

# Mémoire de fin de cycle

**Filière:** Science Biologique

**Option:** Génétique Appliquée

**Thème**

## L'expression des caroténoïdes et des anthocyanes dans l'orange sanguine

Présenté par : M<sup>elle</sup> ATTOUMI Lilia et M<sup>elle</sup> HADIOUCHE Thafath



Soutenu le : **14-06-2016**

### Membres de jury

M <sup>r</sup> GHIDOUCHE A.	Maitre de conférences B, A.Mira, Béjaïa	Président
M <sup>r</sup> MADANI K.	Professeur, A. Mira, Bejaïa	Promoteur
M <sup>elle</sup> AIT ALI D.	Maitre de conférences B, A. Mira, Bejaïa	Examinatrice

Année Universitaire : **2015/2016**

**Remerciements**

**Dédicaces**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Introduction** ..... 1

**Chapitre I : Revue bibliographique**

Partie 1. L'Orange sanguine ; description, variétés, composition et importance

I.1-L'orange (*Citrus sinensis*)..... 3

I.1.1-Définition et structure..... 3

I.1.1.1-Définition..... 3

I.1.1.2-Structure..... 3

I.1.2-Les espèces et les principales variétés..... 4

I.1.3-Intérêts..... 5

I.1.4-Les anthocyanes et caroténoïdes des oranges..... 6

I.1.4.1-Les anthocyanes..... 6

I.1.4.2-Structure des anthocyanes..... 6

I.1.4.3-Principales sources des anthocyanes..... 8

I.1.4.4-Localisation et transport des anthocyanes..... 9

I.1.4.5-Intérêt nutritionnel et thérapeutique des anthocyanes..... 9

I.1.5-Caroténoïdes ..... 9

I.1.5.1-Définition..... 9

# Sommaire

---

I.1.5.2-Classification.....	10
1.1.5.3-structure.....	10
I.1.5.4-source.....	12
Partie 2 : Anthocyanes de l'orange sanguine : biosynthèse, expression des gènes et régulation transcriptionnelle	
2.1-Biosynthèse des anthocyanes dans l'orange sanguine.....	14
2.2-La régulation transcriptionnelle intervenant dans la biosynthèse des anthocyanes dans l'orange sanguine.....	17
2.2.1-Les facteurs de transcription dans la synthèse des anthocyanes.....	17
2.2.2-L'expression du gène Ruby dans les oranges sanguines et communes.....	20
2.3-L'influence de quelques facteurs sur l'expression des gènes de la biosynthèse des anthocyanes dans l'orange sanguine.....	22
2.3.1-Le stade de maturation .....	22
2.3.2-L'expression des gènes de structure et de régulation en fonction de type de la variété d'orange sanguine.....	24
2.3.3-L'effet de la baisse température sur l'expression des gènes dans l'orange sanguine.....	26
Partie 3 : Caroténoïdes de l'orange sanguine : biosynthèse, expression des gènes et la régulation transcriptionnelle	
3.1-Biosynthèse des caroténoïdes et régulation des gènes.....	28
3.1.1-Biosynthèse des caroténoïdes dans les oranges.....	28
3.1.2-La régulation et expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes .....	30
3.1.2.1-Effet de la variété.....	30

3.1.2.2-Effet de la température.....	31
--------------------------------------	----

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II.1-Matériel végétal.....	35
----------------------------	----

II .2-Protocole expérimental.....	35
-----------------------------------	----

II .2.1-Préparation de l'échantillon.....	35
---	----

II.2.2-Analyses physico-chimiques du jus d'orange .....	36
---	----

II.2.2.1-Mesure de PH .....	36
-----------------------------	----

II.2.2.2- L'activité de l'eau.....	36
------------------------------------	----

II.2.2.3-Détermination du degré de Brix .....	36
---	----

II.2.2.4-Détermination de l'acidité titrable .....	36
--	----

II.2.2.5-Test d'humidité .....	37
--------------------------------	----

II .3.2-Analyses des composés phénoliques .....	37
---	----

II. 3.2.1-Dosage des polyphénols totaux .....	37
---	----

II. 3.2.2-Dosage des flavonoïdes .....	38
--	----

II. 3.2.3-Dosage des anthocyanes .....	38
--	----

II.3.2.4-Dosage des caroténoïdes .....	34
--	----

II.2.4-Evaluation de l'activité antioxydante .....	40
--	----

II.2.4.1-Pourcentage d'inhibition du DPPH .....	40
---	----

II.2.4.2-Pouvoir réducteur .....	41
----------------------------------	----

## **Chapitre III : Résultats et discussions**

III.1-Caractéristique physico-chimique du jus d'orange sanguine.....	43
--	----

# Sommaire

---

III.2 La caractérisation phytochimique du jus d'orange sanguine.....	44
III.2.1-Les Polyphénols .....	44
III.2.2-Les flavonoïdes .....	44
III.2.3-Les anthocyanes .....	45
III.2.4-Les caroténoïdes.....	45
III.3-Evaluation de l'activité antioxydante .....	45
III.3.1-Pourcentage d'inhibition du DPPH .....	45
III.3.2-Pouvoir réducteur .....	47
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	51

**Annexe A** : Courbe d'étalonnages.



# Remerciement

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons tout d'abord à remercier le « bon dieu » le tout puissant de nous avoir accordé le courage, la patience et surtout la santé pour réaliser ce travail.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à Mr MADANI pour avoir accepté de nous encadrer, pour son aide et ses conseils. Nos remerciements vont également à M<sup>me</sup> HADDACHE pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Nos vifs remerciements à Mr DAIRI pour son aide précieuse, pour avoir veillé sur le bon déroulement de notre travail.*

*Nous tenons également à présenter notre gratitude à Mr GHIDOUCHE de nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Ainsi qu'à M<sup>elle</sup> AIT ALI d'avoir accepté d'évaluer notre travail.*

*Nos remerciements vont également aux personnels du laboratoire pour leur accueil, disponibilité et gentillesse.*

*Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

# *Dédicaces*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour  
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes  
moments les plus difficiles, à mes chers parents que  
dieu les protégé et les garde en bonne santé.*

*A mon cher frère mouhand*

*A mes soeurs Lydia et Amel*

*A mon très cher fiancé messaoud et sa famille*

*Toutes mes amies: Salima Souad Lynda Soraya et*

*Manel*

*A ceux que j'aime de tout mon cœur*

*Thafath*

# *Dédicaces*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour  
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les  
plus difficiles*

*Et ceux à qui je dois tant*

*A mes parents pour leur amour et leur support continu*

*A mes sœurs : Leila, Dalila, Nabila, Halima et mes frères ;*

*Mohand, Ali, Kaci, Dalil, Sofiane, Larbi, Cherif, Lounis*

*A mon petit frère Badis auxquels je souhaite une très bonne*

*Continuité dans leurs études*

*A ceux qui m'ont soutenu de loin ou de près*

*A mes amis ; Mohamed , Sassa , Sabrina, Lila, Salima, Zahra*

*A ma binôme Thafath et toute sa famille ;*

*A toute la promotion Génétique Appliquée : 2015/2016.*

*Lilia*



# *INTRODUCTION*

*CHAPITRE I*  
*REVUE BIBLIOGRAPHIQUE*

*CHAPITRE II*  
*MATERIELS ET METHODES*

*CHAPITRE III*  
*RESULTATS ET DISCUSSION*

## *CONCLUSION*

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

# *ANNEXES*

## *LISTE DES ABRÉVIATIONS*

---

**AlCl<sub>3</sub>** : trichlorure d'aluminium.

**EAG** : Equivalent Acide Gallique.

**EβC** : Equivalent β Carotène.

**EQ** : Equivalent Quercétine.

**g** : gramme.

**IC50** : Concentration Inhibitrice à 50%.

**M** : masse.

**mg** : milligramme.

**ml** : millilitre.

**min** : minute.

**NaOH** : Hydroxyde de sodium.

**NF** : Norme Française.

**OH** : Radical hydroxyle.

**P<sub>sc</sub>** : pourcentage scavenger.

**RE** : Réticulum Endoplasmique.

**µg** : microgramme.

**µl** : microlitre.

## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre de la figure</b>	<b>page</b>
<b>1</b>	Les caractéristiques morphologiques d'une orange	<b>4</b>
<b>2</b>	La structure de base des anthocyanes	<b>6</b>
<b>3</b>	Les principales anthocyanidines naturelles	<b>7</b>
<b>4</b>	Anthocyanes de l'orange sanguine	<b>8</b>
<b>5</b>	La structure de l'isoprène	<b>11</b>
<b>6</b>	Structures chimiques de quelques caroténoïdes	<b>11</b>
<b>7</b>	contenu en caroténoïdes dans les sacs a jus de quatre variétés d'orange	<b>13</b>
<b>8</b>	Schéma général de la voie de biosynthèse des anthocyanes	<b>15</b>
<b>9</b>	La régulation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes.	<b>18</b>
<b>10</b>	Description de la coopération des facteurs de transcription impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes	<b>19</b>
<b>11</b>	L'analyse de l'expression du Ruby	<b>21</b>
<b>12</b>	Le profil d'expression des gènes différentiels pendant la maturation de l'orange sanguine 'Moro'	<b>22</b>
<b>13</b>	La détection par RP-PCR en temps réel des gènes biosynthétiques et la teneur en anthocyanes totaux dans la pulpe de l'orange 'Moro' pendant la maturation	<b>23</b>
<b>14</b>	Analyse différentielle de l'expression des gènes entre l'orange sanguine et blonde. 1, 2, 3, et 4 Double fine, Tarocco, orange navel, et Caracara orange navel, respectivement	<b>25</b>
<b>15</b>	Expression du facteur de transcription Ruby et la production d'anthocyanes dans l'orange sanguine et l'orange blonde en réponse à un stockage à froid	<b>26</b>
<b>16</b>	Le profil d'expression des gènes de régulation et de structure pendant le stockage à froid. 1, 2, 3,4 et 5 représente l'orange Tarocco sous stockage à froid pendant 0, 28, 42, 56 et 70 jours respectivement.	<b>27</b>
<b>17</b>	La voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les chromoplastes des fruits.	<b>29</b>
<b>18</b>	Analyse northern-blot d'expression des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes dans les sacs de jus de trois variétés de Citrus	<b>30</b>
<b>19</b>	L'apparence externe et interne des oranges 'Navelina' pendant stockage à 2°C et 12 °C pendant 7 semaines.	<b>31</b>
<b>20</b>	Analyse quantitative par RT-PCR de l'expression des genes PSY, ZDS,β-LCY1, β-LYC2 et β-CHX dans la peau	<b>33</b>
<b>21</b>	Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant (AH) et le radical DPPH.	<b>41</b>
<b>22</b>	Le pouvoir antioxydant du jus d'orange sanguine vis-à-vis du radical DPPH.	<b>45</b>
<b>23</b>	l'activité antiradicalaire du jus, α-tocophérol et BHA.	<b>46</b>
<b>24</b>	pouvoir réducteur du jus d'orange sanguine.	<b>47</b>



## *LISTE DES TABLEAUX*

Tableau	Titre du tableau	Page
<b>I</b>	Principales variétés d'oranges de l'espèce <i>Citrus Sinensis</i>	<b>5</b>
<b>II</b>	Exemples d'anthocyanes	<b>7</b>
<b>III</b>	La teneur en anthocyanes de quelques fruits et légumes	<b>8</b>
<b>IV</b>	Sources principales de quelques caroténoïdes	<b>12</b>
<b>V</b>	Le coefficient de corrélation Pearson entre les gènes de la chalcone synthase (CHS), l'anthocyanidine synthase (ANS) et UDP-glucose-flavonoïde 3-O-glucosyltransférase (UFGT) avec la teneur en anthocyanes dans l'orange Moro	<b>24</b>
<b>VI</b>	La composition physicochimique du jus d'orange sanguine	<b>42</b>
<b>VII</b>	La composition du jus d'orange sanguine en polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes et caroténoïdes	<b>43</b>

L'importance des fruits et des légumes en matière de nutrition, de santé et d'économie n'est plus à démontrer. Ce sont eux qui transportent le mieux les vitamines, les minéraux essentiels, les fibres alimentaires et les antioxydants. Pour cela, les fruits et les légumes jouent donc un rôle important dans notre alimentation quotidienne (**FAO, 2000**).

Actuellement les fruits et les légumes occupent une place prépondérante dans le secteur agroalimentaire. En effet, l'approvisionnement de ce dernier en matière agricole destinés à l'agro-industrie a incité les industriels à investir dans la transformation des fruits et légumes en boissons et eaux fruités. Le jus de fruit est un aliment contenant des éléments nutritifs essentiels à notre santé. Outre ses bienfaits réhydratant, il couvre de nombreux besoins de l'organisme et présente des qualités communes même si chaque jus de fruits a ses avantages nutritionnels spécifiques (**Vierling, 2008**). Ce dernier contient des antioxydants qui sont des substances qui peuvent retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (**Boyd et al., 2003**).

Dans la famille des agrumes, approximativement 52% de la production d'orange est destiné pour l'extraction de jus (FAO, 2003). Parmi les variétés d'orange, l'orange sanguine est la variété la plus consommée dans la région méditerranéenne. Sa couleur rouge est principalement associée aux pigments d'anthocyanes. A cela s'ajoute, les caroténoïdes qui contribuent aussi à la couleur de l'orange mais elle est masquée par la présence des anthocyanes. Ces caroténoïdes sont responsables de la couleur jaune, orange et rouge des fruites et des légumes (**Rao et al., 2007**).

Les jus d'oranges sanguines possèdent une flaveur unique et sont considéré comme les plus délicieux des jus d'agrumes, et cela est un facteur important affectant l'attraction des consommateurs et aussi la valeur marchande du produit. La quantité et la composition des anthocyanes présents dans l'orange pigmentée varient considérablement en fonction de variété, la maturité, région de culture, et beaucoup d'autres facteurs environnementale (**Rapisarda et al., 2001 ; Crifò et al., 2011**). En effet, la plupart des variétés d'oranges sanguines exigent une large gamme de température, jour et nuit, pour maximiser la formation de la couleur (**Butteli et al., 2012**). Par conséquent, la production d'oranges rouges caractérisé par des niveaux élevés d'anthocyanine est limitée à quelques région tels que le Brésil et la Floride, et en particulier à la région sicilienne, où les conditions climatiques donnent des fruits de couleur unique d'intensité et de qualité.

Les voies de biosynthèses des anthocyanes sont très étudié dans différentes espèces à savoir le maïs , le mufler et opuntia.(**Lo piro, 2006**) et leurs gènes de biosynthèses est largement régulé au niveau transcriptionnel (**Quattrocchio et al., 1993**).Ces études, ont montré que ces pigments sont synthétisés quand deux types de gènes sont exprimés : gènes structuraux qui codent pour les enzymes de métabolisme, et gènes de régulations qui codent pour les facteurs de transcription (**Licciardello et al., 2008**). En effet, il a trouvé que la production d'anthocyanes est régulé par un complexe MYB-bHLH WD40 (MBW) et qui a été largement trouvé dans la pomme (**An et al., 2012**), fraise (**Schaart et al., 2013**), la pêche (**Rahim et al., 2014**), et chez *Arabidopsis thaliana* (**Li, 2014**). La question qui reste posée c'est de savoir est ce que ce même complexe est impliqué dans la biosynthèse des anthocyanes dans l'orange sanguine et cela serait utile pour la compréhension du mécanisme de pigmentation des anthocyanes dans ce fruit.

Concernant la biosynthèse des caroténoïdes, différentes études ont identifiées les gènes responsables et les facteurs influençant leurs accumulations dans différentes espèces (**Fanciullino et al., 2008**). Néanmoins, il y a peu d'étude sur la production des caroténoïdes dans l'orange sanguine.

Notre travail porte sur l'expression des anthocyanes et des caroténoïdes dans l'orange sanguine. Pour cela ce travail est subdivisé en deux parties :

- Partie 1 : cette partie consiste à faire une analyse de la bibliographie pour dresser un état de l'art sur la biosynthèse des anthocyanes et les caroténoïdes ainsi que leurs régulation dans l'orange sanguine. De plus, la détermination des différents facteurs qui affectent la production de ces différents pigments dans ce fruit ;

- Partie 2 : cette partie consiste à caractériser les paramètres physicochimiques (pH, acidité titrable, brix etc.) et les paramètres phytochimiques (polyphénols totaux, flavonoïdes) de l'orange sanguine. L'activité antioxydante du jus d'orange sanguine a été aussi réalisé en utilisant le test DPPH et le pouvoir réducteur.

## Partie 1. L'Orange sanguine ; description, variétés, composition et importance

### I.1-L'orange (*Citrus sinensis*)

#### I.1.1-Définition et structure

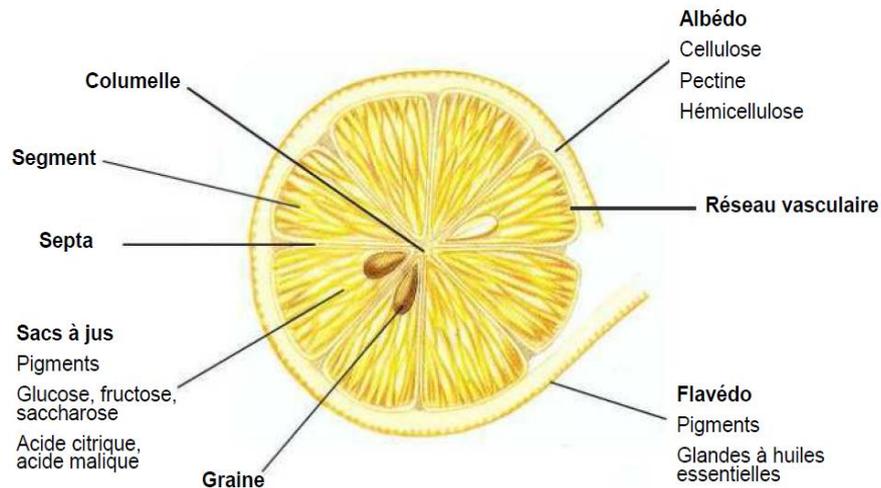
##### I.1.1.1-Définition

L'orange est un agrume qui peut aussi être appelé hesperidium. L'hesperidium diffère des autres fruits comme la tomate ou le raisin car il possède une peau dure et solide qui protège la partie comestible du fruit (Davies et Albrigo, 1994 ; Berlinet et al., 2006). Les orangers dépassent rarement 9 m de haut. Les feuilles sont persistantes, ovales et luisantes et les fleurs sont blanches et parfumées.

##### I.1.1.2-Structure

La structure d'une orange est présentée dans la (Figure 1). Les parties caractéristiques communes aux agrumes sont les suivantes :

- Une *couche extérieure colorée*, le flavedo, rappelant le mot « flaveur » car elle contient les glandes à huiles essentielles,
- Une *couche intérieure blanche* et spongieuse, l'albédo (ou mésocarpe), riche en pectines,
- Une *partie comestible*, l'endocarpe ou épiderme interne. Dans le cas des oranges, les cellules très juteuses formant des sacs à jus ou encore vésicules à jus sont des poils produits par l'endocarpe. Les segments (ou quartiers) qui comprennent de nombreuses vésicules sont séparés par des parois carpellaires ou membranes constituées de cellulose, pectine et hémicelluloses. Les segments sont attachés à la partie centrale du fruit appelée columelle (placenta) (Berlinet et al., 2006).



**Figure 1** : Les caractéristiques morphologiques d'une orange (**Hendrix et al ., 1995**).

### I.1.2-Les espèces et les principales variétés

L'orange fait partie du genre *Citrus* de la famille des Rutacées. Le genre *Citrus* contient deux Espèces d'orange :

- La première, *Citrus aurantium* (L) correspond aux oranges amères. Ces dernières sont également appelées bigarades ;
- la deuxième, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, correspond aux oranges douces (**Berlinet, 2006**). Cette dernière catégorie de l'orange douce est représentée par différentes variétés (navels, blondes, sanguines et douceâtres). (**Tableau I**).

**Les oranges navels**, caractérisées par une excroissance « ombilic » ou « navel » en anglais dans leur partie inférieure et une quasi absence de pépins. Ces oranges sont les plus consommées en fruits de bouche. Elles sont moins juteuses que la plupart des autres variétés et elles développent une certaine amertume lors du pressage ce qui peut les rendre impropres à une production de jus (**Saunt ,1990**)

**Les oranges blondes** dont la principale variété est la Valencia, première variété commerciale de tous les types d'agrumes. Celle-ci peut être rencontrée dans toutes les zones principales de production d'oranges Elles développent beaucoup moins d'amertume que les oranges navels lors de leur pressage. Elles sont donc principalement transformées en jus (**Kimball, 1999**).

**Les oranges sanguines** sont caractérisées par leur chair colorée due à des pigments rouges, des anthocyanes. Ceux-ci sont sensibles aux techniques d'extraction des jus et au stockage du jus, et leur dégradation peut donner une couleur brune indésirable au produit encore appelées

oranges douceâtres (Davies et Albrigo, 1994). Les deux principales variétés sont la variété Moro (Portugaise) et la variété Sanguinilli. La variété Moro est la plus colorée de toutes les oranges sanguines, et dont l'écorce ainsi que le jus sont d'une couleur rouge vif. La Sanguinelli est de petite à moyen taille, ayant une peau mince avec peu ou pas de pépins (kelebek *et al.* , 2008 ).

