

Article de synthèse

Nutrition

Les antioxydants des agrumes : action en solitaire ou matricielle ?

E. Rock, A. Fardet

INRA, UMR 1019, unité nutrition humaine, centre Clermont-Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Correspondance : Edmond.Rock@clermont.inra.fr

Résumé : Les agrumes sont des fruits largement consommés dans le monde. Sur un plan nutritionnel, comme beaucoup de fruits, ils apportent des composés de nature organique et minérale connus pour jouer un rôle biologique primordial. Les antioxydants organiques font l'objet de la présente revue principalement centrée sur des études menées chez l'Homme. L'objectif est de montrer que la propriété antioxydante est clairement établie par les données expérimentales et sur les composés des agrumes de trois familles de molécules, l'acide ascorbique (vitamine), la cryptoxanthine (caroténoïdes) et les flavanones (polyphénols). Chacun des composés possédant aussi des activités biologiques indépendantes de leur propriété antioxydante, la question de l'impact d'un apport d'agrumes sur les fonctions biologiques nécessite de connaître la contribution de chacun des composés pour comprendre et expliquer le rôle des agrumes dans l'alimentation. Les données expérimentales et épidémiologiques montrent que le rôle protecteur des agrumes ne peut pas être conféré à un seul composé des agrumes, et il est proposé qu'une action additionnelle a minima soit envisagée pour expliquer l'effet biologique et physiologique des agrumes.

Mots clés : Agrumes – Stress oxydatif – Antioxydants – Bêta-cryptoxanthine – Acide ascorbique – Matrice

Citrus Antioxidants: Alone or into a Matrix?

Abstract: Citrus fruits are widely consumed in the world. From a nutritional point of view, like many fruits, they provide organic and inorganic compounds known to play important biological roles. Organic antioxidants are the subject of this review mainly centered on studies in humans. The aim is to show that the antioxidant property is clearly established by experimental data on the compounds of three citrus families of molecules, e.g., ascorbic acid (vitamin), cryptoxanthin (carotenoids) and flavanones (polyphenols). Each of these compounds, also possessing biological activities independent of their antioxidant property, raises the question of the impact of intake of citrus on the biological functions that requires knowledge on the contribution of each compound to understand and explain

the role of dietary citrus. Experimental and epidemiological data suggest that the protective role of citrus may not be conferred to a single compound of citrus and it is proposed that additional action a minima should be envisaged to explain the biological and physiological effects of citrus.

Keywords: Citrus – Oxidative stress – Antioxidant – Beta-cryptoxanthin – Ascorbic acid – Matrix

Introduction

Les agrumes, une composante de l'alimentation méditerranéenne, sont des fruits composés par les citrons, les oranges, les pommelos et pamplemousses pour ceux les plus consommés. Sur un plan nutritionnel, la perception de ces fruits réside principalement sur leur contenu en vitamine C et l'action antioxydante qui leur est associée. Cependant, d'autres composants présentent une activité antioxydante comme ceux sélectionnés à partir des tables de composition (USDA, Phenol Explorer) (Tableau 1).

La nature chimique de ces composés, minérale ou organique, permet de les classer en antioxydants indirects (Cu, Zn, Se) agissant comme cofacteurs d'enzymes antioxydantes ou en antioxydants directs comme piègeurs d'espèces chimiques initiateurs et/ou présentant un pouvoir réducteur (vitamines, polyphénols, caroténoïdes). Sur la base des études entreprises chez l'Homme, la revue se focalisera principalement sur les antioxydants organiques considérés comme spécifiques des agrumes, la vitamine C, la bêta-cryptoxanthine et l'héspéridine.

Stress oxydant et minéraux antioxydants

Un apport élevé ou adéquat en antioxydants alimentaires est associé à des conséquences biochimiques comme une diminution de dommages oxydants sur l'ADN, les glucides et la peroxydation des acides gras polyinsaturés. Les dommages oxydatifs de ces molécules organiques sont considérés

Tableau 1. Composés antioxydants des agrumes (extrait des bases de données USDA et Phenol Explorer).

Composés antioxydants de jus	Citrons	Oranges	Pamplemousses
Minéraux et vitamines (mg/100 g)			
Cuivre	0,042	0,025	0,033
Zinc	0,049	0,026	0,225
Sélénium	0,002	0,01	0
Vitamine B9	0,021	0,027	0,017
Vitamine C	42,6	53,8	33
Vitamine E	0,115	0,15	0,17
Bêta-cryptoxanthine (provitamine A)	0,0005	0,13	0,005
Polyphénols (mg/100 ml)			
Flavanones			
Hespéridine	17,81	25,85	0,65
Naringénine			1,56
Ériocitrine	13,82	0,36	0,16
Naringine			30,78
Phlorine	4,3	2,22	5,73
Narirutine	0,64	5,36	9,69
Néohespéridine		0,06	0,68
Didymine		5,93	0,68
Néoériocitrine			0,09
Poncirine			1,95
Flavone			
Diosmine	2,92		
Lutéoline 7-O-rutinoside	1,85		
Sinensine		0,06	
Nobilétine		0,07	
Apigénine 6,8-di-C-glucoside		5,53	
Flavonols			
Quercétine		1,06	0,63
3-méthoxynobilétine		0,02	
Autres			
Furanocoumarine (Bergapten)			0,35
Phlorine	4,3	2,22	5,73

comme initiateurs de processus pathologiques comme le cancer associé à l'oxydation de l'ADN et les pathologies vasculaires associées à l'oxydation des lipoprotéines à faible densité ou LDL. Les dommages, somme toute inévitables, des composants biologiques sont initiés par des actions pro-oxydantes résultant de l'association obligatoire de l'oxygène aux fonctions des mitochondries et de la chaîne respiratoire, des phagocytes et de la lutte contre les bactéries et virus pathogènes, des peroxisomes ou des cytochromes P450 et de la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, un certain nombre de métabolites de l'oxygène, comme l'oxygène singulet et l'anion superoxyde, peuvent engendrer d'autres espèces oxygénées réactives (EOR) comme le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène, l'oxyde d'azote ou l'anion peroxydite. Ces espèces réactives initient des réactions

radicalaires en chaîne par échange du ou des électrons surnuméraires et stabilisation des EOR aux dépens des autres molécules biologiques environnantes. En outre, les métaux de transition comme le cuivre ou le fer sont aussi capables d'initier des oxydations entretenues par la réaction radicalaire. Le niveau de ces EOR, catalysé par des enzymes comme les peroxydases ou la respiration mitochondriale, est avant tout contrôlé par les enzymes antioxydantes de la première ligne de défense (superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase) dont les formes actives sont constituées par l'addition posttraductionnelle de métaux sur le site actif. Ces métaux, comme le cuivre, le zinc ou le manganèse pour les superoxydes dismutases, le sélénium pour la glutathion peroxydase et le fer pour la catalase, jouent ainsi un rôle indirect dans la protection de l'organisme contre le stress oxydant. D'autres molécules issues des aliments peuvent contrecarrer l'initiation de la réaction radicalaire en piégeant les EOR et/ou les métaux de transition (caroténoïdes, polyphénols), voire d'arrêter la réaction radicalaire par piégeage et stabilisation par résonance moléculaire de l'électron surnuméraire (tocophérols, acide ascorbique et polyphénols). Les approches expérimentales, animales et cellulaires, sur ces composés organiques ont permis d'émettre des hypothèses quant à l'implication potentielle de ces antioxydants, vectorisés par certains aliments sources, dans l'incidence de certains cancers, de maladies cardiovasculaires ou de pathologies dégénératives décrite par des études épidémiologiques.

