2006).

357. Li, P.-S., Fu, Z.-Y., Zhang, Y.-Y., Zhang, J.-H., Xu, C.-Q., Ma, Y.-T., Li, B.-L., Song, B.-L., The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1. *Nat. Med.* **20**, 80–86 (2014).

358. Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L.-L., Immerdal, L., Danielsen, E. M., Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*. **52**, 1424–1431 (2003).

359. Béaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., Carrière, V., Sensing of Dietary Lipids by Enterocytes: A New Role for SR-BI/CLA-1. *PLOS ONE*. **4**, e4278 (2009).

360. Briand, O., Touche, V., Colin, S., Brufau, G., Davalos, A., Schonewille, M., Bovenga, F., Carrière, V., de Boer, J. F., Dugardin, C., Riveau, B., Clavey, V., Tailleux, A., Moschetta, A., Lasunción, M. A., Groen, A. K., Staels, B., Lestavel, S., Liver X Receptor Regulates Triglyceride Absorption Through Intestinal Down-regulation of Scavenger Receptor Class B, Type 1. *Gastroenterology*. **150**, 650–658 (2016).

361. Castenmiller, J. J. M., West, C. E., Bioavailability and Bioconversion of Carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 19–38 (1998).

362. Ong, D. E., Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr. Rev.* **52**, S24-31 (1994).

363. Xueping, E., Zhang, L., Lu, J., Tso, P., Blaner, W. S., Levin, M. S., Li, E., Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II. *J. Biol. Chem.* **277**, 36617–36623 (2002).

364. MacDonald, P. N., Ong, D. E., Binding specificities of cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein, type II. *J. Biol. Chem.* **262**, 10550–10556 (1987).

365. O'Byrne, S. M., Wongsiriroj, N., Libien, J., Vogel, S., Goldberg, I. J., Baehr, W., Palczewski, K., Blaner, W. S., Retinoid Absorption and Storage Is Impaired in Mice

Lacking Lecithin: Retinol Acyltransferase (LRAT). *J. Biol. Chem.* **280**, 35647–35657 (2005).

366. Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Banno, Y., Jouni, Z. E., Kobayashi, M., Sato, R., Maekawa, H., Tsuchida, K., Isolation, Characterization, and cDNA Sequence of a Carotenoid Binding Protein from the Silk Gland of Bombyx mori Larvae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 32133–32140 (2002).

367. Bhosale, P., Li, B., Sharifzadeh, M., Gellermann, W., Frederick, J. M., Tsuchida, K., Bernstein, P. S., Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from human retina. *Biochemistry*. **48**, 4798–4807 (2009).

368. Sakudoh, T., Iizuka, T., Narukawa, J., Sezutsu, H., Kobayashi, I., Kuwazaki, S., Banno, Y., Kitamura, A., Sugiyama, H., Takada, N., Fujimoto, H., Kadono-Okuda, K., Mita, K., Tamura, T., Yamamoto, K., Tsuchida, K., A CD36-related Transmembrane Protein Is Coordinated with an Intracellular Lipid-binding Protein in Selective Carotenoid Transport for Cocoon Coloration. *J. Biol. Chem.* **285**, 7739–7751 (2010).

369. Wang, W., Huang, M.-H., Dong, X.-L., Chai, C.-L., Pan, C.-X., Tang, H., Chen, Y.-H., Dai, F.-Y., Pan, M.-H., Lu, C., Combined Effect of Cameo2 and CBP on the Cellular Uptake of Lutein in the Silkworm, Bombyx mori. *PLOS ONE*. **9**, e86594 (2014).

370. Bhosale, P., Larson, A. J., Frederick, J. M., Southwick, K., Thulin, C. D., Bernstein, P. S., Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye. *J. Biol. Chem.* **279**, 49447–49454 (2004).

371. Drevon, C. A., Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Radic. Res. Commun.* **14**, 229–246 (1991).

372. Haddad, J. G., Matsuoka, L. Y., Hollis, B. W., Hu, Y. Z., Wortsman, J., Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J. Clin. Invest.* **91**, 2552–2555 (1993).

373. Zimmer, S., Stocker, A., Sarbolouki, M. N., Spycher, S. E., Sassoon, J., Azzi, A., A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in vitro expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **275**, 25672–25680 (2000).

374. Zingg, J.-M., Kempna, P., Paris, M., Reiter, E., Villacorta, L., Cipollone, R., Munteanu, A., De Pascale, C., Menini, S., Cueff, A., Arock, M., Azzi, A., Ricciarelli, R., Characterization of three human sec14p-like proteins: α-Tocopherol transport activity and expression pattern in tissues. *Biochimie*. **90**, 1703–1715 (2008).

375. Teegarden, D., Nickel, K. P., Shi, L., Characterization of 25-Hydroxyvitamin D Binding Protein from Intestinal Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 845–849 (2000).

376. Pohl, J., Ring, A., Korkmaz, Ü., Ehehalt, R., Stremmel, W., FAT/CD36-mediated Long-Chain Fatty Acid Uptake in Adipocytes Requires Plasma Membrane Rafts. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 24–31 (2005).

377. Sané, A. T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Ménard, D., Beaulieu, J.-F., Levy, E., Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J. Lipid Res.* **47**, 2112–2120 (2006).

378. Yu, L., Bharadwaj, S., Brown, J. M., Ma, Y., Du, W., Davis, M. A., Michaely, P., Liu, P., Willingham, M. C., Rudel, L. L., Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J. Biol. Chem.* **281**, 6616–6624 (2006).

379. Hamilton, R. L., Synthesis and Secretion of Plasma Lipoproteins, *Pharmacological Control of Lipid Metabolism*, pp. 7–24 (1972).

380. Drobnik, W., Lindenthal, B., Lieser, B., Ritter, M., Weber, T. C., Liebisch, G., Giesa, U., Igel, M., Borsukova, H., Büchler, C., Fung–Leung, W. P., Bergmann, K. V., Schmitz, G., ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology*. **120**, 1203–1211 (2001).

381. Mulligan, J. D., Flowers, M. T., Tebon, A., Bitgood, J. J., Wellington, C., Hayden, M. R., Attie, A. D., ABCA1 Is Essential for Efficient Basolateral Cholesterol Efflux during the Absorption of Dietary Cholesterol in Chickens. *J. Biol. Chem.* **278**, 13356–13366 (2003).

382. Brunham, L. R., Kruit, J. K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J. M., Pape, T. D., Coburn, B. A., Bissada, N., Staels, B., Groen, A. K., Hussain, M. M., Parks, J. S., Kuipers, F., Hayden, M. R., Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* **116**, 1052–1062 (2006).

383. Anwar, K., Kayden, H. J., Hussain, M. M., Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* **47**, 1261–1273 (2006).

384. Anwar, K., Iqbal, J., Hussain, M. M., Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *J. Lipid Res.* **48**, 2028–2038 (2007).

385. Reboul, E., Trompier, D., Moussa, M., Klein, A., Landrier, J.-F., Chimini, G., Borel, P., ATP-binding cassette transporter A1 is significantly involved in the intestinal absorption of α- and γ-tocopherol but not in that of retinyl palmitate in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 177–184 (2009).

386. Terasaka, N., Yu, S., Yvan-Charvet, L., Wang, N., Mzhavia, N., Langlois, R., Pagler, T., Li, R., Welch, C. L., Goldberg, I. J., Tall, A. R., ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J. Clin. Invest.* **118**, 3701–3713 (2008).

387. Landrier, J.-F., Gouranton, E., Reboul, E., Cardinault, N., El Yazidi, C., Malezet-Desmoulins, C., André, M., Nowicki, M., Souidi, M., Borel, P., Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 1207–1213 (2010).

388. Olivier, M., BottG, R., Frisdal, E., Nowick, M., Plengpanich, W., Desmarchelier, C., Roi, S., Quinn, C. M., Gelissen, I., Jessup, W., Van Eck, M., Guérin, M., Le Goff, W., Reboul, E., ABCG1 is involved in vitamin E efflux. *Biochim. Biophys. Acta*. **1841**, 1741–1751 (2014).

389. Cai, L., Eckhardt, E. R. M., Shi, W., Zhao, Z., Nasser, M., Villiers, W. J. S. de, Westhuyzen, D. R. van der, Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells1. *J. Lipid Res.* **45**, 253–262 (2004).

390. Herron, K. L., McGrane, M. M., Waters, D., Lofgren, I. E., Clark, R. M., Ordovas, J. M., Fernandez, M. L., The ABCG5 Polymorphism Contributes to Individual Responses to Dietary Cholesterol and Carotenoids in Eggs. *J. Nutr.* **136**, 1161–1165 (2006).

391. Iqbal, J., Hussain, M. M., Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **296**, E1183–E1194 (2009).

392. Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., Hobbs, H. H., Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters. *Science*. **290**, 1771–1775 (2000).

393. Margier, M., Collet, X., le May, C., Desmarchelier, C., André, F., Lebrun, C., Defoort, C., Bluteau, A., Borel, P., Lespine, A., Reboul, E., ABCB1 (P-glycoprotein) regulates vitamin D absorption and contributes to its transintestinal efflux. *FASEB J.* **33**, 2084–2094 (2019).

394. Antoine, T., Le May, C., Margier, M., Halimi, C., Nowicki, M., Defoort, C., Svilar, L., Reboul, E., The Complex ABCG5/ABCG8 Regulates Vitamin D Absorption Rate and Contributes to its Efflux from the Intestine. *Mol. Nutr. Food Res.* **65**, e2100617 (2021).

395. Margier, M., Antoine, T., Siriaco, A., Nowicki, M., Halimi, C., Maillot, M., Georgé, S., Reboul, E., The Presence of Pulses within a Meal can Alter Fat-Soluble Vitamin Bioavailability. *Mol. Nutr. Food Res.* **63**, e1801323 (2019).

396. Levin, G., Mokady, S., Incorporation of all-trans- or 9-cis-beta-carotene into mixed micelles in vitro. *Lipids*. **30**, 177–179 (1995).

397. Tyssandier, V., Reboul, E., Dumas, J.-F., Bouteloup-Demange, C., Armand, M., Marcand, J., Sallas, M., Borel, P., Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **284**, G913–G923 (2003).

398. O'Sullivan, L., Galvin, K., Aisling Aherne, S., O'Brien, N. M., Effects of cooking on the profile and micellarization of 9-cis-, 13-cis- and all-trans-β-carotene in green vegetables. *Food Res. Int.* **43**, 1130–1135 (2010).

399. Borel, P., Mekki, N., Boirie, Y., Partier, A., Grolier, P., Alexandre-Gouabau, M. C., Beaufrere, B., Armand, M., Lairon, D., Azais-Braesco, V., Postprandial chylomicron and plasma vitamin E responses in healthy older subjects compared with younger ones. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 812–821 (1997).

400. Traber, M. G., Rader, D., Acuff, R. V., Ramakrishnan, R., Brewer, H. B., Kayden, H. J., Vitamin E dose-response studies in humans with use of deuterated RRR-alpha-tocopherol. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 847–853 (1998).

401. Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F. J., Polidori, M. C., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Viña-Ribes, J., Williamson, G., Astley, S. B., Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.* **23**, 39–100 (2002).

402. De Pee, S., West, C. E., Permaesih, D., Martuti, S., Muhilal, Hautvast, J. G., 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 (1998).

403. Schweiggert, R. M., Mezger, D., Schimpf, F., Steingass, C. B., Carle, R., Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato. *Food Chem.* **135**, 2736–2742 (2012).

