



HAL
open science

Etude chimique de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels au Bénin dans le domaine artisanal

Louis Fagbohoun

► **To cite this version:**

Louis Fagbohoun. Etude chimique de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels au Bénin dans le domaine artisanal. Chimie organique. Université d'Avignon; Université de Parakou, 2014. Français. ⟨NNT : 2014AVIG0256⟩. ⟨tel-01168469⟩

HAL Id: tel-01168469

<https://theses.hal.science/tel-01168469v1>

Submitted on 25 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

N° d'ordre :

Année 2014



THESE EN COTUTELLE

Présentée pour obtenir le titre de :

Docteur

DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI (BENIN)

ET DE

L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE (FRANCE)

***Spécialité:* CHIMIE ORGANIQUE ET SUBSTANCES NATURELLES**

Par

Louis FAGBOHOUN

**ETUDE CHIMIQUE DE COLORANTS NATURELS ET MATERIAUX
RESINEUX TRADITIONNELS DU BENIN DANS LE DOMAINE
ARTISANAL**

Soutenu publiquement le 01/11/ 2014 devant un jury composé de :

M. Mansourou MOUDACHIROU	Professeur Emérite, Universités Nationales du Bénin	Président du jury
M. Félicien AVLESSI	Professeur, Université d'Abomey-Calavi	Rapporteur
M. Gbandi DJANEYE-BOUNDJOU	Professeur, Université de Lomé	Rapporteur
M. Joachim D. GBENOU	Professeur, Université de Parakou	Examineur
M. Marc Abel AYEDOUN	Maître de Conférences, Université de Parakou	Co-directeur
Mme Cathy VIEILLES CAZES	Professeur, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Co-directrice

DEDICACES

✚ *Au tout Puissant Créateur*

✚ *A ma sœur défunte Jeanne FAGBOHOUN*

✚ *A ma très chère fille Abikè Grace Maëlle*

✚ *A mon épouse Rolande AOHOUI*

✚ *A mes parents FAGBOHOUN Ibikounlé et EGOUGBOWOUN Monrênikédji*

✚ *A mes frères et sœurs Gisèle, Sabine, Célestine, François et OluwaTogni Aristide*

✚ *A la famille OITCHAYOMI*

✚ *A tous ceux qui me sont chers : grande famille et amis*

AVANT PROPOS

Une partie des travaux relatés dans ce manuscrit de thèse a donné lieu à des communications scientifiques dont trois par affiche et quatre en communication orale. Deux articles ont été soumis dans des journaux internationaux à comité de lecture dont le premier est en cours de publication dans la revue de la société française d'ethnopharmacologie (octobre 2014). Ces travaux ont également été valorisés par le prix du meilleur poster scientifique organisé par l'institut Français du Bénin et la Direction Nationale de la Recherche Scientifique et Technologique (DNRST).

-Communications par affiche

1°) *Journée Scientifique de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Edition 2013. Centre d'Enseignement et de Recherche en Informatique (CERI)-Campus Agroparc le 29/11/2013*

Caractérisation et quantification des principes colorants de deux légumineuses (*Indigofera tinctoria* et *Philenoptera cyanescens*) utilisées par les artisans au Bénin

L. FAGBOHOUN, C. MATHE, F. A. GBAGUIDI, A. M. AYEDOUN, M. MOUDACHIROU, C. VIEILLESQUES

2°) *Exposition de Posters scientifiques à l'Institut Français de Cotonou du 23 au 30 Octobre 2013 et à l'Institut Français de Parakou du 7 au 9 Novembre 2013*

Evaluation de la toxicité et de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles de teck (*Tectona grandis* L., Lamiaceae) utilisées dans l'artisanat agroalimentaire au Bénin

Louis FAGBOHOUN

3°) *1/2 Journée TERSYS du 12-Septembre 2013- Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse*

Phytochimie, cytotoxicité et évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles de *Tectona grandis* L.f. (Lamiaceae) utilisées dans l'artisanat agroalimentaire au Bénin

L. FAGBOHOUN, C. MATHE, F. A. GBAGUIDI, A. M. AYEDOUN, M. MOUDACHIROU, C. VIEILLESQUES

-Communications orales

1°) *Journée Scientifique de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Edition 2013. (CERI)-Campus Agroparc le 29/11/2013*

Contribution à l'identification des colorants naturels et matériaux résineux issus de quelques objets du patrimoine béninois

L. FAGBOHOUN, C. MATHE, F. A. GBAGUIDI, A. M. AYEDOUN, M. MOUDACHIROU, C. VIEILLESQUES

2°) *IV^e colloque des Sciences, Cultures et Technologies de l'UAC-Bénin Du 23 au 28 septembre 2013 à l'UAC.*

Optimisation d'extraction et activité antioxydante des colorants issus de *Tectona grandis* L (Lamiaceae) utilisé dans l'artisanat et en pharmacopée au Bénin

L. FAGBOHOUN, A. HOUNGBEME, C. MATHE, F. A. GBAGUIDI, A. M. AYEDOUN, M. MOUDACHIROU, C. VIEILLESQUES

3°) *15^e Journées de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM) tenue du 12 au 17 Août 2013 à Ouaga au Burkina-Faso.*

Optimisation d'extraction, étude chromatographique et activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles de *Tectona grandis* L. f. (Lamiaceae) utilisées dans l'artisanat au Bénin

L. FAGBOHOUN, C. MATHE, F. A. GBAGUIDI, A. M. AYEDOUN, M. MOUDACHIROU, C. VIEILLESQUES

4°) *Journées doctorales de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse Edition 2012. Du 29/10 au 01/11/2012 Université d'Avignon.*

Enquête ethnobotanique et screening phytochimique des plantes tinctoriales et matériaux résineux utilisés par les artistes béninois

L. FAGBOHOUN, F. A. GBAGUIDI, C. MATHE, A. M. AYEDOUN, M. MOUDACHIROU, C. VIEILLESQUES

-Publication

Etudes ethnobotanique et phytochimique des plantes tinctoriales sources de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du Bénin dans le domaine artisanal. (Ifangni/ Bénin) *Société Française d'ethnopharmacologie* (parution d'octobre 2014)

FAGBOHOUN Louis, GBAGUIDI A. Fernand, AYEDOUN A. Abel, MATHE Carole MOUDACHIROU Mansourou, VIEILLESQUES Cathy

-Prix

2^{ème} Prix du meilleur poster scientifique organisé par l'institut Français du Bénin et la Direction Nationale de la Recherche Scientifique et Technologique (DNRST), en partenariat avec l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). 4^e Edition (2013)

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser en premier lieu mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du Jury pour l'intérêt porté à ces travaux de recherche.

A noter que ce travail a été réalisé alternativement au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de Porto-Novo /Université d'Abomey-Calavi (UAC) et au Laboratoire de Chimie de l'Equipe Ingénierie de la Restauration des Patrimoines Naturel et Culturel (EIRPNC) de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (UAPV) avec le soutien de l'Ambassade de France au Bénin à travers la bourse **SCAC**. C'est avec une grande sincérité que je remercie les professionnels qui ont fait l'honneur de m'accueillir dans leur laboratoire et de me consacrer souvent leur temps précieux pour me faire partager un peu de leur savoir. Ceux là que je considère comme mes promoteurs et mes références. En les citant ici, c'est leur rendre hommage avec humilité.

Professeur Cathy VIEILLES CAZES, recevez mes sincères reconnaissances pour votre implication personnelle dans l'aboutissement de ce travail et pour votre soutien moral et matériel durant mes deux séjours en France. Votre professionnalisme en tant que responsable de l'équipe IRPNC m'a permis de bénéficier de la bourse Perdiguier. Je remercie donc à travers vous et le service des relations internationales de l'UAPV, les organisateurs de ce programme.

Professeur Marc Abel AYEDOUN, merci pour vos conseils avisés, votre appui matériel et moral ainsi que vos recommandations tout au long de la réalisation de cette étude.

Professeur Fernand A. GBAGUIDI, pour votre appui et votre franchise aussi bien dans le cadre professionnel que social, je vous témoigne toute ma gratitude. Merci tout d'abord de votre encadrement depuis que j'ai intégré votre laboratoire.

Carole MATHE, Maître de Conférences à l'UAPV, votre soutien quotidien, vos conseils toujours pertinents et votre intarissable flot d'idées ainsi que votre enthousiasme communicatif m'ont été très bénéfiques tout au long de mon travail. Merci tata d'avoir accepté d'encadrer ce travail.

Je remercie chaleureusement Monsieur Mansourou MOUDACHIROU, Professeur Titulaire Emérite des Universités du Bénin pour avoir été l'un des initiateurs de cette étude.

Je remercie également le Professeur Dominique SOHOUNHLOUE, Directeur Pédagogique de l'Ecole Doctorale Chimie et Applications de l'UAC et à travers lui, tous les professeurs intervenant dans cette école pour leur contribution à la formation de jeunes chercheurs.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à Céline JOLIOT, technicienne de recherche, pour la constante disponibilité dont elle fait toujours preuve, signe du grand attachement qu'elle porte pour le bon déroulement de notre travail ainsi qu'à Simon Raynal et Emmanuel PETITCOLAS (alias "Manu") de green laboratoire pour m'avoir accompagné lors de la réalisation de l'activité antioxydante.

Une mention spéciale au Professeur Olivier Dangles, directeur de l'Ecole Doctorale Agrosciences et Sciences de l'UAPV, à Monsieur Grégory Durand, Madame Françoise et leurs collègues du laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels pour leurs divers soutiens durant mon séjour à l'UAPV.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Mathieu MENAGER et tous mes collègues Clara, Amra et Marie de l'UAPV pour leur franche collaboration durant mon séjour.

Je profite de l'occasion pour dire un sincère merci aux Pr. Georges C.ACCROMBESSI, Pr Joachim GBENOU et Pr Salomé KPOVIESSI pour leurs précieux conseils et soutiens.

Je voudrais également remercier mes camarades : Assogba, Bambola, do Régo, Sakirigui Hounghèmè..., pour ces moments d'apprentissage, de travail et de partage, que nous avons passé ensemble.

J'adresse également toute ma gratitude à la famille OïTCHAYOMI de France pour son soutien financier et moral dans la réalisation de ce travail ainsi qu'à mon tuteur OLLOFINDJI Acadiri et sa femme Moufouli dont l'indispensable présence n'est plus à démontrer.

J'adresse mes remerciements au Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'ambassade de France au Bénin pour leurs soutiens financiers pendant la réalisation de ce travail et à ses animateurs notamment M. MAYRARGUE C. et M. BAHUAUD J.F.

Enfin, mes profondes gratitudes vont à l'endroit de tous ceux qui d'une manière ou d'une autre nous ont accordé leur précieux soutien de tout genre et dont les noms n'ont pas été cités ici.

Je souhaite à mon lecteur autant de plaisir à lire cette thèse que j'en ai eu à l'écrire.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	i
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
PARTIE I.....	9
ACTIVITES D'ORIENTATION ET SELECTION DES PLANTES TINCTORIALES ETUDIEES.....	9
Chapitre 1..... Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique des plantes recensées	10
1. Aperçu sur l'art et l'artisanat au Bénin.....	10
2. Etude ethnobotanique des plantes tinctoriales : Présentation de la zone d'étude	11
2.1. Enquête	13
2.2. Détermination du degré d'utilisation des plantes recensées et matériel du criblage phytochimique.....	14
2.3. Traitement des données.....	16
2.4. Résultats et discussion	16
2.5. Conclusion	28
Chapitre 2..... : Dosage spectrophotométrique, activités antioxydantes et toxicité larvaire des extraits méthanoliques des plantes sélectionnées	29
2.1. Mesure du pouvoir antiradicalaire par piégeage des radicaux libres de DPPH (2,2- diphényle-1-picrylhydrazyle)	43
2.1.1. Principe.....	43
2.1.2. Résultats	44
2.2. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power)	48
2.2.1. Principe.....	48
2.2.2. Résultats	49
2.3. Corrélation activité antioxydante et teneur en polyphénols	51

2.3.1.	Principe de l'Analyse en Composante Principale (ACP)	51
2.3.2.	Résultats	52
3.1.	Cycle vital d' <i>Artemia salina</i> (Crustacea-Anostroca)	54
3.2.	Principe du test "Brine Shrimp"	56
3.3.	Résultats.....	56
PARTIE II		61
PRESENTATION DES PLANTES ET ETUDE ANALYTIQUES		61
Chapitre 1: Présentation des plantes étudiées		62
1.	<i>Tectona grandis</i> L. f. (Lamiaceae)	62
1.1.	Distribution botanique et géographique	62
1.2.	Historique	64
1.3.	Composition chimique.....	65
1.4.	Propriétés et utilisations.....	71
1.4.1.	Dans le domaine tinctorial.....	71
1.4.2.	Dans le domaine pharmacologique	73
1.4.3.	Intérêt économique et écologique	74
2.	Les plantes à indigo: <i>Indigofera tinctoria</i> et <i>Philenoptera cyanescens</i>	75
2.1.	Distribution botanique et géographique	75
2.2.	Historique	79
2.3.	Composition chimique des plantes à indigo	81
2.4.	Propriétés et utilisations.....	85
2.4.1.	Dans le domaine tinctorial.....	85
2.4.2.	Dans le domaine pharmacologique	86
3.	<i>Lawsonia inermis</i> Linn.	88
3.1.	Distribution botanique et géographique	88
3.2.	Historique	89
3.3.	Composition chimique.....	90
3.4.	Propriétés et utilisations.....	93
3.4.1.	Dans le domaine tinctorial.....	93
3.4.2.	Dans le domaine pharmacologique	94
4.	<i>Khaya senegalensis</i> (Ders.) A. Juss. (Meliaceae)	95
4.1.	Distribution botanique et géographique	95
4.2.	Historique	96