Tableau I : Principales variétés d'oranges de l'espèce *Citrus Sinensis* (L.) Osbeck

(Saunt, 1990)

catégorie	Variété	Lieu de production	Utilisation principale
Navel	Bahianinha	Brésil	Fruits de bouche
	Navelate	Espagne, Maroc, Afrique du Sud	
	Naveline	Espagne, Portugal, Maroc	
Blondes	Washington ou Bahia	Bresil, Californie, Mexique, Floride, Région Méditerranéenne	Jus
	Valencia	Espagne, Argentine, Australie, Californie, Floride, Maroc, Afrique de Sud, Uruguay, Brésil, Israel	
	Pera	Brésil	
	Pineapple	Floride, Argentine, Brésil, Mexique, Inde	
	Hamlin	Brésil, Floride, Maroc, Turquie, Chine	
Sanguines	Shamouti	Israël, Turquie, Afrique de Sud, Egypte, Chine, Inde	Fruits de bouche
	Maltaise	Tunisie, Maroc	Fruits de bouche
	Moro	Italie, Sicile	Jus
	Sanguinelli	Espagne	Fruits de bouche
Douceâtres	Succari	Egypte	Fruits de bouche
	Lima	Brésil	

### I.1.3-Intérêts

Le jus d'orange constitue une source diététique importante de composés bioactifs. Il contient des caroténoïdes : provitamine A ( $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -cryptoxanthine), aussi bien que d'autres caroténoïdes antioxydants (zéaxanthine et lutéine). Ces caroténoïdes ont été impliqués dans la réduction des maladies dégénératives (cardiovasculaires et cérébro-vasculaires). Il est également caractérisé par une teneur élevée d'acide ascorbique (vitamine C ; antioxydant naturel pouvant empêcher le développement des conditions d'oxydation chez l'homme (Sánchez-Moreno et al., 2003).

### I.1.4-Les anthocyanes et caroténoïdes des oranges

#### I.1.4.1-Les anthocyanes

Le terme anthocyane dérive des mots grecs anthos (fleur) et cyanus (bleu sombre). Il définit des substances pigmentaires naturel des feuilles des pétales et des fruits et qui sont responsables des colorations oranges, roses, rouges, violettes et bleus brillantes des feuilles et des fruits de nombreuses plantes (Valls Millan, Marti et al., 2009). Les anthocyanes sont considérés comme des colorants alimentaires naturels non toxique et ça depuis l'époque romaine (Castaneda ovando et al., 2009 ; Hubbermann et al., 2010) et elles possèdent cependant un rôle majeur dans la pollinisation des fleurs par l'attraction des espèces et impliquées dans la lutte antistress physico-chimique (Bruneton, 1999 ; Kong et al., 2003 ; Cavalcanti et al 2010; Shipp et al., 2010).

#### I.1.4.2-Structure des anthocyanes

Les anthocyanes appartiennent au groupe des flavonoïdes qui sont caractérisés par une structure en C6-C3-C6. Les anthocyanes ont une structure de base commune, le cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium (Figure 2). L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine.

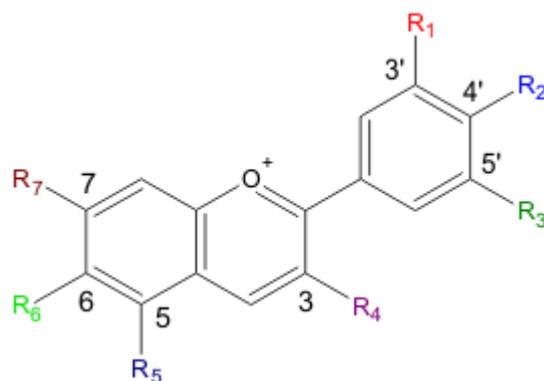


Figure 2 : La structure de base des anthocyanes.

Les anthocyanidines sont le plus souvent glycosylées en position 3 et 5 avec le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents. Ceci augmente leur solubilité et leur stabilité (Brouillard, 1993). La principale caractéristique des anthocyanes est leur diversité de couleur allant du bleu, au rouge, mauve, rose et orange (Tanaka *et al.*, 2008). Leur coloration est très tributaire de l'acidité du milieu, elle est rouge en milieu acide et bleu en milieu neutre ou alcalin (yahlaoui, 2012).

Les principales anthocyanidines rencontrées dans la nature sont illustrées dans la figure 2. Leur différence principale est le nombre et la position des groupements hydroxyles (OH) dans leur structure de base (Tableau II).

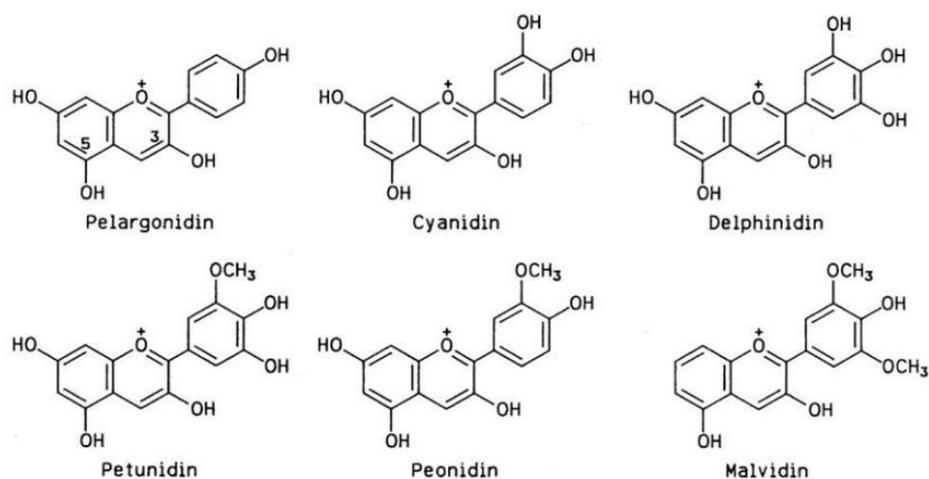
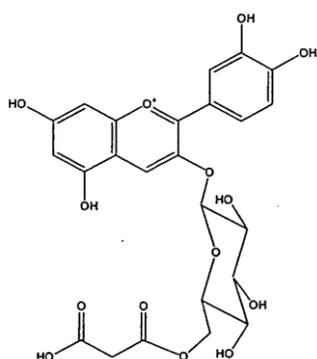


Figure 3 : Les principales anthocyanidines naturelles (Valls *et al* 2009).

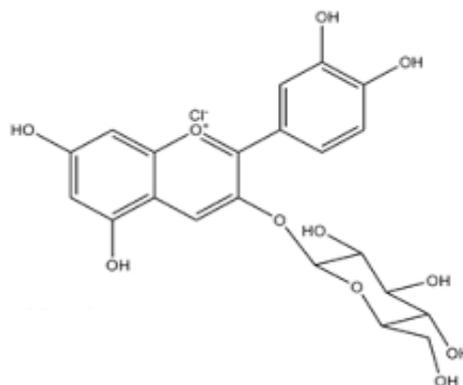
Tableau II : Exemples d'anthocyanes (D'après Kong *et al.*, 2003).

nom	Abréviation	Radicaux présents aux positions						Couleur (milieu naturel)
		3	5	7	3'	4'	5'	
Cyanidine	Cy	OH	OH	OH	OH	OH	H	Orange/rouge
Delphinidine	Dp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Bleu
Malvidine	Mv	OH	OH	OH	OMe	OH	OMe	Mauve
Pélagonidine	Pg	OH	OH	OH	H	OH	H	Orange
Péonidine	Pn	OH	OH	OH	OMe	OH	H	Orange/rouge
Petunidine	Pt	OH	OH	OH	OME	OH	OH	Mauve

Dans les oranges sanguines, les anthocyanidines les plus abondantes sont la cyanidine 3-glucoside qui représente environ 97% des anthocyanes majoritaires (Maccarone *et al.*, 1983).



Cyanidine3-(6-malonyl) glucoside



Cyanidine 3 glucoside

Figure 4 : Anthocyanes de l'orange sanguine

### I.1.4.3-Principales sources des anthocyanes

Les anthocyanes sont présents dans des fleurs et des fruits de nombreuses plantes, en abondance dans les fruits et les baies et en moindre quantité dans les autres parties de plantes (tige, feuille, racine, bois) (Berlinet, 2006).

Tableau III : La teneur en anthocyanes de quelques fruits et légumes (Willig, 2009).

Fruits et Légumes	Concentration en anthocyanines
-------------------	--------------------------------

	(mg/100 g)
<b>Pomme</b>	<b>1-17</b>
<b>Mure</b>	<b>145-607</b>
<b>Raisin</b>	<b>27-120</b>
<b>Fraise</b>	<b>13-55</b>
<b>Oignon rouge</b>	<b>~ 49</b>
<b>Carotte violette</b>	<b>38-98</b>
<b>Radis</b>	<b>11-60</b>
<b>Mais</b>	<b>~1640</b>
<b>Chou</b>	<b>~ 322</b>

#### I.1.4.4-Localisation et transport des anthocyanes

Les anthocyanes sont des composées phénoliques qui s'accumulent dans des cellules les plus externe (épidermes et hypodermes) (**Oren-Shamir, 2009**), sous forme de structures pigmentées, nommées incorrectement anthocyanoplastes puisqu'il s'agit d'inclusions et non de structures dans le cytoplasme (**Samouelian et al., 2008**). Les flavonoïdes sont essentiellement synthétisés dans le cytosol, à la surface du RE, puis séquestrés dans la vacuole ou sécrétés dans la paroi cellulaire. Cette compartimentation contribue à les stabiliser et/ou à empêcher leur oxydation, ce qui préserve leur activité biologique. Elle permet en outre de réduire la réactivité et la toxicité que présentent les formes aglycones des flavonoïdes. Au moins deux modèles ont été proposés quant au transport des flavonoïdes, le premier impliquant l'intervention de protéines de transport comme les GST, le second impliquant la formation de vésicules dérivées du RE (**Kitamura, 2006**).

#### I.1.4.5-Intérêt nutritionnel et thérapeutique des anthocyanes

Les anthocyanes sont largement reconnus pour leur activité antioxydante, activité proportionnelle au nombre d'hydroxyles libres. Pour certains végétaux, cette activité se montre supérieure à celle de la vitamine E. Elle explique en grande partie le pouvoir chimio-protecteur attribué, de manière particulière, aux anthocyanes (**Macheix et al., 2005**). Les

anthocyanes ont également manifesté des effets protecteurs sur les lésions gastriques, effets étroitement liée à leur capacité de prévenir les ou d'atténuer les processus inflammatoires (Shipp et Abdel-Aal, 2010). Différents travaux scientifiques ont démontrées que des polyphénols peuvent prévenir les maladies vasculaires, asthme, allergie, cancers, diabète, cataracte, polyarthrite rhumatoïdes etc (Roy et al., 2009). Les résultats d'une étude portant sur l'impact de la consommation de jus fruits et de légumes (forte concentration de polyphénols), sur la diminution du risque de maladie d'Alzheimer, montre qu'il y'aurait au moins un effet retardateur sur l'apparition de la maladie (Joseph et al., 2009).

### I.1.5-Caroténoïdes

#### I.1.5.1-Définition

Les caroténoïdes représentent un ensemble de pigments naturels, liposolubles très répandus dans la nature (Faure et al., 1999), et qui fournissent une coloration attrayante pour les fleurs et les fruits, allant du jaune, orange et rouge (Alquezar et al., 2008). Ces substances existent dans les végétaux, les algues, les champignons et chez les animaux (Stahl et al., 2003 ; Tapiero et al., 2004).

#### I.1.5.2-Classification

Les caroténoïdes sont divisés en deux grands groupes (Hurst, 2002 ; Vargas et al., 2002).

- selon la structure chimique

Ils sont divisés en deux classes :

##### ➤ Carotène

Les carotènes ( $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -carotène, phytofluène, phytoène etc.). Ce sont des substances non polaires, qui présentent des chaînes hydrocarbonées avec un grand nombre de liaisons conjuguées, qui leur confèrent une coloration pouvant aller du jaune au rouge (Rodriguez-Amaya, 2001).

##### ➤ Xanthophylles

Elles sont plus polaires que les carotènes et renferment des atomes d'oxygène dans leur structure (lutéine, Zéaxanthine,  $\beta$ -cryptoxanthine, Violaxanthine) (Dionne, 2002).

- selon la fonction

Les caroténoïdes sont regroupés en deux groupes :

- Caroténoïdes primaires qui participent à la photosynthèse ( $\beta$ -carotène, lutéine) ;
- Caroténoïdes secondaires qui entrent dans la composition des chromoplastes des fleurs et des fruits. Ces caroténoïdes existent aussi dans les bactéries, les levures et les champignons ( $\alpha$ -carotène, capsanthine, lycopène, bixine) (Richter,1993 ;Vargas *et al.*,2002).

### 1.1.5.3-structure

Les caroténoïdes font partie d'une grande classe de composé chimique caractérisé par la présence d'un enchainement linéaire de huit unité isopréniques (figure 4) associé en deux groupes de quatre unité  $C_{20}$  (géranyl-géranyl) qui s'organisent en un hydrocarbure acyclique en  $C_{40}H_{56}$  (Morais *et al.*,2002 ;Dutta *et al.*,2005).

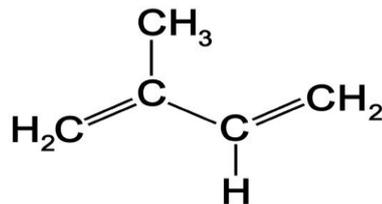


Figure 5 : La structure de l'isoprène (Vargas *et al.*, 2002).

La diversité des caroténoïdes est due aux différentes modifications du squelette tétra terpénique (Delia et Amaya, 1997 ;Tapiero *et al.*,2003 ; Dutta *et al.*,2005).

Ce squelette peut être modifié par diverses façons telle que :

- Cyclisation dans l'une ou les deux terminaisons.
- Addition de groupement fonctionnel contenant d'atome d'oxygène.
- Changement dans le niveau d'hydrogénation.
- Migration de double liaison, et selon leur nombre plusieurs configuration cis/trans (E/Z) sont possibles

La caractéristique distincte des caroténoïdes par rapport aux autres antioxydants est le système de conjugaison important des doubles liaisons qui servent à l'absorption lumineuse par le chromophore, responsable de la coloration jaune ,orange et rouge de plusieurs aliments (Dutta, 2005).

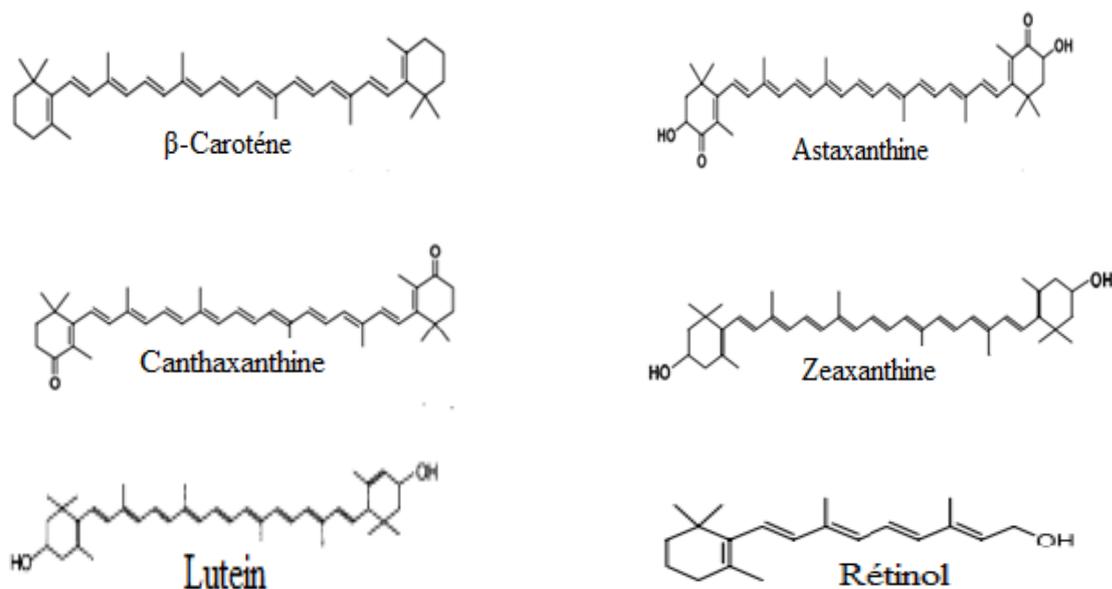


Figure 6 : Structures chimiques de quelques caroténoïdes (El-Agamy *et al.*, 2004).

I.1.5.4-source

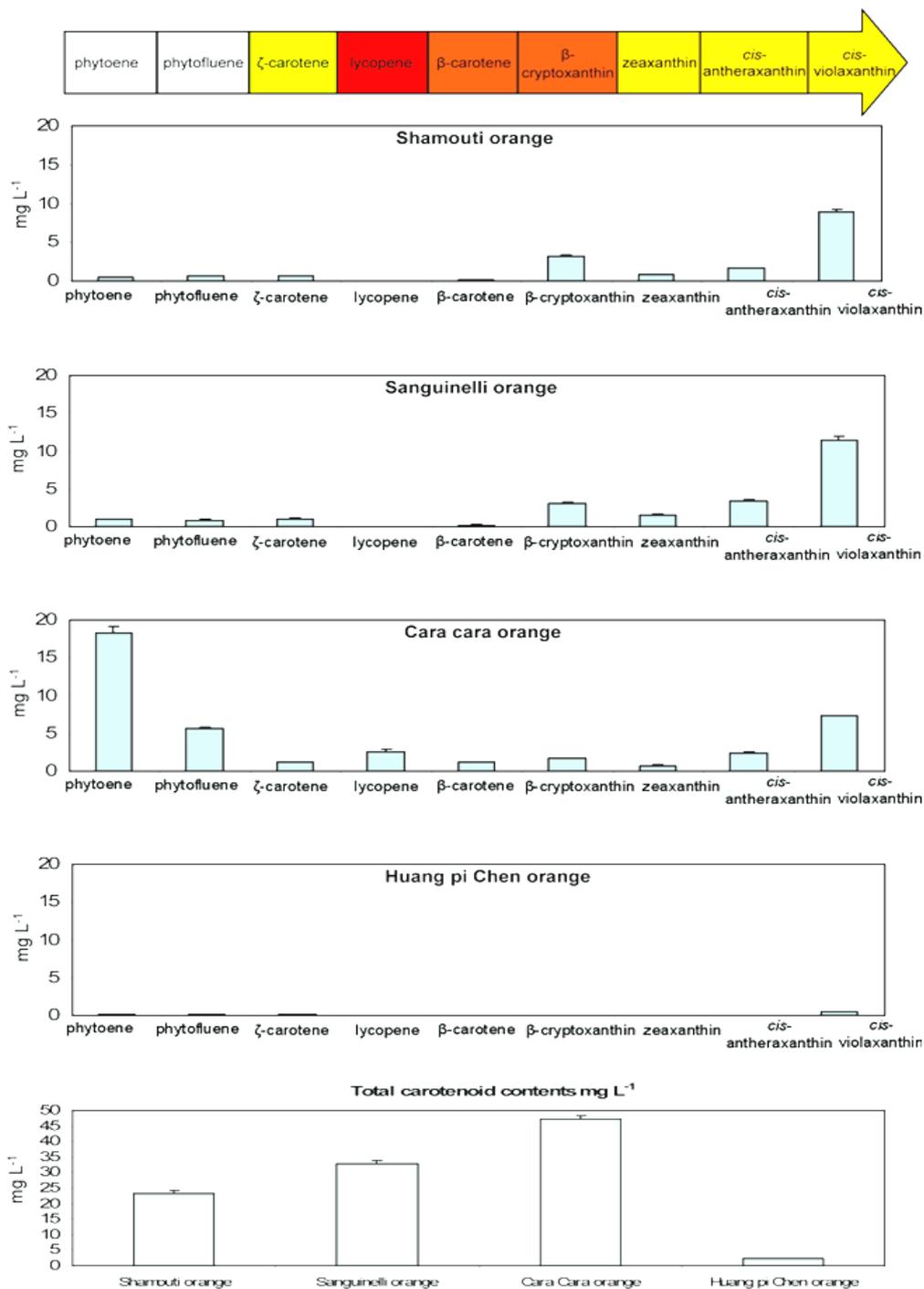
Chez les végétaux, les caroténoïdes sont retrouvés dans les tissus verts photosynthétiques, les fruits, les racines, les graines et les fleurs. Par ailleurs, des organismes photosynthétiques tels que le phytoplancton, certaines algues, bactéries, champignons et levures sont capables de les synthétiser (voutilainen *et al.*, 2006). Les légumes sont la source principale des caroténoïdes, quelques exemples sont cités dans le tableau IV.

Tableau IV : Sources principales de quelques caroténoïdes (Voutilainen *et al.*, 2006).

Caroténoïdes	Sources alimentaires
β-Carotène	Abricot, brocoli, carotte, chou, mangue, épinard, mangue, pêche, poivron, orange tomate, mandarine.
β-Cryptoxanthine	Kaki, cerise de Cayenne, Papaye, poivron, courge, mandarine.
Lutéine	Brocoli, légumes-feuilles, poivron
α-carotène	Jaune d'œuf, courge. Citrouille, maïs, chou frisé.