404. Schweiggert, R., Kopec, R., Villalobos, M., Högel, J., Quesada, S., Esquivel, P., Schwartz, S., Carle, R., Carotenoids are more bioavailable from papaya than from tomato and carrot in humans: A randomised cross-over study. *Br. J. Nutr.* **111**, 1–9 (2013).

405. O'Connell, O. F., Ryan, L., O'Brien, N. M., Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutr. Res.* **27**, 258–264 (2007).

406. Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Vainstein, A., Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.* **4**, 232–235 (1999).

407. Granado, F., Olmedilla, B., Herrero, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco, I., Blázquez, S., Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: in vivo and in vitro assessment. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ.* **231**, 1733–1738 (2006).

408. Outila, T. A., Mattila, P. H., Piironen, V. I., Lamberg-Allardt, C. J., Bioavailability of vitamin D from wild edible mushrooms (Cantharellus tubaeformis) as measured with a human bioassay. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 95–98 (1999).

409. Urbain, P., Singler, F., Ihorst, G., Biesalski, H.-K., Bertz, H., Bioavailability of vitamin D_2 from UV-B-irradiated button mushrooms in healthy adults deficient in serum 25-hydroxyvitamin D: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **65**, 965–971 (2011).

410. Espersen, R., Ejlsmark-Svensson, H., Madsen, L. R., Nebel, C., Danielsen, M., Dalsgaard, T. K., Rejnmark, L., Influence of food matrix delivery system on the bioavailability of vitamin D3: A randomized crossover trial in postmenopausal women. *Nutrition*. **107**, 111911 (2023).

411. Hornero-Méndez, D., Mínguez-Mosquera, M. I., Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **8**, 407–412 (2007).

412. Trancoso-Reyes, N., Ochoa-Martínez, L. A., Bello-Pérez, L. A., Morales-Castro, J., Estévez-Santiago, R., Olmedilla-Alonso, B., Effect of pre-treatment on physicochemical and structural properties, and the bioaccessibility of β-carotene in sweet potato flour. *Food Chem.* **200**, 199–205 (2016).

413. Buniowska, M., Carbonell-Capella, J. M., Frigola, A., Esteve, M. J., Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with Stevia rebaudiana. *Food Chem.* **221**, 1834–1842 (2017).

414. Hofmann, A. F., Borgstrom, B., Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta*. **70**, 317–331 (1963).

415. Brown, M. J., Ferruzzi, M. G., Nguyen, M. L., Cooper, D. A., Eldridge, A. L., Schwartz, S. J., White, W. S., 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 (2004).

416. Goltz, S. R., Campbell, W. W., Chitchumroonchokchai, C., Failla, M. L., Ferruzzi, M. G., Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 866–877 (2012).

417. Mashurabad, P. C., Palika, R., Jyrwa, Y. W., Bhaskarachary, K., Pullakhandam, R., Dietary fat composition, food matrix and relative polarity modulate the micellarization and intestinal uptake of carotenoids from vegetables and fruits. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 333–341 (2017).

418. Yao, Y., Yang, Z., Yin, B., Goh, H. M., Toh, D. W. K., Kim, J. E., Effects of dietary fat type and emulsification on carotenoid absorption: a randomized crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **117**, 1017–1025 (2023).

419. Van Het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., Hautvast, J. G., Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J. Nutr.* **130**, 503–506 (2000).

420. Roodenburg, A. J., Leenen, R., van het Hof, K. H., Weststrate, J. A., Tijburg, L. B., Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α-carotene, β-carotene, and vitamin E in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1187–1193 (2000).

421. Jayarajan, P., Reddy, V., Mohanram, M., Effect of dietary fat on absorption of β carotene from green leafy vegetables in children. *Indian J. Med. Res.* **71**, 53–56 (1980).

422. Castenmiller, J. J. M., West, C. E., Linssen, J. P. H., van het Hof, K. H., Voragen, A. G. J., The Food Matrix of Spinach Is a Limiting Factor in Determining the Bioavailability of β-Carotene and to a Lesser Extent of Lutein in Humans. *J. Nutr.* **129**, 349–355 (1999).

423. Ribaya-Mercado, J. D., Influence of Dietary Fat on β-Carotene Absorption and Bioconversion into Vitamin a. *Nutr. Rev.* **60**, 104–110 (2002).

424. Jeanes, Y. M., Hall, W. L., Ellard, S., Lee, E., Lodge, J. K., The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. *Br. J. Nutr.* **92**, 575–579 (2004).

425. Bruno, R. S., Leonard, S. W., Park, S.-I., Zhao, Y., Traber, M. G., Human vitamin E requirements assessed with the use of apples fortified with deuterium-labeled alpha-tocopheryl acetate. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 299–304 (2006).

426. Kim, J. E., Ferruzzi, M. G., Campbell, W. W., Egg Consumption Increases Vitamin E Absorption from Co-Consumed Raw Mixed Vegetables in Healthy Young Men. *J. Nutr.* **146**, 2199–2205 (2016).

427. Holvik, K., Madar, A. A., Meyer, H. E., Lofthus, C. M., Stene, L. C., A randomised comparison of increase in serum 25-hydroxyvitamin D concentration after 4 weeks of daily oral intake of 10 microg cholecalciferol from multivitamin tablets or fish oil capsules in healthy young adults. *Br. J. Nutr.* **98**, 620–625 (2007).

428. Wagner, D., Sidhom, G., Whiting, S. J., Rousseau, D., Vieth, R., The bioavailability of vitamin D from fortified cheeses and supplements is equivalent in adults. *J. Nutr.* **138**, 1365–1371 (2008).

429. Korkor, A. B., Bretzmann, C., Effect of fish oil on vitamin D absorption. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **53**, 356 (2009).

430. Van den Berg, H., Bioavailability of vitamin D. *Eur. J. Clin. Nutr.* **51 Suppl 1**, S76-79 (1997).

431. Niramitmahapanya, S., Harris, S. S., Dawson-Hughes, B., Type of dietary fat is associated with the 25-hydroxyvitamin D3 increment in response to vitamin D supplementation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 3170–3174 (2011).

432. Failla, M. L., Chitchumronchokchai, C., Ferruzzi, M. G., Goltz, S. R., Campbell, W. W., Unsaturated fatty acids promote bioaccessibility and basolateral secretion of carotenoids and α-tocopherol by Caco-2 cells. *Food Funct.* **5**, 1101–1112 (2014).

433. Gallo-Torres, H. E., Ludorf, J., Brin, M., The effect of medium-chain triglycerides on the bioavailability of vitamin E. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **48**, 240–241 (1978).

434. Liu, X., Bi, J., Xiao, H., McClements, D. J., Increasing Carotenoid Bioaccessibility from Yellow Peppers Using Excipient Emulsions: Impact of Lipid Type and Thermal Processing. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8534–8543 (2015).

435. Brownlee, I., Dettmar, P., Strugala, V., Pearson, J., The interaction with dietary fibres and the colon. *Curr Nutr Food Sci*. **2** (2006).

436. Pasquier, B., Armand, M., Castelain, C., Guillon, F., Borel, P., Lafont, H., Lairon, D., Emulsification and lipolysis of triacylglycerols are altered by viscous soluble dietary fibres in acidic gastric medium in vitro. *Biochem. J.* **314**, 269–275 (1996).

437. Montagne, L., Pluske, J. R., Hampson, D. J., A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* **108**, 95–117 (2003).

438. Borel, P., Drai, J., Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Laromiguière, M., Le Moël, G., Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **63**, 165–177 (2005).

439. Aschoff, J. K., Kaufmann, S., Kalkan, O., Neidhart, S., Carle, R., Schweiggert, R. M., In Vitro Bioaccessibility of Carotenoids, Flavonoids, and Vitamin C from Differently Processed Oranges and Orange Juices [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 578–587 (2015).

440. Riedl, J., Linseisen, J., Hoffmann, J., Wolfram, G., Some Dietary Fibers Reduce the Absorption of Carotenoids in Women. *J. Nutr.* **129**, 2170–2176 (1999).

441. Greenwood, D. C., Cade, J. E., White, K., Burley, V. J., Schorah, C. J., The impact of high non-starch polysaccharide intake on serum micronutrient concentrations in a cohort of women. *Public Health Nutr.* **7**, 543–548 (2004).

442. Tan, Y., Li, R., Liu, C., Mundo, J. M., Zhou, H., Liu, J., McClements, D. J., Chitosan reduces vitamin D bioaccessibility in food emulsions by binding to mixed micelles. *Food Funct.* **11**, 187–199 (2020).

443. Corte-Real, J., Iddir, M., Soukoulis, C., Richling, E., Hoffmann, L., Bohn, T., Effect of divalent minerals on the bioaccessibility of pure carotenoids and on physical properties of gastro-intestinal fluids. *Food Chem.* **197**, 546–553 (2016).

444. Borel, P., Desmarchelier, C., Dumont, U., Halimi, C., Lairon, D., Page, D., Sébédio, J. L., Buisson, C., Buffière, C., Rémond, D., Dietary calcium impairs tomato lycopene bioavailability in healthy humans. *Br. J. Nutr.* **116**, 2091–2096 (2016).

445. Zhou, H., Zheng, B., Zhang, Z., Zhang, R., He, L., McClements, D. J., Fortification of Plant-Based Milk with Calcium May Reduce Vitamin D Bioaccessibility: An In Vitro Digestion Study. *J. Agric. Food Chem.* **69**, 4223–4233 (2021).

446. Wu, T., Fu, J., Yang, Y., Zhang, L., Han, J., The effects of phytosterols/stanols on blood lipid profiles: a systematic review with meta-analysis. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **18**, 179–186 (2009).

447. Brufau, G., Canela, M. A., Rafecas, M., Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr. Res. N. Y. N.* **28**, 217–225 (2008).

448. Clifton, P. M., Noakes, M., Ross, D., Fassoulakis, A., Cehun, M., Nestel, P., High dietary intake of phytosterol esters decreases carotenoids and increases plasma plant sterol levels with no additional cholesterol lowering. *J. Lipid Res.* **45**, 1493–1499 (2004).

449. Richelle, M., Enslen, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J.-P., Berger, A., Métairon, S., Quaile, S., Piguet-Welsch, C., Sagalowicz, L., Green, H., Fay, L. B., Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 171–177 (2004).

450. Granado-Lorencio, F., Donoso-Navarro, E., Sánchez-Siles, L. M., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., Bioavailability of β-Cryptoxanthin in the Presence of Phytosterols: In Vitro and in Vivo Studies. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 11819–11824 (2011).

451. Miettinen, T. A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H., Vartiainen, E., Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1308–1312 (1995).

452. Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R., Stresa Workshop Participants, Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin. Proc.* **78**, 965–978 (2003).

453. Hendriks, H. F. J., Brink, E. J., Meijer, G. W., Princen, H. M. G., Ntanios, F. Y., Safety of long-term consumption of plant sterol esters-enriched spread. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 681–692 (2003).

454. Goncalves, A., Gleize, B., Bott, R., Nowicki, M., Amiot, M.-J., Lairon, D., Borel, P., Reboul, E., Phytosterols can impair vitamin D intestinal absorption in vitro and in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, S303–S311 (2011).

455. Kostic, D., White, W. S., Olson, J. A., 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 (1995).

456. Van den Berg, H., van Vliet, T., Effect of simultaneous, single oral doses of beta-carotene with lutein or lycopene on the beta-carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 82–89 (1998).