4.3.	Composition chimique.....	97
4.4.	Propriétés et utilisations.....	99
4.4.1.	Dans le domaine tinctorial.....	99
4.4.2.	Dans le domaine pharmacologique	99
4.4.3.	Intérêt écologique et économique	99
Chapitre 2:	Etude analytique.....	101
1.	Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF).....	101
1.1.	Principe et plan d'analyse	101
1.2.	Etude et discussion des molécules de référence	101
1.3.	Conclusion	105
2.	Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP).....	106
2.1.	Mise au point des conditions analytiques	106
2.2.	Etude des molécules standards	108
2.3.	Procédés d'extraction et analyse des divers extraits obtenus	114
2.3.1.	Analyse des extraits de <i>Tectona grandis</i>	117
2.3.1.1.	Essai d'optimisation des conditions d'extraction	117
2.3.1.1.1.	Rendements en colorants	117
2.3.1.1.2.	Approche écologique, économique et santé	125
2.3.1.1.3.	Conclusion	127
2.3.1.2.	Caractérisation des molécules cibles	128
2.3.1.2.1.	Fractionnement et purification	128
2.3.1.2.2.	Identification des composés et empreintes chromatographiques des fractions	137
2.3.1.2.3.	Conclusion	139
2.3.2.	Analyse des extraits de plantes à indigo.....	140
2.3.2.1.	Etude comparative des procédés d'extraction	140
2.3.2.1.1.	Optimisation des procédés traditionnels par réduction chimique	140
2.3.2.1.1.1.	Principe	140
2.3.2.1.1.2.	Avantages et limites	141
2.3.2.1.1.3.	Alternatives	141
2.3.2.1.2.	Etude et discussion des rendements	142
2.3.2.2.	Caractérisation des composés tinctoriaux des deux espèces à indigo.....	143
2.3.2.2.1.	Fractionnement et purification des molécules cibles	148

2.3.2.2.2. Identification des molécules cibles des deux espèces et empreintes chromatographiques des fractions	150
2.3.2.2.3. Conclusion	153
2.3.2.3. Quantification	154
2.3.2.3.1. Préparation des solutions du standard et de la gamme d'étalon	154
2.3.2.3.2. Détermination de la teneur en indigoïdes et en isatine des extraits	155
2.3.2.3.3. Conclusion	159
2.3.2.4. Paramètres d'application et de différenciation des deux espèces à indigo	159
2.3.2.4.1. Dégradation photochimique des extraits.....	159
2.3.2.4.2. Différenciation des deux espèces par le rapport de leur proportion relative en indigoïde	161
2.3.2.5. Conclusion	163
2.3.3. Analyse des extraits de <i>Lawsonia inermis</i>	164
2.3.3.1. Extraction et identification des molécules cibles	164
2.3.3.2. Conclusion	168
2.3.4. Analyse des extraits de <i>Khaya senegalensis</i>	169
2.3.4.1. Etude et discussion de la composition en colorants de <i>K. senegalensis</i> ...	169
2.3.4.2. Conclusion	171
Partie III	172
ETUDE DE CAS	172
Chapitre 1: Application à des échantillons muséaux	173
1. Aperçu historique	173
2. Les objets du patrimoine échantillonnés	175
2.1. Les masques Guèlèdè	175
2.2. Les statuettes de jumeaux "Ibéji"	176
2.3. Les fétiches	177
2.4. Les textiles culturels et coutumiers	177
3. Analyse des échantillons muséaux	178
3.1. Principe du plan d'analyse	178
3.2. Aperçu sur les pigments probablement utilisés dans l'artisanat au Bénin	179
3.3. Résultats et discussion	181
4. Conclusion.....	202

Chapitre 2:Applications pharmacologiques *via* des tests chimiques *in-vitro*
..... 203

1. Activité anticancer : Test de cytotoxicité sur des cellules MCF-7 et IGROV 203

1.1. Principe 203

1.2. Résultats..... 204

2. Discussion générale sur la caractérisation et les propriétés pharmacologiques des
plantes étudiées..... 207

ANNEXE..... 249

LISTE DES ABREVIATIONS

- λ max** : Longueur d'onde d'absorption maximale
- ACE** : Acétate d'éthyle
- ACN** : Acétonitrile
- AcOH** : Acide acétique
- ARP** : Pouvoir antiradicalaire
- CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- cHex** : Cyclohexane
- CPG/SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse
- COSY** : Correlation spectroscopy
- DCM** : Dichlorométhane
- DPPH** : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
- DMF** : Diméthylformamide
- DMSO** : Diméthylsulphoxide
- EtOH** : Ethanol
- FC** : Folin Ciocalteu
- FRAP** : Pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique (Ferric Reducing Antioxydant Power)
- Hex** : Hexane
- IdT** : *Indigofera tinctoria*
- IR-TF** : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
- MeOH** : Méthanol
- MTT** : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
- PcF** : *Philenoptera cyanescens*
- RMN** : Résonance magnétique nucléaire
- SPE** : Extraction sur phase solide
- T** : Température
- TFA** : Acide trifluoroacétique
- t_R** : Temps de rétention (CLHP)
- UA** : Unité d'absorbance
- UV** : Ultra-violet
- UAC** : Université d'Abomey Calavi
- UAPV** : Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
- Vis** : Visible

LISTE DES FIGURES

Figure I.1.1 : Carte de situation géographique de présentation de la zone d'étude (Commune d'Ifangni)	12
Figure I.2.1: Teneur en composés phénoliques totaux (TPC) en mg EAG/g, des extraits MeOH des plantes dosées à des concentrations initiales de 5 mg/mL.	30
Figure I.2.2: Squelettes de base des flavonoïdes.	31
Figure I.2.3: Courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.	33
Figure I.2.4: Teneur en flavonoïdes totaux en mg EQ/g des extraits de plantes dosés à concentration initiale de 5 mg/mL.	33
Figure I.2.5: Structure de la forme prédominante des anthocyanes suivant la variation du pH.	35
Figure I.2.6 : Courbe d'étalonnage réalisée avec le cyanidine-3-glucoside pour le dosage des anthocyanes totaux.	36
Figure I.2.7: Teneur en anthocyanes totaux en mgECyd-3-glu/g. Les extraits de plantes sont dosés à concentration initiale de 5 mg/mL.	36
Figure I.2.8: Structure d'un tannin gallique (1,2,3,4,6-pentagalloyl-O-D-glucose)	38
Figure I.2.9: Modèle de structure branchée des tannins condensés (Bruneton, 1999)	38
Figure I.2.10 : Courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique pour le dosage des tannins totaux.	40
Figure I.2.11: Teneur en tannins totaux en mg.L ⁻¹ EAT. Les extraits de plantes sont dosés à concentration initiale de 2 mg/mL.	41
Figure I.2.12: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH [*] et un antioxydant (AH).	43
Figure I.2.13: Dépistage du potentiel réducteur des extraits testés sur plaque CCM.	44
Figure I.2.14 : Résultats du test antioxydant par diminution de l'absorbance du DPPH (A, B et C)...	45
Figure I.2.15: Activité antioxydante en EC ₅₀ (a) et en ARP (b) du trolox et des extraits de plantes testés	47
Figure I.2.16 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe(III) et un antioxydant (AH).	48
Figure I.2.17: Test FRAP traduisant le pouvoir réducteur des extraits de plantes testés suivant les doses appliquées	50
Figure I.2.18: Courbe d'étalonnage du trolox pour le test FRAP	50

Figure I.2.19: Analyse en composantes principales basée sur la teneur en composés polyphénols et le pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes testés: graphique d'observations et des variables.....	52
Figure I.2.20 : Cycle de développement d' <i>Artemia salina</i> (Ainane, 2011)	55
Figure I.2.21: Anatomie schématique d'un nauplius d' <i>Artemia</i>	55
Figure I.2.22 : Toxicité des extraits vis à vis d' <i>Artemia salina</i> du même âge (24 h)	56
Figure I.2.23 : Courbe représentant le pourcentage de mortalité en fonction de la concentration des échantillons testés.....	57
Figure II.1.1: Représentation de <i>Tectona grandis</i> L. f. (Lamiaceae).....	63
Figure II.1.2 : Répartition géographique du teck en Afrique. (Louppe, 2005).....	64
Figure II.1.3 : Structure du noyau anthraquinone(a) et naphthoquinone (b)	66
Figure II.1.4: Structures des quinones isolées des feuilles de <i>T.grandis</i>	67
Figure II.1.5 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy <i>et al.</i> ,1996).....	68
Figure II.1.6: Structure des flavonoïdes et acides phénoliques isolés des feuilles de <i>T. grandis</i>	69
Figure II.1.7: Structures des autres composés isolés dans les feuilles de <i>T. grandis</i>	70
Figure II.1.8: Complexe de coordination probable, formé par une teinture à la tectograndone (teck) et d'une fibre de coton avec mordantage à l'aluminium	72
Figure II.1.9: Structure probable du complexe de coordination tectograndone-aluminium-eau-fibre	73
Figure II.1.10: Répartition géographique des principales plantes à indigo (Hovaneissian, 2005)	76
Figure II.1.11: Représentation d' <i>Indigofera tinctoria</i> (Takawira et Cardon, 2005).....	77
Figure II.1.12: Répartition géographique d' <i>Indigofera tinctoria</i> en Afrique (Takawira et Cardon, 2005).....	77
Figure II.1.13: Représentation de <i>Philenoptera cyanescens</i>	78
Figure II.1.14: Répartition géographique de <i>Philenoptera cyanescens</i>	79
Figure II.1.15: Structure de l'indican et de l'isatan B.....	82
Figure II.1.16: Biosynthèse de l'indigotine et de l'indirubine à partir de l'indoxyle (Xia et Zenk, 1992)	82
Figure II.1.17: Biosynthèse des indigoïdes dans les feuilles d'indigotier (<i>I. tinctoria</i>)	83
Figure II.1.18: Structures des autres composés isolés des feuilles de <i>I. tinctoria</i>	84
Figure II.1.19: Structures des triterpénoïdes isolées de <i>P. cyanescens</i> (Moronkola et Oladosu, 2013)	85

Figure II.1.20 : Réduction de l'indigotine en sel de leuco-indigotine (Cardon, 2003).....	86
Figure II.1.21 : Présentation de <i>Lawsonia inermis</i>	88
Figure II.1.22 : Répartition géographique de <i>Lawsonia inermis</i> (planté et naturalisé) en Afrique (Aweke et Tapapul, 2005)	89
Figure II.1.23 : Structure de quelques molécules isolées des feuilles de <i>L. inermis</i>	93
Figure II.1.24 : Représentation de <i>khaya senegalensis</i>	95
Figure II.1.25 : Répartition géographique de <i>Khaya senegalensis</i>	96
Figure II.1.26 : Principaux composés isolés des écorces de <i>Khaya senegalensis</i>	98
Figure II.2.1 : Spectre IR (a) et attribution des fréquences vibrationnelles des liaisons N-H et C=O des indigoïdes (b)	103
Figure II.2.2 : Attribution des fréquences vibrationnelles des liaisons C=O des quinones	104
Figure II.2.3 : Résonance entre l'azote en C-2 et l'oxygène du carbonyle en C-10 de la 2-aminoanthraquinone (Bloom <i>et al.</i> , 1959).....	105
Figure II.2.4 : Liaisons hydrogène et leur influence sur l'ordre d'élution de quelques flavonoïdes...	111
Figure II.2.5 : Liaisons hydrogène et leur influence sur l'ordre d'élution de quelques anthraquinones	112
Figure II.2.6 : Ordre d'élution des indigoïdes (gradient n°1)	112
Figure II.2.7 : Spectres UV-Vis de l'indigotine et de l'indirubine.....	113
Figure II.2.8 : Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation initiées par les ondes ultrasonores (Mason, 1990).....	116
Figure II.2.9 : Evolution et implosion d'une bulle de cavitation à la surface d'un solide (matrice végétale)	117
Figure II.2.10 : Pourcentage du rendement d'extraction conduit aux ultrasons et à l'éthanol absolu issu des différents ratio appliqués.....	118
Figure II.2.11 : Profils chromatographiques à 350 nm d'extraits bruts réalisés avec le méthanol et l'éthanol absolu (MeOHa et EtOHa)	121
Figure II.2.12 : Profils chromatographiques à 350 nm d'extraits bruts réalisés avec le méthanol et l'éthanol absolu (MeOH 70% et EtOH 70%).....	122
Figure II.2.13 : Profils chromatographiques à 450 nm des extraits bruts MeOHa de <i>T. grandis</i>	124
Figure II.2.14 : Chromatogramme CLHP UV-Vis à 350 nm de l'extrait brut MeOHa et des fractions acide et neutre de <i>T. grandis</i>	129

Figure II.2.15 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 350 nm de l'extrait brut MeOH _a UAE et des fractions cétonique et non cétonique.	131
Figure II.2.16 : Schéma récapitulatif du fractionnement des colorants de <i>T. grandis</i> au combiflash	132
Figure II.2.17 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 450 nm des fractions F ₃ , F ₄ et F ₅ et les spectres UV-Vis de composés ciblés (Ta : t _R = 26,38 min ; Tv : t _R =28,16 min ; Tb : t _R =35,5 min et Tc : t _R =37,41 min)	134
Figure II.2.18 : Spectre UV-Vis issu du scan global de l'extrait MeOH UAE de <i>T. grandis</i> à 7,8125.10 ⁻⁵ g/mL	135
Figure II.2.19 : CCM sous UV à 365 nm et chromatogrammes CLHP UV-Vis à 450 nm de la fraction F ₅ et des composés purifiés Tb (Rf: 0,32 ; t _R = 35,5 min) et Tc (Rf: 0,45 ; t _R = 37,41 min)	136
Figure II.2.20 : Empreintes chromatographiques CLHP/UV-Vis des fractions F ₁₂ , F ₁₃ et F ₁₅	138
Figure II.2.21 : Spectres UV-Vis de la quercétine et de la rutine	139
Figure II.2.22 : Chromatogrammes CLHP/ UV-Vis à 350 nm des extraits MeOH UAE de PcF et IdT sous gradient n°1 (a) et gradient n°2 (b):	145
Figure II.2.23 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 285 nm des extraits ERC, DCM RE 1h et acétone RE 1h des espèces PcF et IdT	147
Figure II.2.24 : Empreintes CCM en colorants des différents extraits, développés par divers systèmes d'éluant et lues à la lumière visible.....	148
Figure II.2.25 : Schéma récapitulatif du fractionnement des colorants de <i>I. tinctoria</i> au combiflash et de purification de l'indirubine.....	149
Figure II.2.26 : Comparaison des spectres IRTF de l'indigo synthétique et de l'indigotine (F ₄) purifiée.	150
Figure II.2.27 : Empreinte chromatographique et spectre UV-Vis du colorant jaune de la fraction F ₁	151
Figure II.2.28 : Empreinte chromatographique et spectres UV-Vis des colorants de la fraction F ₂ ..	151
Figure II.2.29 : Chromatogramme CLHP UV-Vis et CCM sous lumière visible de l'indirubine purifiée (F ₅)	152
Figure II.2.30 : Analyse comparative de la teneur en indigoïdes et en isatine en fonction des différents extraits de <i>P. cyanescens</i> et d' <i>I. tinctoria</i>	158
Figure II.2.31 : Chromatogrammes CLHP et spectres UV-Vis à 285 nm des solutions de IdT ERC avant et après 1et 2 mois d'exposition à la lumière	160
Figure II.2.32 : Dégradation photochimique de l'indigotine et de l'indirubine	161