Vitamine C ou acide ascorbique

L'activité vitaminique, antiscorbutique de l'acide ascorbique résulte de la perte de la capacité de synthèse de ce composé par l'Homme [38]. La vitamine C est l'antioxydant organique majeur des citrus tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Ce céto lactone hydrosoluble possède deux groupes hydroxyles (Fig. 1) qui lui confèrent la propriété réductrice par formation successive du radical ascorbyl et de l'acide déhydroascorbique (DHA). Cette vitamine est capable de détoxifier une espèce radicalaire par piégeage de l'électron surnuméraire et stabilisation de cet électron par résonance, rendant la forme ascorbyl moins réactive que l'espèce radicalaire initiale [9]. Le radical ascorbyl résultant de ces réactions est réduit à son tour par les réductases NADH- et NADP-dépendants [16]. La vitamine C alimentaire se trouve en général sous les deux formes d'ascorbate et de déhydroascorbate. Le niveau faible du DHA circulant indique que l'ascorbate est préférentiellement et spécifiquement absorbée par les cellules. La concentration plasmatique en vitamine C est de 40–80 µM. À ces concentrations, en terme thermodynamique, l'ascorbate est capable de donner un électron aux espèces radicalaires les plus communes comme les hydroxyles, peroxydes, ou les radicaux thiols [9]. À ces mêmes concentrations physiologiques, il a été montré que l'acide ascorbique inhibe l'oxydation des lipoprotéines à faible densité, les LDL [37] ou de recycler la vitamine E par

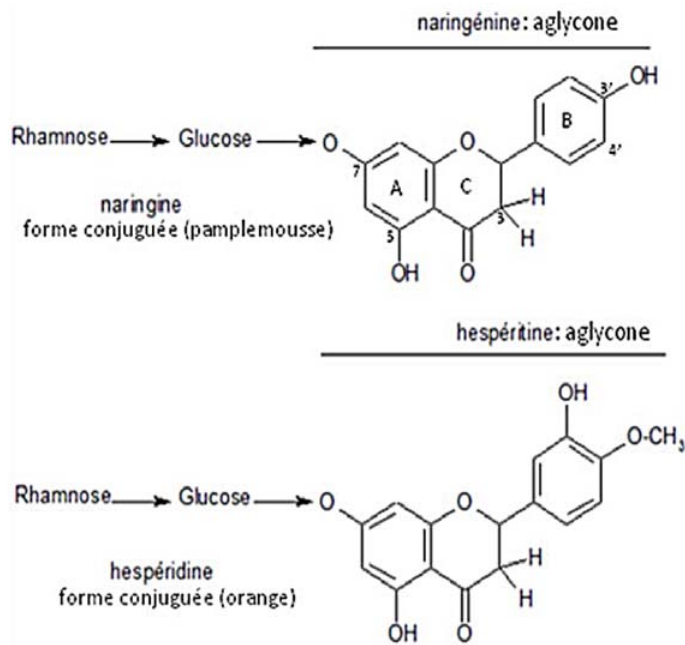
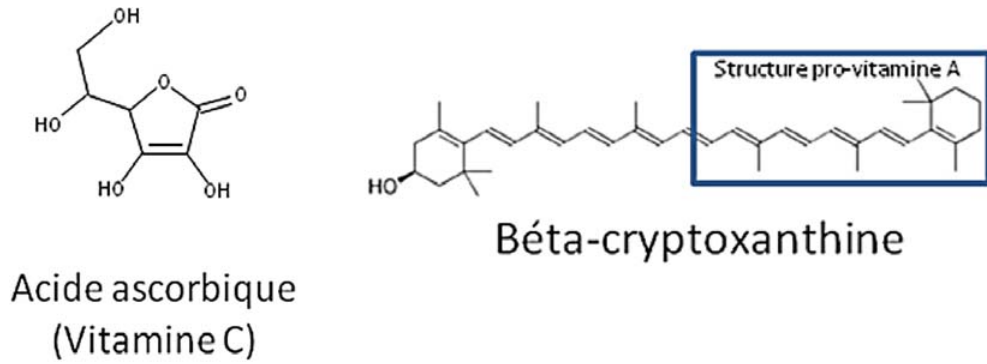


Fig. 1. Structures chimiques des antioxydants organiques majeurs des citruses Flavanones de pamplemousse et d'orange

réduction du radical tocophéry], expliquant la normalisation de la vitamine E plasmatique des fumeurs supplémentés avec de la vitamine C [8]. La concentration d'ascorbate, trouvée augmentée dans le fluide et les macrophages alvéolaires des fumeurs, a ouvert l'hypothèse d'un mécanisme d'adaptation pour détoxifier les EOR dérivées des cigarettes [10].

Cette forte capacité réductrice, notamment en présence de métaux de transition, induit une auto-oxydation de cette vitamine. Ainsi, l'effet pro-oxydant de la vitamine C peut dériver de la réduction des métaux de transition (e.g. fer ferrique en fer ferreux) qui réagissent à leur tour avec l'oxygène ambiant pour le transformer en anion superoxyde, initiateur des réactions radicalaires. Ces propriétés pro-oxydantes de la vitamine C ont été décrites sous certaines conditions chimiques (pH neutre, forte concentration), mais qui n'ont pas été retrouvées dans le plasma enrichi en fer in vitro [46], sans doute en raison de la présence de chélateurs de métaux (albumine, transferrine, céruloplasmine)

et d'autres antioxydants enzymatiques (SOD) et organiques (GSH, vitamine E...). Dans des conditions physiopathologiques (hémochromatose, ischémie-reperfusion, inflammation chronique), l'administration de la vitamine C à forte dose peut se traduire par des effets délétères sur les fonctions biologiques résultant de l'oxydation tissulaire [3,9,12].