457. Reboul, E., Thap, S., Perrot, E., Amiot, M.-J., Lairon, D., Borel, P., Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, gamma-tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on alpha-tocopherol absorption. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61**, 1167–1173 (2007).

458. Kusin, J. A., Reddy, V., Sivakumar, B., Vitamin E supplements and the absorption of a massive dose of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**, 774–776 (1974).

459. Lobo, G. P., Hessel, S., Eichinger, A., Noy, N., Moise, A. R., Wyss, A., Palczewski, K., von Lintig, J., ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal beta,beta-carotene absorption and vitamin A production. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 1656–1666 (2010).

460. Lobo, G. P., Amengual, J., Palczewski, G., Babino, D., von Lintig, J., Mammalian Carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*. **1821**, 78–87 (2012).

461. Leung, W. C., Hessel, S., Méplan, C., Flint, J., Oberhauser, V., Tourniaire, F., Hesketh, J. E., von Lintig, J., Lietz, G., Two common single nucleotide polymorphisms in the gene encoding β-carotene 15,15′-monoxygenase alter β-carotene metabolism in female volunteers. *FASEB J.* **23**, 1041–1053 (2009).

462. Borel, P., Desmarchelier, C., Nowicki, M., Bott, R., A Combination of Single-Nucleotide Polymorphisms Is Associated with Interindividual Variability in Dietary β-Carotene Bioavailability in Healthy Men. *J. Nutr.* **145**, 1740–1747 (2015).

463. Borel, P., Desmarchelier, C., Nowicki, M., Bott, R., Morange, S., Lesavre, N., Interindividual variability of lutein bioavailability in healthy men: characterization, genetic variants involved, and relation with fasting plasma lutein concentration. *Am. J. Clin. Nutr.* **100**, 168–175 (2014).

464. Borel, P., Moussa, M., Reboul, E., Lyan, B., Defoort, C., Vincent-Baudry, S., Maillot, M., Gastaldi, M., Darmon, M., Portugal, H., Planells, R., Lairon, D., Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *J. Nutr.* **137**, 2653–2659 (2007).

465. Faure, H., Preziosi, P., Roussel, A.-M., Bertrais, S., Galan, P., Hercberg, S., Favier, A., Factors influencing blood concentration of retinol, alpha-tocopherol, vitamin C, and beta-carotene in the French participants of the SU.VI.MAX trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **60**, 706–717 (2006).

466. Sokol, R. J., Reardon, M. C., Accurso, F. J., Stall, C., Narkewicz, M., Abman, S. H., Hammond, K. B., Fat-soluble-vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis identified by screening of newborns. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**, 1064–1071 (1989).

467. Lark, R. K., Lester, G. E., Ontjes, D. A., Blackwood, A. D., Hollis, B. W., Hensler, M. M., Aris, R. M., Diminished and erratic absorption of ergocalciferol in adult cystic fibrosis patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 602–606 (2001).

468. Shumo, M., Osuga, I. M., Khamis, F. M., Tanga, C. M., Fiaboe, K. K. M., Subramanian, S., Ekesi, S., van Huis, A., Borgemeister, C., The nutritive value of black soldier fly larvae reared on common organic waste streams in Kenya. *Sci. Rep.* **9**, 10110 (2019).

469. Diener, S., Zurbrügg, C., Tockner, K., Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Manag. Res.* **27**, 603–610 (2009).

470. Liu, C.-S., Glahn, R. P., Liu, R. H., Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4330–4337 (2004).

471. Lee, C. M., Lederman, J. D., Hofmann, N. E., Erdman, J. W., The mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) is an appropriate animal model for evaluation of the conversion of beta-carotene to vitamin A. *J. Nutr.* **128**, 280–286 (1998).

472. Lokaewmanee, K., Yamauchi, K., Komori, T., Saito, K., Enhancement of Yolk Color in Raw and Boiled Egg Yolk with Lutein from Marigold Flower Meal and Marigold Flower Extract. *J. Poult. Sci.* **48**, 25–32 (2011).

473. Wen, C., Su, Y., Tao, Z., Cheng, Z., Zhou, D., Wang, T., Zhou, Y., Dietary Supplementation with Microencapsulated Lutein Improves Yolk Color and Lutein Content in Fresh and Cooked Eggs of Laying Hens. *J. Poult. Sci.* **58**, 97–102 (2021).

474. LuBo, W., Min, X., Jia, W., XiuFeng, W., YinHua, Z., ChunYan, C., Effect of natural xanthophylls on growth performance and body pigmentation of yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco). *J. Fish. China*. **36**, 1102–1110 (2012).

475. Cucco, M., Guasco, B., Malacarne, G., Ottonelli, R., Effects of β-carotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the Grey Partridge, Perdix perdix. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **147**, 1038–1046 (2007).

476. Murray, I. J., Makridaki, M., van der Veen, R. L. P., Carden, D., Parry, N. R. A., Berendschot, T. T. J. M., Lutein Supplementation over a One-Year Period in Early AMD Might Have a Mild Beneficial Effect on Visual Acuity: The CLEAR Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 1781–1788 (2013).

477. Renzi-Hammond, L. M., Bovier, E. R., Fletcher, L. M., Miller, L. S., Mewborn, C. M., Lindbergh, C. A., Baxter, J. H., Hammond, B. R., Effects of a Lutein and Zeaxanthin Intervention on Cognitive Function: A Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Trial of Younger Healthy Adults. *Nutrients*. **9**, 1246 (2017).

478. Liu, Q., Lanari, M. C., Schaefer, D. M., A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *J. Anim. Sci.* **73**, 3131–3140 (1995).

479. Pearce, K. L., Masters, D. G., Smith, G. M., Jacob, R. H., Pethick, D. W., Pearce, K. L., Masters, D. G., Smith, G. M., Jacob, R. H., Pethick, D. W., Plasma and tissue α-tocopherol concentrations and meat colour stability in sheep grazing saltbush (Atriplex spp.). *Aust. J. Agric. Res.* **56**, 663–672 (2005).

480. Mau, J.-L., Chen, P.-R., Yang, J.-H., Ultraviolet Irradiation Increased Vitamin D2 Content in Edible Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5269–5272 (1998).

481. Simon, R. R., Phillips, K. M., Horst, R. L., Munro, I. C., Vitamin D mushrooms: comparison of the composition of button mushrooms (Agaricus bisporus) treated postharvest with UVB light or sunlight. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 8724–8732 (2011).

482. Maurer, V., Holinger, M., Amsler, Z., Früh, B., Wohlfahrt, J., Stamer, A., Leiber, F., Replacement of soybean cake by Hermetia illucens meal in diets for layers. *J. Insects Food Feed*. **2**, 83–90 (2016).

483. Secci, G., Bovera, F., Nizza, S., Baronti, N., Gasco, L., Conte, G., Serra, A., Bonelli, A., Parisi, G., Quality of eggs from Lohmann Brown Classic laying hens fed black soldier fly meal as substitute for soya bean. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* **12**, 2191–2197 (2018).

484. Astuti, D. A., Wiryawan, K. G., Black soldier fly as feed ingredient for ruminants. *Anim. Biosci.* **35**, 356–363 (2022).

485. Mohan, K., Rajan, D. K., Muralisankar, T., Ganesan, A. R., Sathishkumar, P., Revathi, N., Use of black soldier fly (Hermetia illucens L.) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry: A review of past and future needs. *Aquaculture*. **553**, 738095 (2022).

486. Jones, L. D., Cooper, R. W., Harding, R. S., Composition of Mealworm Tenebrio molitor Larvae. *J. Zoo Anim. Med.* **3**, 34–41 (1972).

487. Barker, D., Fitzpatrick, M. P., Dierenfeld, E. S., Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo Biol.* **17**, 123–134 (1998).

488. Finke, M. D., Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.* **21**, 269–285 (2002).

489. Dreyer, J., Wehmeyer, A., Nutritive value of Mopanie worms, *South African Journal of Science*, Vol. 78, pp 33-35 (1982).

490. Kodondi, K. K., Leclercq, M., Gaudin-Harding, F., Vitamin estimations of three edible species of Attacidae caterpillars from Zaire. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int.* **57**, 333–334 (1987).

491. Oyarzun, S. E., Crawshaw, G. J., Valdes, E. V., Nutrition of the Tamandua: I. Nutrient composition of termites (Nasutitermes spp.) and stomach contents from wild tamanduas (Tamandua tetradactyla). *Zoo Biol.* **15**, 509–524 (1996).

492. Eeva, T., Helle, S., Salminen, J.-P., Hakkarainen, H., Carotenoid Composition of Invertebrates Consumed by Two Insectivorous Bird Species. *J. Chem. Ecol.* **36**, 608–613 (2010).

493. Finke, M. d., Complete nutrient content of three species of wild caught insects, pallid-winged grasshopper, rhinoceros beetles and white-lined sphinx moth. *J. Insects Food Feed*. **1**, 281–292 (2015).

494. Borel, P., Troadec, R., Damiani, M., Halimi, C., Nowicki, M., Guichard, P., Couturier, C., Margier, M., Mounien, L., Grino, M., Reboul, E., Landrier, J.-F., Desmarchelier, C., Vitamin A deficiency during the perinatal period induces changes in vitamin A metabolism in the offspring. The regulation of intestinal vitamin A metabolism via ISX occurs only in male rats severely vitamin A-deficient. *Eur. J. Nutr.* **62**, 633–646 (2023).

495. Toprak, U., Hegedus, D., Doğan, C., Güney, G., A journey into the world of insect lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **104** (2020).

496. Bailey, E., Biochemistry of Insect Flight, *Insect Biochemistry and Function*, pp 89–176 (1975).

497. Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E., Wells, M. A., Fat Metabolism in Insects. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 23–46 (2001).

498. Arrese, E. L., Soulages, J. L., Insect fat body : energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 207–225 (2010).

499. Li, W., Li, M., Zheng, L., Liu, Y., Zhang, Y., Yu, Z., Ma, Z., Li, Q., Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid accumulation in black soldier fly. *Biotechnol. Biofuels*. **8**, 117 (2015).

500. Gold, M., Binggeli, M., Kurt, F., de Wouters, T., Reichlin, M., Zurbrügg, C., Mathys, A., Kreuzer, M., Novel Experimental Methods for the Investigation of Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. *J. Insect Sci.* **20**, 21 (2020).

501. Pimentel, A. C., Montali, A., Bruno, D., Tettamanti, G., Metabolic adjustment of the larval fat body in Hermetia illucens to dietary conditions. *J. Asia-Pac. Entomol.* **20**, 1307–1313 (2017).

502. Baumbach, J., Xu, Y., Hehlert, P., Kühnlein, R. P., Gαq, Gγ1 and Plc21C Control Drosophila Body Fat Storage. *J. Genet. Genomics*. **41**, 283–292 (2014).

503. Amundsen, A. L., Ntanios, F., Put, N. van der, Ose, L., Long-term compliance and changes in plasma lipids, plant sterols and carotenoids in children and parents with FH consuming plant sterol ester-enriched spread. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 1612–1620 (2004).

504. Baumgartner, S., Ras, R. T., Trautwein, E. A., Mensink, R. P., Plat, J., Plasma fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations after plant sterol and plant stanol consumption: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Nutr.* **56**, 909–923 (2017).