Figure II.2.33 : Echelle de classement technique des extraits en fonction de leur proportion en indigotine.....	163
Figure II.2.34 :Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 350 nm des colorants issus des extraits de <i>L. inermis</i>	166
Figure II.2.35 : Chromatogramme CLHP/UV-Vis à 350 nm de la fraction étherée de <i>L. inermis</i>	168
Figure II.2.36 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 350 nm des colorants extraits de l'écorce de <i>K. senegalensis</i>	169
Figure II.2.37 : Empreinte chromatographique CLHP/UV-Vis à 350 nm de l'extrait issu de l'hydrolyse acide de <i>K. senegalensis</i> et spectre UV-Vis des composés P et 7.....	170
Figure III.1.1 : Plan schématique d'analyse des prélèvements muséaux	178
Figure III.1.2 : Empreintes IRTF des prélèvements jaunes P19-20, rouges P8, P14 et bruns P2 et P18	183
Figure III.1.3 : Empreintes IR-TF des prélèvements bleus P1, P6 et P11	184
Figure III.1.4 : Empreintes CLHP des colorants extraits des différents échantillons muséaux.....	193
Figure III.2.1 : Structure et schéma réactionnel impliquant le sel de tétrazolium (MTT) dans les cellules vivantes	204
Figure III.2.2 : Histogramme illustrant le pourcentage d'inhibition des extraits ou fraction de plantes testées sur les lignées cellulaires MCF-7 et IGROV	207

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1.1 : Principes généraux des réactions de caractérisation des grands groupes de composés chimiques recherchés	15
Tableau I.1.2 : Répertoire des plantes tinctoriales utilisées par les artisans dans la zone d’Ifangni.....	17
Tableau I.1.3 A : Degré d’utilisation et importance tinctoriale et médicinale des plantes tinctoriales recensées dans la zone d’Ifangni	19
Tableau I.1.3 B : Degré d’utilisation et importance tinctoriale et médicinale des plantes tinctoriales recensées dans la zone d’Ifangni (suite).....	20
Tableau I.1.4 : Récapitulatif du criblage phytochimique.....	22
Tableau I.1.5 : Cross tabs ou tableau croisé résultant de l'association des groupes chimiques aux principales couleurs obtenues.....	24
Tableau I.1.6 : Coefficients de détermination corrélant les groupes chimiques aux couleurs obtenues	25
Tableau I.2.1 : EC ₅₀ et ARP d'extraits méthanoliques des plantes et du standard trolox testés.....	46
Tableau I.2.2 : Pouvoir réducteur des extraits de plantes testés en fonction de la concentration appliquée	49
Tableau I.2.3 : Matrice de corrélations entre les différents composés polyphénoliques dosés et l'activité antioxydante en ARP, avec le coefficient de corrélation de Pearson.....	53
Tableau I.2.4 : Valeurs LC ₅₀ des extraits de plantes et composés colorants testés	57
Tableau I.2.5 : Correspondance entre LC ₅₀ et toxicité.....	58
Tableau II.1.1 : Classification classique et phylogénétique de <i>Tectona grandis</i>	62
Tableau II.1.2 : Composés isolés des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i>	91
Tableau II.1.3 : Principales propriétés pharmacologiques répertoriées des feuilles de <i>L. inermis</i>	94
Tableau II.2.1 : Principales bandes d'absorption IR des indigoïdes (vibrations de déformation δ et d'élongation ν)	102
Tableau II.2.2 : Principales bandes d'absorption IR de la lawsone et de la tectoquinone.....	104
Tableau II.2.3 : Gradient CLHP n°1 employé pour l'étude des colorants rouges et jaunes	107
Tableau II.2.4 : Gradient CLHP n°2 employé pour l'étude des plantes à indigo.....	108
Tableau II.2.5 : Données chromatographiques des composés phénoliques de référence (gradient n°1)	109
Tableau II.2.6 : Données chromatographiques des anthraquinones de référence(gradient n°1).....	110

Tableau II.2.7 : Données chromatographiques des indigoïdes et composés de dégradation de référence (gradient n°1 et gradient n°2)	110
Tableau II.2.8 : Récapitulatif des procédés alternatifs d'extraction	115
Tableau II.2.9 : Récapitulatif des rendements d'extraction issus des différents procédés employés avec le méthanol et l'éthanol absolu (a) et leur mélange à 30 % d'eau (b).....	119
Tableau II.2.10 : .Récapitulatif des données collectées sur le méthanol et l'éthanol	126
Tableau II.2.11 : Rendements d'extraction des plantes à indigo par divers procédés	142
Tableau II.2.12 : Déplacement chimique (ppm) des protons issus de la RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) du colorant rouge fuchsia (indirubine) purifié.....	153
Tableau II.2.13 : Données de régression linéaire, limite de détection et limite de quantification pour les composés étudiés	154
Tableau II.2.14 :Teneur (%) en indigoïdes et en isatine des différents extraits des deux espèces étudiées (<i>Philenoptera cyanescens</i> et <i>Indigofera tinctoria</i>).....	155
Tableau II.2.15 : Proportions d'aire relative des indigoïdes des principaux extraits de <i>P. cyanescens</i> et <i>I. tinctoria</i>	162
Tableau II.2.16 : Rendements en colorants des extraits de feuilles de <i>L. inermis</i>	164
Tableau III.1.1 : Principaux pigments d'origine naturelle/synthétique anciennement employés au Bénin	180
Tableau III.1.2 : Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des composants des prélèvements et résultats des tests microchimiques.....	187
Tableau III.2.3 : Fiche identitaire des prélèvements muséaux et récapitulatif des résultats de leur caractérisation.....	195
Tableau III.2.1 : Pourcentage d'inhibition illustrant la cytotoxicité des extraits ou leurs fractions sur la croissance des cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV.....	205

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE

Depuis des temps immémoriaux, les « Hommes de toutes les civilisations répandues dans le monde emploient pour colorer leurs tissus et leurs œuvres d'art des substances tinctoriales », note Jean Dorst de l'académie des sciences, dans la préface qu'il a rédigée au livre de D. Cardon et G. du Chatenet, Guide des teintures naturelles (1990). Ces substances d'origine naturelle sont des pigments ou des composés végétaux et animaux. Les plus connues, comme celles découvertes dans les grottes de Lascaux, en Dordogne datent de 15000 av. J.-C. ou les sucres de plantes, d'amidon, de cire d'abeille..., utilisés en Egypte 4000 ans av. J.-C...., montrent que les hommes possédaient déjà une très grande technique de l'utilisation des ressources naturelles que la nature avait mises à leur disposition. Par ailleurs, les hommes ont depuis toujours utilisé leur environnement et en particulier les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle (Newmann et Cragg, 2007): obtenus par héli-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification d'un produit naturel; composés issus des biotechnologies, ou d'origine végétale, animale et microbiologique. La connaissance de ces composés ou celle des matériaux et des techniques utilisés dans la confection des œuvres d'art, qu'elles appartiennent à l'époque antique ou contemporaine, évolue avec les progrès scientifiques. Ce développement des rapports entre les sciences et l'art est allé de pair avec le sentiment profond que le patrimoine, en grande partie fragile et dispersé, doit être sauvé et mis en valeur. Comme l'explique Françoise Cachin, directrice des Musées de France (*in connaissance des Arts, 1995*), "pour les sociétés actuelles (...) les références patrimoniales constituent une source de stabilité, mais aussi de curiosité et de compréhension des phénomènes esthétiques, moraux et sociaux".

C'est dans ce sens que, depuis plusieurs années, l'équipe "Ingénierie de la Restauration des Patrimoines Naturel et Culturel de l'Institut Méditerranéen de la Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE) de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse expertise dans le domaine des pigments, résines et colorants naturels entrant dans la composition de matériaux anciens et archéologiques. En outre, le Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de l'Université d'Abomey-Calavi est spécialisé dans la validation des plantes utilisées en médecine traditionnelle, la recherche de nouvelles molécules pharmacologiquement actives de sources naturelles, le développement, la standardisation des méthodes d'analyse et le contrôle de qualité des phyto-médicaments. En effet, l'identification des constituants chimiques ou biologiques utilisés dans divers supports artistiques, archéologiques et officinaux présente un intérêt majeur pour les historiens, les archéologues et les restaurateurs d'œuvres d'art, mais également pour les chimistes et les pharmaciens

puisqu'elle permet de compléter des considérations géographiques, historiques, culturelles et scientifiques (Hovaneissian, 2005). C'est dans ce contexte que ce sujet de thèse est issu d'une collaboration scientifique entre les deux précédentes entités, et porte sur les colorants naturels et matériaux résineux traditionnellement employés par les artisans au Bénin, dans le but de les appliquer à l'étude des échantillons muséaux et à des tests pharmaco-chimiques. Ces travaux tendent à une meilleure compréhension des techniques anciennes, des matériaux et de leur comportement au cours du temps. Des partenariats établis entre musées (Musée Africain de Lyon et Musée Guimet de Lyon), Ecole du patrimoine Africain (EPA) du Bénin et les deux Universités franco-béninoises, témoignent que de telles préoccupations concernent non seulement les secteurs de la restauration des œuvres d'art et de la conservation du patrimoine mais également les botanistes et les chimistes spécialistes des substances naturelles. C'est dans ce cadre que nous avons eu l'opportunité d'avoir accès aux réserves du musée du service des missions africains (SMA) et du musée Guimet de Lyon et à leurs prestigieuses collections où des prélèvements ont été effectués sur une diversité d'objets du patrimoine d'origine béninoise.

En effet, au Bénin, les études ethnobotaniques réalisées par Adjahoun *et al.* en 1989 et celles effectuées précédemment par Bosseaux (1965) sur les plantes cultivées et spontanées du Dahomey, se sont attachées à identifier non seulement les espèces médicinales, mais aussi les formes d'utilisation de quelques plantes tinctoriales par les populations béninoises. Plus précisément les travaux réalisés par Camille Romeggio (2006), ont permis de dresser la liste des matériaux naturels utilisés dans l'artisanat de la région de Porto-Novo et alentours. Dans cette région du Sud Bénin où l'activité artisanale est encore manuelle mais très développée, on utilise en effet les colorants naturels et matières collantes associées dans la sculpture, le tissage, la vannerie, la poterie Ces colorants sont pratiquement omniprésents dans les objets du patrimoine culturel. L'observation de ces objets du passé, notamment ceux conservés dans nos musées, et de ceux de la vie actuelle, montre que les artisans et les artistes ont associé divers matériaux afin d'aboutir aux produits finis souhaités. Ces associations sont rencontrées aussi bien dans le cas d'ustensiles de la vie quotidienne que dans celui des attributs d'apparat ou de la vie rituelle (Mark, 1998). Le rôle des colorants, des résines et des enduits dépasse largement la seule fonction décorative. Les enquêtes et les études ont montré autrefois, et toujours actuellement mais dans une moindre mesure, que la teinte retenue et l'endroit où elle est apposée relèvent de savoir-faire, de goûts et de codes précis, dont la connaissance n'est pas toujours accessible à tous (Bleton *et al.*, 1996). Les enduits et résines, notamment ceux employés pour les objets à fonction culturelle, maintiennent en place des

éléments indispensables (cauris, talisman, ossements d'animaux...) et rendent l'objet fonctionnel, participant à son identité (Bleton *et al.*, 1995). C'est ainsi que les masques, statues et habits destinés aux cérémonies culturelles dans l'ethnie yoruba sont strictement confectionnés dans les couvents (*Ashè* pour les masques Guèlèdè, *Igbalè* pour les revenants, *Igbo Oro* ou *forêt sacrée* pour la société secrète *d'Oro*). Certaines de ces matières premières sont connues et identifiées depuis longtemps (Michele *et al.*, 1999 ; Russell, 2010). Elles sont d'origine minérale comme les oxydes de fer, végétale comme le bois et son charbon. D'autres restent presque oubliées, c'est le cas des colorants les plus anciens, devenus obsolètes avec le temps (en raison de l'apparition des colorants synthétiques). Ces colorants anciens sont restés méconnus tandis que, grâce à leur présence, ils donnent vie à un instrument et attirent immédiatement le regard.

Depuis une vingtaine d'années, on constate au niveau mondial, un regain d'intérêt croissant pour les colorants naturels, non seulement parmi les artisans traditionnels mais aussi dans les milieux de la conservation des textiles, de la production des peintures et pigments, des industries cosmétique et alimentaire (Hnawia *et al.*, 2010). En effet, avec un public de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules issues de la synthèse chimique, un certain nombre de secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation des molécules naturelles, aux caractéristiques physico-chimiques et biologiques originales dans leurs formulations. La valorisation de ces principes actifs ou marqueurs d'origine naturelle représente donc un potentiel économique énorme. Des programmes de recherche systématiques s'imposent dans ce domaine :

1°- Les mondes végétaux et animaux regorgent de sources de colorants encore peu reconnues, ou tout simplement inconnues, qui risquent fort de disparaître avant d'avoir été découvertes et étudiées,

2°- Si de nombreux colorants naturels sont connus comme sources de vitamines ou possédant d'autres propriétés médicinales, tous n'ont pas fait l'objet d'une étude chimique approfondie ou de recherches sur leur éventuelle toxicité.