Au-delà de l'habileté antioxydante, la vitamine C assure d'autres fonctions dépendantes de sa propriété réductrice, notamment en maintenant le fer des sites actifs de l'enzyme sous la forme ferreuse et conférant l'activité maximale à ces enzymes. Ainsi, elle joue le rôle de cofacteur des hydroxylases, impliquées dans la synthèse de collagène [35] ou la déméthylation des histones. Ainsi, l'analyse des conséquences physiopathologiques d'un apport en vitamine C alimentaire doit prendre en compte les propriétés anti- ou pro-oxydantes mais aussi ces autres propriétés d'effecteur, voire des interactions avec d'autres composants des aliments. Une illustration (voir plus loin) est l'impact de cette

vitamine sur l'ostéoporose au travers de ses effets sur les cellules de l'os (ostéoblastes et ostéoclastes) mais aussi sur la synthèse de collagène.

Bêta-cryptoxanthine (bCx)

La structure chimique de la bCx se compose de deux squelettes de tétraterpène assemblés tête-bêche et formant une structure composée de 40 atomes de carbone comportant neuf doubles liaisons conjuguées lui conférant sa propriété de colorant (Fig. 1). Molécule de la famille des caroténoïdes oxygénés ou xanthophylles, la bCx a aussi la caractéristique de posséder une activité provitaminique A (Fig. 1). Dans les populations des pays occidentaux, le taux circulant de ce caroténoïde est strictement corrélé aux citrus consommés comme les oranges (74 µg/100 g) et les mandarines (112 µg/100 g) [1]. La concentration plasmatique de la bCx est beaucoup plus faible que celle des carotènes comme le bêta-carotène (ubiquitaire des fruits et légumes [F&L]), le lycopène (apporté par les tomates largement consommées) et la lutéine et zéaxanthine (retrouvées dans les légumes feuillus et le maïs plus consommés que les agrumes). Cependant, l'apport alimentaire rapporté au statut plasmatique montre que la bCx présente un rapport plus élevé que tous les autres caroténoïdes. L'analyse des données sur les caroténoïdes totaux des populations américaines [22] et européennes [6] montre qu'un apport en bêta-carotène de 30 et 40 % de caroténoïdes totaux se traduit par 27 à 28 % des caroténoïdes plasmatiques, alors qu'un apport de 1 à 2,5 % de bCx alimentaire se traduit par un statut plasmatique de 8 à 8,5 %. Cette analyse étendue aux autres caroténoïdes montre que la bCx est plus efficacement absorbée que les carotènes (bêta-carotène et lycopène) et certains xanthophylles (lutéine/zéaxanthine). Une étude comparant l'apport et le statut en bêta-carotène, en alpha-carotène et en bCx montre que la biodisponibilité apparente pour un apport alimentaire similaire est très largement supérieure pour la bCx [11]. L'apport de fruits ou de jus d'une variété de mandarine contenant 1,8 mg de bCx/100 g de fruit, dont 80 % sous forme estérifiée et 20 % sous une forme libre, a montré une biodisponibilité équivalente [48]. Le niveau sérique post-prandial atteint une valeur maximale d'environ 15 µg/dl, une dizaine d'heures après absorption, et cette valeur est maintenue sur plus de 48 heures. Les auteurs de cette étude ont aussi montré que l'émulsion augmente très significativement l'absorption. Comparée à une autre étude menée aussi sur des modèles de cellules intestinales Caco-2 [13], il apparaît que les formes libres soient mieux absorbées en présence notamment d'émulsifiants alimentaires [7].

Comme pour les autres caroténoïdes, les propriétés antioxydantes de la bCx sont conférées par les doubles liaisons conjuguées susceptibles de capter et de dissiper par résonance le surplus d'énergie associé à la formation d'oxygène singulet et aux électrons surnuméraires d'espèces radicalaires. La désactivation de l'oxygène singulet conduit à la pro-

duction de caroténoïde à l'état triplet. Cette réaction s'explique notamment par l'état proche des niveaux d'énergie à l'état triplet des caroténoïdes et de l'oxygène (87 et 94 kJ/mole). L'efficacité est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons conjuguées est grand. Ainsi, la bCx (neuf doubles liaisons conjuguées) possède une activité plus faible que le lycopène (11 doubles liaisons conjuguées) capable d'une activité atteignant 10^{10} /Ms [5]. La durée de vie du caroténoïde à l'état triplet étant courte, la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur a lieu sans possibilité de provoquer des dommages aux molécules environnantes. Pour l'activité antiradicalaire, des études réalisées sur des membranes modèles montrent que les xanthophylles préservent mieux que les carotènes les lipides membranaires de l'oxydation, notamment par l'effet ancrage de ces molécules au niveau de la tête polaire, induit par la présence du cycle oxygéné terminal (hydrophile), avec la partie hydrocarbonée (hydrophobe) plongée dans le cœur de la bicouche. Cette position particulière résulte en une orientation favorable des xanthophylles pour protéger les acides gras des positions 1 et 2 des phospholipides membranaires, voire des lipoprotéines [33]. Cette position structurale pourrait aussi affecter les propriétés physicochimiques de la membrane (fluidité et perméabilité) avec des conséquences sur les fonctions des protéines membranaires, notamment comme celles impliquées dans la transduction de signaux au travers de canaux protéiques intercellulaires appelés *gap junction* [4,18]. L'activité antiradicalaire des caroténoïdes, en général, conduit à la formation de cation radical des caroténoïdes d'une durée de vie suffisante pour provoquer des réactions pro-oxydantes. Des expériences chimiques montrent aussi que la présence d'autres caroténoïdes permet de régénérer des formes natives à partir des caroténoïdes radicalaires. Le faible potentiel réducteur du lycopène (980 mV) laisse supposer que ce caroténoïde pourrait servir de molécule sacrifice pour les autres caroténoïdes. D'autres expériences montrent que la vitamine C réagit avec les formes radicalaires des caroténoïdes suivant une constante de vitesse de 1,3 à 15×10^8 /Ms en solution méthanolique, plus élevée pour les xanthophylles que les carotènes [5]. Ainsi, pour éviter une activité pro-oxydante et augmenter l'efficacité de l'action antioxydante de la bCx, son apport doit être accompagné d'autres caroténoïdes et de la vitamine C.

Les mécanismes par lesquels la bCx exerce les effets bénéfiques sur la santé ne sont pas complètement élucidés et peuvent être attribuables en partie à ses propriétés antioxydantes mais aussi par d'autres propriétés comme effecteur cellulaire et/ou par l'activité provitaminique A associée. En effet, un clivage central de la molécule de bCx forme la molécule de vitamine A et un apo-caroténoïde dont le rôle n'est pas connu. Un tel clivage peut être produit par une enzyme initialement découverte par des travaux ciblant le bêta-carotène formé de deux molécules de vitamine A tête-bêche. La découverte de la 15,15'-bêta-carotène mono-oxygénase, exprimée au niveau des cellules intestinales, a permis d'expliquer l'absence de carence en vitamine A des

individus végétariens n'ayant aucun apport de vitamine A préformée retrouvée exclusivement dans les produits des animaux herbivores [30]. De plus, des études sur modèles animaux montrant une rétro-inhibition de l'expression et de l'activité de la mono-oxygénase par la forme active de la vitamine A (l'acide rétinol) constituent une base mécanistique de l'absence d'hypervitaminose induite par un apport élevé en caroténoïde provitaminique A [2]. Toutefois, dans les populations des pays émergents, les essais de complémentation par des aliments riches en caroténoïde provitaminique ne résultent pas toujours d'une augmentation du statut plasmatique en rétinol [52].