505. Naito, K., Hamamura, Y., Studies on the micro constituent in mulberry leaves-III Isolation of β-sitosterol from mulberry leaves. *J Agric Chem Soc Jpn.* **35**, 848–850 (1961).

506. Ikekawa, N., Suzuki, M., Kobayasi, M., Tsuda, K., Studies on the Sterol of Bombyx mori L. IV. Conversion of the Sterol in the Silkworm. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **14**, 834–836 (1966).

507. Gupta, H. O., Eggum, B. O., Processing of maize germ oil cake into edible food grade meal and evaluation of its protein quality. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* **52**, 1–8 (1998).

508. Jiang, Y., Wang, T., Phytosterols in cereal by-products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82**, 439–444 (2005).

509. Gül, M., Seker, M., Comparative analysis of phytosterol components from rapeseed (Brassica napus L.) and olive (Olea europaea L.) varieties. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**, 759–765 (2006).

510. Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A. B., Saura-Calixto, F., Common Sources and Estimated Intake of Plant Sterols in the Spanish Diet. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3462–3471 (2006).

511. Smulikowska, S., Czerwiński, J., Mieczkowska, A., Nutritional value of rapeseed expeller cake for broilers: Effect of dry extrusion. *J. Anim. Feed Sci.* **15**, 447–455 (2006).

512. Derakhshan-Honarparvar, M., Hamedi, M., Kh, M., Pirouzifard, Rice Bran Phytosterols of Three Widespread Iranian Cultivars. *J Agr Sci Tech*. **12**, 167–172 (2010).

513. Gupta, A., Savopoulos, C., Ahuja, J., Hatzitolios, A., Role of phytosterols in lipid-lowering: Current perspectives. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians*. **104**, 301–8 (2011).

514. Del Río, J. C., Prinsen, P., Gutiérrez, A., Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *J. Cereal Sci.* **58**, 248–254 (2013).

515. Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I., Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Sep. Purif. Technol.* **108**, 152–158 (2013).

516. Locatelli, S., Berardo, N., Chemical composition and phytosterols profile of degermed maize products derived from wet and dry milling. *Maydica*. **59**, 261–266 (2014).

517. Kareem, K., Abdulla, N., Foo, H. L., Nabilah, A., Zamri, M., Shazali, N., Loh, T., Alshelmani, M. I., Effect of feeding larvae meal in the diets on growth performance, nutrient digestibility and meat quality in broiler chicken. *Indian J. Anim. Res.* **88**, 1180–1185 (2018).

518. Lynch, K., Strain, C., Johnson Phd, C., Patangia, D., Stanton, C., Koc, F., Gil-Martinez, J., O'Riordan, P., Sahin, A., Ross, R., Arendt, E., Extraction and characterisation of arabinoxylan from brewers spent grain and investigation of microbiome modulation potential. *Eur. J. Nutr.*, 3 (2021).

519. Parker, R. S., McCormick, C. C., Selective accumulation of α-tocopherol in Drosophila is associated with cytochrome P450 tocopherol-ω-hydroxylase activity but not α-tocopherol transfer protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1537–1541 (2005).

520. Jouni, Z. E., Wells, M. A., Purification and Partial Characterization of a Lutein-binding Protein from the Midgut of the Silkworm Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **271**, 14722–14726 (1996).

521. Bhosale, P., Bernstein, P. S., Vertebrate and Invertebrate Carotenoid-Binding Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **458**, 121–127 (2007).

522. Soulages, J. L., Wells, M. A., Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv. Protein Chem.* **45**, 371–415 (1994).

523. Swevers, L., Raikhel, A. S., Sappington, T. W., Shirk, P., Iatrou, K., Vitellogenesis and Post-Vitellogenic Maturation of the Insect Ovarian Follicle, *Comprehensive Molecular Insect Science*, pp. 87–155, (2005).

524. Tsuchida, K., Sakudoh, T., Recent progress in molecular genetic studies on the carotenoid transport system using cocoon-color mutants of the silkworm. *Arch. Biochem. Biophys.* **572**, 151–157 (2015).

525. Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M. F., von Lintig, J., A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10581–10586 (2002).

526. Voolstra, O., Kiefer, C., Hoehne, M., Welsch, R., Vogt, K., Von Lintig, J., The Drosophila Class B Scavenger Receptor NinaD-I Is a Cell Surface Receptor Mediating Carotenoid Transport for Visual Chromophore Synthesis. *Biochemistry*. **45**, 13429–13437 (2006).

527. O'Sullivan, L., Jiwan, M. A., Daly, T., O'Brien, N. M., Aherne, S. A., Bioaccessibility, Uptake, and Transport of Carotenoids from Peppers (Capsicum Spp.) Using the Coupled in Vitro Digestion and Human Intestinal Caco-2 Cell Model. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 5374–5379 (2010).

528. Nik, A. M., Corredig, M., Wright, A. J., Release of lipophilic molecules during in vitro digestion of soy protein-stabilized emulsions. *Mol. Nutr. Food Res.* **55 Suppl 2**, S278-289 (2011).

529. Verkempinck, S. H. E., Salvia-Trujillo, L., Moens, L. G., Carrillo, C., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E., Grauwet, T., Kinetic approach to study the relation between in vitro lipid digestion and carotenoid bioaccessibility in emulsions with different oil unsaturation degree. *J. Funct. Foods*. **41**, 135–147 (2018).

530. Traber, M. G., Kayden, H. J., Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma-tocopherol in human lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**, 517–526 (1989).

531. Traber, M. G., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U., Hidaka, H., Malloy, M., Kane, J., Hyams, J., Kayden, H. J., Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **33**, 1171–1182 (1992).

532. Porsgaard, T., Høy, C. E., Absorption by rats of tocopherols present in edible vegetable oils. *Lipids*. **35**, 1073–1078 (2000).

533. Mutsokoti, L., Panozzo, A., Pallares Pallares, A., Jaiswal, S., Van Loey, A., Grauwet, T., Hendrickx, M., Carotenoid bioaccessibility and the relation to lipid digestion: A kinetic study. *Food Chem.* **232**, 124–134 (2017).

534. De Pee, S., West, C. E., Hautvast, J. G. A. J., Muhilal, Karyadi, D., West, C. E., Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. *The Lancet*. **346**, 75–81 (1995).

535. Rodrigues, D. B., Chitchumroonchokchai, C., Mariutti, L. R. B., Mercadante, A. Z., Failla, M. L., Comparison of Two Static in Vitro Digestion Methods for Screening the Bioaccessibility of Carotenoids in Fruits, Vegetables, and Animal Products. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 11220–11228 (2017).

536. Rüfer, C. E., Moeseneder, J., Briviba, K., Rechkemmer, G., Bub, A., Bioavailability of astaxanthin stereoisomers from wild (Oncorhynchus spp.) and aquacultured (Salmo salar) salmon in healthy men: a randomised, double-blind study. *Br. J. Nutr.* **99**, 1048–1054 (2008).

537. Gleize, B., Tourniaire, F., Depezay, L., Bott, R., Nowicki, M., Albino, L., Lairon, D., Kesse-Guyot, E., Galan, P., Hercberg, S., Borel, P., Effect of type of TAG fatty acids on lutein and zeaxanthin bioavailability. *Br. J. Nutr.* **110**, 1–10 (2013).

538. Mamatha, B. S., Baskaran, V., Effect of micellar lipids, dietary fiber and β-carotene on lutein bioavailability in aged rats with lutein deficiency. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif.* **27**, 960–966 (2011).

539. Maurya, V. K., Aggarwal, M., Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 3753–3765 (2017).

540. Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Toivo, J. I., Swank, M. A., Simpkins, A. H., Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats. *J. Food Compos. Anal.* **15**, 123–142 (2002).

541. Piironen, V., Lampi, A.-M., Occurrence and Levels of Phytosterols in Foods, *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, CRC Press, (2003).

542. Acuff, R. V., Dunworth, R. G., Webb, L. W., Lane, J. R., Transport of deuterium-labeled tocopherols during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 459–464 (1998).

543. Burton, G. W., Traber, M. G., Acuff, R. V., Walters, D. N., Kayden, H., Hughes, L., Ingold, K. U., Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 669–684 (1998).

544. Howe, E. R., Simenstad, C. A., Toft, J. D., Cordell, J. R., Bollens, S. M., Macroinvertebrate Prey Availability and Fish Diet Selectivity in Relation to Environmental Variables in Natural and Restoring North San Francisco Bay Tidal Marsh Channels. *San Franc. Estuary Watershed Sci.* **12** (2014).

545. Whitley, S. N., Bollens, S. M., Fish assemblages across a vegetation gradient in a restoring tidal freshwater wetland: diets and potential for resource competition. *Environ. Biol. Fishes*. **97**, 659–674 (2014).

546. Veldkamp, T., Bosch, G., Insects: a protein-rich feed ingredient in pig and poultry diets. *Anim. Front.* **5** (2015).

547. Arru, B., Furesi, R., Gasco, L., Madau, F. A., Pulina, P., The Introduction of Insect Meal into Fish Diet: The First Economic Analysis on European Sea Bass Farming. *Sustainability*. **11**, 1697 (2019).

548. Ferrer Llagostera, P., Kallas, Z., Reig, L., Amores de Gea, D., The use of insect meal as a sustainable feeding alternative in aquaculture: Current situation, Spanish consumers' perceptions and willingness to pay. *J. Clean. Prod.* **229**, 10–21 (2019).

549. IPIFF, Edible Insects on the European Market (2020), (available at https://ipiff.org/wp-content/uploads/2020/06/10-06-2020 -IPIFF-edible-insects-market-factsheet.pdf ().

550. Zhou, F., Tomberlin, J., Zheng, L., Ziniu, Y., Zhang, J., Developmental and Waste Reduction Plasticity of Three Black Soldier Fly Strains (Diptera: Stratiomyidae) Raised on Different Livestock Manures. *J. Med. Entomol.* **50**, 1224–30 (2013).

551. Ayieko, M. a., Ogola, H. j., Ayieko, I. a., Introducing rearing crickets (gryllids) at household levels: adoption, processing and nutritional values. *J. Insects Food Feed*. **2**, 203–211 (2016).

552. Oonincx, D. G. a. B., van der Poel, A. F. B., Effects of diet on the chemical composition of migratory locusts (Locusta migratoria). *Zoo Biol.* **30**, 9–16 (2011).

553. Fang, M. Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., Yang, C. S., Tea Polyphenol (−)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **63**, 7563–7570 (2003).

554. Mellor, D. D., Sathyapalan, T., Kilpatrick, E. S., Beckett, S., Atkin, S. L., High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabet. Med.* **27**, 1318–1321 (2010).

555. Hou, T., Zhang, L., Yang, X., Ferulic acid, a natural polyphenol, protects against osteoporosis by activating SIRT1 and NF-κB in neonatal rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biomed. Pharmacother.* **120**, 109205 (2019).

556. Mendonça, R. D., Carvalho, N. C., Martin-Moreno, J. M., Pimenta, A. M., Lopes, A. C. S., Gea, A., Martinez-Gonzalez, M. A., Bes-Rastrollo, M., Total polyphenol intake, polyphenol subtypes and incidence of cardiovascular disease: The SUN cohort study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **29**, 69–78 (2019).

557. Fiesel, A., Gessner, D. K., Most, E., Eder, K., Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Vet. Res.* **10**, 196 (2014).

558. Gessner, D. K., Ringseis, R., Eder, K., Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **101**, 605–628 (2017).