En outre, l'étude des plantes tinctoriales au Bénin est un domaine de recherche naissant. L'objectif de ce travail de thèse est de contribuer à l'étude chimique des colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du Bénin dans le domaine artisanal, en mettant en œuvre des méthodes d'extraction, de fractionnement, de séparation et d'identification de composés

tinctoriaux, rapides, efficaces, tout en réduisant les quantités de solvant, d'énergie et d'échantillon consommées.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre parties correspondant respectivement aux activités d'orientation et de sélection des plantes tinctoriales présentées, ainsi qu'à leur étude analytique et enfin, une application à l'analyse des échantillons muséaux et des tests pharmaco-chimiques est présentée. La première partie a permis de sélectionner les plantes étudiées à l'issue d'une enquête ethnobotanique suivie de différents dosages et de tests de toxicité réalisés sur les plantes tinctoriales sélectionnées ainsi que de tests pharmaco-chimiques. Dans la seconde partie, une étude sur la composition chimique de cinq espèces tinctoriales du Bénin a été développée par chromatographie en phase liquide (CLHP-UV/Visible), dans le but d'avoir une meilleure connaissance de ces plantes. Enfin, les résultats précédemment obtenus sont appliqués à l'analyse d'objet du patrimoine culturel béninois.

ORGANISATION DES TRAVAUX

Les objectifs de ce sujet de thèse se réunissent autour de l'activité de sélection des espèces tinctoriales étudiées, de l'extraction, de l'analyse et de la différenciation des colorants naturels et marqueurs chimiques présents dans ces plantes et dans les échantillons étudiés. Dans ce contexte, les travaux ont été développés suivant plusieurs axes:

- Enquête ethnobotanique et évaluation de la toxicité, du potentiel antioxydant et de la teneur en polyphénols des plantes sélectionnées.
- Réalisation de tests pharmaco-chimiques.
- Optimisation des procédés d'extraction, assistés par les ultrasons, des colorants de *T. grandis* ou par réduction chimique des colorants des plantes à indigo.
- Mise au point des conditions chromatographiques en phase liquide nécessaires à l'étude des molécules de référence et des composés présents dans les matériaux colorés.
- Recherche et caractérisation des marqueurs chimiques des espèces tinctoriales et échantillons étudiés.
- Application des principaux résultats obtenus à l'identification d'échantillons muséaux.

La sélection des plantes tinctoriales étudiées nécessite un travail préalable qui consiste à prendre en compte les connaissances autochtones à travers la réalisation d'une enquête ethnobotanique. Les plantes les plus utilisées et plus disponibles en terme d'approvisionnement ont fait l'objet de tri par l'évaluation de leur toxicité, de leur potentiel antioxydant et de leur teneur en polyphénols.

Les techniques analytiques employées pour l'identification des composés correspondent à la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF) et la Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à un détecteur UV-Visible (CLHP-UV/Vis). Pour des extraits très riches en composés tinctoriaux, des étapes de fractionnement préalable sont nécessaires à leur identification. Par ailleurs, des tests microchimiques complémentaires sont appliqués pour l'identification des pigments dans le cas de l'étude de prélèvements d'objets muséaux.

La caractérisation de certains composés non commerciaux nécessite de les isoler, de les purifier avant leur analyse et de les caractériser par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H) et bidimensionnelle homonucléaire (COSY ^1H - ^1H).

Enfin, pour ce qui concerne l'analyse des échantillons muséaux, une étape de décomplexation du colorant doit être effectuée dans le but de solubiliser ce dernier lorsqu'il est impliqué dans un complexe métallique dans le cas de l'utilisation d'une laque par l'artiste. Ce prétraitement est réalisé suivant la nature de l'échantillon en privilégiant la méthode d'extraction non dénaturante par rapport au protocole traditionnel utilisant l'acide chlorhydrique. Par ailleurs, les fractions soumises à des tests de cytotoxicité seront celles qui contiennent les marqueurs de coloration de la plante plus ou moins purifiés.

PARTIE I
ACTIVITES D'ORIENTATION ET
SELECTION DES PLANTES
TINCTORIALES ETUDIEES

Chapitre 1. Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique des plantes recensées

1. Aperçu sur l'art et l'artisanat au Bénin

La frontière entre l'Art et l'artisanat est très étroite. Alors que l'art représente l'ensemble des œuvres esthétiques représentatives d'une civilisation, d'un pays, d'une époque, d'un courant ou d'un créateur particuliers; l'artisanat quant à lui, constitue le métier, ou la production d'une personne qui travaille de ses mains (Encarta, 2009). L'artisanat consiste en effet, en l'extraction, la production, la transformation des biens et/ ou la prestation grâce à des procédés techniques dont la maîtrise requiert une formation par la pratique (Davodoun, 2011). Donoff (2008) distingue l'artisan d'un métier d'Art de l'artisan, en remarquant que ce dernier réalise son travail bien pour son bien-être alors que l'artisan d'un métier d'Art est beaucoup plus qu'un simple ouvrier. Ainsi, son investissement personnel lors du processus de création d'un objet inclut un esprit créatif qui peut conférer une dimension artistique à l'objet. Et c'est par une créativité exceptionnelle que l'artisan d'un métier d'Art met non seulement son savoir-faire appris et son expérience acquise en œuvre, mais aussi son esprit innovateur pour réaliser des objets de création (Pearlman, 2004 ; Swengley, 2008). La compétence technique, tous deux la possèdent, mais ce qui les sépare tient au goût et à l'investissement spirituel. Non pas que l'artisan n'ait point de goût. Mais il l'exprime dans un cadre bien défini ; il fait son travail avec goût. Par contre pour l'artisan d'Art, le goût est affaire de jugement : il juge ce qui est beau ou laid, provoquant ou consensuel, conformiste ou à la marge. Par ses œuvres, l'artisan d'un métier d'art fournit de l'information sur ses processus de fabrication, mais aussi sur sa passion de la matière travaillée. Cette liaison authentique entre le savoir-faire fonctionnel et le domaine émotionnel se traduit dans l'objet. Ainsi, émotion et expertise se conjuguent pour créer un objet artistique par un artisanat, et, ce, même si l'impulsion initiale n'est rien d'autre qu'une commande d'un client. Est artisan au Bénin, tout travailleur indépendant, de l'un ou l'autre sexe qui exerce une activité artisanale pour laquelle il justifie d'une qualification professionnelle reconnue, assure la direction de son entreprise et prend personnellement part à l'exécution de son travail telle que définit à l'article 1^{er} de la loi n°98-037 du 22 Novembre 2011 portant code de l'artisanat en République du Bénin. La nomenclature des métiers de l'artisanat au Bénin reconnaît 210 métiers regroupés en 42 corps de métiers répartis en 11 branches d'activités allant des plus natives (fibres végétales, textile, cuir et peau, poterie et céramique...) aux plus modernes (métaux et constructions mécaniques, électronique, bâtiment, alimentation...). En effet, l'artisanat dans sa forme native a pris naissance dans les couvents qui étaient à la fois des centres de formation du "vodounsi"

(adepte du fétiche), et des foyers de création artistique familiaux. L'artisanat relève principalement du secteur secondaire et du fait des cumuls de fonctions a un prolongement dans le secteur tertiaire. Il occupe 13% de la population active et la 3^{ème} place en terme d'emplois après l'agriculture et le commerce. Sa contribution au produit intérieur brut (PIB) est de l'ordre de 11% selon les dernières estimations de l'INSAE en 2011. Les entreprises artisanales représentent 51,02% de l'ensemble des entreprises béninoises recensées dans le cadre du recensement général des entreprises de 2008. Elles contribuent à la satisfaction des besoins fondamentaux de l'Homme (se vêtir, se loger, s'instruire...), à la formation professionnelle des jeunes garçons et filles par l'apprentissage d'un métier, à la valorisation des matières premières locales et constituent une solution à la crise de l'emploi. En effet, l'entreprise artisanale offre la plus grosse opportunité d'auto-emploi au Bénin. Plus de 78% des entrepreneurs artisans sont installés à leur propre compte. C'est un secteur qui offre aux jeunes de véritables chances à s'auto employer. La disponibilité des matières premières locales représente une potentialité insuffisamment encore exploitée par l'activité artisanale malgré l'écoulement des produits, et le secteur demeure peu professionnalisé. Cet état de chose serait dû en partie par une discontinuité entre les connaissances autochtones et l'enseignement moderne. C'est donc dans le sillage de la redécouverte des savoirs faire locaux en matière des colorants naturels et plantes tinctoriales traditionnellement employés par les artisans au Bénin, qu'une enquête ethnobotanique a été réalisée dans le cadre de cette étude.

2. Etude ethnobotanique des plantes tinctoriales : Présentation de la zone d'étude

La commune d'Ifangni est située sur le rebord Sud-Est du Bénin dans le département du plateau. Elle est marquée par une faible altitude dont la moyenne est de 100 m et caractérisée par un climat subéquatorial avec deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches (Gandonou et Guidibi, 2006). D'une superficie de 242 km² représentant 0,21% de la superficie nationale, la commune d'Ifangni est subdivisée aujourd'hui en six arrondissements regroupant au total 40 villages et quartiers de ville (**Figure I.1.1**). Au troisième recensement de l'Institut National de Statistiques et d'Analyses Economiques (INSAE, 2003), la population totale d'Ifangni estimée à 71 606 habitants, regroupant majoritairement deux courants socioculturels (Tohazin, 1986) dont le groupe **Yoruba** composé des *Anagonu* et *Ifonyin*, et le groupe **Ajà-Tado** formé des *Gunnu* et *Tilinu* en majorité. Le plateau d'Ifangni est dominé à l'Est par le cours d'eau **Aguidi** qui forme la branche principale recevant de part et d'autre des affluents. Cette vallée est occupée par des forêts marécageuses de palmiers raphia, de joncs et d'autres essences utiles. Les formations végétales sont constituées de reliques de forêts

sacrées, de fourrés arbustifs où dominent *Elaeis guineensis*, et des graminées (Assogba, 2008). Les populations de cette commune vivent encore de manière très traditionnelle et donc ont une excellente connaissance de leurs ressources naturelles et végétales qu'elles exploitent pour leurs différentes activités. Elles sont constituées d'habiles artisans et excellent dans l'art de la vannerie et de la sculpture sur bois (Godonou et Guidibi, 2006).

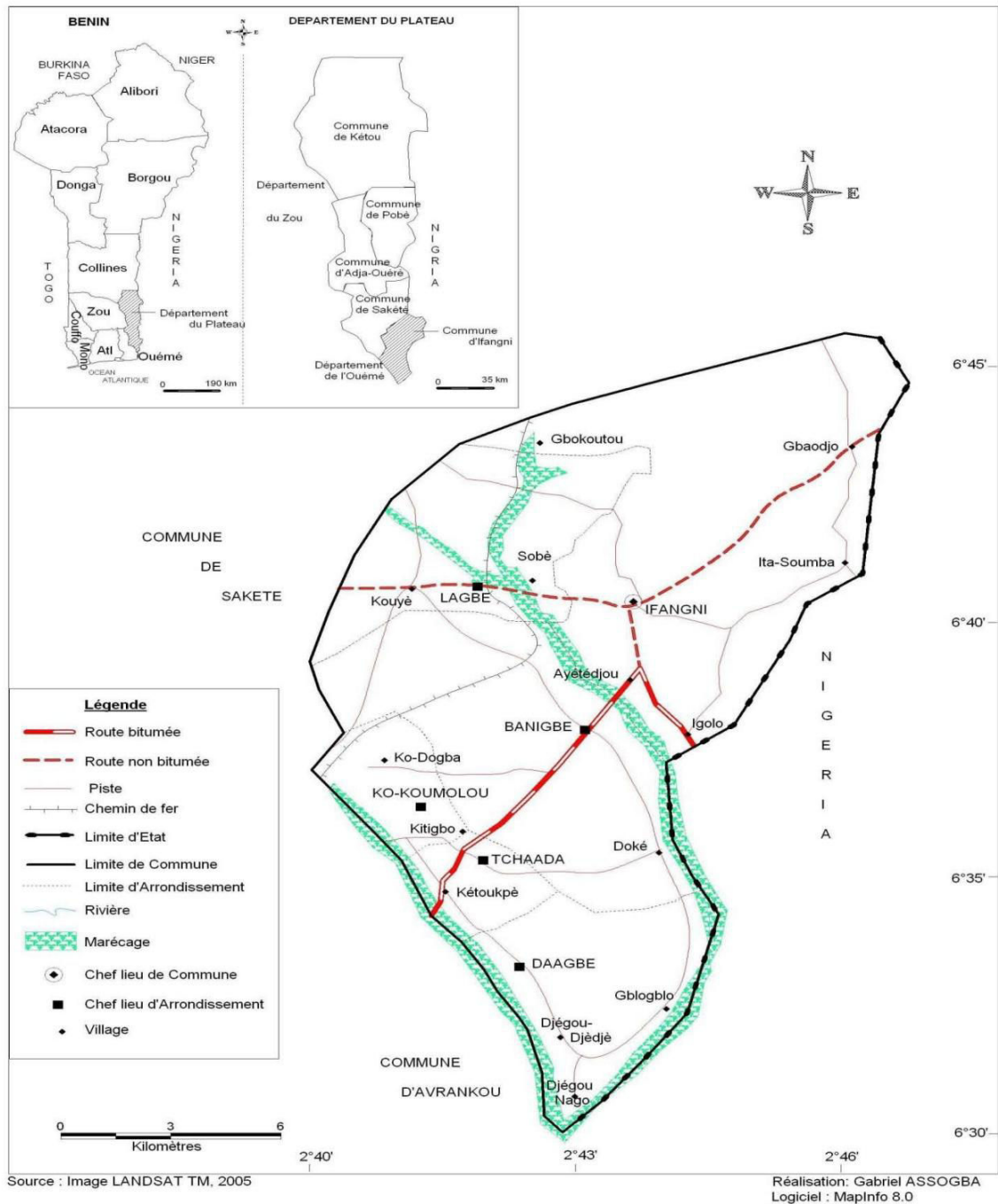


Figure I.1.1 : Carte de situation géographique de présentation de la zone d'étude (Commune d'Ifangni) Source : Assogba Gabriel (2008)

Malgré la disponibilité des matières premières et la facilité d'écoulement des produits, le secteur de l'artisanat demeure peu professionnalisé car l'Art sous ses différentes formes a pris naissance dans les couvents qui étaient à la fois des centres de formation du "vodounsi" (adepte du fétiche) et des foyers de création artistique familiaux. C'est le cas des différentes familles de sculpteur de Daagbé qui ont servi d'instructeurs au cours de cette enquête. En bref, le choix de cette zone se traduit par sa diversité végétale riche et remarquable, qui présente des sols variés et des différences de pluviométrie importantes, car il était intéressant pour cette étude de disposer d'un maximum de diversités afin de pouvoir obtenir et étudier une large gamme de plantes tinctoriales exploitées traditionnellement, aussi bien dans l'artisanat qu'en pharmacopée.