Lycopène	Tomate, pastèque, Carotte, goyave Pamplemousse rose, papaye, Abricot, kaki.
Zéaxanthine	Poivron, Kaki, courge, maïs.

La concentration et la composition des caroténoïdes dans la famille Citrus dépendent principalement de la variété et les conditions de culture. En effet, dans les variétés mandarine, il y a accumulation des  $\beta$ -cryptoxanthine dans le flavedo et le jus du fruit mature. Néanmoins, dans les oranges douces (dont fait partie l'orange sanguine) il y a accumulation des isomères de violaxanthines (Figure 7) dont le 9-Cis violaxanthine est le principal caroténoïde (**Kato et al., 2004**).



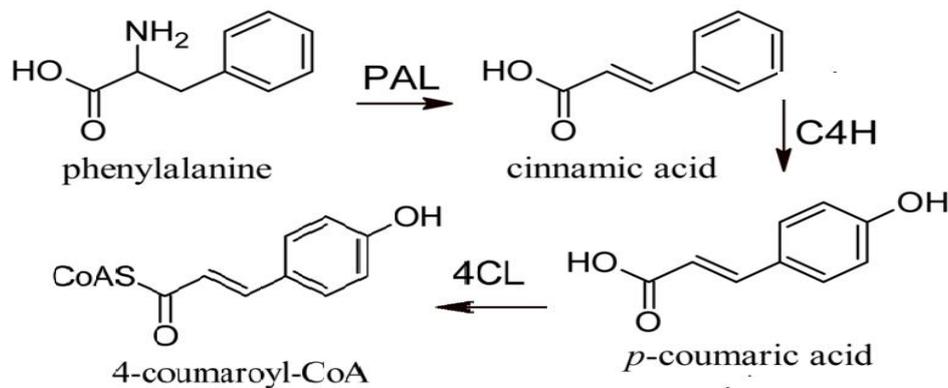
**Figure 7** : contenu en caroténoïdes dans les sacs à jus de quatre variétés d'orange (Fanciullino *et al.*, 2008).

**Partie 2 : Anthocyanes de l'orange sanguine : biosynthèse, expression des gènes et régulation transcriptionnelle**

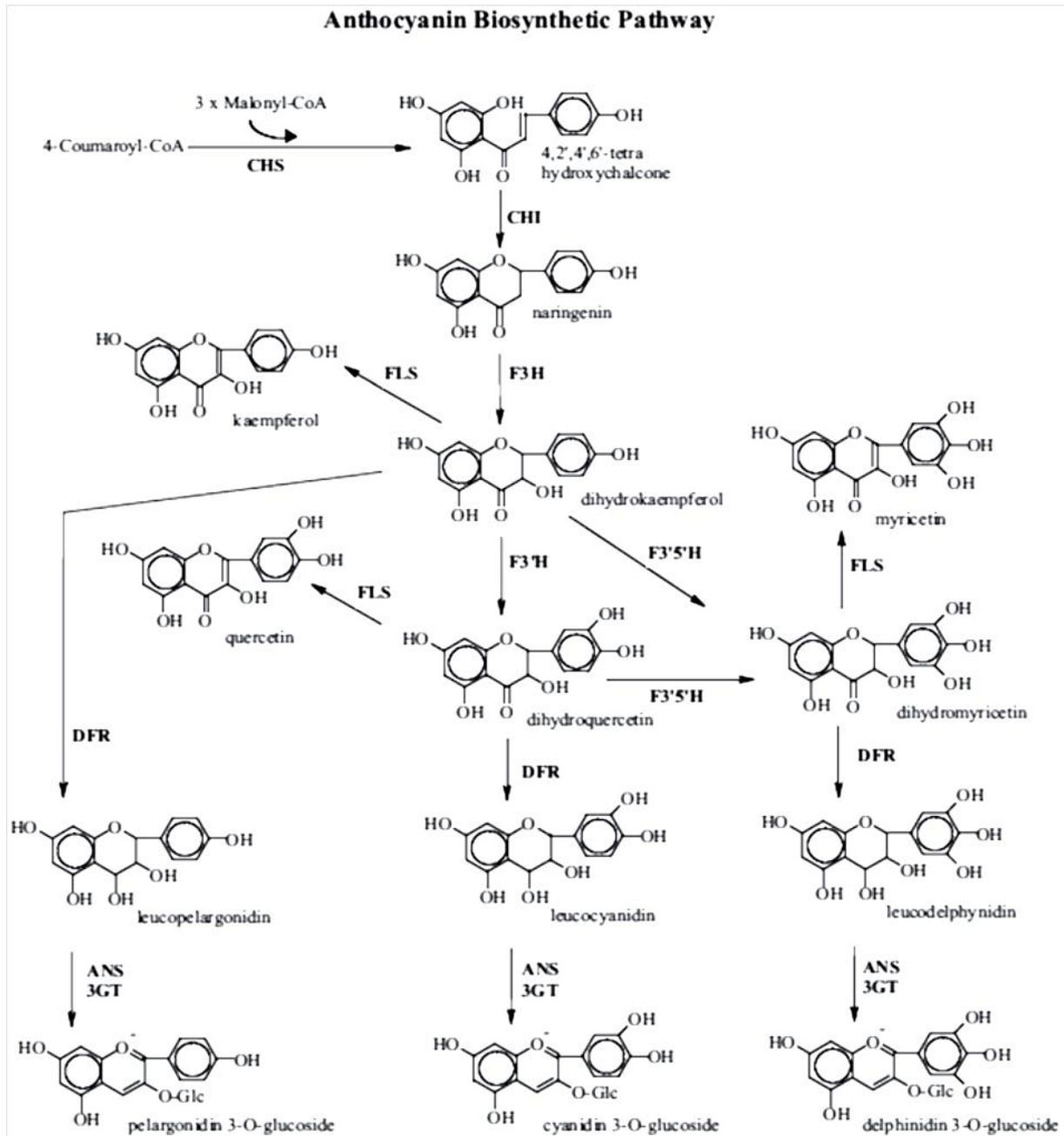
**2.1-Biosynthèse des anthocyanes dans l'orange sanguine**

Les anthocyanes sont des dérivés de la biosynthèse des flavonoïdes et responsables de la couleur de différentes espèces végétales. Ils sont de puissants scavengers et contribuent à l'activité antioxydante. L'orange sanguine (*Citrus sinensis*) est caractérisée par sa couleur unique, et les principaux anthocyanes du jus d'orange sanguine sont : cyanidine 3-glucoside, et cyanidine 3- (6 - malonylglucoside) (Hillebrand *et al.*, 2004).

Les anthocyanes sont synthétisés via un réseau très complexe, dans lequel un complexe multienzymatique est formé et régulé par des facteurs de transcription. La phénylalanine est un précurseur direct pour la synthèse d'anthocyanidines, et sa conversion en anthocyanes nécessite une série de réactions qui sont illustré dans la figure (Chen *et al.*, 2015).



Tout d'abord, la transformation de la phénylalanine à l'acide trans-cinnamique par l'élimination de l'ammoniac est catalysée par la phénylalanine ammoniaque lyase (PAL) qui a été largement étudiée pour son implication dans les réponses aux divers stress de la plante. L'hydroxylation de l'acide cinnamique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) génère ensuite l'acide p-coumarique, qui est activé par la 4-coumarate CoA ligase (4CL) pour aboutir à la formation du 4-coumaroyl CoA (Schijlen *et al.*, 2004).



**Figure 8 :** Schéma général de la voie de biosynthèse des anthocyanes (Xie *et al.*, 2004).

CHS : chalcone synthase, CHI : chalcone isomérase, F3H : flavanone-3-hydroxylase, F3'H : Flavonoïde 3'-hydroxylase, F3'5'H : flavonoïde 3',5'-hydroxylase, FLS : flavonol synthase, DFR : dihydroflavonol réductase, ANS : anthocyanidine synthase, UFGT ou 3-GT : uridinediphosphateglucoseflavonoïde 3-O glucosyl transférase.

Ensuite, la chalcone synthase (CHS) condense trois molécules de malonyl-CoA et un p-coumaroyl-CoA pour produire la naringeninechalcone pour la biosynthèse éventuelle des anthocyanes et d'autres composés phénoliques (He *et al.*, 2010). La naringenine chalcone

obtenue subit une isomérisation sous l'action d'une chalcone isomérase (CHI) pour donner la flavanononaringénine. Le noyau C de cette molécule (naringénine) est ensuite hydroxylé en position 3 par une flavanone 3-hydroxylase (F3H) (**Moriguchi et al., 2001 ; Lucheta et al., 2007**.) pour donner le dihydrokampférol. Cette molécule peut ensuite être hydroxylée sur le noyau B soit en position 3' soit en 3' et 5' par une flavonoïde 3' ou 3'-5' hydroxylase (F 3'H ou F 3'5'H) (**Doostdar et al., 1995**) générant respectivement soit la dihydroquercétine soit la dihydromyricétine. Le rôle crucial des deux enzymes CHS et F3H dans la pigmentation en anthocyanes a été confirmée par le profilage protéomique de maturation "Moro" (orange sanguine) et "Cadenera" (orange commun), qui sont exprimés de manière différentielle et pourrait être utilisé pour distinguer l'orange commune et sanguine (**Muccilli et al., 2009**).

Les dihydroflavonols formés peuvent donner naissance d'une part à des flavonols par l'action de la flavonol synthase (FLS), et d'une autre part, des leucoanthocyanidines correspondantes (leucocyanidine, leucodelphinidine et Leucopélargonidine) par une réduction sous l'action de la dihydroflavonol 4-réductase (DFR). Il n'y a pas de différences dans le gène codant pour la DFR et les séquences promotrices entre l'orange sanguine et les oranges blondes, mais le gène DFR est détecté que dans l'orange sanguine. Par conséquent, son expression doit être sous contrôle des régulateurs de la transcription (**piero et al., 2006**).

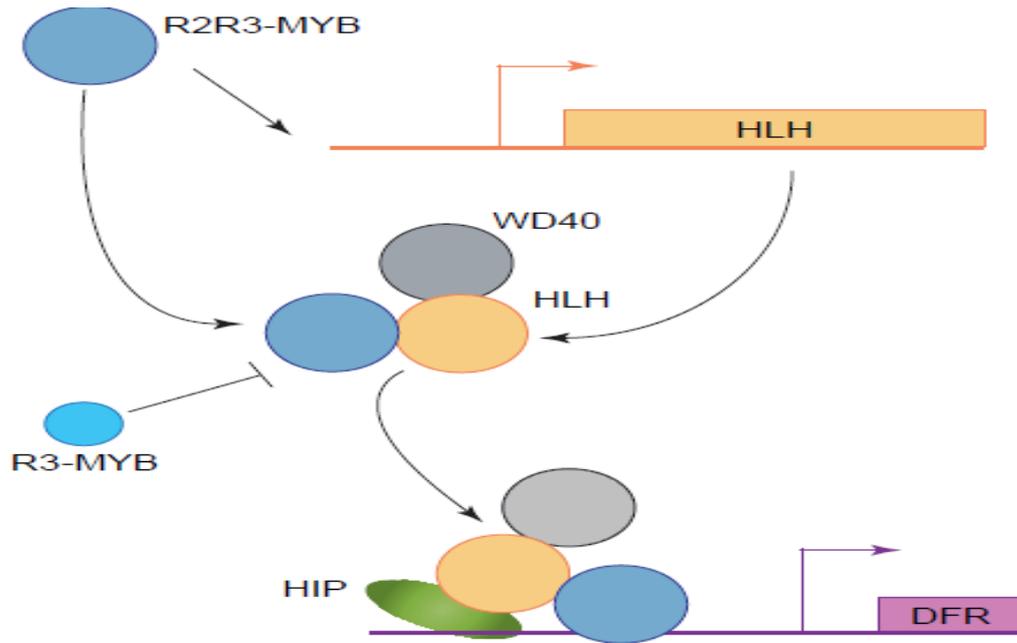
Finalement, l'oxydation des leucoanthocyanidines catalysée par la flavonoïde 3-O-glucosyltransférase/anthocyanidine synthase (UFGT ou GT/ANS) aboutit à la formation des anthocyanidines ; cyanidine, delphinidine et pélargonidine (**Abrahams et al., 2003**). En effet, l'anthocyanidine synthase (ANS), une  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  oxoglutaratedioxygénase dépendante, convertit les leucoanthocyanidines incolores en anthocyanidines colorés qui, une fois formées, doivent immédiatement être modifiées vue qu'elles sont intrinsèquement instables dans les conditions physiologiques (**fig. 8.6**). Par conséquent, l'uridinediphosphate (UDP) -glucose flavonoïde glucosyl-transférase (UFGT) catalyse l'addition d'une fraction de glucose dans les positions 3-OH des anthocyanidines augmentant ainsi leur hydrophilie et leur stabilité. Les gènes ANS et UFGT dans l'orange sanguine "Tarocco" ont été clonées par Lo Piero et ses collaborateurs (no ANSAY581048;UFGT, AY519364). La présence d'anthocyanes diglycosylée dans le jus d'orange sanguine (**Maccarone et al., 1998**) indique que d'autres enzymes de glucosylation pourraient être impliqués dans la modification des anthocyanes comme ce qui se produit dans de raisin (**He et al., 2010**) bien que des gènes homologues ne sont pas encore identifiés dans le Citrus. L'acylation est l'une des modifications les plus

courantes des anthocyanes d'oranges sanguines, ce qui entraîne une augmentation de la diversité structurale des anthocyanines par l'addition des constituants aromatiques et / ou aliphatiques liés aux positions C6' des groupes glucosylés (Maccarone *et al.*, 1998) IL y'a lieu de noter que les anthocyanes sans la protection d'acylation peuvent être facilement et rapidement décolorés dans des solutions aqueuses neutres ou faiblement acides. Au niveau des plantes, l'acylation des anthocyanes est catalysée par l'action des acyltransférases anthocyanes (ACTs, également connu sous le nom AATs), qui ont une double spécificité, pour les anthocyanes accepteurs et les donneurs de groupements acyles. Chez les plantes, il existe principalement deux types d'ACTs qui sont classés selon le type de donneurs de groupement acyl: la famille de BAHD utilisant acyl-CoA et le groupe de la serine carboxypeptidase-like (SCPL) qui utilise les sucres acyles activés ( D'Aurié *et al.*, 2006) Les anthocyanines acylées peuvent représenter plus de 40% de la teneur en anthocyanes totale dans certaines oranges sanguines, bien que jusqu'à présent il n'y a aucun rapport sur les gènes requis et responsable dans l'acylation des anthocyanines dans l'orange sanguine (Chen *et al.*, 2015).

## **2.2-La régulation transcriptionnelle intervenant dans la biosynthese des anthocyanes dans l'orange sanguine**

### **2.2.1-Les facteurs de transcription dans la synthèse des anthocyanes**

La voie de biosynthèse des anthocyanes est relativement bien caractérisée et le profil d'expression des gènes de structure a été étudié dans les fruits d'agrumes. (Licciardello *et al.*, 2008 ;Cultrone *et al.*, 2010).Cependant, la plupart des travaux sont liés aux tissus de la pulpe, où l'accumulation des anthocyanes se produit préférentiellement (Cotroneo *et al.*, 2006). Comme dans d'autres fruits, des études ont conduit à la conclusion que les anthocyanes s'accumule lorsque deux ensembles de gènes sont exprimés : gènes de structure qui codent pour des enzymes catalysant des réactions de la voie métabolique et des gènes régulateurs nommés facteurs de transcription (Cultrone *et al.*, 2010 ; Licciardello *et al.*, 2008). Ces derniers sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse des anthocyanes à savoir la MYB, bHLH, WD40 comme représenté dans la Figure 9.

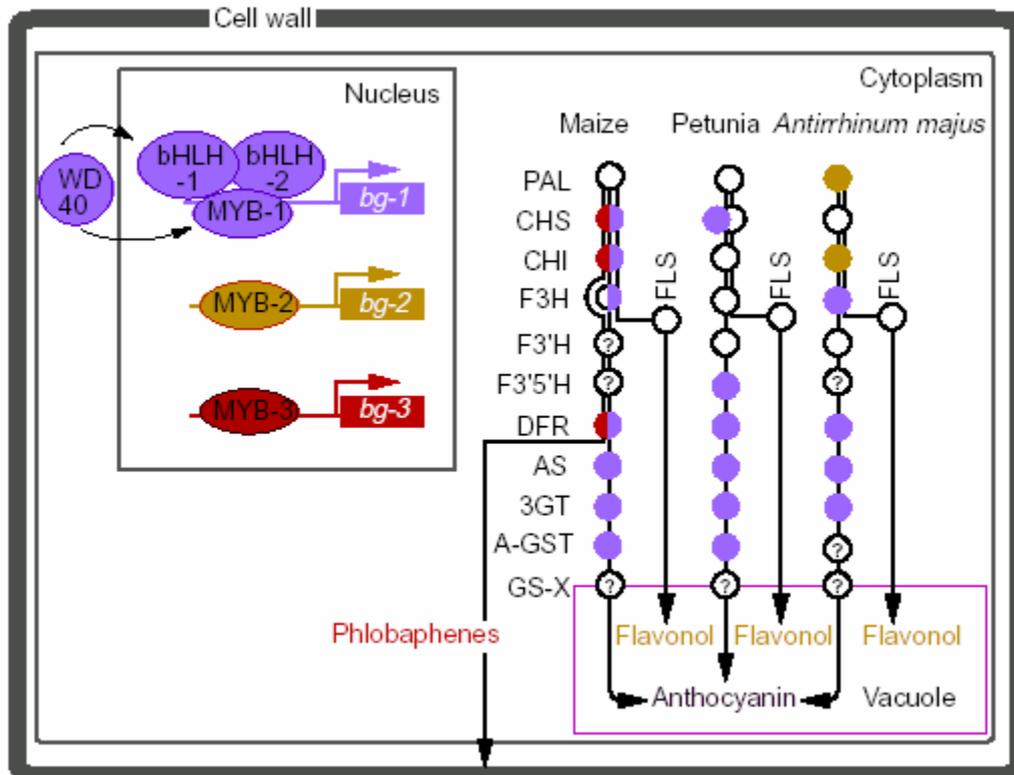


**Figure 9:** La régulation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes.

La MYB contient deux régions distinctes : un domaine C-terminal variable, responsable de la régulation de la transcription, et un domaine N-terminale. Ce dernier est composé de trois régions R1, R2, et R3. La région R1 stabilise l'interaction entre la séquence d'ADN et la protéine (Howe *et al.*, 1991). Les régions R2 et R3 sont impliquées dans la fixation de l'ADN (Ogata *et al.*, 1994).

La protéine R2R3-MYB est impliquée dans la régulation des anthocyanes en association avec la protéine HLH et cela forme un complexe avec la protéine WD40. Cette dernière se lie directement sur la séquence d'ADN tandis que la HLH va se lier indirectement via une interaction avec la HIP (hypothetical HLH INTERACTING PROTEIN) (Hernandez *et al.*, 2004). Actuellement, le gène R2R3-MYB est appelé gène Ruby et l'ADNc de ce gène code pour 262 acides aminés dans les protéines R2R3 MYB avec le motif d'interaction avec les protéines bHLH (Butelli *et al.*, 2012). Le complexe, MYB-HLH a largement été étudiée chez le pétunia, le maïs et le muflier. Dans ces organismes, il joue le rôle de régulateur de la biosynthèse des anthocyanes. Chez *Arabidopsis thaliana*, il régule également la synthèse des tanins condensés dans les graines (VomEndt *et al.*, 2002). Les facteurs WD40 sont, quant à eux, fortement conservés y compris dans des organismes qui ne peuvent synthétiser les anthocyanes tels les algues, les champignons ou les animaux. Leur fonction reste à préciser. Des expériences sur les mutants *ttg1* (*Arabidopsis thaliana*) et *an11* (pétunia) suggèrent que

ces facteurs activeraient de façon post-traductionnelle le complexe MYB-HLH (De Vetten *et al.*, 1997). En effet, la figure 10 schématise la régulation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes. Cette dernière est divisée en trois catégories qui se différencient par leur mode d'activation. Bg1, par exemple, représente un ensemble de gènes codant pour les seules enzymes matérialisées en violet. Les facteurs de transcription sont mentionnés sous leur nom commun : bHLH, MYB et WD40.



**Figure 10.** Description de la coopération des facteurs de transcription impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes (Mol *et al.*, 1998).