559. Maqsood, S., Benjakul, S., Preventive effect of tannic acid in combination with modified atmospheric packaging on the quality losses of the refrigerated ground beef. *Food Control*. **21**, 1282–1290 (2010).

560. Liu, F., Xu, Q., Dai, R., Ni, Y., Effects of natural antioxidants on colour stability, lipid oxidation and metmyoglobin reducing activity in raw beef patties. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **14**, 37–44 (2015).

561. Al-Hijazeen, M., Lee, E. J., Mendonca, A., Ahn, D. U., Effects of Tannic Acid on Lipid and Protein Oxidation, Color, and Volatiles of Raw and Cooked Chicken Breast Meat during Storage. *Antioxidants*. **5**, 19 (2016).

562. Stabler, S. P., Allen, R. H., Vitamin B12 Deficiency as a Worldwide Problem. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 299–326 (2004).

563. Nyangena, D. N., Mutungi, C., Imathiu, S., Kinyuru, J., Affognon, H., Ekesi, S., Nakimbugwe, D., Fiaboe, K. K. M., Effects of Traditional Processing Techniques on the Nutritional and Microbiological Quality of Four Edible Insect Species Used for Food and Feed in East Africa. *Foods*. **9**, 574 (2020).

Annexe

Annexe 1 : Biodisponibilité de la zéaxanthine de Xantomato, une lignée de tomates riche en ce caroténoïde.

Les expérimentations exécutées dans le cadre de cette étude ont été menées en début de ma thèse, de novembre 2020 à Mars 2021. Cette étude a été réalisée afin de me familiariser avec les méthodes d'analyse que j'ai ensuite utilisées pour l'évaluation de la bioaccumulation, de la bioaccessibilité et de l'absorption intestinale des phytomicronutriments dans les LMSN, i.e. le dosage de vitamines et de caroténoïdes par CLHP, le modèle de digestion *in vitro* et la culture cellulaire par les Caco-2.

Des chercheurs du département de génétique de l'Université de Jérusalem ont développé, par sélection variétale, une lignée de tomates exceptionnellement riche en zéaxanthine, qu'ils ont appelé Xantomato. L'intérêt de cette tomate riche en zéaxanthine vient du fait que ce caroténoïde, de la famille des xanthophylles, a probablement un rôle dans la fonction visuelle, mais que ses sources alimentaires sont relativement limitées (maïs essentiellement en Europe et en Amérique du Nord). Il serait donc intéressant de le retrouver dans la tomate qui est l'un des fruits/légumes les plus consommés au monde. Notre objectif était de répondre à la question suivante : est-ce que la zéaxanthine présente dans cette nouvelle matrice végétale est aussi biodisponible que la zéaxanthine présente dans des sources naturelles riches en ce xanthophylle ? Pour cela, la bioaccessibilité et l'absorption intestinale de la zéaxanthine de Xantomato ont été comparées à celles de légumes naturellement riches en ce xanthophylle. Nous avons tout d'abord mesuré la concentration de zéaxanthine dans une sélection de légumes riches en ce composé (maïs, poivrons, etc.). Puis nous avons comparé, grâce à un modèle de digestion *in vitro*, la bioaccessibilité de la zéaxanthine présente dans ces légumes. La dernière expérimentation, visait à comparer l'efficacité d'absorption intestinale de la zéaxanthine quand elle provenait de micelles issues de la digestion de cette matrice vs quand elle provenait de différents légumes. Pour cela, un captage par des cellules Caco-2 a été effectué.

La bioaccessibilité de la zéaxanthine de Xantomato était comparable à celle des fruits et légumes communs riches en ce composé. L'efficacité d'absorption de la zéaxanthine de Xantomato (7,8 %) était inférieure à celle du poivron orange (10,6 %), mais similaire à celle du maïs (6,9 %). Par conséquent, le modèle de digestion *in vitro*/cellules Caco2 suggère que la zéaxanthine de Xantomato est aussi biodisponible que celle trouvée dans les sources alimentaires communes de ce composé.

Food Research International 168 (2023) 112751

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

The zeaxanthin present in a tomato line rich in this carotenoid is as bioavailable as that present in the food sources richest in this xanthophyll

Lisa Morand-Laffargue [a], Joseph Hirschberg [b], Charlotte Halimi [a], Charles Desmarchelier [a,c], Patrick Borel [a,*]

[a] C2VN, INRAE, Aix-Marseille Univ, INSERM, Marseille, France
[b] Department of Genetics, Alexander Silberman Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Israel
[c] Institut Universitaire de France (IUF), France

ARTICLE INFO

Keywords:
Intestinal absorption
Bioaccessibility
Orange pepper
Corn
Lutein
Freeze-drying

ABSTRACT

It is strongly suspected that, like lutein, zeaxanthin (ZEA) plays a biological role in the human eye. Many studies also suggest that it could reduce the risk of age-related macular degeneration and improve cognition. Unfortunately, it is only present in a very limited number of foods. This is why a new tomato line, named "Xantomato", whose fruits can synthesize this compound, was generated. However, whether ZEA in Xantomato is bioavailable enough for Xantomato to qualify as a nutritionally relevant ZEA source is not known. The objective was to compare the bioaccessibility and intestinal cell uptake efficiency of ZEA from Xantomato to that present in the richest sources of this compound. Bioaccessibility was assessed using *in vitro* digestions and uptake efficiency using Caco-2 cells. Xantomato ZEA bioaccessibility was not statistically different from that of common fruits and vegetables rich in this compound. Xantomato ZEA uptake efficiency (7.8%) was lower ($P < 0.05$) than that of orange pepper (10.6%) but not different from that of corn (6.9%). Therefore, the results of the *in vitro* digestion/Caco-2 cell model suggest that Xantomato ZEA could be as bioavailable as that found in common food sources of this compound.

1. Introduction

Zeaxanthin (ZEA) is a plant pigment belonging to the carotenoid xanthophyll family. Although this phytochemical is not synthesized by humans, it is present in our bodies since it is found in certain fruits and vegetables. Its bioavailability is very variable (Bohn et al., 2017; Desmarchelier & Borel, 2017) and it is found in significant concentrations in various tissues, e.g. eye, skin and adipose tissue. Interest for this compound mainly comes from the observation that, along with lutein, another xanthophyll, it accumulates in the central area of the human retina (Bernstein et al., 2001), thereby producing the typical yellow color of the macula lutea. This specific accumulation has led to hypothesize that these molecules could exert a biological role in the eye and since they possess antioxidant properties, it has been suggested that they could participate in the protection of the retina from oxidative damages. This mechanism could, at least in part, explain their beneficial effects on age-related macular degeneration (Ma et al., 2012; Chew et al., 2022). Moreover, as the optical density of the macular pigment, which depends on xanthophyll concentration in the macula, has been recognized as a biomarker of the concentration of these compounds in the brain, recent studies have made it possible to suggest that these xanthophylls also play a beneficial role in cognition (Wang et al., 2022).

One of the main providers of ZEA in some populations is corn and corn products (Perry et al., 2009). Corn and its derivatives can contain approximately 2 (canned corn) to 25 μg/g (bio-fortified varieties) ZEA (Humphries & Khachik, 2003; O'Hare et al., 2015). Another interesting source of ZEA is eggs and egg products because of the high bioavailability of xanthophylls from this food source (Chung et al., 2004). This source can contain about 4 to 13 μg/g of ZEA (Maiani et al., 2009). However, common food sources that provide significant amounts of this phytochemical are scarce (Sommerburg et al., 1998). Therefore, and given the probable importance of this compound in visual function, and possibly in cognition, an increasing number of studies aim at biofortifying fruits and vegetables with ZEA and lutein (Karniel, Koch,

Abbreviations: ZEA, zeaxanthin.

* Corresponding author at: UMR C2VN "Center for CardioVascular and Nutrition Research of Marseille", Faculté de Médecine, 27, boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France.
E-mail address: Patrick.Borel@univ-amu.fr (P. Borel).

https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112751
Received 24 November 2022; Received in revised form 7 March 2023; Accepted 21 March 2023
Available online 30 March 2023
0963-9969/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Zamir, & Hirschberg, 2020; Wu et al., 2022). To this end, a novel variety of tomato, Xantomato, with >50 μg/g fresh weight of ZEA in fruits, has been developed (Karniel, Koch, Zamir, & Hirschberg, 2020). Regular tomatoes mainly accumulate lycopene but provide only residual amounts of ZEA, e.g., <0.1 μg/g fresh weight. Xantomato was created through classical genetic breeding, i.e., it is a non-transgenic biofortified variety (Karniel, Koch, Zamir, & Hirschberg, 2020). To assess whether Xantomato can be considered a nutritionally relevant source of ZEA, we first compared ZEA concentration in Xantomato to that in common ZEA food sources. We focused on free ZEA, although some plants such as peppers also contain ZEA esters (Weller & Breithaupt, 2003), as the free form is preferentially absorbed (Chitchumroonchokchai & Failla, 2006) and found in our body (Breithaupt et al., 2004). Next, we compared the bioaccessibility, i.e. the relative amount solubilized in micelles during digestion, of ZEA from Xantomato to that from foods rich in this compound. It is indeed well established that ZEA, like other fat-soluble molecules present in our food, is incorporated into micelles during digestion, and that these vehicles transport the fat-soluble molecules towards the apical membrane of the intestinal cells where they are absorbed (Desmarchelier & Borel, 2017). Finally, we compared ZEA uptake efficiency by intestinal cells when incorporated into micelles resulting from *in vitro* digestion of Xantomato or from foods rich in this compound. The measurement of bioaccessibility, using an *in vitro* digestion model, coupled with that of uptake efficiency by intestinal cells is indeed recognized as a good predictor of lipid phytochemical bioavailability (Reboul et al., 2006) and additionally offers mechanistic insights into their absorption (Reboul et al., 2005).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Enzymes used in the *in vitro* digestion experiments, i.e. α-amylase from *Bacillus* sp., pepsin from porcine gastric mucosa, pancreatin from porcine pancreas, and porcine bile extract, were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Chemicals used for carotenoid quantification (ethanol, n-hexane, dichloromethane and HPLC grade methanol, methyl tert-butyl ether (MTBE) and water) were from Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France). Carotenoid standards, i.e. lutein, ZEA, β-carotene, lycopene and echinenone (HPLC purity >95%), were from Carotenature GmbH (Müsingen, Switzerland). Cell culture consumables, i.e. DMEM, non-essential amino acids, penicillin and PBS, were from Life Technologies (Villebon sur Yvette, France). Fetal bovine serum (FBS) was from Dutscher (Brumath, France).

2.2. ZEA-rich food sources and their preparation

Commonly consumed ZEA-rich vegetables (Table 1) and foods used in the *in vitro* digestion experiments (potatoes, ground beef and olive oil) were purchased from local grocery stores. Fruits of Xantomato (Karniel, Koch, Zamir, & Hirschberg, 2020) and the standard lycopene-producing tomato variety Ailsa Craig (used as a control) were harvested in Jerusalem from greenhouse-grown plants at the "red" stage of ripening. The pericarp, columella, and placenta tissues (i.e. the more solid components of the fruit) were chopped by a kitchen blender to obtain a tomato puree, which was immediately frozen at −80 °C. The puree samples were freeze-dried in 50 ml tubes and shipped to France. To compare the results of tomatoes treated as described above with those of the other ZEA-rich vegetables (Table 1), the same treatment was applied to these latter, i.e. we reduced them to a puree then we freeze-dried them and finally we rehydrated them before their use, i.e. measurement of their ZEA content and *in vitro* digestion experiments.