Polyphénols

Contrairement aux autres micronutriments discutés ci-dessus, de nombreuses molécules de la famille des polyphénols sont retrouvées dans les jus d'agrumes. Le Tableau 1 résume les molécules identifiées (Phenol Explorer) dont les principaux appartiennent à la famille des flavanones (Fig. 1). Ces données montrent que 100 ml de jus de pamplemousse contiennent plus de polyphénols (58,7 mg/100 ml) que les jus de citron [6,44] et d'oranges [7,47]. La nature chimique des polyphénols varie significativement entre les trois espèces d'agrumes avec des composés plus marqués. C'est ainsi que les études se sont centrées sur ces polyphénols majeurs et spécifiques comme l'ériocitrine du citron, la naringine de pamplemousse et l'hespéridine des oranges. La plupart de ces études ont porté sur des agrumes apportés sous forme de jus qui représentent environ 80 % de consommation comparé à l'apport sous forme de fruit (Mouly et al., 1998)¹. Les propriétés antioxydantes des polyphénols et en particulier des flavonoïdes sont conférées par les groupements hydroxyles des noyaux benzéniques A et B (Fig. 1). Une étude sur la relation structure-activité a été comparée avec l'activité de piégeage d'un cation radical du Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E [40] avec des résultats exprimés en activité équivalent Trolox ou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity). Globalement, les flavanones des citrus avec 1,53 mM (naringénine) à 0,76 mM TEAC (narirutine) ont une activité antioxydante plus faible que les flavanols (épicatéchine gallate, 4,9 mM TEAC) ou les anthocyanidines (delphinidine, 4,7 mM TEAC). La comparaison avec d'autres structures des flavonoïdes montre que la présence des deux groupements hydroxyles en positions 5 et 7 confère une meilleure activité antioxydante. Ainsi, avec le modèle utilisant l'ABTS il est montré que la glycosylation de l'hydroxyle en position 7 de la narirutine inhibe d'environ 50 % l'activité antioxydante observée avec la naringénine se caractérisant par la présence d'un groupe hydroxyle dans cette même position. Un tel effet suppresseur est également noté avec l'hespéridine comparée avec son homologue, l'hespéri-

dine, dont le groupement hydroxyle en position 7 du noyau A est conjugué avec le rhamnoside. Or, dans les agrumes, les flavanones d'intérêt sont la naringine et l'hespéridine conjuguées avec un glycoside en position 7. De plus, l'absence de groupement hydroxyle en position 3 du noyau C permet de supposer que l'activité de piégeage de l'oxygène singulet est également absente [49]. Concernant l'hespéridine, la méthylation de l'hydroxyle en position 4' de l'hespéridine peut faire perdre le potentiel de ce flavonoïde à piéger des ions peroxy-nitrites [21]. Outre ces relations structure-activité antioxydante, une étude *in vitro*, comparant la naringénine avec l'hespéridine suggère que la conjugaison entraîne la perte de l'activité agoniste du récepteur alpha des estrogènes [24]. Ces résultats suggèrent que les formes aglycones des flavanones ont une activité antioxydante mais aussi biologique, plus importante que leurs formes conjuguées. L'absorption et le métabolisme résultent en des formes circulantes de glucuronides (87 %) et de sulphoglucuronides (13 %), comme montré dans une étude suivant le devenir de l'hespéridine après ingestion de jus d'orange [32]. Ainsi, la forme circulante des flavanones étant aussi des formes conjuguées, il est difficile de rapporter d'éventuels effets de leur présence à leur activité antioxydante. L'absence relative de propriétés antioxydantes aux polyphénols conjugués alimentaires et circulants a récemment conduit un groupe européen à proposer que les preuves d'un effet antioxydant direct des polyphénols ne soient pas encore établies [23]. Cependant, des études *in vitro* montrent que des activités biologiques pourraient être conservées par des flavanones conjuguées et indépendamment de la structure chimique. Ainsi, l'activité de différenciation des ostéoblastes primaires de rat est induite par l'hespéridine (aglycone) et par l'hespéridine-7-O-glucuronide, le métabolite circulant majeur de l'hespéridine [50]. Pour asseoir le rôle physiologique supposé des polyphénols en général et des flavanones en particulier, d'autres études sont nécessaires pour caractériser les métabolites formés dans la circulation sanguine, voire dans le tractus digestif et réaliser des tests à des concentrations physiologiques avec ces métabolites en lieu et place des formes aglycones ou natives.

Effet matriciel des agrumes

Il est clair que la consommation des fruits de la famille des agrumes apporte les antioxydants majeurs développés ci-dessus, mais aussi bien d'autres nutriments qui peuvent interagir avec ces antioxydants. Basé sur les études publiées, l'impact de cet apport des antioxydants avec la matrice et dans un cadre d'une alimentation complexe a été analysé selon deux approches. L'une portant sur des études comparatives d'un antioxydant isolé versus l'apport du fruit ou de jus, et l'autre, sur des études indépendantes de nature épidémiologique analysant l'impact des nutriments antioxydants des agrumes et l'apport de ces agrumes dans l'alimentation.

¹ Mouly P, Gaydou EM, Auffray A. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *J.Chromatogr A*. 1998; 800:171-179.