2.1. Enquête

Cette étude s'est déroulée d'avril 2011 à juin 2012. Les travaux de terrain, les enquêtes ethnobotaniques et les sorties destinées à préparer des échantillons sont réparties sur toutes les saisons de manière à disposer de récoltes concernant les plantes pérennes et annuelles, ainsi que les différents organes végétaux recherchés. La technique d'enquête utilisée est basée sur l'entretien et l'observation. Elle consiste *a priori* en une conversation en tête à tête entre deux personnes dont l'une transmet à l'autre des informations. Cet entretien aboutit à un rendez-vous au cours duquel l'enquêté présente et explique son Art à travers l'usage des plantes tinctoriales. La plupart des échantillons utilisés par les enquêtés ont été identifiés sur le terrain en utilisant Arbonnier (2002), la Flore analytique du Bénin (Akoègninou *et al*, 2006) et confirmés à l'herbier national du Bénin puis harmonisés par The Plant List (2010). La procédure adoptée dans le premier temps est l'entretien semi-directif selon la méthode proposée par Baladier (1963) et Cuvillier (1964), où l'enquêté est invité à répondre de façon exhaustive dans ses propres termes et avec son propre cadre de références aux questions qui lui sont posées sur la base d'un questionnaire élaboré dans ce contexte. Les personnes interrogées sont des artisans et des particuliers ayant une expérience dans l'utilisation des plantes tinctoriales. L'échantillonnage est spécifique et guidé. Au total 23 artisans ou groupes d'artisans et particuliers ont participé à ces enquêtes.

2.2. Détermination du degré d'utilisation des plantes recensées et matériel du criblage phytochimique

Les enquêtes ethnobotaniques réalisées dans la zone d'Ifangni ont permis de sélectionner des espèces végétales pour leur double intérêt tinctorial et médicinal. Ainsi le matériel végétal répertorié est constitué de différents organes (écorce, feuilles et jeunes feuilles, gousses, racines, graines et résines) issus des plantes tinctoriales utilisées traditionnellement par les artisans de la zone d'Ifangni. Les espèces les plus connues et utilisées par les artisans ont été déterminées selon la méthode proposée par le groupe Tramil aux Caraïbes (Tramil 4, 1989). Cette méthode considère comme plantes à fréquence d'utilisation élevée, celles ayant été citées par au moins 20% des enquêtés. Par la suite, le criblage phytochimique s'est effectué sur les différentes parties des espèces végétales plus fréquentes, il s'agit des feuilles, écorces, gousses, graines et résines des plantes présentées. En effet, les analyses concernant le criblage phytochimique ont été réalisées au laboratoire de Pharmacognosie et des huiles essentielles de Porto-Novo. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Celle-ci est effectuée selon la méthodologie décrite par Houghton & Raman (1998) sur des organes végétaux préalablement séchés à température ambiante, à l'abri de la lumière puis moulus à l'aide d'un broyeur électrique type Flour Mills Of Nig El.Motor N°1827. Le tableau I.1.1 indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

Tableau I.1.1 : Principes généraux des réactions de caractérisation des grands groupes de composés chimiques recherchés

Familles chimiques	Principes de la réaction et résultats
Alcaloïdes	En milieu acide et en présence du réactif de Mayer (solution aqueuse d'iodure double de mercure et de potassium), les alcaloïdes se combinent avec le mercure et forment un précipité blanc ou jaunâtre.
Tanins	Avec les sels ferriques, les tannins donnent une coloration bleue ou noire ou un précipité rose.
Tanins catéchiques	Réactif de Stiasny puis bain marie (80°C, 30min) donne des précipités roses gros flocons.
Tanins galliques	Saturation du filtrat issu de tanins catéchiques à l'acétate de sodium puis l'ajout de 3 gouttes de FeCl ₃ donne une coloration bleu-noir intense.
Flavonoïdes	Réaction à la cyanidine : il s'agit de la mise en évidence en milieu acide de la génine (flavone, dihydroflavonols) des flavonoïdes en présence de poudre de magnésium à l'aide de coloration spécifique. Ainsi les flavonols sont colorés en orangé et les flavanones sont colorés en rouge.
Anthocyanes	Coloration rouge de filtrat augmenté en milieu acide et bleue violacée en milieu alcalin.
Leucoanthocyanes	En présence d'alcool et d'acide chlorhydrique puis chauffage au bain marie (90°C, 15min), le filtrat donne une coloration rouge cerise.
Dérivés quinoniques	Réaction de Bornträger : il s'agit d'une réaction de coloration. Elle s'obtient en dissolvant les quinones en milieu alcalin aqueux. La solution prend une teinte vive allant du rose au rouge violacé. Cette teinte varie selon la structure de la quinone (naphthoquinone, anthraquinone).
Saponosides	Ils sont mis en évidence par l'indice de mousse qui est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue qui, dans des conditions déterminées, donne une mousse persistante (après 15min)
Stéroïdes et terpènes	Libermann-Burchard (anhydride acétique-H ₂ SO ₄ , 50:1) donne coloration violette virant au bleu ou verte.
Coumarines	L'ajout d'une solution d'ammoniac à 25% au filtrat étheré donne une fluorescence intense à l'UV.
Mucilages	Il apparaît un précipité floconneux après ajout d'alcool absolu au décocté (étude de la viscosité des infusés et décoctés).
Dérivés cyanogéniques	Les ions cyanures réagissent avec l'acide picrique et donnent une coloration marron.
Cardénolides	Réaction de Kedde : en milieu alcalin (NaOH), l'acide dinitrobenzoïque s'additionne sur la γ lactone α,β -insaturée du cardénolide pour former un dérivé fortement coloré en rouge pourpre ou rouge au vin.

2.3. Traitement des données

L'analyse statistique est faite à l'aide du logiciel SPSS version 17.0 où les données ont été soumises à une analyse statistique descriptive "cross tabs" ou tableau croisé du logiciel SPSS 17.0 en vue de déterminer la répartition des grands groupes de composés chimiques suivant les principales couleurs observées. Un groupe chimique sera déterminant d'une couleur lorsque son degré de signification est inférieur à 5%. Ces résultats ont été ensuite soumis à une analyse logistique binaire en vue d'en extraire le coefficient de détermination dans le but d'apprécier l'efficacité des résultats obtenus.

2.4. Résultats et discussion

2.4.1. Etude ethnobotanique

Les enquêtes dans la commune d'Ifangni ont permis de répertorier 26 espèces végétales réparties entre 25 genres et 14 familles comme l'indique le tableau I.1.2 ; la plupart d'entre elles étant déjà connues (Bosseaux, 1965 ; Adjanohoun *et al*, 1989 ; Nacro et Millogo-Rasolodimbi, 1994). Les familles des *Leguminosae* (26,9%), *Phyllanthaceae* (11,5%), *Anacardiaceae*, *Bixaceae*, *Lamiaceae* et *Meliaceae* (7,7%), sont dominantes et représentent 69,2% des espèces inventoriées (**Tableau I.1.2**). Diverses parties de ces plantes fournissent des matières colorantes et résineuses utilisables par les artisans. Dans 13 des 26 espèces répertoriées, sont utilisés les feuilles et rameaux feuillés, dans 7 il s'agit de l'écorce, et dans 5 espèces ce sont les résines. Viennent ensuite les graines (3 espèces), le bois (2 espèces) et les parties souterraines (racine et rhizome) pour 2 espèces. Ces résultats montrent que les feuilles (50%) sont majoritairement sollicitées par les artisans. Selon Poffenberger *et al.* (1992) cité par Ouattara (2006), le prélèvement de 50% des feuilles d'un arbre n'affecte pas de façon significative sa survie.

Tableau I.1.2: Répertoire des plantes tinctoriales utilisées par les artisans dans la zone d'Ifangni

Famille botanique	Genre et espèce botanique	Noms locaux yoruba/nago	Partie utilisée	Préparation	Résultat
Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Kandju/Cajou	Feuilles/Ecorce	Décoction	Colorant jaune
	<i>Mangifera indica</i> L.	Mangoro	Feuilles	Décoction	Colorant jaune
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i> L.	Osun elede	Graines	Pressage, pétrissage, broyage	Matière pâteuse rouge
	<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook. f. ex Planch.	Gbehoutou/Ferou	Racine (rhizome)	Pilage et infusion	Colorant jaune
Cannabaceae	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Afoforo	Feuilles	Décoction	Colorant brun rouge
Capparaceae	<i>Crateva religiosa</i> G. Forst.	Eyigouhonron/Erun	Feuilles/gomme	Broyage et infusion	Colorant jaune
Combretaceae	<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	Anyi	Feuilles/résine	Broyage/décoction plus potasse blanche	Colorant jaune/ teinture brune
Euphorbiaceae	<i>Jatropha curcas</i> L.	Akpôro	Feuilles/ Ecorce	Infusion et macération	Colorant jaune brun
Lamiaceae	<i>Tectona grandis</i> L. f.	Ikpatomu	Jeunes feuilles (bourgeons)	Froissement/ broyage/ décoction	Teinture rouge
	<i>Vitex doniana</i> Sweet	Ori	Ecorce/racine	Décoction	Colorant rouge brun ou noir
Leguminosae	<i>Baphia nitida</i> Lodd.	Irosun/owiwi	Ecorce	Décoction	Teinture rouge
	<i>Indigofera tinctoria</i> L.	Shenshe/chenche	Plantes (tiges feuillées)	Pilage et infusion jusqu'à fermentation/ infusion dans l'urine fermentée	Teinture bleue variable
	<i>Parkia biglobosa</i> (Jacq.) G. Don	Igba	Ecorce/ Cosses	Pilage puis infusion	Teinture brune/ colorant rouge brun
	<i>Philenoptera cyanescens</i> (Schum. & Thonn.) Roberty	Elu	Feuilles et jeunes feuilles (bourgeons)	Pilage, mise en boulette séchage puis infusion	Teinture bleue variable
	<i>Pterocarpus erinaceus</i> Poir.	Apepe/ Osun dudu	Bois/résine	Décoction longue dans la potasse	Teinture rouge brun
	<i>Pterocarpus osun</i> Craib	Igi osun	Bois	Pétrissage de la poudre issue de la décomposition du tronc (après 3ans environ)	Pâte de teinture rouge
Lythraceae	<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	Adjangoulou	Feuilles/graines	Broyage puis décoction	Pâte noire/ jus brun-rouge
	<i>Lawsonia inermis</i> L.	Lali	Feuilles	Broyage avec potasse ou citron	Pâte de teinture rouge brun/ colorant rouge brun
Malvaceae	<i>Gossypium barbadense</i> L.	Owu	Feuilles	Trituration plus citron	Teinture rouge
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Dogonyaro	Gomme de l'écorce	Infusion macération	Colle de teinture jaune orangée
	<i>Khaya senegalensis</i> (Desv.) A. Juss.	Gawo	Ecorce	Débitage puis infusion	Colorant rouge orangé
Moraceae	<i>Ficus thonningii</i> Blume.	Odan	Latex ou résine	Léger séchage	Enduit
Phyllanthaceae	<i>Bridelia ferruginea</i> Benth.	Igi ira	Ecorce	Décoction/infusion, décoction plus potasse/Pilage et macération	Colorant brun/ bain de teinture kaki foncé/ noir
	<i>Hymenocardia acida</i> Tul.	Igi osu/ orukpa	Ecorce	Infusion	Teinture brun rouge
	<i>Flueggea virosa</i> (Roxb. ex Willd.) Royle	Iranjé	Plante	Pilage et infusion	Teinture noire
Poaceae	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Raeusch.	Ekan	Plante (feuilles)	Décoction (plus mordant)	Teinture jaune (variable)

En revanche, le prélèvement des parties souterraines, du bois et des écorces tue l'arbre (Jansen et collaborateurs, 2005) et peut mettre en péril sa conservation (Olivier *et al.*, 2001). Par ailleurs, les espèces tinctoriales recensées interviennent principalement dans la vannerie pour teindre les raphias et les nattes ; moyennement dans la production de teinture pour la poterie, la sculpture et le tissage ; et faiblement dans la confection des masques et autres objets d'art. Elles sont souvent utilisées par les Vodounsi sous forme de marqueur dans le cadre des cérémonies rituelles (mariage, circoncision, accouchement...), dans les couvents pour teindre les pagnes des féticheurs et les sculptures tapissées d'enduit soutenant divers éléments (**Tableaux I.1.3A ; I.1.3B**). En outre, près de 97% des espèces répertoriées sont utilisées pour des soins médicaux dans cette zone. Au total, ces plantes entrent dans le traitement de plus de 47 maladies différentes dont les plus courantes sont le diabète, le paludisme, l'anémie, les maladies de la peau, les hémorroïdes, la diarrhée et l'hypertension artérielle. Il est à remarquer que les feuilles sont les parties de la plante les plus utilisées (54,83%) pour les préparations médicamenteuses. Ce résultat est proche de celui observé quant à l'usage tinctorial de ces mêmes plantes. En effet, il est identique à celui établi par Adjanooun et Aké Assi (1979) cité par N'Guessan *et al.* (2009) qui ont indiqué que les feuilles étaient sollicitées, majoritairement, dans 59,10 % des cas. De même, divers modes de préparation ont été répertoriés aussi bien pour la préparation des teintures (broyage, pétrissage, pressage, pilage, trituration, infusion, décoction, macération avec ajout éventuel de mordants...) que pour les préparations médicamenteuses (décoction, cure-dent, macération et trituration).