Since it is well established that cooking foods can have a major effect on carotenoid bioavailability (Desmarchelier & Borel, 2017) and since the ZEA-rich foods studied are commonly consumed cooked, we decided to cook them before freeze-drying. Cooking times were from common French recipes. We chose steam cooking because it is a relatively common culinary preparation method that has the advantage of better preserving micronutrients (Fabbri & Crosby, 2016; Junpatiw et al., 2013). All vegetables were first washed with tap water. Then the non-edible parts were removed. Vegetables were then chopped and blended using a kitchen mixer to form a puree. The puree samples were then freeze-dried until all their water was sublimated. A preliminary experiment allowed us to determine that at least 96 h were necessary in order for the vegetables to lose all their water (checked by expected theoretical mass loss and by the fact that longer freeze-drying times did not lead to additional mass loss). The puree powders were stored at −80 °C until further use. All vegetables were rehydrated as previously described (Qiu, 2019) before *in vitro* digestions, adding a volume of distilled water corresponding to the volume lost upon freeze-drying.

Table 1
ZEA-rich vegetables investigated in this study and their method of culinary preparation.

Common name	Scientific name	Form of marketing	Laboratory preparation	Steaming time (min)
Bell pepper, orange	*Capsicum annuum var. grossum*	Fresh	steamed	18
Bell pepper, red	*Capsicum annuum var. grossum*	Fresh	steamed	18
Bell pepper, yellow	*Capsicum annuum var. grossum*	Fresh	steamed	18
Broccoli	*Brassica oleracea var. italica*	Fresh	steamed	18
Cabbage, Kale	*Brassica oleracea var. sabellica*	Fresh	steamed	10
Corn	*Zea mays var. saccharata*	Canned	none	–
Potato	*Solanum tuberosum var Gwenne*	Fresh	steamed	30
Spinach	*Spinacia oleracea L.*	Fresh	steamed	14
Tomato	*Solanum lycopersicum L.*	Fresh	none	–

2.3. In vitro digestions to assess carotenoid bioaccessibility

The *in vitro* digestion model (Reboul et al., 2006) was adapted from a previous model (Garrett, Failla & Sarama, 1999). Samples were prepared as follows: 2 g of freeze-dried sample (rehydrated as described above) of the 6 richest sources of ZEA studied were added to 6.7 g boiled potatoes, 1.2 g ground beef (fat content: 5%) and 200 mg olive oil. The rest of the protocol is described in detail in Reboul et al. (Reboul et al., 2006). At the end of the digestion, digestate and micelle samples were frozen at −80 °C before liquid–liquid extraction and carotenoid quantification by HPLC (described hereafter). Bioaccessibility was then calculated as follows:

$$Bioaccessibility(\%) = \frac{Amount\ of\ carotenoid\ recovered\ in\ micelles}{Amount\ of\ carotenoid\ recovered\ in\ digestate}$$

2.4. Cell experiments to assess xanthophyll uptake efficiency

2.4.1. Caco-2 cell culture

Caco-2 clone TC-7 cells were cultivated in the presence of DMEM supplemented with 16% heat-inactivated FBS, 1% non– essential amino acid, and 1% antibiotics (complete medium) as previously described (Reboul et al., 2005). For each experiment, cells were seeded and grown during 15 days on 6-well plates to obtain confluent and highly

differentiated cell monolayers.

2.4.2. Determination of the dilution to obtain non-cytotoxic micellar solutions

Cell viability upon incubation for 4 h at 37 °C with micellar solutions from *in vitro* digestions was determined using a MTT assay adapted from Goncalves et al. (Goncalves et al., 2016). Micellar solutions, diluted in DMEM, were tested until a dilution was found that no longer caused toxicity. Consequently, a 1:5 (v:v) dilution was used for cell uptake efficiency measurements (data not shown).

2.4.3. Measurement of the uptake efficiency of xanthophylls from the micellar fraction by Caco-2 cells

We decided to evaluate intestinal cell uptake efficiency of ZEA and lutein from the micellar fraction of *in vitro* digestions of Xantomato puree, the food source richest in ZEA, i.e. orange pepper, and corn, which is the major dietary ZEA contributor in some population (Perry et al., 2009). Uptake efficiency was studied using Caco-2 cell monolayers with a protocol commonly used in our laboratory (Reboul et al., 2007). The apical side of the cell monolayers received 1 ml of the micellar fraction, which was diluted 5 times (see above) with DMEM. Following incubation for 4 h at 37 °C (Liu et al., 2004), the medium was collected and the cell monolayers were washed twice with 1 ml PBS, scraped and collected in 500 µL PBS. Samples were stored at −80 °C until analysis.

2.5. Xanthophyll extraction

Five hundred µL from the rehydrated vegetable purees, digestate, or micellar fractions were used for xanthophyll extraction, following previously published method (Borel et al., 2021), with only minor modifications for the cell culture samples, i.e. for homogenization (vortex blender, 5 min) and centrifugation (1,257*g*, 5 min, 4 °C). For cell culture samples, distilled water was added to reach a final volume of 500 µL.

2.6. Xanthophyll quantification by HPLC

The separation and quantification of xanthophylls (free ZEA and lutein) were performed by HPLC as described in detail previously (Borel et al., 2021). Five to 50 µL from extracted samples of rehydrated vegetables, 100 µL from extracted samples of micellar fractions and digestates, and 150 µL from extracted samples of cell experiments, were injected in the HPLC apparatus. A YMC-Pack YMC C30 column (250 × 4.6 mm; 5 µm) (Crawford Scientific Ltd, Strathaven, UK) preceded by a precolumn (10 × 4 mm; 5 µm) set at 35 °C was used for the HPLC analyses. Carotenoids were detected at a wavelength of 450 nm.

2.7. Calculations and statistics

Data were expressed as means ± SEM. To determine the impact of freeze-drying on carotenoid concentration, a 3-way mixed analysis of variances (ANOVA) was carried out with 2 between-subjects factors, processing and matrix, and 1 within-subject factor, carotenoid species. To assess the normality of our data, Q-Q plots of standardized residuals were used. Homogeneity of variances was assessed by Levene's test. If the main effect was statistically significant, multiple pairwise comparisons using the Bonferroni correction were carried out to determine which group means were different. In the same way, 2-way ANOVA were carried out to estimate the effect of freeze-drying on carotenoid bioaccessibility. To compare ZEA concentration in Xantomato and in ZEA-rich fruits and vegetables, as well as to compare its bioaccessibility, 1-way ANOVA were performed. Homogeneity of variances was checked by Levene's test. In case of data with inhomogeneous variances, a log-transformation was performed before performing the ANOVA. Finally, Tukey-Kramer's test was used as a post hoc test for pairwise comparisons. To estimate the intestinal absorption efficiency of micellar ZEA from *in vitro* digestion of Xantomato and ZEA-rich fruits and vegetables, a 1-way ANOVA was used as described previously. For the analysis of lutein intestinal uptake efficiency, Student's *t*-test was used with Welch's correction in case of inhomogeneous variances. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. All analyses were conducted with R version 1.0.136 for Macintosh (R Core Team, 2020).

3. Results

3.1. Effect of freeze-drying on tomato puree and corn carotenoid content

We chose tomatoes and corn as model plant matrices because they are respectively the matrix of Xantomato and the matrix of one of the major dietary ZEA contributors in certain populations. Table 2 shows carotenoid concentration in fresh and freeze-dried tomatoes and corn. Lutein and β-carotene concentrations in rehydrated freeze-dried tomato puree were significantly lower than those in fresh tomato puree ($P < 0.001$), in contrast to lycopene concentrations in fresh and freeze-dried tomato puree ($P = 0.06$). Lutein and ZEA concentrations were lower in freeze-dried corn than in fresh corn ($P < 0.05$), which was not the case for β-carotene ($P = 0.1$). The average decrease in carotenoid concentration in tomato puree was about 31%, while it was about 18% in corn. There was a significant interaction between the food matrix, the freeze-drying treatment, and the carotenoid species ($P < 0.01$). The effect of freeze-drying was different depending on the carotenoid species in corn ($P < 0.05$) but not in tomato puree ($P = 0.08$). Moreover, the effect of freeze-drying on lutein ($P < 0.05$) and β-carotene ($P < 0.001$) concentration was not the same depending on the matrix.

3.2. Effect of freeze-drying on tomato puree and corn carotenoid bioaccessibility

We used again tomatoes and corn as model plant matrices. Results are shown in Table 3. Lutein and ZEA bioaccessibilities from rehydrated freeze-dried corn (36 ± 1% and 38 ± 2%, respectively) were significantly higher (both $P < 0.01$) than in fresh corn (22 ± 1% and 25 ± 2%, respectively). Concerning tomato, lutein bioaccessibility from rehydrated freeze-dried puree (43 ± 3%) was significantly higher ($P < 0.01$) than in fresh tomato puree (33 ± 3%). On the contrary, β-carotene bioaccessibility from the freeze-dried puree (14 ± 1%) was significantly lower than in the fresh puree (26 ± 2%). Finally, lycopene bioaccessibility from the freeze-dried puree was not significantly different from that from the fresh puree (about 2%, $P = 0.75$). Freeze-drying did not impact differently lutein bioaccessibility from tomato vs maize ($P = 0.5$).

Table 2
Concentrations of carotenoids (mg/kg fresh weight) in fresh and rehydrated freeze-dried tomato puree and corn.

	Tomato puree			Corn		
	Fresh	Freeze-dried	P-value	Fresh	Freeze-dried	P-value
β-carotene	1.44 ± 0.03	1.10 ± 0.03	<0.001	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.145
Lutein	0.24 ± 0.01	0.16 ± 0.01	<0.001	4.85 ± 0.21	4.03 ± 0.26	0.049
Lycopene	1.83 ± 0.26	1.18 ± 0.13	0.062	ND	ND	–
ZEA	ND	ND	–	3.95 ± 0.12	3.22 ± 0.24	0.034

Values are means ± SEM (n = 4). ND: not detected, i.e. lower than 0.1 mg/kg. The effect of freeze-drying on carotenoid content was evaluated with a 3-way ANOVA, followed by pairwise comparisons using T-tests.

Table 3
Bioaccessibility* (%) of carotenoids from fresh and rehydrated freeze-dried tomato puree and corn.

	Tomato puree			Corn		
	Fresh	Freeze-dried	P-value	Fresh	Freeze-dried	P-value
β-carotene	26.1 ± 1.9	14.3 ± 1.2	<0.01	39.1 ± 1.7	NM	–
Lutein	32.9 ± 2.8	43.4 ± 3.1	0.012	22.0 ± 1.3	35.8 ± 1.5	<0.001
Lycopene	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1	0.752	NM	NM	–
ZEA	NM	NM	–	24.8 ± 1.7	38.1 ± 1.7	<0.01

*Bioaccessibility refers to the percentage of food carotenoids that is recovered in the micelle fraction after *in vitro* digestion.
Values are means ± SEM (n = 4). NM: not measured (because the corresponding carotenoid was below the limit of quantification in the micelle fraction). For each matrix, the effect of freeze-drying on the bioaccessibility of carotenoids was evaluated with a 2-way ANOVA. Differences in the bioaccessibility of each carotenoid were then analyzed by pairwise comparisons using T-tests.