Études expérimentales comparatives

Des expériences d'intervention avec des jus d'agrumes et des composés d'agrumes isolés sont relativement rares. La relation entre la consommation des composés avec ou sans la matrice sur des biomarqueurs de stress oxydant a été étudiée. Ainsi, Johnston et al. [27] montrent que l'apport de vitamine C sous forme de composé synthétique et sous forme de jus d'orange augmente le statut plasmatique en cette vitamine et diminue le taux de marqueur de peroxydation lipidique sanguin déterminé par la mesure des dialdéhydes totaux ou TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique). De même, l'apport de jus d'orange induit une diminution significative de l'épi-prostaglandine (8-epi-PGF2a), et la teneur en ce marqueur de peroxydation lipidique est significativement et inversement corrélée à la teneur plasmatique en vitamine C [44]. Sur un plan de biodisponibilité, une étude de Vinson et Bose [53] avait comparé l'apport de la vitamine C sous une forme isolée ou dans un extrait d'agrumes. Les résultats montrent que le pic d'absorption est similaire entre les groupes recevant de la vitamine C isolée ou apportée par la matrice (197 ± 20 et $209 \pm 33 \mu\text{mol/l}$) comparé à une boisson placebo ($56 \pm 8 \mu\text{mol/l}$) mais l'aire sous la courbe du taux plasmatique d'ascorbate était plus élevée avec l'apport de l'extrait. Les auteurs proposent l'hypothèse d'une augmentation de l'absorption et/ou une meilleure stabilisation de la vitamine C. Cette dernière hypothèse reste vraisemblable au vu du contenu des antioxydants des agrumes. Compte tenu de ces données sur la biodisponibilité, il peut sembler naturel que l'apport de la vitamine C synthétique ou protégé dans une matrice alimentaire de type agrume pourrait participer à augmenter le pouvoir antioxydant du plasma et conférer une action protectrice des organes contre le stress oxydant. Ainsi, les études d'intervention développées ci-dessus soulignent un effet prépondérant de la vitamine C comme bioactif du jus d'orange. Cependant, ces études manquent pour l'une d'un marqueur spécifique et l'autre d'une comparaison avec l'apport de vitamine C sous forme isolée. Les marqueurs de peroxydation lipidique, dérivant des acides gras polyinsaturés, devraient être étudiés en parallèle d'un dosage de ces acides gras, d'autant que l'apport de vitamine C ou de jus d'orange peut affecter la lipémie [15]. De plus, ces marqueurs statiques d'un niveau de peroxydation lipidique ne présagent pas de l'impact de cette peroxydation ou de sa protection sur des fonctions cellulaires et/ou des organes.

D'autres études ont comparé l'effet de la vitamine C ou de l'héspéridine apportée à des niveaux comparables de ceux du jus d'orange sur des fonctions/protections cellulaires mesurés *in vivo* ou *ex vivo* :

- une étude a ainsi comparé la biodisponibilité et l'effet vasculaire d'un apport d'héspéridine et de narirutine sous forme de boisson complétementée, contrôlée avec un placebo et de jus d'orange [34]. L'intervention a été réalisée sur des volontaires en surpoids consommant les trois boissons selon un dessin croisé et randomisé durant trois périodes de quatre semaines, entrecoupées de trois semaines de période sans

boissons expérimentales et un apport nul en agrumes et restreint en boissons riches en flavonoïdes. La réactivité vasculaire mesurée après quatre semaines d'intervention ne montre pas de différence selon l'apport du jus, de la boisson placebo ou de la boisson complétementée avec les flavanones. Au contraire, les mesures faites six heures après ingestion des boissons montrent une meilleure réactivité avec le jus d'orange que la boisson complétementée, comparée à la boisson placebo. De plus, cette réactivité coïncide avec le pic plasmatique de l'héspéridine observée après ingestion du jus d'orange et de boisson complétementée ($0,86$ et $0,77 \mu\text{mol/l}$ respectivement) et positivement et statistiquement corrélée avec le taux plasmatique de ce flavonoïde. Ainsi, l'effet vasculaire a été conféré au moins partiellement aux flavonoïdes. Cet effet n'est vraisemblablement pas lié à leurs propriétés antioxydantes en raison de leur forme chimique circulante, peu antioxydante. L'hypothèse sous-jacente serait que la présence des autres micronutriments antioxydants pourrait expliquer l'effet prononcé du jus d'orange. En effet, comparés à la boisson complétementée en polyphénols, les taux circulants de la vitamine C ($+5,4 \mu\text{mol/l}$) et du bCx ($+0,24 \mu\text{mol/l}$) ont été trouvés significativement plus élevés après consommation du jus d'orange ;

- l'effet de jus d'orange sur la production des EOR par les neutrophiles (PMNs) a été évalué sur trois groupes de volontaires sains ingérant un repas riche en lipides (51 g) et en glucides (81 g). Le repas administré avec de l'eau ou de glucose induit une augmentation de la production d'anion superoxyde des neutrophiles isolés de recueil sanguin à une, trois et cinq heures après le repas. Cette induction est significativement atténuée par l'apport de 750 ml (300 kcal) de jus d'orange. Les auteurs attribuent cet effet antioxydant postprandial aux flavanones contenues dans le jus d'orange. Dans une de leur étude précédente, ils ont montré un effet suppresseur des flavanones sur la production d'EOR des monocytes *in vitro*, sans effet de l'addition d'acide ascorbique ou de fructose. Cependant, la concentration testée sur les monocytes était de $50 \mu\text{mol/l}$, bien supérieure à la valeur atteinte avec 750 ml de jus d'orange administré aux volontaires. En effet, les études de biodisponibilité des flavanones d'orange montrent que le pic de concentration postprandial atteint une valeur de $1,3 \mu\text{mol/l}$ après ingestion d'un litre de jus [32]. Par ailleurs, la forme chimique circulante de la flavanone dans les études de biodisponibilité a été déterminée comme des conjugués de glucuronides (87 %) et de sulfoglucuronides (13 %). Or, la forme testée sur les monocytes consistait en des aglycones (héspéridine) totalement absents de la circulation après ingestion de jus d'orange. Il peut donc être suggéré que l'effet suppresseur *in vivo* des EOR par les monocytes pourrait résulter de la présence d'autres composés que la vitamine C, le fructose ou les flavanones et apportés par le jus d'orange. Un candidat potentiel pour un tel effet serait la bCx. Des expériences basées sur un apport alimentaire plus faible de caroténoïdes montrent un effet activateur de la poussée respiratoire des

neutrophiles mesurées *ex vivo* et *in vitro* [54]. Une autre étude réalisée sur un modèle de rat montre un effet immunostimulateur plus important par un apport de mélange de caroténoïde contenant de la bCx par rapport à celui enrichi uniquement en alpha- et bêta-carotène [14]. Ces observations ouvrent l'hypothèse d'un rôle éventuel de la bCx de l'orange dans la modulation des fonctions des cellules immunitaires dont la dépendance à la vitamine C est également connue ;

- une étude récente a été réalisée pour étudier l'impact antioxydant postprandial associé à l'apport d'agrumes versus vitamine C chez des volontaires de sexe féminin, saines et non fumeuses [19]. Dans ce travail, l'administration de 300 ml de jus d'orange rouge ou de vitamine C a été comparée à celle d'eau complétée avec une même concentration de vitamine C (150 mg), en prenant comme boisson témoin de l'eau additionnée de 38 g de sucre. Dans ces conditions, le pic de concentration en vitamine C a été trouvé similaire entre les groupes recevant le jus ($103 \pm 23 \mu\text{mol/l}$) et l'eau vitaminée ($106 \pm 16 \mu\text{mol/l}$), un pic différenciant significativement de la teneur plasmatique suite à l'ingestion de l'eau sucrée ($75 \pm 17 \mu\text{mol/l}$). L'effet antioxydant de l'apport de ces boissons a été évalué sur les monocytes circulants isolés du sang recueilli après trois et 24 heures postadministration. L'essai comète a été effectué sur les cellules avant et après incubation avec de l'eau oxygénée. Les résultats montrent que l'apport du jus d'orange augmente significativement la résistance de l'ADN à l'action de l'eau oxygénée dès trois heures et persiste après 24 heures. Cet effet n'est pas observé chez les sujets administrés avec de l'eau vitaminée, et aucune corrélation n'a été trouvée avec le taux plasmatique en vitamine C. Les auteurs posent l'hypothèse que les autres antioxydants, les flavanones et la bCx, pourraient contribuer à cette protection des cellules à l'agent pro-oxydant.