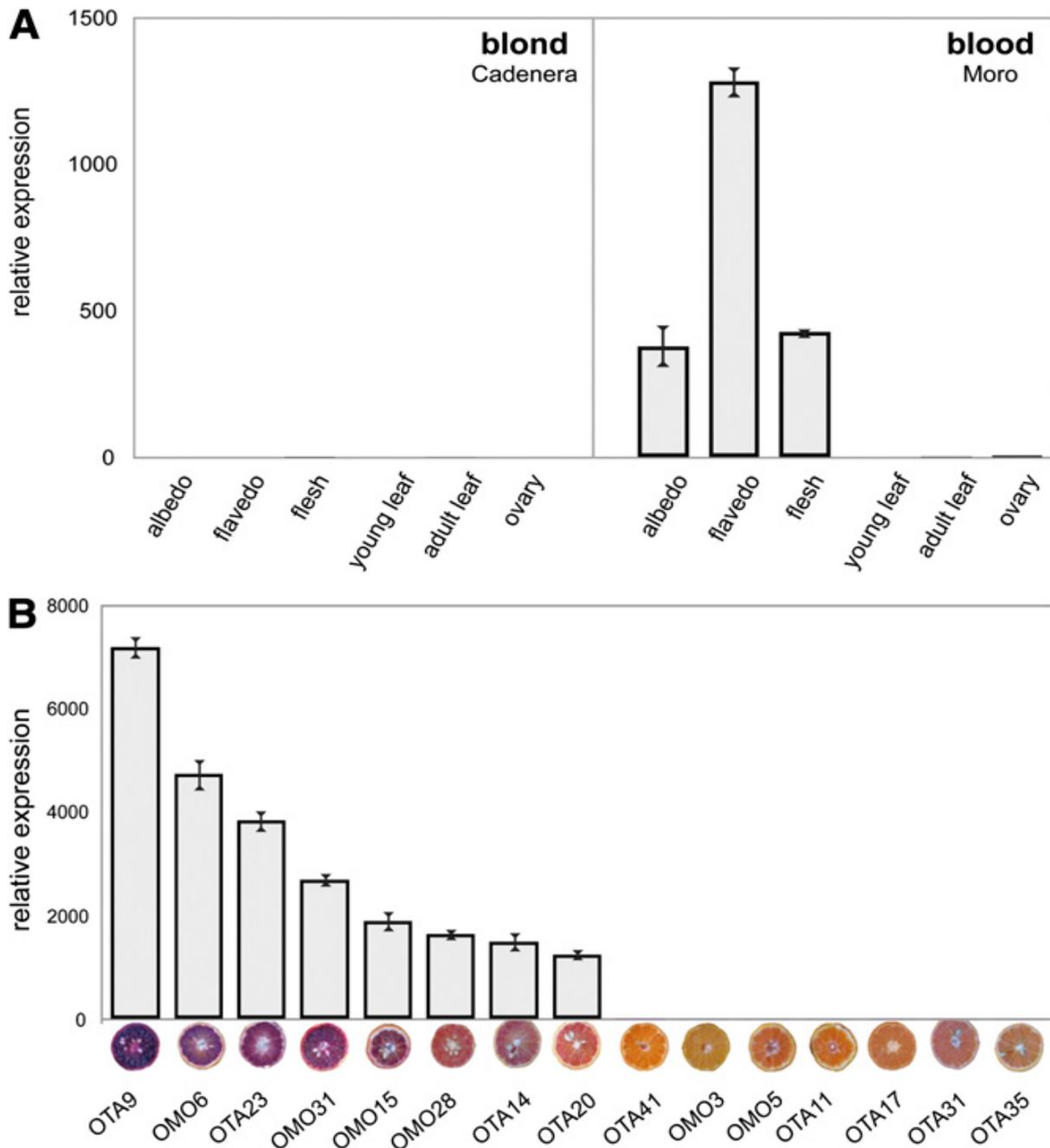
Chez *Vitis vinifera*, le gène VvMYB5a code pour une protéine appartenant la sous famille des R2R3-MYB vient d'être identifié (Deluc *et al.*, 2006). Ce gène est principalement actif durant les premières étapes du développement de la baie dans la pellicule, la chair et les pépins. Sa surexpression chez le tabac stimule la biosynthèse de flavonols, d'anthocyanes et de tanins condensés mais affecte le métabolisme des lignines. Ce gène est donc impliqué dans le contrôle de plusieurs branches de la voie métabolique des phenylpropanoïdes et pourrait jouer le même rôle dans l'orange sanguine.

### 2.2.2-L'expression du gène Ruby dans les oranges sanguines et communes ?

Les variétés rouges peuvent synthétiser et accumuler des anthocyanes dans l'écorce et la chair. Le profil d'expression de six gènes de biosynthèse des anthocyanes (**CHS**, **CHI**, **F3H**, **DFR**, **ANS**, **UFGT**) a été étudié dans les deux variétés d'oranges, sanguines et blondes, et a révélé que les gènes impliqués dans les étapes précoces de la voie biosynthétique de l'anthocyane, tels que **CHS**, **CHI**, et **F3H**, sont exprimés dans les deux oranges incolores et colorées. Néanmoins, les niveaux d'expression beaucoup plus faibles ont été observés dans les cas de **DFR**, **ANS** et **UFGT**, ce dernier étant à peine détectée ou même totalement inexprimé dans l'orange blonde (Navel et Ovale).

Concernant les gènes de régulation dans les oranges sanguines, des niveaux élevés d'expression Ruby ont été détectés dans la chair et l'écorce, y compris le mésocarpe (Albédo) (Figure 11). Néanmoins, l'expression du Ruby n'a pas été détectée dans les oranges communes (figure 11A). Selon le travail du **Butelli et al.. (2012)**, les niveaux d'expression Ruby dans différentes accessions d'orange sanguine et des hybrides entre clémentine et Moro (OMO) et clémentine et Tarocco (OTA) affichent une large gamme de niveaux de pigmentation différente lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions semblables et équivalentes. En effet, selon la figure on peut distinguer une très forte pigmentation (OTA9), une pigmentation moyenne (OMO6, OTA23, OMO31 et OMO15), une faible pigmentation (OMO28, OTA14 et OTA20) et aucune pigmentation (OTA41, OMO3, OMO5, OTA11, OTA17, OTA31 et OTA35). Ces niveaux de transcription Ruby dans la chair des fruits cultivés dans les mêmes conditions ont été déterminés par la quantitative RT-PCR quantitative (qRT-PCR). Il y avait une corrélation claire entre les niveaux de transcription Ruby et les niveaux de l'anthocyanine dans la chair des fruits (Figure 11B). L'expression du Ruby a également été détectée dans des variétés anciennes appartenant au groupe Sanguigno / Sanguinelli.

Ces résultats confirment l'importance et le rôle principal de ce facteur de transcription nommé « Ruby » dans la biosynthèse des anthocyanines.



**Figure 11:** L’analyse de l’expression du Ruby

(A) L’expression du Ruby dans les différents tissus de l’orange blonde ‘cadenera’ et l’orange sanguine ‘Moro’. Albedo est la couche interne blanche et spongieuse. Le flavedo est la couche externe.

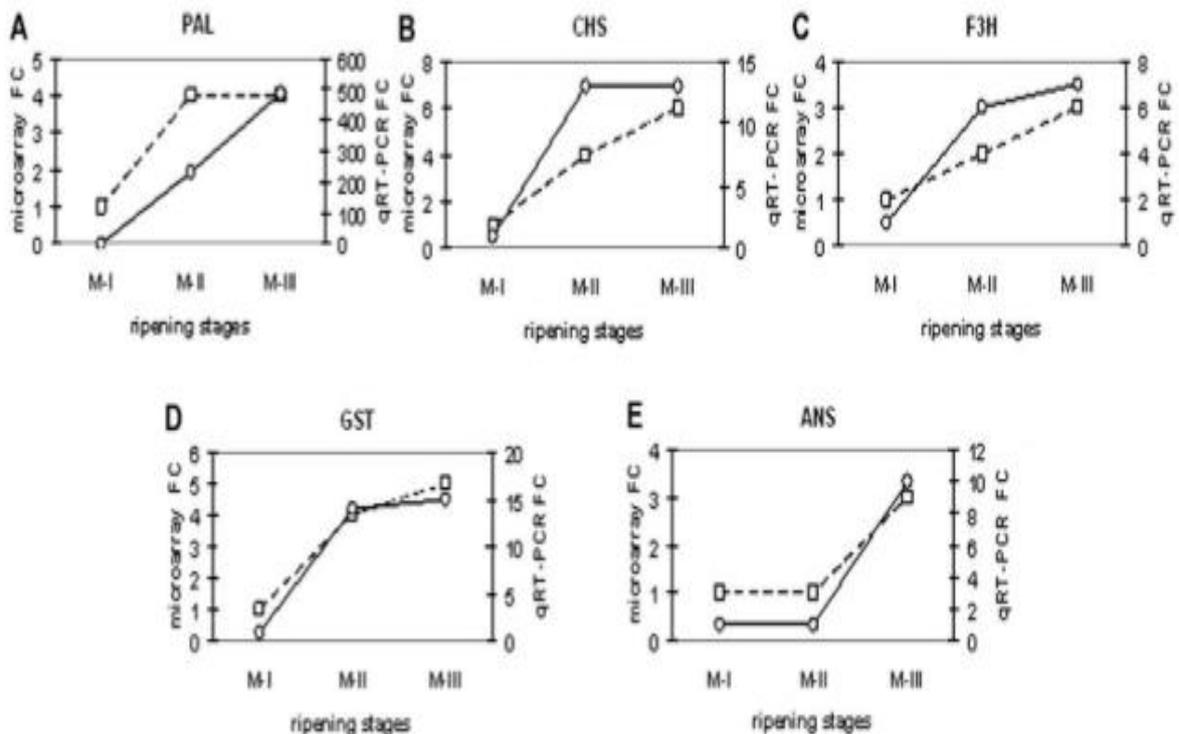
(B) L’expression Ruby dans des hybrides diploïdes obtenus par croisement de la clémentine (C. clementina cv Oroval) avec C. sinensis cv Moro (la série OMO) ou C. sinensis cv Tarocco (la série OTA). Hybrides manquant d’anthocyanes (OMO41, 3, et 5 ; OTA11, 17, 31, and 35) présentent des couleurs légèrement différentes en raison des différents niveaux de caroténoïdes dans la chair du fruit.

## 2.3-L'influence de quelques facteurs sur l'expression des gènes de la biosynthèse des anthocyanes dans l'orange sanguine

### 2.1.3-Le stade de maturation

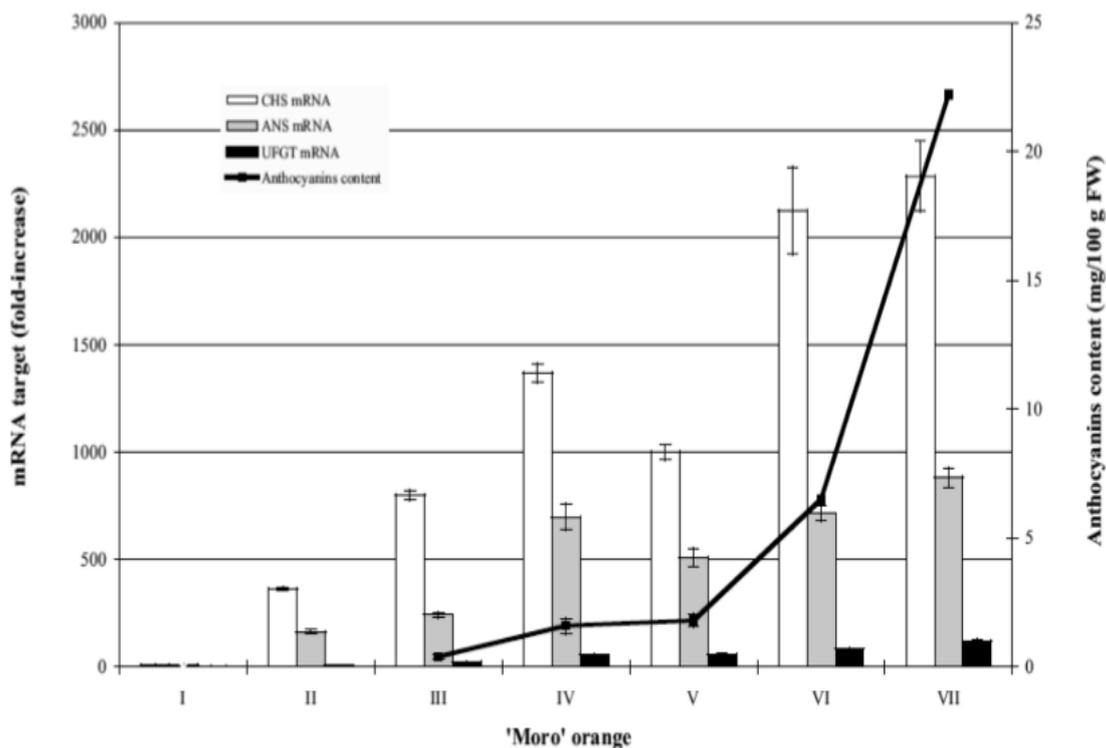
La quantité d'anthocyanines dans les oranges sanguines est strictement corrélée au stade de maturation des fruits, ainsi qu'aux niveaux de transcription des gènes de la biosynthèse (Lo Piero *et al.*, 2015).

Dans les travaux de Benardi *et al.*, (2010) sur les gènes impliqués pendant la maturation de l'orange sanguine 'Moro' ( Figure 12 ), il a été trouvé que le profil d'expression du gène PAL présente une augmentation constante de niveau d'expression pendant tous les stades de la maturation. Concernant l'expression des gènes CHS, F3H et GST, les mêmes profils d'expression ont été observés pendant la maturation. Néanmoins, l'expression du gène ANS ne commence qu'à partir du stage II de la maturation.



**Figure 12 :** Le profil d'expression des gènes différentiels pendant la maturation de l'orange sanguine 'Moro'. Le fold-change (FC) est représenté par RT-PCR quantitative (ligne épaisse avec cercles blancs) et microarray (ligne mince avec des carrés blancs).

De plus, il a été rapporté dans le travail du **Lo Piero *et al.*, (2015)** que l'expression des gènes CHS, ANS, et UFGT augmente pendant toute la période de maturation de l'orange sanguine 'Moro', ce qui est déjà confirmé par les travaux de **Benardi *et al.*, (2010)**. Les anthocyanes totaux sont indétectables au début, mais leurs niveaux augmentent à partir du troisième prélèvement (fin Novembre) et montrent une forte augmentation entre le VI (fin Janvier) et VII (mi-février) stade de maturation.



**Figure 13 :** La détection par RP-PCR en temps réel des gènes biosynthétiques et la teneur en anthocyanes totaux dans la pulpe de l'orange 'Moro' pendant la maturation.

*Les fruits sont cueillis après 7 différents stades de maturation après chaque 3 semaines commençant à partir de 19 octobre jusqu'au 21 février. CHS, chalconesynthase ; ANS, anthocyanidin synthase ; UFGT, UDP-glucose flavonid 3-O-glucosyl transferase.*

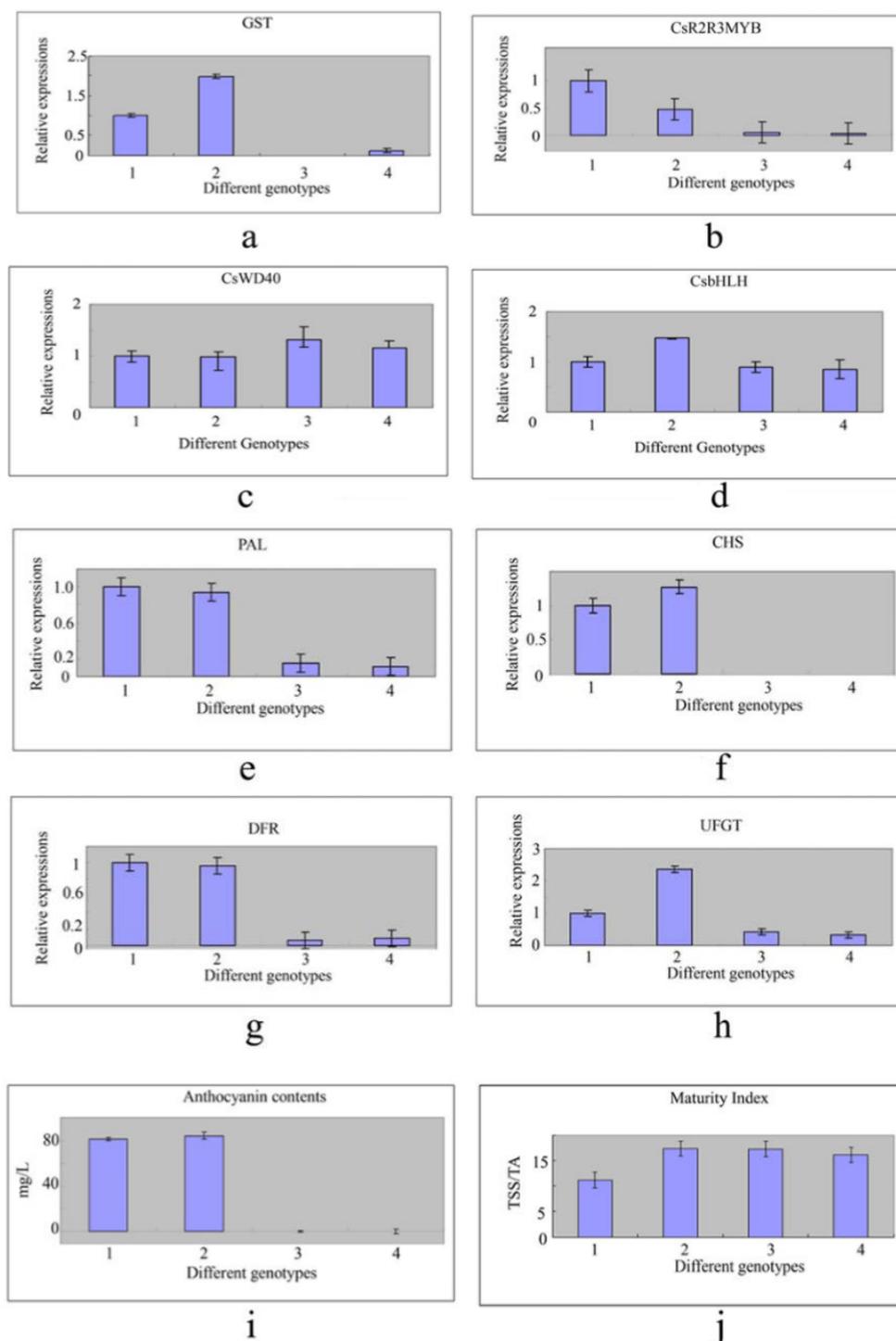
Et selon le coefficient de corrélation de Pearson, une corrélation positive entre ces différents gènes et l'accumulation en anthocyanes a été déterminée (Tableau VI) (**OPiero et al. 2006**).

**Tableau V :** Le coefficient de corrélation Pearson entre les gènes de la chalcone synthase (CHS), l'anthocyanidine synthase (ANS) et UDP-glucose-flavonoïde 3-O-glucosyltransférase (UFGT) avec la teneur en anthocyanes dans l'orange Moro.

	ANS	UFGT	Anthocyanin content mg/100 g FW
CHS	$r = 0.9220$ $P = 0$	$r = 0.8705$ $P = 0$	$r = 0.7688$ $P = 0$
ANS		$r = 0.8185$ $P = 0$	$r = 0.5783$ $P = 0$
UFGT			$r = 0.8827$ $P = 0$

### 2.3.2-L'expression des gènes de structure et de régulation en fonction de type de la variété d'orange sanguine

La nature et le niveau d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes dépendent largement de type de la variété (**Benardi et al., 2010**). Selon un travail récent réalisé par **Wang et al., (2016)**, les variétés de l'orange sanguine (Tarocco et Double fine) ont une pulpe et un flavedo pigmentée par comparaison aux oranges blondes (orange Caracara et Navel) qui sont dépourvues d'anthocyanes (Figure 14i). Les gènes de structure PAL, CHS, DFR, et UFGT impliqués dans la biosynthèse sont fortement exprimés dans les oranges sanguines (Fig. 14e–h), et sont corrélés positivement avec la teneur en anthocyanes. De plus, les gènes de transcription CsR2R3MYB et CsbHLH sont aussi hautement transcrits dans l'orange sanguine (Fig. 14b, d). Néanmoins, la transcription du gène CsWD40 est similaire pour toutes les variétés (Fig. 14c). Ces résultats confirment aussi que le facteur de transcription CsR2R3MYB joue un rôle primordial dans la biosynthèse des anthocyanes.

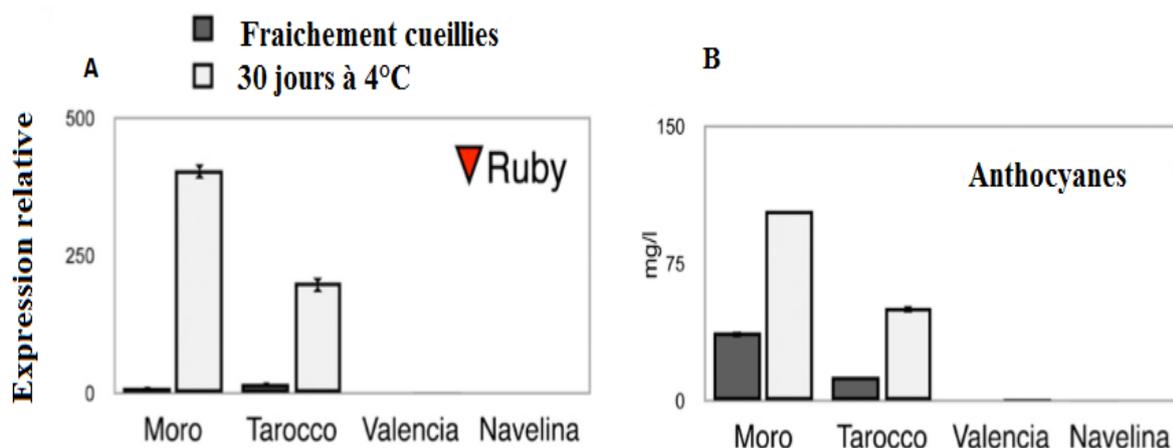


**Figure 14:** Analyse différentielle de l'expression des gènes entre l'orange sanguine et blonde. 1, 2, 3, et 4 Double fine, Tarocco, orange navel, et Caracara orange navel, respectivement.