3.3. ZEA concentrations in Xantomato and in ZEA-rich fruits and vegetables

Fig. 1 shows the ZEA content measured in Xantomato and in ZEA-rich fruits and vegetables. We recall that these measurements were carried out on fruits and vegetables treated in the same way as Xantomato, i.e. reduced to puree, freeze-dried then rehydrated. Orange pepper had the highest ZEA content (22.1 ± 1.0 mg/kg fresh weight), followed by Xantomato (14.6 ± 0.3 mg/kg) and corn (3.2 ± 0.2 mg/kg). ZEA concentration in Xantomato was significantly higher (almost 5 times) than in corn. The four vegetables containing the lowest ZEA content were tomatoes, broccoli, potato and kale. As phytochemical concentrations are affected by different factors, e.g. plant variety and growing conditions, we compared the ZEA concentrations measured in this study to those reported in the literature (Granado et al., 1992; Perry et al., 2009; Murillo et al., 2010). Table 4 shows that, although concentrations measured in this study are sometimes quite different from the published concentrations, they are of the same order of magnitude. Concerning the lutein concentrations in the foods used in the study (**Supplemental Figure**), two vegetables, namely spinach and kale, can be distinguished from the other vegetables by their very high lutein content (51.0 ± 2.4 mg/kg and 48.4 ± 3.2 mg/kg, respectively), which was much higher than that of Xantomato (1.3 ± 0.03 mg/kg).

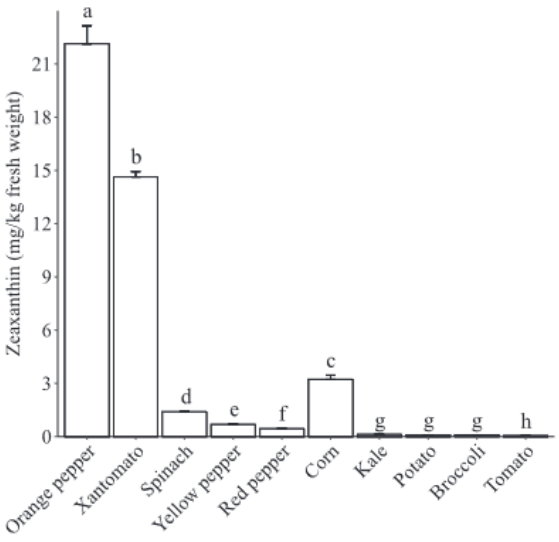


Fig. 1. ZEA concentrations (mg/kg fresh weight) in the ZEA-rich vegetables used in this study. Plants are classified as in Table 4. In order to be able to compare the ZEA contents of Xantomato with those of the other sources of ZEA, these measurements were carried out on fruits and vegetables treated in the same way as Xantomato, i.e. reduced to puree, freeze-dried then rehydrated. Bars represent mean ± SEM (n = 4). Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's HSD test).

3.4. ZEA bioaccessibility from Xantomato and ZEA-rich fruits and vegetables

Fig. 2 shows that ZEA bioaccessibility from corn (38.1 ± 1.7%) was significantly higher than that from orange pepper (28.9 ± 1.1%), Xantomato (26.3 ± 0.8%), spinach (25.6 ± 1.1 %), and yellow pepper (15.5 ± 1.1%). Note that no ZEA was detected in the micelle fractions from digestions of the other fruits and vegetables.

3.5. Caco-2 cell uptake efficiency of ZEA and lutein present in mixed micelles from in vitro digestions

Table 5 shows the uptake efficiency of ZEA and lutein contained in mixed micelles from *in vitro* digestions of corn, Xantomato and orange pepper. The uptake efficiency of ZEA from Xantomato was not significantly different from that from corn ($P = 0.5$), but it was significantly different from that of orange bell pepper ($P < 0.01$). Concerning lutein uptake efficiency, it was not significantly different whether it came from corn or Xantomato ($P = 0.5$).

4. Discussion

The aim of this study was to assess the potential of Xantomato as a relevant ZEA food source for humans. To be the case, i) ZEA concentration in Xantomato should be high enough to provide significant ZEA quantities in case of a reasonable consumption, and ii) ZEA in

Table 4
ZEA and lutein content of vegetables that are the richest in ZEA according to published data (µg/100 g fresh weight basis).

Food*	ZEA	Lutein	References
Bell pepper, orange, raw	1665	208	(Perry et al., 2009)
	6200 ± 60	790 ± 60	(Murillo et al., 2010)
Xantomato, raw	3900		(Karniel, Koch, Zamir, & Hirschberg, 2020)
Scallions, cooked	2490		(Perry et al., 2009)
Egg yolk, raw	870	917	(Perry et al., 2009)
	213 ± 85	292 ± 117	(Handelman et al., 1999)
Spinach, cooked	0	13 504	(Perry et al., 2009)
	179		(Holden et al., 1999)
	564 ± 75	6420 ± 1190	(Granado et al., 1992)
Bell pepper, yellow, raw	18	139	(Perry et al., 2009)
	440 ± 60	220 ± 20	(Murillo et al., 2010)
Bell pepper, red, raw	440 ± 40	220 ± 40	(Murillo et al., 2010)
	148 ± 38		(Granado et al., 1992)
Corn, canned	216	200	(Humphries & Khachik, 2003)
	216	336	(Scott & Eldridge, 2005)
Cabbage, Kale, cooked	0	8884	(Perry et al., 2009)
		3150	(de Sa & Rodriguez-Amaya, 2003)
	173		(Holden et al., 1999)
Potato, cooked	21 + 1	44 + 1	(Granado et al., 1992)

Values represent means ± SD * Foods are ranked from the richest to the least rich in ZEA.

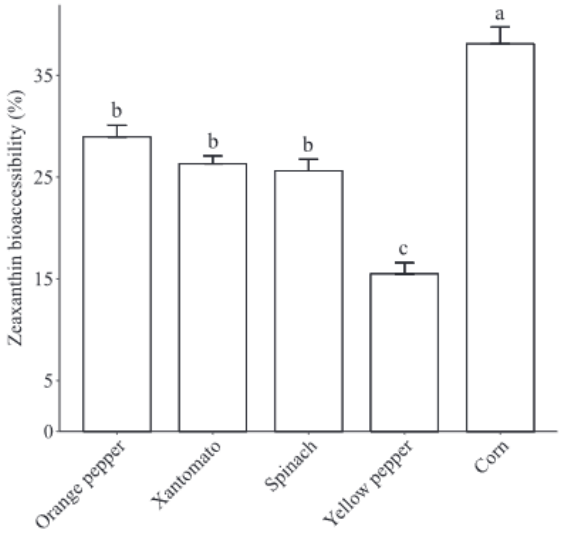


Fig. 2. ZEA bioaccessibility (%) from the ZEA-rich vegetables. In order to be able to compare the bioaccessibility of ZEA from Xantomato with that of the other sources of ZEA, the *in vitro* digestions were carried out on fruits and vegetables treated in the same way as Xantomato, i.e. reduced to puree, freeze-dried and then rehydrated. Note that results were presented only for vegetables whose micelles contained a detectable concentration of ZEA. Bars represent mean ± SEM (n = 3). Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's HSD test).

Table 5
Uptake efficiency (%) of micellarized xanthophylls from *in vitro* digestions of the Xantomato puree and selected ZEA-rich vegetables.

	Corn	Orange pepper	Xantomato
Lutein	7.0 ± 0.3^{b}	NM	6.7 ± 0.4^{b}
ZEA	6.9 ± 0.5^{b}	10.6 ± 0.6^{a}	7.8 ± 0.4^{b}

Concentrations of carotenoids applied on the cells were as follow: corn (Lutein 23 ± 3 nM and ZEA 21 ± 2 nM), orange pepper (ZEA 75 ± 10 nM), xantomato (Lutein 13 ± 2 nM and ZEA 130 ± 6 nM). Values are means ± SEM (n = 4). For each line, mean values with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$; Student *t*-test or ANOVA followed by Tukey's HSD test). NM: not measured (because the corresponding carotenoid was below the limit of quantification).

Xantomato should be sufficiently bioavailable. The latter condition is important to verify because Xantomato is biofortified in ZEA and its intracellular localization in membranous structures of chromoplasts (Karniel, Koch, Zamir, & Hirschberg, 2020) may affect its bioaccessibility (Palmero et al., 2013, 2016). Therefore, we first compared Xantomato ZEA content with that of food sources naturally rich in this carotenoid. We then compared ZEA bioaccessibility from Xantomato with that from ZEA-rich fruits and vegetables. Finally, we compared the intestinal cell uptake efficiency of micellarized ZEA from Xantomato with that of micellarized ZEA from common vegetables rich in ZEA. Indeed, measuring the bioaccessibility of a carotenoid and its uptake efficiency by intestinal cells in culture gives a good estimate of its bioavailability (Reboul et al., 2006).

Lutein and zeaxanthin are both found in eggs, but unlike lutein, which is present in many fruits and vegetables, ZEA is only found in significant amounts in a few vegetables. It is therefore particularly relevant to situate Xantomato in relation to the food sources richest in this pigment. The first way to proceed is to compare with data from literature. However, this method has the disadvantage of comparing values that have not been found under the same experimental conditions (different assay methods, different experimenters, etc.) and that originate from vegetables that have sometimes not been prepared in the same way (raw or cooked with different methods). We therefore decided to measure the concentration of ZEA in Xantomato and in ZEA-rich sources under the same assay conditions. Finally, since we could only freeze-dry Xantomato puree, we measured ZEA content in the other sources also puréed and freeze-dried. This double comparison of ZEA concentrations in Xantomato and in the richest sources of ZEA shows that Xantomato is one of the richest sources of this pigment. Indeed, according to the literature, with 39 mg/kg (Karniel, Koch, Zamir, & Hirschberg, 2020), the raw tomatoes of Xantomato rank after the orange pepper (62 mg/kg), but before the scallion (25 mg/kg). Similarly, according to our measurements, freeze-dried Xantomato purée (15 mg/kg) still ranks after the orange pepper (22 mg/kg) but ahead of all the other sources studied. As the losses of lutein and ZEA in corn upon freeze-drying were not significantly different from one another (-17 and -18% respectively), we can reasonably assume a similar behavior for these two xanthophylls in tomato puree. Knowing that the loss of lutein due to freeze-drying in common tomato puree was 33% (Table 3), we can therefore estimate that the ZEA content of the Xantomato puree before its freeze-drying was 14.6/0.66 = 22 mg/kg. In summary, knowing that raw Xantomato tomatoes can contain >50 mg ZEA/kg fresh weight (Karniel, Koch, Zamir, & Hirschberg, 2020) and Xantomato puree 22 mg/kg, we can estimate that 40 g of Xantomato tomatoes or 91 g of Xantomato tomato puree would provide 2 mg of ZEA, which is the daily amount recommended by the US National Eye Institute to reduce the risk of age-related macular degeneration (https://www.nei.nih.gov/research/clinical-trials/age-related-eye-disease-studies-aredsareds2/about-areds-and-areds2. Accessed 07.11.23).