Dans l'ensemble, les résultats de ces études montrent qu'un composé isolé d'un aliment aussi complexe que l'orange montre toujours un effet biochimique ou fonctionnel limité. Des dessins expérimentaux mieux définis devraient être essayés pour mieux définir le rôle imputable à chacun des composés majeurs et spécifiques des agrumes et rechercher l'existence d'un effet additionnel ou synergique entre ces composés. Par ailleurs, l'apport des agrumes pourrait aussi affecter les enzymes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et interférer avec la pharmacocinétique des médicaments [43]. Un tel effet avéré devrait significativement moduler le métabolisme général et moduler les métabolites endogènes. Ainsi, pour mieux appréhender ces conséquences métaboliques, il semble nécessaire d'effectuer des études utilisant les approches à haut débit, comme la transcriptomique et la métabolomique, afin de rendre compte des effets différentiels entre un apport d'un composé unique et celui de la matrice le contenant. Une telle approche, réalisée avec la tomate et le lycopène, a pu estimer l'impact cellulaire des métabolites circulants dans l'expres-

sion des gènes des cellules de lignée prostatique (Talvas et al., 2010)². Sur la base des gènes sur- et sous-exprimés, l'interprétation donnée de ces résultats est que l'apport de tomates pourvues ou non en lycopène (tomates rouges et tomates jaunes respectivement) a un effet différentiel et moins délétère que l'apport de lycopène purifié.

Observations épidémiologiques

En l'absence de données expérimentales comparant l'effet différentiel des agrumes et de chacun des composés bioactifs sur des mêmes sujets, il est proposé d'analyser des observations épidémiologiques rapportant l'effet d'un apport d'agrumes et/ou des statuts plasmatiques ou d'excrétions urinaires de métabolites des bioactifs de ces fruits sur les impacts physiopathologiques. Pour illustrer cette approche, un exemple est de considérer l'impact physiologique du statut en vitamine C sur la pression sanguine. Considérant que les F&L sont les sources principales de la vitamine C, les études épidémiologiques sur la pression sanguine montrent qu'un apport élevé de F&L diminue la pression sanguine et donc susceptible de réduire les maladies cardiovasculaires dans la population générale [26]. Pour autant, plusieurs études, dont celle de Ness et al. [36], focalisent leur attention sur la vitamine C en montrant une association inverse entre le taux plasmatique en vitamine C et la pression sanguine, et ce, après ajustement avec le tabac, l'activité physique ou la prise d'alcool, et même après exclusion des sujets présentant une hypertension ou prenant des compléments alimentaires. Les auteurs concluent qu'un apport élevé de vitamine C alimentaire confère une protection contre l'augmentation de la pression sanguine. Mais, l'apport de F&L affecte aussi le statut en polyphénols. Des études épidémiologiques montrent ainsi que la pression sanguine est inversement associée à l'excrétion urinaire de polyphénols totaux (Medina-Remon et al., 2011)³. De même, un apport élevé en polyphénols totaux est associé aux maladies cardiovasculaires (Knekt et al., 2002)⁴. Dans l'ensemble, ces études montrent que le risque relatif des facteurs de risque cardiovasculaire est significativement diminué par les apports en antioxydants au travers des F&L. Mais ces études ne permettent pas d'estimer la contribution de chacun des antioxydants, vitamine C et polyphénols, pour évaluer des actions synergiques ou additionnelles de ces composés.

Une analyse centrée sur l'effet des agrumes décrit dans l'étude de Knekt et al. (2002) montre que le risque relatif déterminé à partir de la consommation des oranges ou de

² Talvas J, Caris-Veyrat C, Guy L, et al, Differential effects of lycopene consumed in tomato paste and lycopene in the form of a purified extract on target genes of cancer prostatic cells. *Am.J.Clin.Nutr.* 2010; 91:1716-1724.

³ Medina-Remón A, Zamora-Ros R, Rotchés-Ribalta M, et al., Total polyphenol excretion and blood pressure in subjects at high cardiovascular risk. *Nutr.Metab.Cardiovasc.Dis.* 2011; 21: 323-31.

⁴ Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R et al, Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am.J.Clin.Nutr.* 2002; 76:560-568.

pamplemousses est respectivement de 0,79 (IC : 0,64–0,98) et de 0,63 (IC : 0,57–0,99). Ces résultats laissent supposer que la consommation de pamplemousses a un meilleur impact sur le facteur de risque que la consommation d'oranges. Par contre, le risque relatif déterminé à partir des flavanones montre un résultat similaire de 0,80 (IC : 0,64–0,99) pour l'hespéridine et de 0,79 (IC : 0,64–0,98) pour la naringénine. Ces données montrent que les flavanones des pamplemousses et des oranges ont un impact similaire. Or, les pamplemousses contiennent peu d'hespéridine comparées aux oranges, et apportent plus de naringénine. Dans la population étudiée, les apports estimés sont de 3,5 mg/j de naringénine exclusivement apportée par les pamplemousses et de 10,6 mg/j d'hespéridine apportée majoritairement par les oranges. Ces résultats laissent supposer que la consommation de pamplemousses a un meilleur impact sur le facteur de risque alors que l'apport de la naringénine est limité par rapport à l'hespéridine apportée par l'orange. Cette étude ne donne pas de résultats sur les autres composés des agrumes étudiés. Ainsi, une analyse d'association avec la vitamine C et/ou la bCx aurait été intéressante pour mieux attribuer l'effet cardioprotecteur des agrumes et par une action synergique ou additionnelle des flavanones, de la vitamine ou de la bCx.