### 2.3.3-L'effet de la baisse température sur l'expression des gènes dans l'orange sanguine

L'activation de la biosynthèse des anthocyanes par le froid a reçu plus d'attention que d'autres facteurs environnementaux. En effet, la productivité de la plupart des variétés commercialement importantes d'agrumes est sévèrement affectée par une faible température due à l'induction de plusieurs altérations métaboliques telles que les fuites d'électrolyte accrue et une diminution de la capacité photosynthétique et le taux de la respiration (Allen *et al.*, 2011).

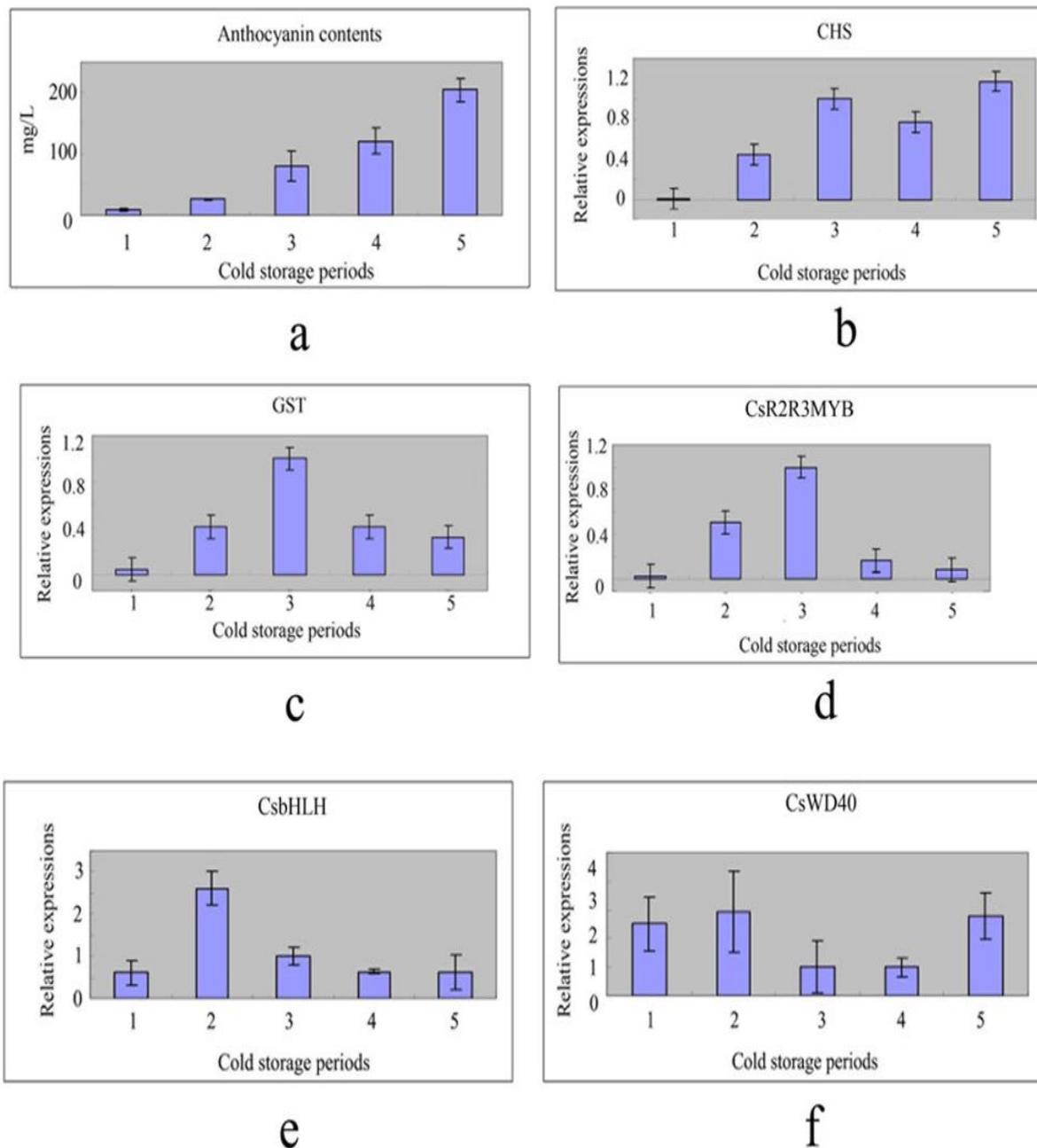
Dans les travaux de Butelli *et al.*, (2012), le stockage à froid a fortement augmenté le niveau d'expression du Ruby dans les oranges sanguines et également la teneur en anthocyanes (Figure 15). Ces résultats ont été aussi confirmés le travail du Wang *et al.*, (2016).



**Figure 15 :** Expression du facteur de transcription Ruby et la production d'anthocyanes dans l'orange sanguine et l'orange blonde en réponse à un stockage à froid (Butelli *et al.*, 2012).

En effet, dans le travail récent de Jian-hui Wang *et al.* (2016), la teneur en anthocyanes dans le jus d'orange Tarocco a augmenté rapidement durant le stockage à 10 °C pendant 70 jours, passant d'une teneur de 8.26 mg/L à 204.33 mg/L sous l'induction de froid (Figure 16). L'expression du gène CHS atteint son maximum après 42 jours de stockage, après le niveau d'expression reste constant. L'accumulation des anthocyanes dans les cellules des plantes exigent le gène GST pour leur transport dans les vacuoles. De ce fait, il a été observé que le niveau d'expression de ce gène augmente progressivement jusqu'à 42 jours, puis son niveau commence à diminuer graduellement (Figure 16c), ce qui est en accord avec le taux de production des anthocyanes dans le cytoplasme. Le niveau de transcription du facteur

CsR2R3MYB est corrélé positivement avec le transporteur GST (coefficient de corrélation de Pearson =0.928). Par conséquent, ce facteur de transcription joue un rôle important dans la production des anthocyanes par rapport aux deux autres facteurs de transcription.



**Figure 16 :** Le profil d'expression des gènes de régulation et de structure pendant le stockage à froid. 1, 2, 3, 4 et 5 représente l'orange Tarocco sous stockage à froid pendant 0, 28, 42, 56 et 70 jours respectivement.

### Partie 3 : Caroténoïdes de l'orange sanguine : biosynthèse, expression des gènes et la régulation transcriptionnelle

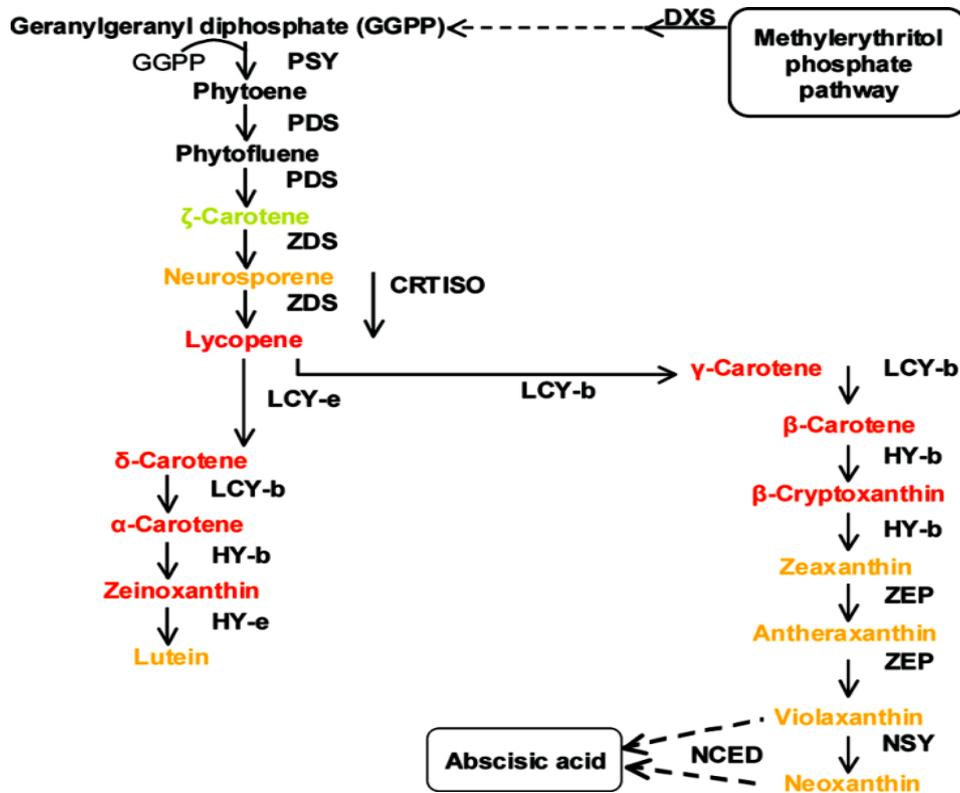
Dans la famille Citrus, les caroténoïdes sont des pigments responsables de la coloration externe et interne des fruits, et leur contenu et composition sont des indices importants pour la qualité commerciale et nutritionnelle des fruits. Les agrumes présentent généralement des profils en caroténoïdes complexes qui dépendent de plusieurs facteurs, y compris les facteurs génétiques, le stade de maturation, et les conditions environnementales. L'accumulation des caroténoïdes se produit dans des sacs de jus de Citrus pendant la maturation des fruits. La voie de biosynthèse des caroténoïdes a été bien établie ( **Hirschberg et al., 2001** ; **Sandman et al., 2001**) (figure 17), mais de plus amples informations concernant le rôle de chaque étape biosynthétique dans le contrôle du flux des intermédiaires de la voie de biosynthèse de caroténoïdes dans les fruits d'agrumes est nécessaire.

#### 3.1-Biosynthèse des caroténoïdes et régulation des gènes

##### 3.1.1-Biosynthèse des caroténoïdes dans les oranges

Les caroténoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes et les chromoplastes par des enzymes codées. Le précurseur immédiat des caroténoïdes (et aussi des gibbérélines, chlorophylles, phylloquinones et tocophérols) est le diphosphate de géranylgeranyle (GGPP). La condensation de deux molécules de GGPP catalysée par phytoène synthase (PSY) conduit à la formation du premier caroténoïde incolore : *phytoène*. Les précurseurs de caroténoïdes synthétisés dans les chloroplastes et chromoplastes proviennent principalement de la voie phosphate méthylerythritol plastidial (MEP) (**Rodriguez-conception et al., 2001**) La coordination de la voie du MEP et de la voie de caroténoïdes a été montrée pour être impliquée dans la régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans les fruits de tomate ( **Lois et al., 2000**). Une étude précédente sur le flavedo du *Citrus clementina* a montré que le désoxylulose 5- phosphate synthase (DXS) et PSY, les enzymes premières de la voie MEP et voie de biosynthèse des caroténoïdes, respectivement, ont été impliqués dans le contrôle de la biosynthèse des caroténoïdes ( **Alos et al., 2006**) À ce jour, il n'y a pas de données sur la coordination de la voie du MEP et de la voie de caroténoïde pendant la biosynthèse des caroténoïdes dans les sacs de jus d'agrumes. Le Lycopène, caroténoïde rouge, est synthétisé par l'action de deux désaturases : phytoène désaturase (PDS), et ζ-carotène désaturase (ZDS)

en quatre étapes. La cyclisation du lycopène est un point de ramification : une branche mène à l' $\alpha$ -carotène et l'autre au  $\beta$ -carotène. La formation d' $\alpha$ -carotène nécessite



**Figure 17 :** La voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les chromoplastes des fruits. Les caroténoïdes sont écrits sous la couleur qu'ils apparaissent.

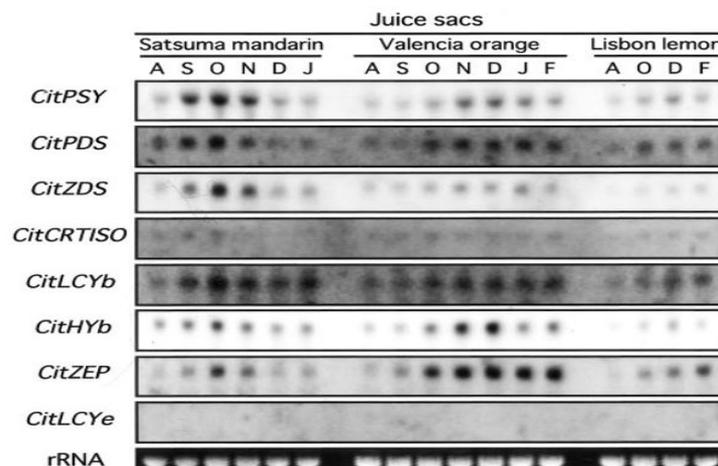
L'action de deux enzymes, la lycopène cyclase  $\epsilon$ -(LCY-e) et lycopène cyclase  $\beta$ -(LCY-b), alors que LCY-b convertit le lycopène en  $\beta$ -carotène en deux étapes. Selon **Ronen *et al.*, 1999** les étapes catalysées par les deux lycopène cyclases sont impliqués dans l'accumulation de lycopène dans les fruits de tomate. La synthèse de la  $\beta$ -cryptoxanthine, l'un des principaux pigments dans les poches de jus d'agrumes, est effectuée en deux étapes par LCY-b et de  $\beta$ -carotène hydroxylase (HY-b). Violaxanthine est synthétisé à partir de  $\beta$ -cryptoxanthine en trois étapes : une étape catalysée par HY-b et deux étapes de zéaxanthine époxydase (ZEP). Les gènes Hy-b et ZEP devraient jouer un rôle important dans l'accumulation de caroténoïdes différentiel dans les poches de jus de mandarine et de fruits orange ( **Kato *et al.*, 2004 ; Fanciullino *et al.*, 2006**) La violaxanthine est converti en néoxanthine par l'action de la synthase néoxanthine (NSY). Cependant, la néoxanthine n'apas été identifiée dans des sacs de jus de mandarine et d'orange ( **Kato *et al.*, 2006**) Le catabolisme de certains caroténoïdes dans l'accumulation des caroténoïdes influence principalement l'accumulation de cis violaxanthine.

L'enzyme dioxygénase 9-cis-epoxycaroténoïde (NCED), qui catalyse une étape limitante dans de la biosynthèse d'acide abscissique (ABA), a été montré pour être impliqué dans la régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans la pulpe des agrumes (**Kayo et al., 2004 ; Kita et al., 2007 ; Alquezar et al., 2009**).

### 3.1.2-La régulation et expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes

#### 3.1.2.1-Effet de la variété

Récemment, des gènes codant pour des enzymes pour les principales étapes du métabolisme des caroténoïdes ont été isolés et leur expression a été caractérisée dans les plantes (**Kato et al., 2004, 2006 ; Kita et al., 2007**). Au cours de la maturation des fruits, la régulation transcriptionnelle des gènes caroténoïdes semble être un important mécanisme par lequel la biosynthèse et l'accumulation des caroténoïdes spécifiques sont régulés (**Zhang et al., 2011**). Dans la tomate, il y a une augmentation de l'expression des PSY et PDS, et une diminution de l'expression des LCYb et LCYE ce qui a conduit à l'accumulation de lycopène pendant la maturation des fruits (**Pecker et al., 1996 ; Ronen et al., 1999**). Dans des études antérieures, il a été constaté que pendant la maturation des fruits, une augmentation simultanée de l'expression des gènes (CitPSY, CitPDS, CitZDS, CitLCYb, CitHYb et CitZEP) a conduit à une accumulation massive des  $\beta$ ,  $\beta$ -xanthophylles ( $\beta$ -cri, ZEA, et Vio) dans les flavedo et des sacs de jus de *Satsuma mandarin* et l'orange 'Valencia' (**Kato et al., 2004**). D'une autre part, l'expression de CitNCED2 et CitNCED3 dans la *Satsuma mandarin* et l'expression de CitNCED2 dans citron Lisbonne (Lisbon lemon) étaient principalement responsables de l'accumulation de l'ABA dans des sacs de jus, tandis que dans l'orange Valencia, le niveau extrêmement bas des CitNCED2 était principalement responsable du faible niveau de l'ABA (**Kato et al., 2006**).

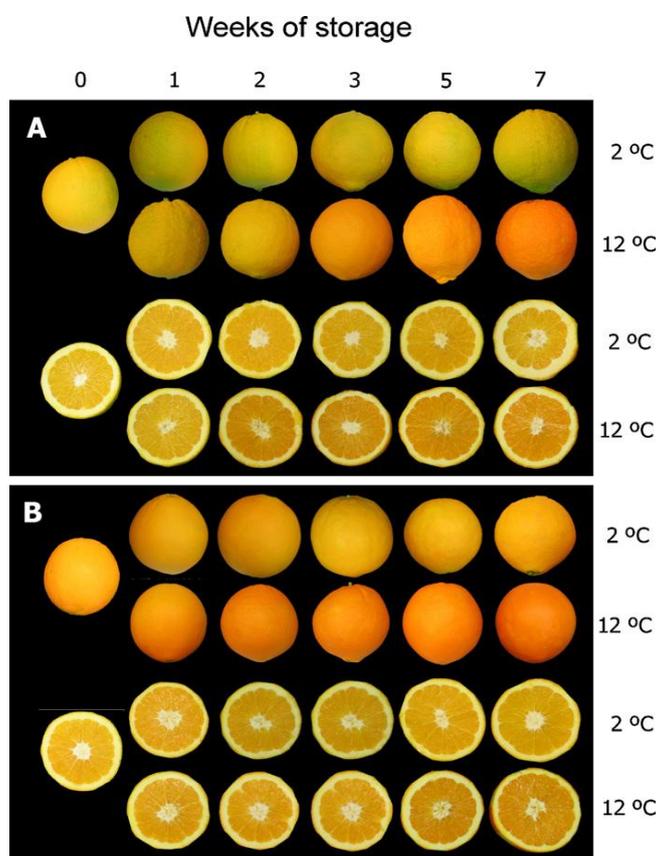


**Figure 18** :Analyse northern-blot d'expression des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes dans les sacs de jus de trois variétés de Citrus, mandarine Satsuma, orange Valencia,et citron Lisbonne pendant la maturation des fruits(Kato *et al.*, 2004).

### 3.1.2.2-Effet de la température

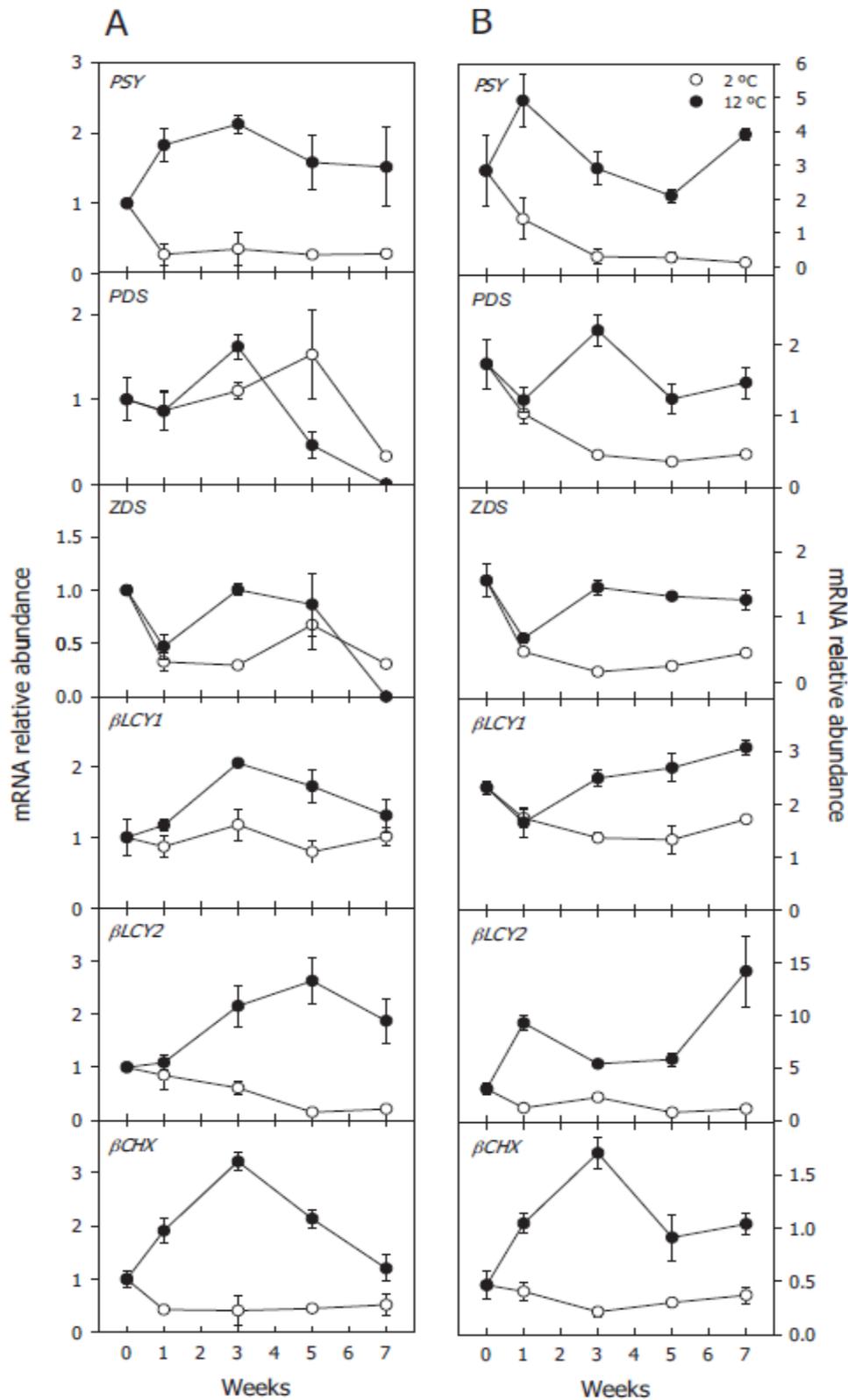
La température est l'un des facteurs environnementaux les plus importants qui affecte la couleur des fruits d'agrumes, et son effet au cours de la saison de croissance a été largement rapporté (Carmona *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2007). En général, la température élevée favorise une concentration élevée de chlorophylles et altère l'augmentation des caroténoïdes spécifiques (Young et Erickson, 1961; Agustí, 1999), principalement  $\beta$ ,  $\beta$ -xanthophylles et les apocaroténoïdes rougeâtres, par exemple  $\beta$ -citraurin, alors que les températures basses produisent des effets opposés, l'accélération et l'augmentation de de la teneur en caroténoïdes (Carmona *et al.*, 2012).