Tableau I.1.3 A : Degré d'utilisation et importance tinctoriale et médicinale des plantes tinctoriales recensées dans la zone d'Ifangni.

Espèce botanique	Effectif d'utilisation	Degré d'utilisation de chaque plante %	Usage tinctorial	Usage pharmacologique recensé
<i>Anacardium occidentale</i> * L.	05	21,74	Teint raphia et natte en vannerie.	Contre l'hypertension, le diabète, la toux (décoction feuilles), diarrhée (décoction écorces).
<i>Mangifera indica</i> * L.	05	21,74	Teint raphia et natte en vannerie.	Contre le vomissement, la diarrhée, le diabète, stomatite (décoction feuilles).
<i>Bixa orellana</i> * L.	08	34,78	Teint les fibres (vannerie), les étoffes et divers masques. Bois pour la fabrication de masques Guèlèdè.	Contre le vomissement, expectorant, diabète, l'ulcère (décoction feuilles); les graines accompagnent les tomates alimentaires.
<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook. f. ex Planch.	01	04,34	Teint les étoffes et les raphias en vannerie. Teint les masques.	Poudre de la racine pour le traitement de l'ictère, des céphalées, rectorragie.
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	03	13,04	Teint les raphias et les poteries.	Contre la stérilité, le ballonnement (décoction feuilles).
<i>Crateva religiosa</i> G. Forst.	05	21,74	Vannerie : teint les nattes et raphia. Produit de gomme pour la sculpture. Teint les étoffes.	Comme légume alimentaire contre l'hypertension. Utilisé en cas d'anémie, de flatulence, des maux de cœur et de calcul urinaire, contre la fatigue et le paludisme (décoction feuilles).
<i>Anogeissus leiocarpus</i> * (DC.) Guill. & Perr.	10	43,48	Teint les étoffes et les fibres (tissage). Teint les cuirs. Gomme utilisée en sculpture comme enduit.	Contre les éruptions cutanées, l'ictère et les hémorroïdes (décoction feuilles). Traite la toux et les abcès (décoction écorces).
<i>Jatropha curcas</i>** L.	09	39,13	Teint les poteries. Teint les raphias et les nattes (vannerie). Utilisé en sculpture.	Contre la fièvre, le paludisme, les vomissements, le hoquet, la drépanocytose, les hémorroïdes, la dysenterie, le diabète, la toux (décoction feuilles et écorces). Traitement de la constipation (fruits), la gonococcie, les infections microbiennes (latex).
<i>Tectona grandis</i>** L. f.	19	82,61	Teint les masques, les raphias, les poteries et les étoffes.	Contre l'anémie, la gale, les douleurs et diverses infections (décoction feuilles).
<i>Vitex doniana</i> * Sweet.	06	26,08	Teint les raphias et les poteries.	Traitement de la dysenterie, de la diarrhée, du panaris, de la varicelle (infusion et décoction feuilles).
<i>Baphia nitida</i> Lodd.	04	17,39	Couvent : teint pagne des féticheurs, les sculptures. Commercialisé en poudre ou en boulettes comme produit cosmétique naturel. Teint les poteries et les raphias.	Contre le diabète, la dysménorrhée, la stérilité, les maladies de la peau (décoction feuilles). Contre l'épilepsie (décoction écorces).
<i>Indigofera tinctoria</i>** L.	09	39,13	Teint les étoffes, les raphias.	Traitement des ictères, des œdèmes (décoction plante).
<i>Parkia biglobosa</i>** (Jacq.) G. Don	08	34,78	Bois pour la fabrication de masque Guèlèdè. Sert de bain de teinture et de mordant pour divers masques.	Contre les maladies de la peau (antibactérien), les hémorroïdes, l'hypertension artérielle (décoction feuilles et écorces).

Tableau I.1.3 B : Degré d'utilisation et importance tinctoriale et médicinale des plantes tinctoriales recensées dans la zone d'Ifangni (suite)

Espèces	Effectif d'utilisation	Degré d'utilisation de chaque plante %	Usage tinctorial	Usage pharmacologique recensé.
<i>Phileoptera cyanescens</i> * * (Schum. & Thonn.) Roberty.	14	60,86	Teint les étoffes, les raphias. Teint les masques divers.	Traitement de rhumatismes, de céphalées, du diabète (décoction feuilles et racine).
<i>Pterocarpus erinaceus</i> Poir.	03	13,04	Utilisé en vannerie et dans les couvents par les vodounsi.	Traitement de la dysenterie, la dysménorrhée, l'aménorrhée, et l'anémie (décoction écorces).
<i>Pterocarpus osun</i> * Craib	05	21,74	Couvent : cérémonies rituelles, mariage, circoncision, fabrication des masques et tam-tams. Teint les raphias.	Traitement de la dysenterie, dysménorrhée, hémorragie utérine, hernie, (décoction écorces)/ traitement des blessures, de la teigne (pommade).
<i>Senna occidentalis</i> * (L.) Link.	05	21,74	Teint les tableaux et la poterie. Teint les masques divers.	Antipaludique, antidiabétique, contre éruption cutanée (décoction feuille), contre angine (racine cure dent).
<i>Lawsonia inermis</i> * * L.	07	30,43	Teint les raphias et les masques. Utilisé pour les tatouages.	Contre la dysménorrhée, le paludisme.
<i>Gossypium barbadense</i> L.	02	08,69	Utilisé en vannerie (raphia et natte).	Contre l'anémie, le vertige, la toux, la dystocie (trituration feuilles + citron).
<i>Azadirachta indica</i> * A. Juss.	06	26,08	Teint les raphias et vernit les masques.	Contre le paludisme, l'ictère, les stomatites, les douleurs (décoction feuilles).
<i>Khaya senegalensis</i> ** (Desv.) A. Juss.	09	39,13	Teint les étoffes.	Traitement des dermatoses, du rhumatisme, de la diarrhée (décoction écorce).
<i>Ficus thonningii</i> Blume.	05	21,74	Sert d'enduit déposé à la surface des tam-tams traditionnels, pour divers objets collés aux masques et aux habits rituels et culturels.	Traitement des maux de rein, des hémorroïdes, des diarrhées (décoction feuilles).
<i>Bridelia ferruginea</i> * Benth.	06	26,08	Teint les poteries et les fibres. Bain de teinture utilisé comme mordant pour la fabrication des masques.	Traitement d'épilepsie, des œdèmes (décoction feuilles), la dysenterie, anémie, rhumatisme, des troubles psychiques (décoction racine).
<i>Hymenocardia acida</i> * Tul.	05	21,74	Teint le raphia et les nattes (vannerie). Utilisé dans la poterie.	Contre les crises convulsives, les hémorroïdes, la drépanocytose, les œdèmes, l'asthénie (décoction feuilles).
<i>Flueggea virosa</i> * (Roxb. ex Willd.) Royle	05	21,74	Teint les poteries et les raphias.	Contre le paludisme, la fièvre, la rougeole, la toux, la constipation, l'angine, la blennorragie, stérilité, et les maladies de la peau (décoction plante).
<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Rausch	03	13,04	Teint les raphias (vannerie)	

*Plantes retenues pour l'analyse phytochimique

** Plantes sélectionnées

Il est constaté par ailleurs pour ce qui concerne les propriétés tinctoriales, que le mode de préparation est fonction de l'usage tinctorial et les résultats obtenus sont plus perceptibles avec l'ajout des mordants (citron, potasse, alun, cendre...) ou peuvent varier en fonction du traitement. Mais toutefois la décoction est le mode de préparation le plus sollicité par les artisans aussi bien pour la production de colorants naturels (46,15%) que dans le traitement des maladies (67,74%). Ce résultat est proche et confirme celui établi par Adjanohoun et Aké Assi (1979) et N'Guessan *et al.* (2009) qui indiquent que la décoction est majoritairement utilisée respectivement dans 32,94 % et 42,30% des cas. Il existe donc une similitude entre les propriétés tinctoriales et médicinales des plantes répertoriées. D'ailleurs, Jansen et collaborateurs (2006) ont admis que les végétaux tinctoriaux sont souvent polyvalents en fonction des parties utilisées ; dans 44% des espèces, plus d'une partie de la plante est utilisée. Dans la présente étude, 19 espèces ont été soumises au criblage phytochimique sur la base de leur degré d'utilisation.

2.4.2. Résultat du criblage phytochimique comparé aux couleurs principales obtenues

Le tableau I.1.4 résume le screening phytochimique effectué sur différents organes des 19 plantes les plus utilisées. Douze principaux groupes de composés chimiques sont caractérisés. Il s'agit des alcaloïdes, des tanins (catéchiques et galliques), des flavonoïdes, des anthocyanes, des leucoanthocyanes, des dérivés quinoniques, des saponosides, des terpénoïdes et stéroïdes, des composés réducteurs, des dérivés cyanogéniques, des coumarines, des mucilages et des cardénolides. Les tanins constituent le groupe le plus fréquent. On les retrouve dans toutes les espèces sélectionnées dont 18 renfermant des tanins catéchiques et 14 des tanins galliques ; 13 espèces ont donc en commun les 2 types de tanins.

Tableau I.1.4 : Récapitulatif du criblage phytochimique

Nom (genre et espèce)/organes utilisés	Grands groupes de composés chimiques															Couleur
	Al	Ta	Tc	Tg	Fl	Ant	LAn	dQ	Sap	T/St	Cr	dCy	Cou	Mu	Card	
<i>Anacardium occidentale</i> L. (feuilles)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	jaune
<i>Mangifera indica</i> L. (feuilles)	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	jaune
<i>Bixa orellana</i> L. (graines)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+/-	+	-	-	+	-	rouge
<i>Crateva religiosa</i> G.Forst. (feuilles)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-/+	-	-	-	+	-	jaune
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr. (feuilles)	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	jaune
<i>Jatropha curcas</i> L. (feuilles)	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+/-	+	-	-	+	-	jaune brun
<i>Tectona grandis</i> L.f. (jeunes feuilles)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	Rouge
<i>Vitex doniana</i> Sweet. (écorce)	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+	+	rouge brun
<i>Indigofera tinctoria</i> L. (tige feuillée)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	bleu
<i>Parkia biglobosa</i> [‡] (Jacq.) G. Don (écorce)	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-/+	+	-	+	+	-	brun
<i>Parkia biglobosa</i> (Jacq.) G. Don Benth (cosses)	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	rouge brun
<i>Philenoptera cyanescens</i> (Schum. & Thonn.) Roberty (jeunes feuilles)	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	bleu
<i>Pterocarpus osun</i> Craib (bois)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	rouge
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link. (graines)	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	brun noir
<i>Lawsonia inermis</i> L. (feuilles)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	+	-	+	+	-	brun-jaune
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (gomme de l'écorce)	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	orangé
<i>Khaya senegalensis</i> (Desv.) A. Juss. (écorce)	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	rouge orangé
<i>Bridelia ferruginea</i> Benth. (écorce)	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	noir
<i>Hymenocardia acida</i> Tul. (écorce)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	rouge brun
<i>Flueggea virosa</i> (Roxb. ex Willd.) Royle (tige feuillée)	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	noir
Total ¹	5	19	18	14	17	8	10	2	10	6/4	10	1	6	14	2	

Al : alcaloïdes, Ta : tanins, Tc : tanins catéchiques, Tg: tanins galliques, Fl : flavonoïdes, Ant: anthocyanes, LAn : leucoanthocyanes, dQ : dérivés quinoniques, Sap : saponosides, T/St : terpènes et stéroïdes, Cr : composés réducteurs, dCy : dérivés cyanogéniques, Cou : coumarines, Mu : mucilages, Card : hétérosides cardiotoniques (cardénolides). + = réaction positive ; - = réaction négative ; [‡]Plante dont deux organes ont été utilisés ; (1) nombre de plantes contenant un composé chimique donné.

Ces résultats montrent que les plantes tinctoriales répertoriées ont toutes des propriétés tannantes et pourraient servir dans le tannage. En effet, les conclusions et recommandations issues des travaux réalisés par Jansen *et al.* (2005) sur les colorants et tanins de l'Afrique tropicale ont admis que les végétaux tannants, en particulier, ont des propriétés tinctoriales et médicinales en plus ; ce qui pourrait justifier *a priori* leur utilisation en médecine traditionnelle par la population locale. En outre, le groupe des flavonoïdes et le groupe des mucilages sont présents respectivement dans 17 et 14 plantes. Des composés réducteurs, saponosides, leucoanthocyanes et anthocyanes sont présents dans la moyenne des plantes sélectionnées. En revanche, 5 plantes contiennent des alcaloïdes ; deux d'entre elles : les cardénolides et les dérivés cyanogéniques ne se retrouvent que dans une seule plante. Par la suite, les résultats du criblage phytochimique ont été soumis à une analyse descriptive « cross tabs » et à une analyse binaire logistique associant les composés chimiques aux différentes couleurs obtenues (**Tableau I.1.5**). Il ressort de l'analyse des résultats que, mis à part les mucilages, les composés réducteurs et les leucoanthocyanes, tous les autres groupes de composés chimiques retrouvés dans les plantes analysées contribuent à la détermination des couleurs. Cependant, aucun groupe chimique à lui seul n'est spécifique d'une couleur.

Tableau I.1.5 : Cross tabs ou tableau croisé résultant de l'association des groupes chimiques aux principales couleurs obtenues.