Ces trois composés ont été associés par des études indépendantes à d'autres facteurs de risque. Ainsi, pour les cytokines pro-inflammatoires, l'apport des flavanones [29] est décrit comme significativement et inversement corrélé soit à l'interleukine 18 et associé à la consommation d'orange (hespéridine) plutôt que les pamplemousses (naringénine), soit à la CRP et associé à l'apport des pamplemousses (naringénine) plutôt que les oranges (hespéridine). D'autres études décrivent des associations entre le statut plasmatique en caroténoïdes et les marqueurs d'inflammation. Ainsi, dans deux études indépendantes, un niveau de la CRP est trouvé inversement associé à la concentration plasmatique de la bCx mais pas à celle de lutéine + zéaxanthine, deux caroténoïdes trouvés dans les agrumes [55]. Enfin, l'effet anti-inflammatoire de la vitamine C a été décrit dans plusieurs études, notamment par des associations inverses avec le taux de la CRP [31,56] montrant en outre que l'apport des fruits, plutôt que des légumes, est significativement et inversement associé au niveau plasmatique de la CRP.

Une autre pathologie liée aux maladies cardiovasculaires et à l'inflammation fait l'objet de nombreuses recherches pour l'établissement d'une relation avec la nutrition. L'ostéoporose, longtemps associée au calcium et à la vitamine D, a été aussi observée comme retardée chez les individus ayant une consommation accrue en F&L [51]. Les études les plus récentes ont montré une association entre l'apport de flavanones et l'augmentation de la densité minérale osseuse des os de la hanche [57] et dans une autre étude, à une relation inverse avec la sécrétion urinaire de pyridinoline, un marqueur de résorption osseuse [20]. L'attention a été aussi portée sur les caroténoïdes principalement fournis par les F&L dans l'alimentation humaine. L'étude de Sugiura

et al. [45] montre que le statut plasmatique en bCx est inversement corrélé à la densité minérale du radius des femmes ménopausées. Ces études, bien qu'initiales sur la base de la protection osseuse résultant de l'apport des F&L, ne font pas référence à celles précédemment développées sur la relation entre l'ostéoporose et l'apport/statut en vitamine C, essentiel pour la synthèse du collagène, de l'hydroxyproline et d'hydroxylysine du tissu osseux. D'un suivi de la cohorte de Framingham, il est montré qu'un apport élevé en vitamine C alimentaire et sous forme de compléments confère un effet protecteur contre les fractures osseuses [42]. Ces auteurs notent cependant que les associations sont atténuées lorsqu'elles sont ajustées à l'apport du potassium alimentaire, un marqueur de consommation de F&L. Comme pour les études relatives à l'inflammation, l'apport ou le statut des composés antioxydants majeurs des agrumes sont chacun associés dans la protection contre l'ostéoporose.

Toutes ces observations indépendantes des effets des bioactifs antioxydants indiquent que les mécanismes d'action pourraient être différents selon la nature des produits végétaux considérés, les variétés des agrumes et les organes/fonctions cibles considérés. Concernant une action en solitaire ou matricielle, les données précédemment développées corroborent l'hypothèse d'une action à minima additionnelle des composés organiques bioactifs des agrumes. Une quantification de la part respective de chacun des bioactifs pourrait aussi être recherchée en recensant les études épidémiologiques portant sur l'apport quantitatif des agrumes ou le statut plasmatique des bioactifs des agrumes et établissant des corrélations avec des paramètres biochimiques. Pour les études futures, il peut être suggéré que les études observationnelles ciblées sur un bioactif des agrumes devraient ajuster les relations établies avec les autres composés décrits de plus en plus précisément dans les tables de composition.

Conclusion

L'intérêt porté par les agrumes sur leur effet protecteur contre les pathologies oxydatives a été initialement rapporté à leur contenu en vitamine C avant d'être étendu à d'autres composés organiques antioxydants comme la bCx et les flavanones. Les antioxydants des agrumes, en terme chimique, sont nombreux et se composent aussi de composés inorganiques. L'implication potentielle de ce pool d'antioxydants n'a pas été recherchée. Les données expérimentales sur les seuls composés organiques ne permettent pas de conclure quant à un impact d'un composé unique sur l'effet physiologique des agrumes par un effet pouvant résulter de leur propriété antioxydante ou par d'autres activités décrites pour ces composés. Les études contrôlées sur des impacts physiologiques et montrant un meilleur effet du jus d'orange comparé à une boisson apportant un taux équivalent en flavanone ou en vitamine C suggèrent une implication d'autres nutriments dans le contrôle de cette réactivité. Une analyse des études épidémiologiques corrobore cette observation

qu'un constituant unique de produits végétaux comme les agrumes ne peut expliquer l'effet complexe décrit pour plusieurs situations physiopathologiques. Des travaux sont encore nécessaires pour mieux attribuer la part éventuelle des divers composés organiques des agrumes pour comprendre l'impact physiologique d'un apport alimentaire d'agrumes. Outre des approches expérimentales sous forme de plan d'expériences sur des modèles animaux ou cellulaires, il peut aussi être suggéré d'ajuster au mieux les associations recherchées entre l'apport d'agrumes et les risques relatifs de pathologies avec l'apport ou le taux plasmatique des composés majeurs des agrumes et/ou de leurs métabolites. Il n'en reste pas moins que la consommation régulière des agrumes, comme les oranges ou les pamplemousses, est aussi associée à des conséquences bénéfiques sur un plan biochimique et physiologique récemment déterminé chez ces consommateurs [39].

Conflit d'intérêt :