D'après le travail de Carmona *et al.*, (2012) étudiant l'effet de stockage à froid des oranges a montré qu'il y a une amélioration remarquable de la couleur de la peau et la pulpe des oranges stockés à 12 °C, et elle était plus évidente dans les fruits A. Dans les fruits stockés à 2 °C, pas de différences visuelles ont été observées par rapport aux fruits fraîchement récoltés.



**Figure 19** : L'apparence externe et interne des oranges 'Navelina' pendant stockage à 2 °C et 12 °C pendant 7 semaines. (A) Fruits cueillis avec un a/b ratio =  $-0.11 \pm 0.02$  et (B) fruit coloré avec un an a/b ratio =  $0.44 \pm 0.01$  (Carmona *et al.* 2012).

Pour une meilleure compréhension de ce constat, une analyse de l'expression des gènes au niveau de la peau et la pulpe a été réalisée. En général, l'expression des six gènes était plus élevée dans la peau et la pulpe des fruits stockés à 12 °C que dans ceux conservés à 2 °C (**Figure 19**), conformément à l'accumulation et la teneur des caroténoïdes observée dans les tissus stockés à la température plus élevée. De plus, Dans le flavedo et la pulpe de fruits fraîchement récoltés, l'expression de PSY, LCY1 et LCY2 a été, comme prévu, plus élevé dans les fruits de stade de maturité A. L'expression des gènes PDS, ZDS, LCY1, LCY2 et CHX a également augmenté lors de l'exposition à 12 °C, même avec des tendances différentes, alors qu'à 2 °C leur expression a été maintenue ou a légèrement diminué. Ces différences dans l'expression du gène dans les deux températures ont été associées à une concentration plus élevée de la  $\beta$ ,  $\beta$ -xanthophylles, anthéroxanthine et le C30 apocaroténoïde,  $\beta$ -citraurine. Ces résultats indiquent que l'accumulation de caroténoïdes à 12 °C est assez bien liée à la stimulation de l'expression du gène de caroténoïde dans la peau de fruits d'orange, qui initie une augmentation des précurseurs de la formation de la  $\beta$ , $\beta$ -xanthophylle. Ainsi, la stimulation de la caroténoïdogenèse pendant le stockage à 12 °C est susceptible d'être régulée principalement au niveau transcriptionnel dans la peau des fruits d'orange.



**Figure 20:** Analyse quantitative par RT-PCR de l'expression des genes PSY, ZDS,  $\beta$ -LCY1,  $\beta$ -LYC2 et  $\beta$ -CHX dans la peau

Concernant l'expression des gènes dans le flavébo, l'expression des gènes caroténogènes dans le flavédo des fruits aux deux stades de maturité a été très faible au cours du stockage à 2 °C, (**Figure 20**). Le motif des changements dans l'expression des gènes dans la pulpe de fruits orange stockés à 12 °C était différente de celle flavédo et dépend de la phase de maturité. Dans la pulpe du fruit Br l'expression de la plupart des gènes a montré une augmentation transitoire pendant le stockage à 12 °C, alors que dans les fruits Co au niveau des transcrits a diminué régulièrement. Malgré cette baisse, les niveaux de transcription de PSY et LCYs après 3 semaines de stockage étaient plus élevés chez Co que dans Br fruits (**Figure 20**), et peuvent expliquer la légèrement plus grande concentration de caroténoïdes individuels. En outre, la diminution de l'accumulation du transcrit pendant le stockage à 2 °C n'a pas été associée à des changements parallèles teneur en caroténoïdes dans la pâte. Ces écarts entre l'expression des gènes de caroténoïdes et de l'évolution de la teneur en caroténoïdes ont indiqué des mécanismes de régulation différentiels par rapport à la peau et l'implication d'autres facteurs réglementaires tels que la régulation post-transcriptionnelle, ou d'autres gènes ou enzymes telles que celles de la voie du MEP (**Matsumoto et al., 2009**). En conclusion, des résultats montrent que le stockage post-récolte des fruits orange 'Navelina' à une température intermédiaire (12 °C) stimule la coloration de peau et la pulpe et augmente la teneur totale en caroténoïde. Ces effets sur la peau sont principalement dus à l'augmentation de l'expression de gènes clés de biosynthèse de caroténoïdes. Les changements dans l'expression des gènes dans la pulpe étaient différents de celles de la peau, ce qui indique une influence de la phase de maturation à la récolte et la participation d'autres facteurs régulateurs. Fait intéressant, l'accumulation de  $\beta$ -cryptoxanthine, un caroténoïde avec pro-vitamine A, dans la chair a été spécifiquement promue à 12 °C, quelles que soient les stades de maturité, ce qui indique que la gestion et le stockage à cette température peut être une stratégie de post-récolte prometteuse pour augmenter les avantages nutritionnels et sanitaires d'agrumes.

Suggérer une modification

La partie pratique de notre travail a pour objectif la caractérisation phytochimique du jus d'orange sanguine en termes de teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes, anthocyanes, et caroténoïdes, et l'évaluation de son activité antioxydant en utilisant le test du pouvoir réducteur et le test DPPH. Les paramètres physico-chimiques du jus d'orange ont été également déterminés à savoir le pH, la teneur en eau, le Brix, la matière sèche et l'acidité titrable.

### **II.1. le matériel végétal**

Le matériel végétal qui a fait l'objet de notre expérimentation est l'orange sanguine (appelée orange "rouge" en Italie et en Espagne et orange "sang" en anglais) et qui est une variété d'orange commune méditerranéenne, fruit de l'oranger (*Citrus sinensis*), dont la couleur de pulpe tend vers le rouge sang. Les oranges utilisées ont été achetées sur le marché local de Bejaia en tenant compte de quelques critères :

- Des oranges de taille moyenne et saine ;
- Des oranges présentant une forte pigmentation en anthocyanes



**Une image d'orange sanguine**

### **II.2. Protocole expérimental (méthodes)**

#### **II.2.1. La réparation du jus d'orange sanguine**

Les oranges sanguines ont été lavées, coupées en deux, pressées à l'aide d'une presse jus manuel (contenant un filtre pour enlever la pulpe et la graine). Le jus ainsi récupéré a subi une deuxième filtration avec le papier filtre. Ensuite, le jus filtré obtenu a été mis dans des

bouteilles et conservé à -20°C. Avant traitement, le jus d'orange congelé est mis à 4°C (pour permettre une décongélation progressive).

### **II.2.2. Analyses physico-chimiques**

#### **II.2.2.1. Mesure de pH (NF V 05-108, 1970)**

Le pH permet de mesurer l'acidité ou la basicité d'une solution. Il est lié à la concentration en ions oxonium  $H_3O^+$  dans la solution. La valeur de pH du jus analysé est lue directement sur le pH mètre (pH 211 micro processor pH Meter) en plongeant directement l'électrode dans la solution du jus d'orange.

#### **II.2.2.2. L'activité de l'eau**

L'activité de l'eau est un paramètre qui caractérise la disponibilité d'eau "libre" dans une substance solide ou liquide. Elle donne des informations sur la stabilité chimique et microbiologique d'un produit. L'activité d'eau a été mesurée à l'aide du Aw mètre (Rotonic Hygropalm, model Aw-palm).

#### **II.2.2.3. Détermination du degré de Brix**

Le Brix exprime le pourcentage de la concentration des solides solubles contenus dans un échantillon (une solution aqueuse, jus ....etc). La mesure du degré de Brix est réalisée à température ambiante, à l'aide d'un réfractomètre (ABBE type refractometer AR12, doté d'un système de refroidissement). La lecture est faite sur une échelle spécifique et l'extrait sec soluble est exprimé en degré Brix (**Brat, 2001**).

#### **II.2.2.4. Détermination de l'acidité titrable**

##### **➤ Principe**

Le titrage de l'acidité d'une solution aqueuse de l'orange sanguine avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 0.1N) jusqu'à un pH de 8.1 à 8.2 (**NF V05-101 1974**).

##### **➤ Expression des résultats :**

$$N_{\text{acide citrique}} \times V_{\text{acide citrique}} = N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

$m_{\text{acide citrique}} \text{ (g/100g du jus)} = 0.064 \times V_{\text{NaOH}}$
--

Où :

N : normalité    M : masse en grammes,    V : volume en ml.

#### II.2.2.5. Test d'humidité

➤ **Principe**

La teneur en eau a été déterminée par séchage d'un échantillon de 5 g dans une capsule en porcelaine dans une étuve à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 3 heures, ensuite par palier de 30 minutes jusqu'à la stabilité du poids (Messaid, 2008).

➤ **Expressions des résultats**

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$\mathbf{H\% = \frac{(M1-M2)}{P} \times 100}$$

Où:

**H%** : Humidité.

**M1** : Masse de la capsule + matière fraîche avant séchage en gramme.

**M2** : Masse de l'ensemble après séchage en grammes.

**P** : Masse de la prise d'essai en grammes.

$$\mathbf{Matière\ sèche\% = 100 - H\%}$$

#### II.2.3. Analyses des composés phénoliques

##### II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux au Folin-Ciocalteu

➤ **Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ). Il est réduit,

lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, d'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

➤ **Mode opératoire**

L'extrait est dilué dans de l'eau distillé (à une concentration finale de 10%), pour obtenir une absorbance finale comprise entre 0.5 et 1. Pour réaliser le dosage, 750 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 10% dans de l'eau distillée) sont additionnés à 100µl à l'extrait dilué. Après 5 min d'incubation à l'obscurité, un volume de 750µl d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6%) est ajoutée (**Boizot et Charpentier, 2006**). Les tubes sont placés à l'obscurité pendant 90 min à température ambiante. Les absorbances sont mesurées à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Specto Scan 50 UV Visible Spectrophotomètre). La teneur totale en composés phénolique est mesurée en se référant à une courbe d'étalonnage d'acide gallique (annexe A).

### **II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes**

➤ **Principe**

Cette méthode utilise comme réactif le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). Les flavonoïdes contiennent des groupements hydroxyles (OH) libre qui, par chélation des métaux (fer et aluminium), forment des complexes de pigmentation jaunâtre. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes dans la solution (**Ribereau-Gayo, 1968**).

➤ **Mode opératoire**

La teneur des échantillons en flavonoïdes a été déterminée en utilisant la méthode de **Djeridane et al. (2006)**. 1.5ml d'extrait de jus a été mélangé avec 1.5ml de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2%. Après 15min de réaction à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 430nm. La concentration des flavonoïdes a été estimée à partir d'une courbe d'étalonnage à la quercétine (annexe A).

### **II.2.3.3. Dosage des anthocyanes**

➤ **Principe**

Le dosage des anthocyanes des extraits de l'orange sanguine a été déterminé par la méthode de pH différentiel utilisée par plusieurs auteurs (**Al-Farsi et al., 2005 ; Wrolstad et al.,**

2002 ; Cheel *et al.*, 2007). La méthode du pH-différentiel est basée sur le changement de la structure du chromophore d'anthocyane entre pH 1,0 et 4,5. Les anthocyanes monomériques subissent une transformation structurale réversible en fonction du pH (forme colorée d'oxonium à pH 1,0 et forme hemiacétale incolore à pH 4,5). La différence dans l'absorbance de ces pigments à 520 nm (visible max des anthocyanes) est proportionnelle à la concentration du colorant (Wrolstad *et al.*, 2002 ;AOAC,2005 ;Lee *et al.*,2005).

➤ **Mode opératoire**

La teneur en anthocyanes totales est mesurée en utilisant deux tampons : le chlorure de potassium (KCl) à pH 1,0 (0,025 M) et l'acétate de sodium (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na) à pH 4,5 (0,5 M). Ensuite, deux dilutions de l'échantillon à analyser, l'une avec le tampon pH 1,0 et l'autre avec le tampon pH 4,5 ont été préparées. Finalement, l'absorbance de l'échantillon dilué avec le tampon pH 1,0 et pH 4,5 sont déterminées pour les deux longueurs d'ondes : 520 nm et 700 nm.

L'absorbance de l'échantillon dilué (A) est comme suit :

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

D'où la concentration des pigments en anthocyanes monomères dans l'échantillon initial est calculée comme suit :

$$\text{Pigment d'anthocyane monomère (mg Equivalent cyanidine/litre)} = \frac{(AX MW X DF X 1000)}{\epsilon X 1}$$

Où :

**A** : L'absorbance de l'échantillon.

**MW** : Masse molaire de la cyanidine 3-glucoside) =449,2 g/mol.

**DF**: Facteur de dilution de l'échantillon.

**ε**: Coefficient d'extinction molaire = 26900 L.mol<sup>-1</sup>.

$10^3$ : le facteur de conversion de g à mg.

1: le trajet optique.

#### **II.2.3.4. Dosage des caroténoïdes**

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée selon la méthode de **Soto-Zamora et al. (2005)** avec quelque modification. 0.1 ml de l'échantillon avec 1 ml de solvant d'extraction (hexane/acétone/éthanol, 5, 5/2, 5/2), ce dernier est récupéré dans une ampoule à décanter, après agitation, on laisse le mélange se reposer et lors de la séparation des deux phases, la phase hexanique supérieure est récupérée et protégée de la lumière par du papier aluminium. La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance de la phase hexanique à 450 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de  $\beta$ -carotène par 100 g de l'échantillon en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe A).

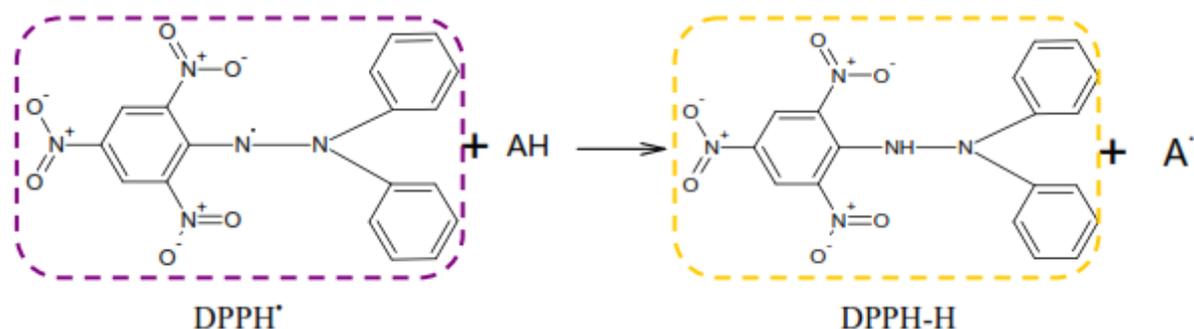
#### **II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante**

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante du jus d'orange sanguine à savoir le test DPPH et le test pouvoir réducteur.

##### **II.2.4.1. Le test DPPH**

###### **➤ Principe**

Le radical libre 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) est utilisé pour déterminer l'activité antiradicalaire du jus d'orange sanguine. L'activité anti radicalaire de l'échantillon est déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical diphénylpicryl-hydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), suite à un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouve dans le milieu réactionnel (Figure 21). La réaction de réduction du DPPH provoque la diminution de l'intensité de la couleur violette qui est mesurée par un spectrophotomètre à 515 nm (**Guimarães et al., 2010**).



**Figure 21:** Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant (AH) et le radical DPPH.

Le protocole utilisé dans cette méthode est celui du **Roberta *et al.*, 1998**. Il consiste à mélanger 3 ml de la solution DPPH (60  $\mu\text{M}$ ) avec 0,1 ml de l'extrait à différentes concentrations (0,12, 0,19, 0,38 et 0,64  $\text{mg mL}^{-1}$ ). La mesure de la réaction de réduction de la solution du DPPH a été faite à 515 nm après une incubation pendant 20 min à 37 °C. Le pourcentage de l'activité Scavenger de l'échantillon est calculé par la formule suivante :

$$P_{\text{sc}} \% = (A_{\text{DPPH}\bullet} - A_{\text{éch}} / A_{\text{DPPH}\bullet}) \times 100$$

Où :

$P_{\text{sc}}$  : pourcentage Scavenger

$A_{\text{DPPH}\bullet}$ : Absorbance de la solution DPPH $\bullet$  seul à 515 nm

$A_{\text{éch}}$  : Absorbance de la solution DPPH $\bullet$  avec l'extrait à 515 nm

#### II.2.4.2 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur se base sur la réaction d'oxydoréduction. C'est l'aptitude des antioxydants présents dans l'échantillon à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de complexe ferricyanure [ $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en présence d'un agent chromogène (KCN). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir de l'extrait (**Ribeiro *et al.*, 2008 ; Guimarães *et al.*, 2010**).

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode **d'Oyaizu (1986)** rapportée par **Kumar *et al.* (2005)**. Un volume de 1 ml de l'extrait, à différentes concentrations (0,12, 0,16, 0,19, 0,32 et 0,64  $\text{mg mL}^{-1}$ ), est ajouté à 2,5 ml de tampon phosphate (pH 6,6 ; 0,2 M), suivi de 2,5 ml de ferricyanure de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] à 1 %. Après agitation, le mélange est soumis à l'incubation dans un bain marie à 50°C pendant 20 min. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont additionnés au mélange réactionnel. Par la suite, un volume de 2,5 ml de surnageant est

ajouté à 2,5 ml d'eau distillée, puis 0,5 ml de chlorure ferrique à 0,1% est ajouté au mélange. Les absorbances sont mesurés à 700 nm.

#### **II.2.5. Analyse statistique**

Une analyse descriptive des résultats de trois essais a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2010.

## II. Résultats et discussion

Le jus d'orange sanguine étudié a été caractérisé en termes de paramètres physicochimiques, composition phytochimique et activités anti oxydantes.

### III.1. La Caractérisation physico-chimique du jus d'orange sanguine

Les résultats de l'analyse des différents paramètres physico-chimiques du jus d'orange sont résumés dans le tableau VII.

**Tableau VI** : La composition physicochimique du jus d'orange sanguine.

Paramètre analysés	Jus d'orange sanguine
pH	3,82 ± 0,01
Brix (°Brix) (g/100g)	11,8 ± 2,17
Matière sèche (%)	6,2
Teneur en eau	0,82 ± 0,02
Acidité titrable (g d'acide/100g)	1,88 ± 0,04

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ ) ± écart type

Selon le tableau VI, le jus d'orange analysé présente un pH acide (pH=3,82) et qui supérieur à celui retrouvé dans l'orange sanguine turque (pH =3,05) analysé par **Kelebek et al. (2008)**.

La détermination de l'acidité titrable du jus d'orange analysé présente une valeur de 1,88 g d'acide acétique /100g de jus et qui est 1.7 fois supérieure à celle retrouvée dans les travaux de **Kelebek et al. (2008)** et **Moufida et Marzouk, (2003)** dans le cas de l'orange sanguine turque et tunisienne avec des valeurs de 1,1 g d'acide /100g et 1,01 g d'acide/100g respectivement. Toutefois, on note une faible teneur en matières solides solubles exprimé en degré Brix (11,8° Brix) par rapport à celle trouvée par **Kelebek et al., (2008)** (12,6 degré Brix) et au voisinage de celle obtenue par **Kirca et Cemeroglu, (2003)**, qui est de 11,20.

Ces différences observées dans les paramètres physicochimiques pourraient être dues aux divers facteurs à savoir la composition phytochimique, la variété, le stade de maturation...(Caro et al., 2004).

### III.2 La caractérisation phytochimique du jus d'orange sanguine

Les résultats de l'analyse phytochimique sont résumés dans le tableau VII.

#### III.2.1. Polyphénols

Les polyphénols sont des groupes de métabolites secondaires largement distribués dans les plantes, légumes et fruits, et dans une série de boissons telles que le jus de thé, le vin, et le jus de fruit (Mahdavi *et al.*, 2010). Le dosage des polyphénols du jus d'orange sanguine par le test de Folin-Ciocalteu, a révélé une teneur de 50 mg EAG /100 g du jus. Ce résultat est en accord avec les travaux d'Iness *et al.* (2013) qui ont trouvé une valeur de 47.38 mg EAG/100g de jus. Néanmoins, Agcam *et al.* (2014) ont rapporté une teneur en composés phénoliques totaux de jus qui varie de 43,90 mg EAG/100g à 44,34 mg EAG/100g, et ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés dans la présente étude.