As mentioned at the beginning of the discussion, our second objective was to compare the bioaccessibility of ZEA from Xantomato with that from common vegetable sources of ZEA. The results obtained first show that the bioaccessibilities we measured were in the range of previously observed values, e.g. 38% in corn, which is close to the 35% observed by Hossain & Jayadeep (Hossain & Jayadeep, 2021), and the 43% observed by Zurak et al. (Zurak et al., 2021). This confirms that our *in vitro* digestion results were reliable and therefore usable to compare ZEA bioaccessibility from Xantomato with that from other ZEA-rich food sources. Our ancillary study on the effect of freeze-drying on the bioaccessibility of carotenoids also suggests that the bioaccessibility of lutein is certainly overestimated because of freeze-drying (+30% according to the difference between the bioaccessibility of lutein from freeze-dried tomato puree compared to the non-freeze-dried one). This ancillary study also shows that the effect of freeze-drying on the bioaccessibility of lutein is greater for corn than for tomato puree, which may explain why corn presented the highest bioaccessibility of ZEA. On the whole, this suggests that the bioaccessibility of ZEA from Xantomato is within the range of bioaccessibility values of other fruits and vegetables.

Regarding ZEA uptake efficiency by Caco-2 cells, which was our third objective, our results show that it was not significantly different when it was in micelles coming from Xantomato than when it was in micelles coming from corn. The fact that the absorption efficiency of ZEA from orange peppers was significantly higher than that from the other sources of ZEA tested could be due to the fact that orange peppers contain, unlike corn and Xantomato, a very large amount of ZEA esters (Weller & Breithaupt, 2003). We hypothesize that a fraction of these esters was hydrolyzed by Caco-2, so that the amount of free ZEA found in the cells did not only originate from the free ZEA present in the micelles, but also from that derived from the hydrolysis of ZEA esters. ZEA esters hydrolysis by Caco-2 cells was not observed in a previous study (Chitchumroonchokchai & Failla, 2006), although the authors had not designed their experiment to study this very precisely, but such an hydrolysis is quite plausible since it has been observed that Caco-2 cells can hydrolyze a vitamin E ester (Desmarchelier et al., 2013).

In summary, this study shows that the ZEA content of Xantomato is

very high as compared to all the richest dietary sources of this compound. Indeed, it ranked second either in the literature or in measurements made on a panel of fruits and vegetables rich in ZEA. It is furthermore important to mention that ZEA accumulates in Xantomato as a free molecule, which is the form present in the majority of fruits and vegetables, while some fruits and vegetables, e.g. peppers and goji berry, contain ZEA esters which must be hydrolyzed to be effectively absorbed (Chitchumroonchokchai & Failla, 2006). ZEA from Xantomato also displays a bioaccessibility equivalent to that of ZEA from the majority of the studied sources and its absorption efficiency by enterocytes is equivalent to that of ZEA from corn, which is one the main dietary source of this xanthophyll in some populations. We can therefore conclude that the consumption of a tomato, which is the world's most popular and widely available vegetable, modified in a non-transgenic fashion to accumulate ZEA could provide significant quantities of bioavailable ZEA to groups of the population who consume few or no other sources of this xanthophyll. Of course, a clinical study comparing the ability of Xantomato and a common source of ZEA, e.g. corn, spinach or egg yolk, to increase the blood status of ZEA, or macular pigment optical density, would provide definitive proof of the interest of this tomato rich in ZEA to improve visual function and prevent AMD.

CRediT authorship contribution statement

Lisa Morand-Laffargue: Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Joseph Hirschberg:** Writing - review & editing. **Charlotte Halimi:** Supervision. **Charles Desmarchelier:** Software, Writing - review & editing. **Patrick Borel:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

Research in the laboratory of J. Hirschberg was supported by the Israel Science Foundation Grant No. 1930/18".

For the purpose of Open Access, a CC-BY public copyright licence (Creative Commons — Attribution 4.0 International — CC BY 4.0) has been applied by the authors to the present document and will be applied to all subsequent versions up to the Author Accepted Manuscript arising from this submission.

Appendix A. Supplementary material

The costs of this project were covered by the own budget of P. Borel's research team, which came mainly from INRAE endowments.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112751.

References

Bernstein, P. S., Khachik, F., Carvalho, L. S., Muir, G. J., Zhao, D. Y., & Katz, N. B. (2001). Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Experimental Eye Research, 72*(3), 215–223. https://doi.org/10.1006/exer.2000.0954

Bohn, T., Desmarchelier, C., Dragsted, L. O., Nielsen, C. S., Stahl, W., Rühl, R., … Borel, P. (2017). Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Molecular Nutrition & Food Research, 61*(6), 1600685. https://doi.org/10.1002/mnfr.201600685

Borel, P., Hammaz, F., Morand-Laffargue, L., Creton, B., Halimi, C., Sabatier, D., & Desmarchelier, C. (2021). Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste as a sustainable dietary source of provitamin a carotenoids. *Food Chemistry, 359*, Article 129911. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129911

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. *British Journal of Nutrition, 91*(5), 707–713. https://doi.org/10.1079/BJN20041105

Chew, E. Y., Clemons, T. E., Agrón, E., Domalpally, A., Keenan, T. D. L., Vitale, S., Weber, C., Smith, D. C., Christen, W., & AREDS2 Research Group. (2022). Long-term Outcomes of Adding Lutein/Zeaxanthin and ω-3 Fatty Acids to the AREDS Supplements on Age-Related Macular Degeneration Progression : AREDS2 Report 28. *JAMA Ophthalmology, 140*(7), 692–698. 10.1001/jamaophthalmol.2022.1640.

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. *The Journal of Nutrition, 136*(3), 588–594. https://doi.org/10.1093/jn/136.3.588

Chung, H.-Y., Rasmussen, H. M., & Johnson, E. J. (2004). Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *The Journal of Nutrition, 134*(8), 1887–1893. https://doi.org/10.1093/jn/134.8.1887

Desmarchelier, C., & Borel, P. (2017). Overview of carotenoid bioavailability determinants : From dietary factors to host genetic variations. *Trends in Food Science & Technology, 69*, 270–280. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.002

Desmarchelier, C., Tourniaire, F., Prévéraud, D. P., Samson-Kremser, C., Crenon, I., Rosilio, V., & Borel, P. (2013). The distribution and relative hydrolysis of tocopheryl acetate in the different matrices coexisting in the lumen of the small intestine during digestion could explain its low bioavailability. *Molecular Nutrition & Food Research, 57*(7), 1237–1245. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200720

Fabbri, A. D. T., & Crosby, G. A. (2016). A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science, 3*, 2–11. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.11.001

Garrett, D. A., Failla, M. L., & Sarama, R. J. (1999). Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(10), 4301–4309. https://doi.org/10.1021/jf9903298

Goncalves, A., Margier, M., Tagliaferri, C., Lebecque, P., Georgé, S., Wittrant, Y., … Reboul, E. (2016). Pinoresinol of olive oil decreases vitamin D intestinal absorption. *Food Chemistry, 206*, 234–238. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.048

Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., & Rojas-Hidalgo, E. (1992). Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40*(11), 11. https://doi.org/10.1021/jf00023a019

Handelman, G. J., Nightingale, Z. D., Lichtenstein, A. H., Schaefer, E. J., & Blumberg, J. B. (1999). Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *The American Journal of Clinical Nutrition, 70*(2),

Holden, J. M., Eldridge, A. L., Beecher, G. R., Marilyn Buzzard, I., Bhagwat, S., Davis, C. S., … Schakel, S. (1999). Carotenoid content of U.S. foods: An update of the database. *Journal of Food Composition and Analysis, 12*(3), 169–196. https://doi.org/10.1006/jfca.1999.0827

Hossain, A., & Jayadeep, A. (2021). Infrared heating induced improvement of certain phytobioactives, their bioaccessible contents and bioaccessibility in maize. *LWT, 142*, Article 110912. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110912

Humphries, J. M., & Khachik, F. (2003). Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(5), 5. https://doi.org/10.1021/jf026073e

Junpatiw, A., Lertrat, K., Lomthaisong, K., & Tangwongchai, R. (2013). Effects of steaming, boiling and frozen storage on carotenoid contents of various sweet corn cultivars. *International Food Research Journal*, 2219–2225.

Karniel, U., Koch, A., Zamir, D., & Hirschberg, J. (2020). Development of zeaxanthin-rich tomato fruit through genetic manipulations of carotenoid biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal, 18*(11), 11. https://doi.org/10.1111/pbi.13387

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(13), 4330–4337. https://doi.org/10.1021/jf040028k

Ma, L., Dou, H.-L., Wu, Y.-Q., Huang, Y.-M., Huang, Y.-B., Xu, X.-R., … Lin, X.-M. (2012). Lutein and zeaxanthin intake and the risk of age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition, 107*(3), 350–359. https://doi.org/10.1017/S0007114511004260

Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., … Schlemmer, U. (2009). Carotenoids : Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research, 53*(S2), S194–S218. https://doi.org/10.1002/mnfr.200800053

Murillo, E., Meléndez-Martínez, A. J., & Portugal, F. (2010). Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chemistry, 122*(1), 1. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.034

O'Hare, T. J., Fanning, K. J., & Martin, I. F. (2015). Zeaxanthin biofortification of sweet-corn and factors affecting zeaxanthin accumulation and colour change. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 572*, 184–187. https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.015

Palmero, P., Lemmens, L., Ribas-Agustí, A., Sosa, C., Met, K., de Dieu Umutoni, J., … Van Loey, A. (2013). Novel targeted approach to better understand how natural structural barriers govern carotenoid in vitro bioaccessibility in vegetable-based systems. *Food Chemistry, 141*(3), 2036–2043. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.064

Palmero, P., Panozzo, A., Colle, I., Chigwedere, C., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2016). Role of structural barriers for carotenoid bioaccessibility upon high pressure homogenization. *Food Chemistry, 199*, 423–432. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.062

Perry, A., Rasmussen, H., & Johnson, E. J. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis, 22*(1), 1. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.006

Qiu, J. (2019). A systematic analysis on tomato powder quality prepared by four conductive drying technologies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.013

Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., André, M., Portugal, H., … 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). *The Biochemical Journal, 387* (Pt 2), 455–461. https://doi.org/10.1042/BJ20040554

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(23), 8749–8755. https://doi.org/10.1021/jf061818s

Reboul, E., Thap, S., Tourniaire, F., André, M., Juhel, C., Morange, S., … Borel, P. (2007). Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *British Journal of Nutrition, 97*(3), 440–446. https://doi.org/10.1017/S0007114507352604

de Sa, M. C., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00227-9

Scott, C. E., & Eldridge, A. L. (2005). Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis, 18*(6), 6. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.04.001

Sommerburg, O., Keunen, J. E. E., Bird, A. C., & van Kuijk, F. J. G. M. (1998). Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: The macular pigment in human eyes. *British Journal of Ophthalmology, 82*(8), 907–910. https://doi.org/10.1136/bjo.82.8.907

Wang, H., Wang, G., Billings, R., Li, D., Haase, S. R., Wheeler, P. F., … Li, W. (2022). Can diet supplements of macular pigment of lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin affect cognition? *Journal of Alzheimer's Disease: JAD, 87*(3), 1079–1087. https://doi.org/10.3233/JAD-215736

Weller, P., & Breithaupt, D. E. (2003). Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(24), 7044–7049. https://doi.org/10.1021/jf034803s

Wu, Y., Yuan, Y., Jiang, W., Zhang, X., Ren, S., Wang, H., … Zhang, Y. (2022). Enrichment of health-promoting lutein and zeaxanthin in tomato fruit through metabolic engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology, 7*(4), 1159–1166. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.08.005

Zurak, D., Grbeša, D., Duvnjak, M., Kiš, G., Međimurec, T., & Kljak, K. (2021). Carotenoid content and bioaccessibility in commercial maize hybrids. *Agriculture, 11*(7), 7. https://doi.org/10.3390/agriculture11070586