les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Al-Delaimy WK, Slimani N, Ferrari P, et al. (2005) Plasma carotenoids as biomarkers of intake of fruits and vegetables: ecological level correlations in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Eur J Clin Nutr* 59: 1397–408
- Bachmann H, Desbarats A, Pattison P, et al. (2002) Feedback regulation of beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J Nutr* 132: 3616–22
- Bailey DM, Raman S, McEneny J, et al. (2006) Vitamin C prophylaxis promotes oxidative lipid damage during surgical ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 40: 591–600
- Bertram JS (1993) Cancer prevention by carotenoids: mechanistic studies in cultured cells. *Ann N Y Acad Sci* 691: 177–91
- Böhm F, Edge R, Truscott TG (2012) Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (IO₂) and free radicals: potential effects for human health. *Acta Biochem Pol* 59: 27–30
- Broekmans WMR, Klöpping-Ketelaars IAA, Schuurman CRWC, et al. (2000) Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *J Nutr* 130: 1578–83
- Brown MJ, Ferruzzi MG, Nguyen ML, et al. (2004) Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr* 80: 396–403
- Bruno RS, Leonard SW, Atkinson J, et al. (2006) Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med* 40: 689–97
- Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, [alpha]-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300: 535–43
- Bui MH, Sauty A, Collet F, Leuenerger P (1992) Dietary vitamin C intake and concentrations in the body fluids and cells of male smokers and non-smokers. *J Nutr* 122: 312–6
- Burri BJ, Chang JS, Neidlinger TR (2011) β -cryptoxanthin- and α -carotene-rich foods have greater apparent bioavailability than β -carotene-rich foods in Western diets. *Br J Nutr* 105: 212–9
- Dabbagh AJ, Trenam CW, Morris CJ, Blake DR (1993) Iron in joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 52: 67–73
- Dhuique-Mayer C, Borel P, Reboul E, et al. (2007) Beta-cryptoxanthin from citrus juices: assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Br J Nutr* 97: 883–90
- Ekam VS, Udosen EO, Chigbu AE (2006) Comparative effect of carotenoid complex from Golden Neo-Life Dynamite (GNLD) and carrot extracted carotenoids on immune parameters in albino Wistar rats. *Niger J Physiol Sci* 21: 1–4
- Franke AA, Cooney RV, Henning SM, Custer LJ (2005) Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem* 53: 5170–8
- Frei B, England L, Ames BN (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6377–81
- Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, et al. (2010) Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr* 91: 940–9
- Gruszecki WI, Strzałka K (2005) Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta* 1740: 108–15
- Guamieri S, Riso P, Porrini M (2007) Orange juice vs vitamin C: effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells. *Br J Nutr* 97: 639–43
- Hardcastle AC, Aucott L, Reid DM, Macdonald HM (2011) Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. *J Bone Miner Res* 26: 941–7
- Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, et al. (2001) Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro* 15: 3–6
- Hendrickson SJ, Willett WC, Rosner BA, Eliassen AH (2013) Food predictors of plasma carotenoids. *Nutrients* 5: 4051–66
- Hollman PC, Cassidy A, Comte B, et al. (2011) The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr* 141: 989S–1009S
- Huang Z, Fang F, Wang J, Wong CW (2011) Structural activity relationship of flavonoids with estrogen-related receptor gamma. *Febs Lett* 584: 22–6
- Iribarren C, Folsom AR, Jacobs DR Jr, et al. (1997) Association of serum vitamin levels, LDL susceptibility to oxidation, and autoantibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis. A case-control study. The ARIC Study Investigators. *Atherosclerosis Risk in Communities Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 17: 1171–7
- John JH, Ziebland S, Yudkin P, et al. (2002) Effect of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. *Lancet* 359: 1969–74
- Johnston CS, Dancho CL, Strong GM (2003) Orange juice ingestion and supplemental vitamin C are equally effective at reducing plasma lipid peroxidation in healthy adult women. *J Am Coll Nutr* 22: 519–23
- Koh WP, Yuan JM, Wang R, et al. (2011) Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese Health Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21: 685–90
- Landberg R, Sun Q, Rimm EB, et al. (2011) Selected dietary flavonoids are associated with markers of inflammation and endothelial dysfunction in US women. *J Nutr* 141: 618–25
- Lietz G, Lange J, Rimbach G (2010) Molecular and dietary regulation of beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1). *Arch Biochem Biophys* 502: 8–16
- Mah E, Matos MD, Kawiecki D, et al. (2011) Vitamin C status is related to proinflammatory responses and impaired vascular endothelial function in healthy, college-aged lean and obese men. *J Am Diet Assoc* 111: 737–43
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, et al. (2003) Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and naringin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr* 57: 235–42
- McNulty H, Jacob RF, Mason RP (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am J Cardiol* 101: 20D–9D

34. Morand C, Dubray C, Milenkovic D, et al. (2011) Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomised crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 93: 73–80
35. Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20: 33–43
36. Ness AR, Khaw KT, Bingham S, Day NE (1996) Vitamin C status and blood pressure. *J Hypertens* 14: 503–8
37. Niki E, Noguchi N (1997) Protection of human low-density lipoprotein from oxidative modification by vitamin C. In: Packer L, Fuchs J (eds) *Vitamin C in health and disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 183–92
38. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, et al. (1994) Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* 269: 13685–8
39. O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL (2012) 100 % orange juice consumption is associated with better diet, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003–2006. *Nutr J* 11: 107
40. Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20: 933–56
41. Rowley K, Walker KZ, Cohen J, et al. (2003) Inflammation and vascular endothelial activation in an Aboriginal population: relationships to coronary disease risk factors and nutritional markers. *Med J Aust* 178: 495–500
42. Sahni S, Hannan MT, Gagnon D, et al. (2009) Protective effect of total and supplemental vitamin C intake on the risk of hip fracture. A 17-year follow-up from the Framingham Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 20: 1853–61
43. Saito M, Hirat-Koizumi M, Matsumoto M, et al. (2005) Undesirable effects of citrus juice on the pharmacokinetics of drugs: focus on recent studies. *Drug Saf* 28: 677–94
44. Sánchez-Moreno C, Cano PM, de Ancos B, et al. (2003) Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr* 78: 454–60
45. Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, et al. (2012) High serum carotenoids associated with lower risk for bone loss and osteoporosis in postmenopausal Japanese female subjects: prospective cohort study. *Plos One* 7: e52643
46. Suh J, Zhu BZ, Frei B (2003) Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 34: 1306–14
47. Suzuki K, Ishii J, Kitagawa F, et al. (2013) Association of serum carotenoid levels with N-terminal pro-brain-type natriuretic peptide: a cross-sectional study in Japan. *J Epidemiol* 2: 163–8
48. Takaishi N, Satsu H, Takayanagi K, et al. (2012) In vivo and in vitro studies on the absorption characteristics of b-cryptoxanthin in the intestine. *Biosc Biotechnol Biochem* 76: 2124–8
49. Tournaire C, Croux S, Maurette MT, et al. (1993) Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen (1 delta g) quenching. *J Photochem Photobiol B* 19: 205–15
50. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, et al. (2010) Molecular mechanism of hesperetin-7-O-glucuronide, the main circulating metabolite of hesperidin, involved in osteoblast differentiation. *J Agric Food Chem* 58: 668–75
51. Tucker KL, Hannan MT, Chen H, et al. (1999) Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 69: 727–36
52. Turner T, Burri BJ, Jamil KM, Jamil M (2013) The effects of daily consumption of β -cryptoxanthin-rich tangerines and β -carotene-rich sweet potatoes on vitamin A and carotenoid concentrations in plasma and breast milk of Bangladeshi women with low vitamin A status in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 98: 1200–8
53. Vinson JA, Bose P (1988) Comparative bioavailability to humans of ascorbic acid alone or in a citrus extract. *Am J Clin Nutr* 48: 601–4
54. Walrand S, Farges MC, Dehaese O, et al. (2005) In vivo and in vitro evidences that carotenoids could modulate the neutrophil respiratory burst during dietary manipulation. *Eur J Nutr* 44: 114–20
55. Wang L, Gaziano JM, Norkus EP, et al. (2008) Associations of plasma carotenoids with risk factors and biomarkers related to cardiovascular disease in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr* 88: 747–54
56. Wannamethee SG, Lowe GD, Rumley A, et al. (2006) Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes, and markers of inflammation and hemostasis. *Am J Clin Nutr* 83: 567–74
57. Welch A, Mac Gregor A, Jennings A, et al. (2012) Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *J Bone Mineral Res* 27: 1872–8