**Tableau VII :** La composition du jus d'orange sanguine en polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes et caroténoïdes.

Paramètre analysés	Jus d'orange sanguine
Polyphénols (mg EAG/100 g)	50,11 ± 4,71
Flavonoïdes (mg rutine/100 g jus)	2,67 ± 0,05
Anthocyanes (mg Eq malvidine /100 g jus)	40,52 ± 3,76
Caroténoïdes (mg Eq β-carotène /100 g jus)	0,58 ± 0,2

*Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3) ± écart type*

#### III.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une grande classe des composants polyphénoliques présents chez les végétaux ayant des effets bénéfique sur la santé (Erdman *et al.*, 2007). Les résultats

du dosage des flavonoïdes de l'échantillon étudié, déterminé par la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) sont exprimés en mg équivalent quercétine/100g de jus d'orange.

Le teneur en flavonoïdes dans le jus analysé est de 2.67 mg/ EQ/100 g et qui inférieure à celle rapporté par **Velázquez et al. (2013)** qui ont obtenus une valeur de 12.28 mg EQ/100g. La différence de la teneur en flavonoïde est préalablement due aux conditions environnementales (la lumière, saison),, la maturation et la différence entre les variétés (**Enayde et al., 2006**).

### III.2.3. Anthocyanes

La teneur en anthocyanes du jus d'orange sanguine a révélé une valeur de 40,52 mg E malvidine/100 g de jus. Cette teneur avoisine celle trouvée par **Kelebek et al. (2008)** qui est de 43,07mg/100g et elle est inférieure à celle trouvée par **Cisse et al., (2009)** qui est 98 mg/l.

### III.2.4. caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels présents dans les aliments d'origine végétale, et sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques tels que l'acétone, l'hexane etc (**Rodriguez-Amaya, 2010**).

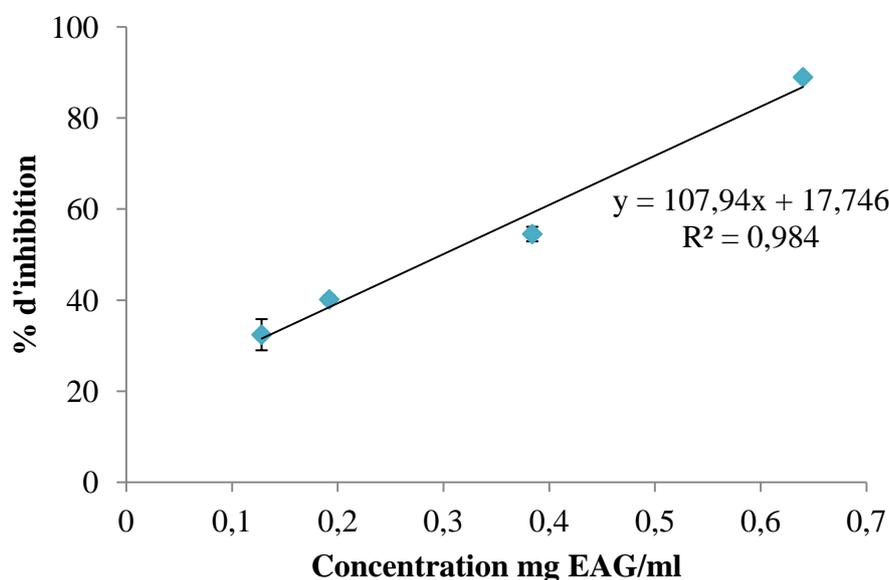
Les résultats du dosage des caroténoïdes obtenus, déterminés par la méthode décrite par (**Zamora et al., 2005**) et exprimés en  $\mu g$  d'équivalent de  $\beta$ -carotène/100g de jus d'orange, a révélé une teneur de 0.58 mg/100 g de jus. Selon les travaux de **Gardner et al. (2000)**, et **Tosun et Ustun, (2003)**, la teneur en caroténoïdes du jus d'orange (0,34mg/100g de jus) est inférieure à celle trouvé dans la présente étude, qui est de 0,58 mg/100g de jus. L'étude de **Lee (2001)** sur les jus des variétés d'orange a rapporté des teneurs comprises entre 0.38 et 0,57 mg/100g, ce qui est en accord les résultats obtenus dans notre travail.

## III.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Il y'a différents antioxydants dans les fruits et il est très difficile de mesurer chaque antioxydant séparément. Par conséquent, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer toute l'activité antioxydante des extraits des fruits ou d'autre tissus des plantes (**Guo et al., 2003**). Dans le présent travail, l'activité antioxydante du jus d'orange sanguine a été déterminée par deux méthodes : le test DPPH et le pouvoir réducteur.

### III.3.1 Test DPPH

Le composé chimique 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Popovici *et al.*, 2009). Cette méthode est recommandée par de nombreux auteurs car elle est facile et précise pour mesurer l'activité antioxydante de jus d'orange et d'autres fruits (Villano *et al.*, 2007). La méthode est basée sur la capacité des composés antioxydants à agir en tant que piègeurs des radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène (Diouf *et al.* 2009 ; Sharma et Bhat, 2009). Pour évaluer le pouvoir antioxydant du jus d'orange sanguine, nous avons testé une gamme de concentration. Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits à des concentrations différentes et exprimées en pourcentage d'inhibition sont illustrés dans la figure 22.



**Figure 22 :** Le pouvoir antioxydant du jus d'orange sanguine vis-à-vis du radical DPPH.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ )  $\pm$  écart type

Selon la figure 22, on peut constater que le pouvoir antioxydant présente un effet dose dépendant avec une corrélation  $R^2 = 0,984$  : plus la concentration augmente, plus le pourcentage d'inhibition augmente également. En effet, le passage d'une concentration de 0,1 mg EAG/mL à 0,65 mg EAG/mL a permis une augmentation du pouvoir d'inhibition de 60 %. Cela signifie d'une part que dans le jus d'orange, il y a des substances pouvant réduire le radical DPPH tels que les flavonoïdes et les anthocyanes dont l'activité antioxydante est rapportée dans plusieurs travaux. D'une autre part, ce résultat confirme la relation activité

antioxydante-teneur en antioxydants comme rapporté précédemment dans divers travaux (Dairi *et al.* 2014).

IC<sub>50</sub> est une valeur qui exprime la quantité d'antioxydants nécessaires pour réduire la concentration du radical de 50%, et il est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé (Villano *et al.*, 2007), plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est faible, plus l'activité antioxydante est importante. La valeur d'IC<sub>50</sub> de notre échantillon est de 0.298 mg EAG ml<sup>-1</sup> du jus (Figure 23) et cela correspond aux résultats trouvés dans le jus d'orange et Sanguine (0,29 mg/ml) analysé par (Kelebek *et al.*,2008).

Une comparaison de l'activité antioxydante de notre échantillon du jus avec les standards BHA et tocophérol (figure 23) montre que ces derniers possèdent un pouvoir Scavenger plus important que l'échantillon analysé. En effet, différentes études ont montré que les antioxydants purs sont plus efficaces que des mélanges de polyphénols lorsque des modèles antioxydants simples, qui mettent en évidence qu'un seul mécanisme d'action sont utilisés (Dairi *et al.*, 2014). Par conséquent, pour une meilleure estimation du pouvoir antioxydant d'un échantillon dont la composition est complexe, il est nécessaire d'utiliser d'autres méthodes permettant de mettre en évidence plusieurs mécanismes d'action.

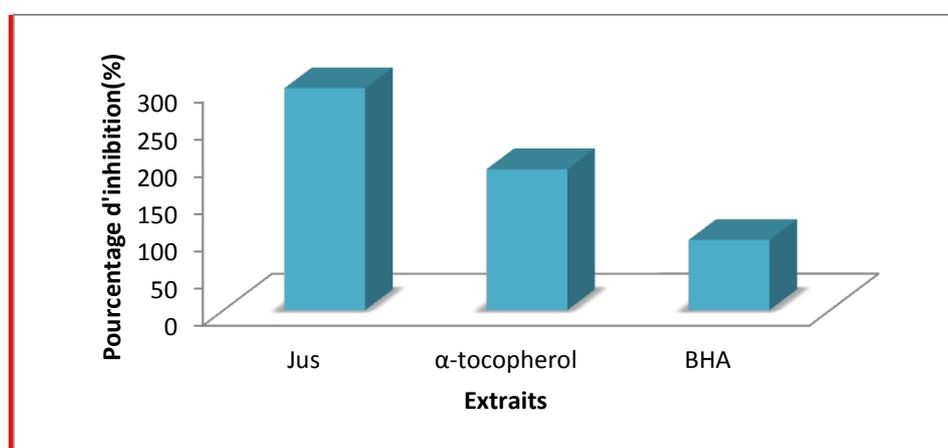
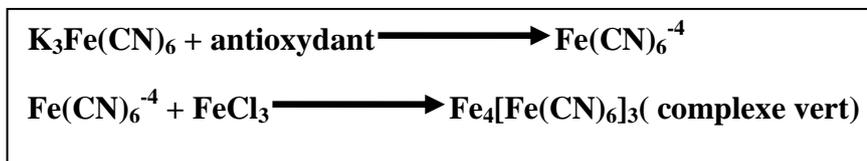


Figure 23. L'activité antiradicalaire du jus, α-tocophérol et BHA.

### III.3.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à donner un électron et à réduire le fer (Gulçin, 2010). De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (Huang *et al.*, 2005). En effet, les

composés antioxydants réduisent le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  par leur capacité réductrice. Le complexe vert est formé par l'addition de  $\text{FeCl}_3$  à la forme ferreux selon la réaction suivante (Koksal *et al.*, 2011).



Le pouvoir réducteur du jus d'orange sanguine est déterminé par la mesure de l'absorbance à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur (Ribeiro *et al.*, 2008). La figure 24 montre que l'absorbance augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève ce qui correspond à un effet dose dépendant ( $R^2=0,98$ ) comme constaté dans le test DPPH. En effet, le passage d'une concentration de 0,128mg/ml à une concentration de 0,64mg/ml a permis une augmentation du pouvoir réducteur de 70%. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de composés donneurs d'électrons qui entraînent la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  (Moral et Jimenez-Perez, 2001).

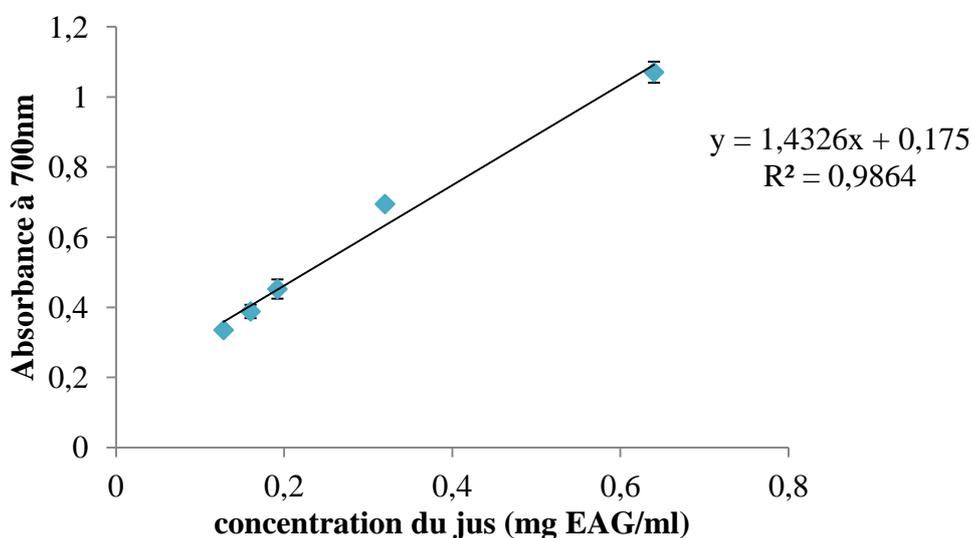


Figure 24. Le pouvoir réducteur du jus d'orange sanguine.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ )  $\pm$  écart type

L'importance des pigments de l'orange sanguine et particulièrement les anthocyanes est due à la fois à leur impact sur les caractéristiques organoleptiques des oranges sanguines qui peuvent influencer sur leur comportement technologique lors de l'extraction et de la transformation du jus, et à l'effet bénéfique sur la santé humaine. Les travaux expérimentaux de plusieurs groupes de recherche a conduit à améliorer suffisamment la connaissance de la façon dont les anthocyanes et les caroténoïdes sont synthétisés dans les oranges sanguines, ainsi que la façon dont ces voies de biosynthèse sont régulées au niveau transcriptionnel par des facteurs génétiques et environnementaux. En effet, dans la biosynthèse des anthocyanes les enzymes PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, F3'H, F3'5'H, FLS, DFR, ANS et UFGT ou 3-GT sont impliqués dans les différentes réactions métaboliques et qui sont régulés par un complexe appelé Ruby, et leur niveau d'expression dépend largement de type de la variété, le stade de maturité et la température. Ce dernier facteur a montré un effet inducteur de la biosynthèse des anthocyanes en augmentant grandement le niveau d'expression du facteur de transcription Ruby dans les oranges stockés à des basses températures. Concernant les caroténoïdes, il a été trouvé que la production des violoxanthines, les principaux caroténoïdes dans l'orange sanguine, fait appel à plusieurs gènes à savoir Psy, PDS, ZDS, LCY-e, LCY-b, HY-b, ZEP et Nsy. Le niveau et le type d'expression de ces gènes dépend largement de la variété et le stade de maturation. De plus, la température basse a montré avoir un effet sur l'amélioration remarquable de la couleur de la peau et la pulpe des oranges stockées à basse température, et elle était plus évidente dans les fruits précocement mures. Cela a été confirmé par l'augmentation des niveaux d'expression des gènes Psy, LCY, CHX dans la peau et la pulpe de l'orange stockés à froid. Tous ces résultats montrent que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la qualité de l'orange sanguine.

L'analyse phytochimique de l'orange sanguine montre que ce fruit est riche en composés phénoliques et particulièrement en anthocyanes et pour cela il pourrait être une source importante d'antioxydants naturels.

En perspectives, il y a encore beaucoup d'aspects qui doivent être clarifiées quant à l'expression des anthocyanes et des caroténoïdes dans l'orange sanguine, et il serait intéressant de concentrer les prochains efforts sur l'identification des gènes impliqués dans la modification des anthocyanines (comme l'acylation), et l'étude des facteurs abiotiques qui peuvent induire l'accumulation de ces pigments. A l'échelle locale, il serait intéressant d'identifier les gènes qui participent à la modulation des anthocyanes ou les caroténoïdes ainsi que l'effet des différents facteurs environnementaux (climat, température, altitude,

salinité du sol...) dans notre pays pour une amélioration de la qualité des fruits dans la culture d'orange sanguine.

**A**

**Agcam, E., Akyildiz, A. and Everendilek, A.G. (2014).** Effects of PEF and pasteurization on PME activity in orange juice with regard to a new inactivation kinetic model. *Food chemistry*, 165 :70-76.

**Agustí, M. (1999).** Preharvest factors affecting postharvest quality of citrus fruit. *Advances in postharvest diseases and disorders control of citrus fruit. Trivandrum: Research Signpost*, 1-34.

**Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M. and Shahidi, F. (2005).** Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and Sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L). Varieties grown in Oman. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 53 (19) :7592-7599.

**Allen, D. J. & Ort, D. R. (2001).** Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in plant science*, 6(1), 36-42.

**Alós, E., Cercós, M., Rodrigo, M. J., Zacarías, L. & Talón, M. (2006).** Regulation of color break in citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4888-4895.

**Alquezar, B., Rodrigo, M. J. and Zacarías, L. (2008).** Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry*, 69(10) : 1997-2007

**An XH Tian, Y., Chen, K.Q., Wang, X.F. and Hao, Y.J. (2012).** The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB protein to regulate anthocyanin accumulation. *J Plant Physiol*, 169: 710-717.

**AOAC. (2005).** Total Monomeric Anthocyanin pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines.

**B**

**Berlinet, C. (2006).** Etude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la qualité du jus d'orange. Thèse DOCTORAT. Agro Paris Tech. P 224

**Bernardi, J., Licciardello, C., Russo, M. P., Chiusano, M. L., Carletti, G., Recupero, G. R. & Marocco, A. (2010).** Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening. *Journal of plant physiology*, 167(4), 301-310.

**Boyd, B., Koepke, M.C., Gary, K., Horn, E., Mcanalley, S. and Mcanalley, B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *glycoScience et Nutrition*, 7p.

**Brat, P. (2001).** Application du procédé de flash-détente (P) sous vide aux fruits tropicaux et méditerranéens pour la préparation de purées et huiles essentielles Th : Doctoral en Science Alimentaire, université de la réunion, 149.

**Boizot, N. et Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA* :79-82.

**Brouillard, R. (1993).** The Flavonoids, Advances in research since 1986, Ed J. B. Harborne. Chapman and Hall, London.

**Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie. phytochimie. Plantes médicinales. 3ème édition, Lavoisier. Paris.

**Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P. & Martin, C. (2012).** Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *The Plant Cell*, 24(3), 1242-1255.

### C

**Caro, D., Piga, A., Vacca, V. and Agabbio, M. (2004).** Changes of flavonoids, Vit C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juice during storage. *Food chemistry*, 84(1) : 99-105.

**Carmona, L., Zacarías, L., & Rodrigo, M. J. (2012).** Stimulation of coloration and carotenoid biosynthesis during postharvest storage of 'Navelina' orange fruit at 12 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 74:108-117.

**Cavalcanti, R. N., Santos, D.T. et Meireles, M.A.A. (2010).** Non thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-an overview. *Food Research International*, 44(2), 449-509.

**Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. & Galán-Vidal, C. A. (2009).** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871.

**Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez, J.A., Caligari, P.D. and Schmeda, H.G. (2007).** Free radical scavenging activity and Phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *Chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. *Food Chemistry*, 102(1):36-44.

**Chen, C., Piero, A.R.L., & Gmitter Jr, F. (2015).** Pigments in Citrus. In *Pigments in Fruits and Vegetables*, 165-187.

**Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuique-Mayer, C. and Dornier, M. (2009).** Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins From Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using The Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 57:6285-6291.

**Cotroneo, P.S., Russo, M.P., Ciuni, M., Recupero, G.R. & Piero, A.R.L. (2006).** Quantitative real-time reverse transcriptase-PCR profiling of anthocyanin biosynthetic genes during orange fruit ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(4), 537-543.

**Crifò', T., Puglisi, I., Petrone, G., Reforgiato Recupero, G. and Lo Piero, A.R. (2011).** Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: implication of the flavonoid biosynthetic pathway, 476, 1-9.

**Cultrone, A., Cotroneo, P. S., & Recupero, G. R. (2010).** Cloning and molecular characterization of R2R3-MYB and bHLH-MYC transcription factors from *Citrus sinensis*. *Tree genetics & genomes*, 6(1), 101-112.

**D**

**D'Auria, J. C. (2006).** Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 331-340

**Davies, F.S., Albrigo, L.G. (1994).** Fruit quality, harvesting and postharvest technology. In *Citrus*. Atherton J., Rees, A., Eds. Crop Production Science in Horticulture. CAB International

**de Vetten, N., Quattrocchio, F., Mol, J. & Koes, R. (1997).** The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes & Development*, 11(11), 1422-1434.

**Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T. & Hamdi, S. (2006).** Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant physiology*, 140(2), 499-511.

**Delia, B. and Amaya, R. (1997).** Carotenoids and food preparation the retention of provitamine a carotenoids in prepared, processed, and stored food :99 p.

**Dionne, J .Y. (2002).** Les caroténoides. Québec pharmacie. 19(9) :800-804.

**Diouf,P.N., Stevanovic, T., and Cloutier, A.(2009).**Study on chemical composition ,antioxydant and anti –inflammatory activities of hot water extract from piceamariana bark and itsproanthocyanidin-rich fractions . *Food chemistry*,133:897-902.

**Dutta, D.,Chaudhui, U.R .and Chakraborty, R . (2005) .** Structure , health benefits, antioxidant properties and processing and storage of caroténoids . *African Journals of Biotechnology* ,4(13) :1510-1520.

**E**

**El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., et Young, A. J. (2004).** Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,430(1) :37-48 .

**Enayde, D.A., Lima, V. and Maciel, M. (2006).** Polyphenol, ascorbic acide and total carotenoids contents in common fruit and vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*. 9(2):89-94.

**Erdman, J.w., Balentine, D., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Hornly, J., Hollman, P., Keen, C.L.,Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., William, G. and Burrawes, J. (2007).** Flavonoids and heart health ;proceeding of the IESI North America flavonoids

workshop May 31-June 1,2005.Washington, DC 1-4. *American society for nutrition*, 137 :718-737.

*F*

**FAO. (2003).** Medium-term Prospects for agricultural Commodities: Projections to the year 2010 (Vol.1). Rome (Italy): Food and Agricultural Organization of the United nations.

**Fanciullino, A.L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Casanova, J., Morillon, R. and Ollitrault, P. (2006).** Carotenoid diversity in cultivated Citrus is highly influenced by genetic factors. *J. Agric. Food Chem*, 54, 4397-440.

**Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Grolier, P., Le Moel, G., Steghens, J. P. and Nabet, F. (1999).** Les caroténoïdes: 1. Métabolisme et physiologie. In *Annales de biologie clinique*, 57(2) : 169-183.

*G*

**Gardner, P.T., White, T.A.C, Mcphail, D.B. and Duthie, G.G. (2000).** The relative contributions of vitamine C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food chemistry*, 68 :471-474.

**Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. and Jiang, y. (2003).** Antioxidant activities of peel, pulp and seed fraction of commom fruits as détermined by FRAP Assay. *Nutrition Research* 23:1719-1726.

*H*

**Huang, D.j., Hsien, J.C., Chun-Der, L.I.N. and Yaw-Huei, L.I.N. (2005).** Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (Ipomoea aquatic Forsk ) constituents . *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46:99-106.

**He, F., Mu, L., Yan, GL., Liang, N.N., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J. and Duan, C.Q. (2010).** Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes, 15(12):9057-9091.

**Hendrix C. M., Redd J. B. et Ashurst P. R. (1995).** Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products. In : « Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages ». Ed. Blackie Academic & Professional. pp. 53-87.

**Hernandez, J.M., Heine, G.F., Irani, N.G., Feller, A., Kim, M.G., Matulnik, T., Chandler, V.L. and Grotewold, E. (2004).** Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor C1. *J Biol Chem*, 279: 48205-48213.

**Hirschberg, J. (2001).** Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current opinion in plant biology*, 4(3), 210-218.

**Howe, K.M. and Watson, R.J. (1991).** Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-mybprotein. *NucleicAcidsRes*, 19: 3913-3919.

**Hubbermann ,E.M.,Stockmann, H.et Schwarz, K.(2010) .**Influence of different ingredients on the color stability of black currant anthocyanins .*Institute Of Humain Nutrition And Food Science* :4p .

**Hurst , W.J.(2002).** Methods of analysis for Functional Food and Nutraceuticals. *CRC press* :101-156.

**J**

**Joseph, A.A., Shukitt-Hale, B. and Willis, L.M. (2009).** Grape Juice, berries, and walnuts affect brain aging and behavior. *The Journal of Nutrition*, 139, 1013 – 1017.

**K**

**Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H. & Yano, M. (2006).** The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany*, 57(10), 2153-2164.

**Kelebek, H., Canbas, A., and Selli, S. (2008 ).** Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs.Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis(L).Obeck*)grown in Turkey. *Food Chemistry*,107(4):1710-1716.

**Kelebek, H., Canbas, A., and Selli, S. (2008 ).** Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs.Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis(L).Obeck*)grown in Turkey. *Food Chemistry*,107(4):1710-1716.

**Kimball, A. D. (1999).** Description of Citrus Fruit. In : « Citrus Processing : A Complete Guide ». Ed. *An Aspen Publication*. pp. 7-35.

**Kirca, A. and Cemeroglu, B. (2003).** Degradation kinetics of anthocyanins in blood juice and concentrate. *Food chemistry*, 107: 1710-1716.

**Kita, M., Kato, M., Ban, Y., Honda, C., Yaegaki, H., Ikoma, Y. & Moriguchi, T. (2007).** Carotenoid accumulation in Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold & Zucc.): molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(9), 3414-3420.

**Kitamura, E., Blow, J. J., & Tanaka, T. U. (2006).** Live-cell imaging reveals replication of individual replicons in eukaryotic replication factories. *Cell*,125(7), 1297-1308

**Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Dikici, E., Tozoglu , F. and Gulcin, I. (2011).** Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves . *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(2): 217-222.

**Kong ,J.M.,Chiaa ,L.S.,Goha,N.k.,Chiaa,T.F.and Brouillardb,R.(2003).**Analysis and biological activities of anthocyanins .*Phytochemistry* ,64:923-933.

**L**

**Lee, H.S. (2001).** Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 :2563-2568.

**Lee, J., Durst, R. W. & Wrolstad, R. E. (2005).** Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 88(5), 1269-1278.

**Li, S. (2014).** Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. *Plant Signal Behav*, 9(1):e27522.

**Licciardello, C., Russo, M.P., & Recupero, R.G. (2008).** Identification of differentially expressed genes in the flesh of blood and common oranges. *Tree Genetics & Genomes*, 4(2), 315-331.

**Lo Piero, A.R. (2015).** The State of the Art in Biosynthesis of Anthocyanins and Its Regulation in Pigmented Sweet Oranges [(Citrus sinensis) L. Osbeck]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(16), 4031-4041.

**Lois, L. M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., & Boronat, A. (2000).** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal*, 22(6), 503-513.

**Lucheta, A.R., Silva-Pinhati, A.C.O, Basilio-Palmieri, A.C., Berger, I.J., Freitas-Astua, J., Cristofani, M. (2007)** . An in silico analysis of the key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Citrus sinensis*. *Genet Mol Biol*, 30(3):819–831.

**M**

**Macheix, J.J., Fleureit, A. et Jay-Allemand, C. (2005)** . Les composés phénoliques des végétaux. CH-1015 Lausanne. 2-88074-625-6.

**Maccarone, E., Rapisarda, P., Fanella, F., Arena, E. and Mondello, L. (1998).** Cyanidin-3-(6"-malonyl)- beta-glucoside. One of the major anthocyanins in blood orange juice. *Ital J Food Sci*, 10(4):367–372.

**Mahdavi, R., Nikniaz, Z., Rafrat, M., and Jouyban, A. (2010).** Determination and comparison of total polyphenol and vitamin C contents of natural fresh and commercial fruit juices. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(10) : 968-972.

**Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N. & Hasegawa, Y. (2009).** Effect of postharvest temperature and ethylene on carotenoid accumulation in the flavedo and juice sacs of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4724-4732

**Messaid, H. (2008).** Optimisation du processus d'immersion-rehydratation du système dattes seches -jus d'orange. Thèse MAGISTER. Université M'hamed Bougura Boumerdes. P. 74.

**Mol, J., Grotewold, E. and Koes, R. (1998).** How genes paint flowers and seeds. *Plant Science*, 3: 213-217.

**Morais, H., Abram, A. and Ferreira, F. (2002).** Carotenoids biosynthesis-a review. *Revista Uusofona*, 7 :22-42.

**Morales, F.J ; Jimenez-Perez, S. ( 2001).** Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food chem* 72: 119-125.

**Moriguchi, T., Kita, M., Tomono, Y., Endo-Inagaki, T. and Omura, M. (2001).** Gene expression in flavonoid biosynthesis: correlation with flavonoid accumulation in developing citrus fruit. *Physiol Plantarum*, 111(1):66–74.

**Moufida, S. & Marzouk, B. (2003).** Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*,62(8), 1283-1289.

**Muccilli, V.,Licciardello, C., Fontanini, D., Russo, M.P., Cunsolo, V., Saletti, R., Recupero, G.R., Foti, S. (2009).** Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *J Proteomics*, 73(1):134-152.

O

**Ogata, K., Morikawa, Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. (1994).** Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, 79: 639-648.

**OPiero, A.R., Puglisi, I. and Petrone, G. (2006).** Gene characterization, analysis of expression and in vitro synthesis of dihydroflavonol 4-reductase from [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Phytochemistry*,67(7):684–6950.

**Oren-Shamir, M. (2009).** Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science*,177(4):310-316.

**Oyaizu, M. (1986).** Studies on Product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of nutrition*, 44: 307-315.

P

**Piero, A. R. L., Puglisi, I. & Petrone, G. (2006).** Gene characterization, analysis of expression and in vitro synthesis of dihydroflavonol 4-reductase from [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Phytochemistry*, 67(7), 684-695.

**Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham Jr, F. X. & Hirschberg, J. (1996).** Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$ -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant molecular biology*, 30(4), 807-819.

**Popovici, C., Saykova, I. and Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.

Q

**Quattrocchio, F., Wing, J.F., Leppen, H.T.C., Mol, J.N.M and Koes, R.E. (1993)**  
.Regulatory Genes-Controlling Anthocyanin Pigmentation Are Functionally Conserved among Plant-Species and Have Distinct Sets of Target Genes. *Plant Cell*,5: 1497-1512.

R

**Rahim, M.A., Busatto, N. and Trainotti, L. (2014).** Regulation of anthocyanin biosynthesis in peach fruits. *Planta*, 240(5):913-29.

**Rao, A.V. and Rao, L.G.(2007).** Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55: 207-216.

**Rapisarda, P., Bellomo, S.E. and Intelisano, S. (2001).** Storage temperature effects on blood orange fruit quality. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3230-3235.

**Ribereau-Gayon, P. (1968).** Notion générale sur les composés phénoliques .In :Les composés phénoliques des végétaux .Ed .Dunod .1-40.

**Ribeiro, S.M.R., Barbosa, L.C.A., Queiroz, J.H., Knodler, M. and Schieber, A. (2008).** Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties .*Food Chemistry*, 110(3): 620-626.

**Richter, G. (1993).** Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. 5<sup>ème</sup> édition : 73-74.

**Rodriguez-Amaya, D. B. (2001).** A guide to carotenoid analysis in foods. International Life Science Institute Press, 65.

**Rodríguez-Concepción, M. & Boronat, A. (2002).** Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, 130(3), 1079-1089.

**Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. & Hirschberg, J. (1999).** Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant Journal*, 17(4), 341-351.

**Roy ,H.J . ,Lundy,S.,Eriksen,C.and Kalicki,B.(2009).** Anthocyanins .Healthier lives through education in nutrition and preventive medicine .1.

### S

**Samouelian, F.,Gaudin, V.et Boccara , M.(2008).**Génétique moléculaire des plantes .Ed.Quae.P:21-22.

**Sanchez Moreno,C. Plaza, L., de Ancos,B. and Cano,M.P.(2003).**Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices.*Journal of the Science of Food and Agriculture*,83(5),430-439.

**Sandmann,G.(2001).** Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of biochemistry and biophysics*, 385(1), 4-12.

**Saunt J. (1990).** Citrus varieties of the world : an illustrated guide. Saunt J., Ed. Sinclair International.

**Schaart, J.G., Dubos, C., Fuente, I.R.D.L., Houwelingen, A.M.M.L., Vos, R.C.H., Jonker, H.H., Xu, W.J., Routaboul, J.M., Lepiniec, L., Bovy, A.G. (2013).** Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry fruits. *New Phytologist*,197:454-467.

**Sharma, O.P. and Bhat,T.K. (2009).** DPPH antioxydant assay revisited. *Food Chemistry*, 113: 1202-1205

**Shipp, J. Abdel-Aal, E.M.(2010).**Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients.*The Open Food Science Journal*,4:7-22.

**Soto-Zamora, G., Yahia, E. M., Brecht, J. K. & Gardea, A. (2005).** Effects of postharvest hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 38(6), 657-663.

**Stahl, W. and Sies, H.(2003).** Antioxydants activity of carotenoids. *Molecular aspects of Medecine*. 24 :34-351.

T

**Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A. (2008).** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733-749.

**Tapiero, H., Townsend, D. M., and Tew, K. D. (2004).** The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2) :100-110.

**Tosun, I. and Sule Ustun, N. (2003).** An investigation about antioxydant capacity of fruit Nectars. *Pakistan journal of Nutrition*, 2(3): 167-169.

V

**Valls, J. ,Millan, S.,Mart,i M.P. ,Borras, E.and Arola, L.(2009).**Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols *.Journal Of Chromathography A* ,1216(43) :7143-7172.

**Vargas,D.F., Sincero, A.P. and Predes-Lopez, O.(2002).** Carotenoid. In *Natural Colorants Food and Nutraceutical Uses*. Ed. *CRC press*.113-166.

**Velazquez, E.R.M., Hernandez, H.M.M., Rufer, C.E., Guamis-Lopez, B. and Roig, S.A.X. (2013).** Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxydant activity of orange juice. *innovative food science & emerging technologies*, 18 :80-94.

**Vierling, E. (2008).** Aliment et boisson :filière et produits . ed .Doin,227-271.

**Vom Endt, D., Kijne, J.W. and Memelink, J. (2002).** Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, 61: 107-114.

**Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., & Rissanen, T. H. (2006).** Carotenoids and cardiovascular health. *The American journal of clinical nutrition*, 83(6) : 1265-1271.

W

**Wang, J. H., Liu, J. J., Chen, K. L., Li, H. W., He, J., Guan, B. & He, L. (2016).** Anthocyanin Biosynthesis Regulation in the Fruit of *Citrus sinensis* cv. Tarocco. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-13.

**Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Giusti, M-M.and Rodriguez-Saona, L.E. (2002).** Analysis of anthocyanins in nutraceuticals. *In ACS Symposium Series*, 803:42-62.

X

**Xie, D. Y., Jackson, L. A., Cooper, J. D., Ferreira, D., & Paiva, N. L. (2004).** Molecular and Biochemical Analysis of Two cDNA Clones Encoding Dihydroflavonol-4-Reductase from *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*,134(3), 979.

Y

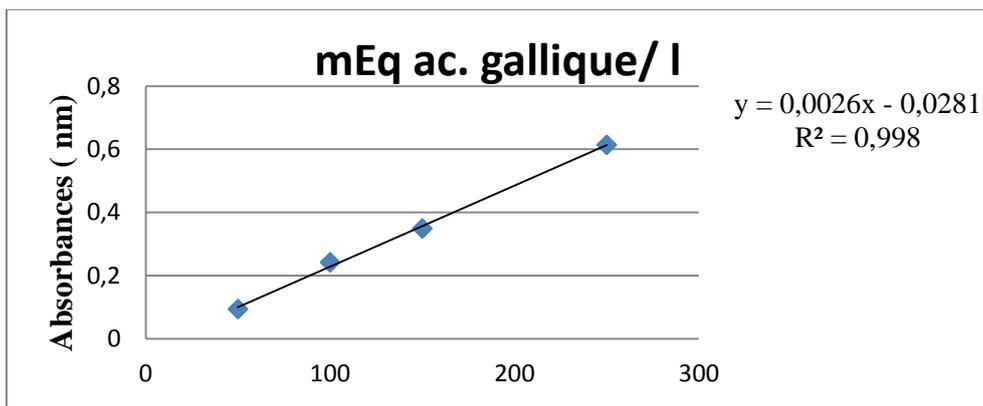
**Yahlaoui,N.(2012).**Etude de l'absorption des composés phénotypique des margines d'olive sur carbonate de calcium ,hydroxyapatite et charbon actif .*Thèse MAGISTER*,University mouloude Mammeri Tizi ouzou ,129.

**Young, L. B. & Erickson, L.C. (1961).** Influences of temperature on color change in Valencia oranges. In *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 78 : 197-200.

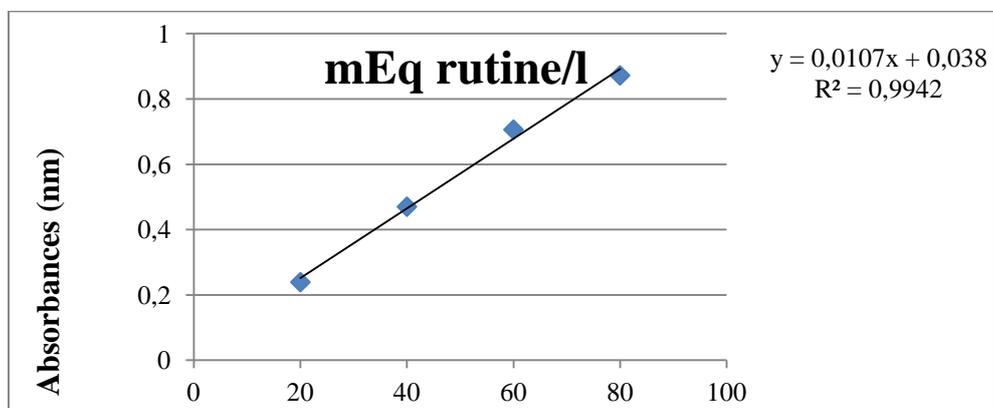
Z

**Zarbà, A.S. and Pulvirenti, G. (2006).** The consumption of Sicilian red oranges: implications for firms involved in commercialization. *J. Bus. Chem*, 3, 22-41.

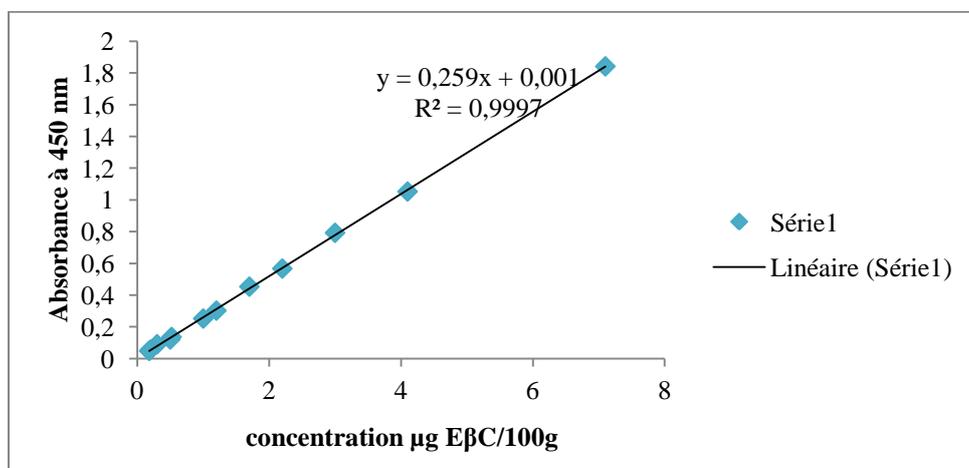
**Zhang, L., Ma, G., Kato, M., Yamawaki, K., Takagi, T., Kiriwa, Y. & Nesumi, H. (2011).** Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs in vitro. *Journal of experimental botany*, err318.



Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols.



Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes.



Courbe d'étalonnage des caroténoïdes.

## RESUME

Les anthocyanes et les caroténoïdes sont des pigments de l'orange sanguine (*Citrus sinensis*; Osbeck) qui ont un intérêt major dans la prévention de nombreuses maladies et jouent un rôle primordial dans la qualité commerciale de ce fruit. L'objectif de ce travail consiste premièrement à faire un état de l'art sur l'expression des gènes impliquée dans la biosynthèse des anthocyanes et des caroténoïdes de l'orange sanguine et leur régulation transcriptionnelle. De plus, l'influence de quelques facteurs tels que la température, la variété et la maturation sur l'expression de ces gènes a été aussi analysé. Cette analyse bibliographique a révélé l'implication de divers gènes dans la biosynthèse des substances étudiées et une étroite relation entre l'expression des gènes et les facteurs cités. Une autre partie de notre travail a consisté à la caractérisation physico-chimique (pH, Brix, Matière sèche, Teneur en eau, Acidité titrable) et phytochimique (polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes et caroténoïdes) et l'évaluation de l'activité anti oxydante de jus d'orange sanguine. Les résultats obtenus montrent que l'orange sanguine pourrait être une source importante d'anthocyanes et d'antioxydants naturels.

**Mots-clés :** orange sanguine, anthocyanes, expression des gènes, caroténoïdes, biosynthèse, activité anti oxydante.

## ABSTRACT

Anthocyanins and carotenoids are pigments of blood orange (*Citrus sinensis*, Osbeck) which have an interest in preventing numerous diseases and play a key role in the commercial quality of the fruit. The objective of this work is first to make a state of the art on the expression of genes involved in the biosynthesis of anthocyanins and carotenoids in blood orange and transcriptional regulation. In addition, the influence of some factors such as temperature, the variety and ripening on the expression of these genes were also analyzed. This literature review has revealed the involvement of various genes in the biosynthesis of tested substances and a close relationship between gene expression and cited factors was found. Another part of our work consisted on the physicochemical characterization (pH, Brix, Dry matter, Water content, titratable acidity) and phytochemical characterization (polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids) and the evaluation of the antioxidant activity of juice blood orange. The results show that blood orange can be an important source of anthocyanins and natural antioxidants.

**Keywords :** Blood orange, anthocyanins, gene expression, carotenoids, biosynthesis, antioxidant activity

## ملخص

الانثوسيانين والكاروتينات هي أصباغ البرتقال الدم، (*Citrus sinensis*, Osbeck) الذين لديهم مصلحة في منع العديد من الأمراض وتلعب دورا رئيسيا في نوعية التجارية الفاكهة. والهدف من هذا العمل هو أول من جعل حالة من الفن على التعبير عن جينات لها دور في التركيب الحيوي من الانثوسيانين والكاروتينات في البرتقال الدم وتنظيم النسخي. وبالإضافة إلى ذلك، تم أيضا تحليل تأثير بعض العوامل مثل درجة الحرارة، وتنوع والنضج في التعبير عن هذه الجينات. وقد كشفت هذه المراجعة للأدب تورط الجينات المختلفة في التركيب الحيوي للمواد الاختبار وجود علاقة وثيقة بين التعبير الجيني و العوامل. جزء آخر من عملنا يتمثل في توصيف الفيزيائي (درجة الحموضة، وبركس، المادة الجافة، محتوى الماء، الحموضة (و الكيمائية النباتية) البوليفينول، الفلافونويد، الانثوسيانين والكاروتينات (وتقييم النشاط المضاد للأوكسدة عصير البرتقال الدم. وأظهرت النتائج أن البرتقال الدم يمكن أن يكون مصدرا هاما من الانثوسيانين ومضادات الأوكسدة الطبيعية

كلمات البحث: البرتقال الدم، الانثوسيانين، التعبير الجيني، الكاروتينات، التركيب الحيوي، النشاط المضاد للأوكسدة