	N	Moyenne	Ecart- type	Erreur standard moyenne	T	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Intervalle de confiance 95% de la différence	
									Inférieure	Supérieure
Espèces	20	10,50	5,916	1,323	7,937	19	0,000	10,500	7,73	13,27
Alcaloïdes	20	0,25	0,444	0,099	2,517	19	0,021	0,250	0,04	0,46
Tanins	20	1,00	0,000 ^a	0,000	19,000	19	0,000	0,950	0,85	1,05
Tanins catéchiques	20	0,95	0,224	0,050	7,550	19	0,000	0,750	0,54	0,96
Tanins galliques	20	0,75	0,444	0,099	13,077	19	0,000	0,900	0,76	1,04
Flavonoïdes	20	0,90	0,308	0,069	3,559	19	0,002	0,400	0,16	0,64
Anthocyanes	20	0,40	0,503	0,112	4,819	19	0,000	0,550	0,31	0,79
Leucoanthocyanes	20	0,55	0,510	0,114	1,453	19	0,163	0,100	-0,04	0,24
Dérivés quinoniques	20	0,10	0,308	0,069	4,359	19	0,000	0,500	0,26	0,74
Saponosides	20	0,50	0,513	0,115	2,854	19	0,010	0,300	0,08	0,52
Terpénoïdes	20	0,30	0,470	0,105	2,179	19	0,042	0,200	0,01	0,39
Stéroïdes	20	0,20	0,410	0,092	4,819	19	0,000	0,550	0,31	0,79
Composés réducteurs	20	0,55	0,510	0,114	1,000	19	0,330	0,050	-0,05	0,15
Dérivés cyanogéniques	20	0,05	0,224	0,050	2,854	19	0,010	0,300	0,08	0,52
Coumarines	20	0,30	0,470	0,105	7,550	19	0,000	0,750	0,54	0,96
Mucilages	20	0,75	0,444	0,099	1,453	19	0,163	0,100	-0,04	0,24
Cardénolides	20	0,10	0,308	0,069	7,493	19	0,000	4,150	2,99	5,31
Couleur d'origine	20	4,15	2,477	0,554						

a. t ne peut être calculé car l'écart-type est nul.

Par ailleurs, les résultats consignés dans le tableau I.1.6 montrent que 95,6% de la variation de l'obtention des couleurs sont expliqués par l'ensemble des groupes chimiques selon la méthode de Cox et Snell. De même la méthode Nagelkerke montre que cette variation est de 97,3%. Celle de Mc Fadden reconnue par sa puissance vient corroborer ces résultats, puis montre clairement que seulement 77,5% de la même variation sont expliqués par l'ensemble des groupes chimiques.

Tableau I.1.6 : Coefficients de détermination corrélant les groupes chimiques aux couleurs obtenues

Extraction du coefficient de détermination (R^2)	
Cox et Snell	0,956
Nagelkerke	0,973
McFadden	0,775

En effet, ces résultats confirment qu'il existe une synergie dans la détermination des couleurs par les groupes chimiques. Cette observation est proche de celle exprimée par Escribano-Bailon et ses collaborateurs (1996) à propos d'une étude réalisée sur les anthocyanes où ils expliquent que « les anthocyanes tendent à créer entre elles et/ou avec d'autres composés phénoliques des assemblages dits de co-pigmentation qui améliorent leur pouvoir colorant, leur tonalité et leur tenue selon les supports ».

2.4.3. Utilisation tinctoriale et médicinale

Toutes les espèces tinctoriales analysées sont aussi utilisées pour les soins médicaux dans cette zone. Ces observations sont proches de celles énoncées par Jansen *et al.* (2005) qui stipulent que les espèces à usage principal de colorants et tanins sont souvent polyvalentes et comptent en général quatre usages secondaires dont le plus important est l'usage médicinal. En effet, leurs principes actifs seraient souvent les composés chimiques également responsables des propriétés tinctoriales. La plupart de ces plantes cohabitent encore avec les populations autochtones ; certaines se retrouvent aux alentours des maisons (*Anogeissus leiocarpus*, *Crateva religiosa*, *Tectona grandis*, *Khaya senegalensis*, *Philenoptera cyanescens*, *Flueggea virosa* ...), d'autres servent de palissades ou de pilier (*Ficus thonningii*, *Jatropha curcas*, *Bixa orellana*, *Lawsonia inermis*...). La proximité de ces plantes constitue donc une source de matières premières non seulement pour la teinture et les marquages divers mais aussi pour les premiers soins médicaux. Les populations connaissent bien l'importance

thérapeutique de ces plantes auxquelles elles avaient recours pour les soins d'urgence et les besoins de la médecine domestique (Ahyi *et al.*, 1988). D'ailleurs, plusieurs auteurs, dont Kilahama (1998) ont admis que les connaissances autochtones sont un outil indispensable aux différentes stratégies de vulgarisation mais aussi de sauvegarde du savoir traditionnel. Ces plantes n'étaient donc pas choisies au hasard. Les critères qui prévalaient pour leur sélection étaient surtout leur utilité, leur disponibilité et leur facilité de récolte.

Les noms locaux yoruba/nago rapportés font surtout référence pour la plupart à l'usage tinctorial ou aux propriétés médicinales de la plante. C'est le cas de *Pterocarpus osun* dont le nom vernaculaire "osun" fait référence aux miracles attribués à la substance molle rouge préparée à partir de cette plante. En effet, cette substance est utilisée sous forme de pommade par les femmes juste après l'accouchement pour annoncer non seulement la naissance du bébé en raison de sa couleur mais surtout pour ses propriétés antifongiques (Jansen, 2005). La teinture de *Pterocarpus osun* peut être remplacée par celles d'autres bois rouges, les plus connus étant le bois de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Apepe /Osun dudu), et le bois de *Baphia nitida* Lodd (Irosun). Ces derniers bois se font aussi rares; le seul endroit où on a pu récolter quelques échantillons est la forêt sacrée de Daagbé; une zone interdite d'accès aux non initiés et surtout aux femmes qui constituent des artisans directement impliqués dans la transformation de ces bois en pigments commercialisables. Mis à part les tanins, les composés les plus impliqués dans la coloration de ces plantes sont les flavonoïdes. Ainsi, la couleur caractéristique de divers bois, du genre *Pterocarpus*, est due à certains flavonoïdes. La couleur rouge et jaune de ces espèces bois résulte de la présence de molécules appartenant à la famille des santalines (Kinjo *et al.*, 1995 ; Surowiec *et al.*, 2004). Ces molécules sont très utilisées dans le domaine de l'industrie textile où elles servent de colorants. La couleur rouge est due aux santalines A et B, tandis que la couleur jaune est due aux santalines Y et AC (Kinjo *et al.*, 1995 ; Dweck, 2002).

Les flavonoïdes sont également très utilisés en cosmétique, et participent à la lutte contre le vieillissement cutané en tant que composés antioxydants. Ils limitent l'accumulation des formes actives de l'oxygène très réactives, et protègent les protéines structurales de la peau (collagène et élastine) (Macheix *et al.*, 2005). Dans le domaine pharmacologique, les proanthocyanidines (biflavonoïdes) possèdent des effets anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-ulcéreux (Santos-Buelga et Scalbert, 2000 ; Hooper et Cassidy, 2006). Par ailleurs, plusieurs propriétés biologiques citées par Koné (2009) ont été attribuées à divers composés polyphénoliques. Il s'agit de propriétés anticancérogènes, anti-ulcéreuses, anti-inflammatoires, analgésiques, antispasmodiques, antiparasitaires, antimicrobienne. En outre, de nombreux

triterpènes, isolés de diverses plantes, possèdent des propriétés très variées telles que les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, analgésiques, anticancéreuses, et antivirales (Liu, 2005). On pourrait trouver une certaine compatibilité entre les propriétés des groupes chimiques trouvés, les objectifs thérapeutiques recherchés dans les traitements traditionnels relevés et les diverses couleurs exhumées par ces plantes. Cette étude a révélé que les propriétés antalgiques, antispasmodiques, anti-inflammatoires, antiseptiques et antibactériennes des groupes chimiques présents dans les plantes, sont les plus exploitées. Dinesh *et al.* (2009) dans une étude réalisée sur *Lawsonia inermis* confirment les propriétés antibactériennes de l'extrait éthanolique sur *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* et *Bacillus subtilis*. Ils font remarquer que les composés chimiques responsables de ces propriétés sont des naphtoquinones, or ces mêmes quinones sont responsables des propriétés tinctoriales de la plante d'après les travaux réalisés par Bensegueni (2001). De même les travaux réalisés par Purushotham *et al.* (2010) ont révélé les activités antibactérienne et analgésique de *Tectona grandis*. Cette plante possède des anthraquinones et naphtoquinones (Ranjana et Saikia, 2005 ; Mahesh et Jayakumar, 2011), qui seraient à l'origine de cette activité. En revanche *Hymenocardia acida* est une espèce reconnue pour sa teinture rouge brun mais son analyse phytochimique n'a révélé que des tanins et des dérivés cyanogéniques. Cette plante est localement interdite d'usage comme bois de chauffe à cause de la fumée toxique qu'il dégagerait sous l'effet de la chaleur ; d'où son appellation en nago "fumée qui tue". En effet, cette toxicité serait due aux dérivés cyanogéniques présents dans la plante. Cependant, ses feuilles sont utilisées en décoction dans le traitement des hémorroïdes, des œdèmes, de l'asthénie et de la drépanocytose. D'ailleurs son activité antidrépanocytaire *in vitro* a été prouvée par les travaux de Mpiana *et al.* (2007). En général, les espèces végétales inventoriées ont fait l'objet de plusieurs études pharmacologiques. C'est ainsi que les travaux de Rajib *et al.* (2009) ont montré une activité hépatoprotectrice des graines de *Bixa orellana*, utilisées en grande partie comme colorant alimentaire ayant des propriétés antioxydantes (Cardarelli *et al.*, 2008). La teinture des écorces d'*Anacardium occidentale* (Akinpelu, 2001), de *Vitex doniana* (Kilani, 2006) et celle de *Jatropha curcas* (Igbiosa *et al.*, 2009) ont montré un large spectre d'activité antibactérienne dont l'inhibition de *Shigella dysenteriae*, ce qui pourrait justifier leur usage régulier dans le traitement des diarrhées graves par la population autochtone.

Par ailleurs la multitude des types de composés chimiques responsables des couleurs et leur synergie d'action rendent difficile leur caractérisation, voire même leur connaissance par

criblage phytochimique. En effet, si certains pigments comme les anthocyanes, les flavonoïdes et les caroténoïdes sont respectivement responsables de la couleur violette à rouge-violacé des feuilles et des tiges, de la couleur jaune, orangée et rouge-orangé des pièces florales, des fruits et des racines tubérisées dans lesquelles ils sont présents, d'autres par contre ne livrent leur couleur qu'après traitement : rouge pour certaines quinones et bleue pour l'indigo. Il ressort de ce travail, l'intérêt de réaliser une étude chimique approfondie des molécules responsables des diverses couleurs issues des plantes sélectionnées sur la base de leur fréquence d'utilisation, de leur facilité d'approvisionnement et de leur répartition géographique à l'échelle nationale. Sept plantes tinctoriales obéissent à ce critère; il s'agit de *Tectona grandis*, *Phileoverta cyanescens*, *Indigofera tinctoria*, *Khaya senegalensis*, *Jatropha curcas*, *Parkia biglobosa* et *Lawsonia inermis*.

2.5. Conclusion

L'enquête ethnobotanique sur l'usage traditionnel des plantes tinctoriales dans la zone d'Ifangni a permis de répertorier 26 plantes. Ces plantes, en plus des divers colorants et résines qu'elles présentent, sont aussi utilisées par la population locale pour des soins multiples. Le criblage phytochimique a permis de caractériser dans les plantes recensées les groupes de composés chimiques suivants : alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, terpènes, stéroïdes, saponosides, dérivés quinoniques, composés réducteurs, dérivés cyanogéniques, coumarines, mucilages et cardénolides. Les diverses couleurs obtenues résultent selon l'analyse statistique de synergies entre les groupes chimiques présents dans la plante. En outre, les propriétés médicinales des plantes répertoriées sont liées à la présence de ces mêmes composés chimiques. Les résultats obtenus sur les plantes tinctoriales du Sud-Est Bénin sont donc plus qu'encourageants et l'étude se poursuit par l'identification des molécules chimiques responsables de ces couleurs et des propriétés médicinales répertoriées. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Ethnopharmacologia* (Fagbohoun *et al.*, 2014). Ces travaux passeront en outre par une investigation de la teneur en polyphénols, du potentiel antioxydant et de la toxicité des sept espèces sélectionnées.

Chapitre 2. : Dosage spectrophotométrique, activités antioxydantes et toxicité larvaire des extraits méthanoliques des plantes sélectionnées

1. Dosage spectrophotométrique

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (380 à 750 nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés chromophores. Ces derniers représentent les groupements qui confèrent la couleur à la molécule colorante ou chromogène. D'autres groupes d'atomes du chromogène peuvent intensifier ou changer la couleur due au chromophore, ils sont appelés les groupements auxochromes. Ces deux groupements (chromophores : carbonyle $=C=O$; vinyl $=C=C-$..., et auxochromes: hydroxyl -OH; alkoxy -OR...) caractérisent en général les composés polyphénoliques présents dans les plantes (Capon *et al.*, 1999; Barka, 2008). L'évaluation de la teneur en composés polyphénoliques des plantes tinctoriales sélectionnées pourrait *à priori* justifier leur richesse en colorants naturels.

1.1. Dosage des phénols totaux

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires qui sont omniprésents dans les plantes et les produits végétaux (Razali *et al.*, 2008). Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal non purifié. Néanmoins une estimation du contenu en phénols totaux (TPC) des extraits peut être obtenue par différentes méthodes en particulier par utilisation d'un mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate commercialisé sous la dénomination de réactif de Folin-Ciocalteu (Macheix *et al.*, 2005). Le caractère réducteur des composés phénoliques et leur complexation possible avec les métaux lourds conduisent dans ce cas à la formation de complexes colorés bleus que l'on peut doser par colorimétrie vers 620-720 nm. Le test Folin-Ciocalteu (FC) est une méthode simple et rapide et elle peut être utile dans la caractérisation et la normalisation des échantillons botaniques.

1.1.1. Principe

Le dosage des phénols totaux est basé sur celui du Kit pré-fait, commercialisé par ISITEC-LAB SEPPAL (Code produit: KHPE035565). Le protocole décrit par ce kit fait

référence à la méthode utilisée par Singleton et Rossi (1965), reprise par Yizhong *et al.*, (2004). En effet, en présence du carbonate de sodium (milieu basique), le réactif de Folin Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans les échantillons. Les produits de réduction de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Après environ 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance des solutions d'échantillon et celle de l'étalon (acide gallique) sont mesurées à 620 nm par rapport à la solution d'eau distillée représentant le blanc réactif.

Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g d'échantillon) après une première transformation utilisant l'expression :

$$[(\text{Abs échantillon} - \text{blanc réactif})/(\text{Abs Standard} - \text{blanc réactif})] \times 3 = \text{g/L d'acide gallique}$$

1.1.2. Résultats

L'estimation des composés phénoliques totaux *via* le test de Folin (**Figure I.2.1**) met en évidence que les extraits les plus riches en composés phénoliques par ordre décroissant sont ceux de *K. senegalensis*, *T. grandis*, *P. biglobosa*, *L. inermis* avec respectivement une teneur de $427,59 \pm 4,05$; $307,08 \pm 8,56$; $228,31 \pm 5,67$ et $197,97 \pm 6,47$ mg EAG/g; approximativement 3 à 12 fois plus élevée que celle des extraits méthanoliques bruts de *J. curcas*; *P. cyanescens* et *I. tinctoria*.

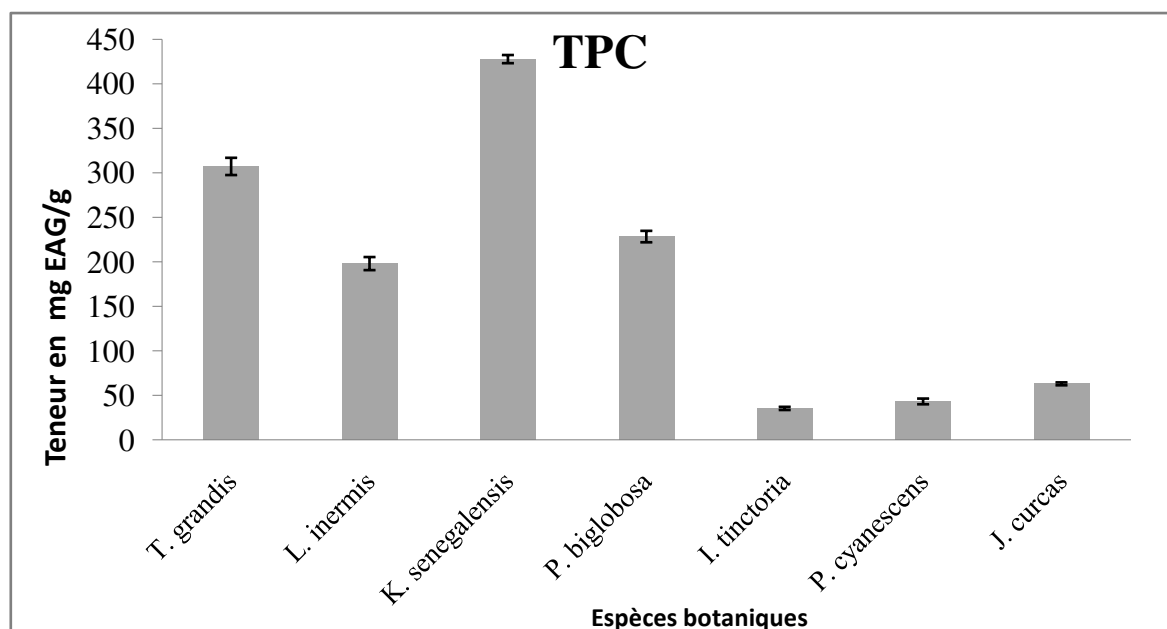


Figure I.2.1: Teneur en composés phénoliques totaux (TPC) en mg EAG/g, des extraits MeOH des plantes dosées à des concentrations initiales de 5 mg/mL. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions ($n=3$) \pm Ecart-type.

Le test FC étant mené sur les extraits bruts méthanoliques, le résultat obtenu au niveau de chaque espèce reste très global et ne donne aucune indication sur les composés présents dans chaque échantillon. De plus, chacun d'entre eux peut réagir de manière différente dans la réaction d'oxydoréduction, en fonction du nombre de groupes phénoliques présents. Cependant il pourrait favoriser la comparaison entre différents échantillons de la dispersion en teneur des composés phénoliques avec l'estimation complémentaire en composés flavonoïdiques, anthocyaniques, tanniques.... Par ailleurs, on constate qu'il y a une répartition des couleurs issues de ces plantes suivant leur teneur en phénols totaux. En effet, la teneur en composés phénoliques est plus élevée au niveau des espèces donnant des colorants rouge-orangé, rouge-brun, puis s'en suivent les espèces produisant des colorants bruns et jaune-brun. Les plus faibles résultats sont issus des espèces donnant des colorants bleu-vert ou bleu-noir. Ce test, basé sur une réaction d'oxydo-réduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (Prior *et al.*, 2005). De ce fait, les extraits les plus riches en composés phénoliques pourraient *a priori* être également considérés comme les plus antioxydants.

1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

L'appellation « flavonoïdes » rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base à 15 atomes de carbone dont la structure s'organise toujours autour de trois cycles 1,3-diphénylpropane C6-C3-C6 (**Figure I.2.2**) décrit par une nomenclature spécifique. Ils sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phénylchromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié : à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont déjà été isolées et caractérisées (Harborne, 1989 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

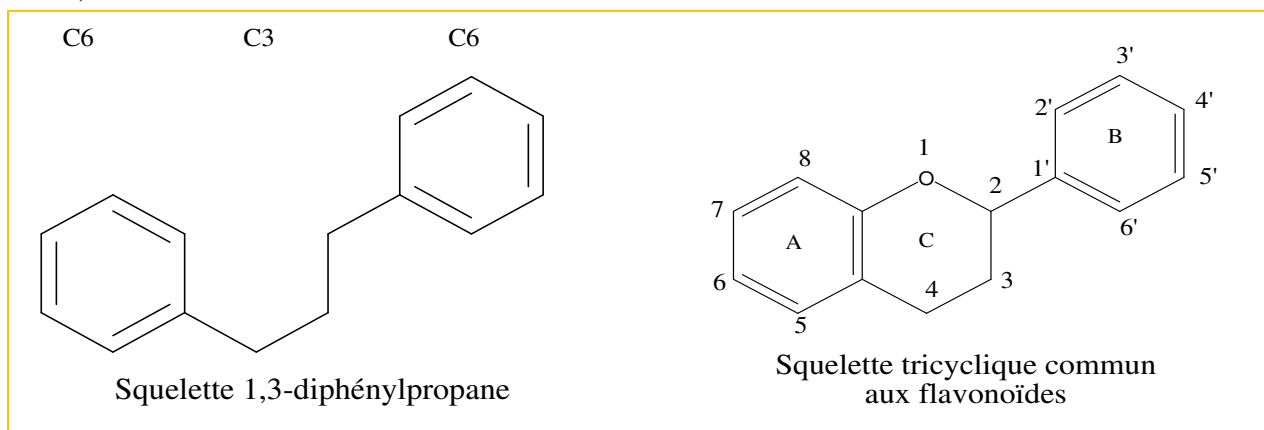


Figure I.2.2: Squelettes de base des flavonoïdes

Le terme «flavonoïdes» est dû à leur couleur jaune (= *flavus* en latin) qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration; au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes (Wilson, 1987). Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois.... Aussi, varient-ils quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal (Fritch et Griesbach, 1975).

1.2.1. Principe

La méthode décrite par Hariri et *al.* (1991), utilisant le 2-aminoéthyl diphénylborate a été exploitée pour la détermination de la teneur en flavonoïdes totaux présents dans les plantes. En effet, en présence des flavonoïdes, la solution méthanolique de 2-aminoéthyl diphénylborate vire au jaune fluorescent. Cette fluorescence, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents, est suivie par spectrophotométrie à 404 nm. La quercétine est le standard utilisé pour réaliser la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en équivalent quercétine (mg EQ/g) après transformation dérivant de la formule:

$$F = [(C_{Eq} \times Abs_{ext}/Abs_q) / C_{ext}] \times 100$$

C_{Eq} : Concentration de quercétine équivalente à l'extrait à une absorbance donnée de l'extrait sur la courbe d'étalonnage.

Abs_{ext} : Absorbance de l'extrait

Abs_q : Absorbance de quercétine

C_{ext} : Concentration de l'extrait en matériel végétal

1.2.2. Résultats

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits méthanoliques des plantes tinctoriales sélectionnées, a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (**Figure I.2.3**) réalisée avec la quercétine à différentes concentrations (0,001 à 0,03 mg/mL).

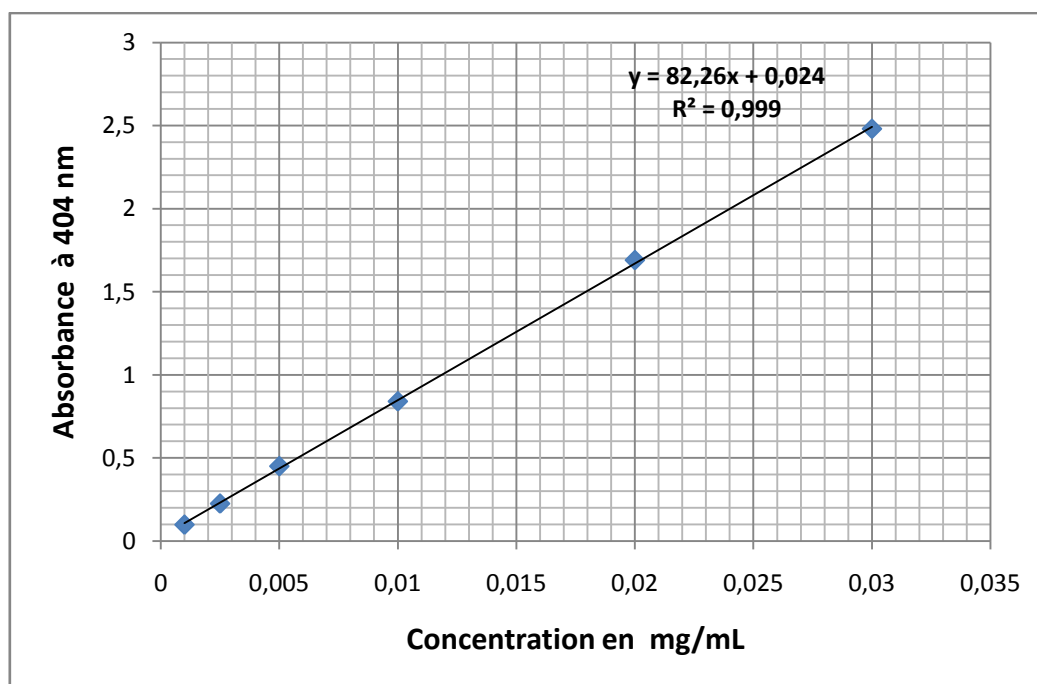


Figure I.2.3: Courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Les quantités de flavonoïdes correspondantes à chaque espèce, rapportées en équivalent gramme de l'étalon quercétine se traduisent par les résultats de la **figure I.2.4**

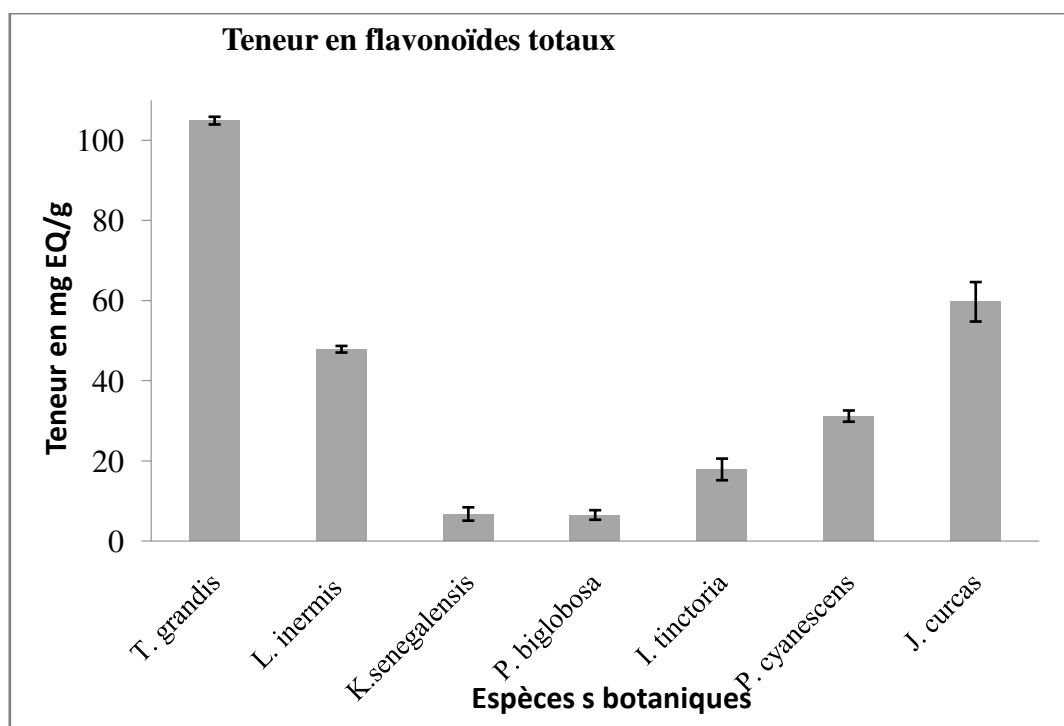


Figure I.2.4: Teneur en flavonoïdes totaux en mg EQ/g des extraits de plantes dosés à concentration initiale de 5 mg/mL. Les valeurs sont exprimées par la moyenne \pm Ecart-type ($n=3$)

Ces résultats exprimés sous forme d'histogramme, révèlent des proportions en flavonoïdes totaux allant de 6,52 à 104,9 mgEQ/g d'extrait. La plus forte teneur en flavonoïdes totaux $104,9 \pm 0,84$ mgEQ/g est issue de *T. grandis*, puis s'en suivent $59,7 \pm 4,35$ et $47,86 \pm 0,72$ mgEQ/g enregistrées respectivement au niveau de *J. curcas* et de *L. inermis*. Ces dernières proportions sont approximativement deux fois supérieures à celles trouvées au niveau des espèces responsables de colorants bleus: *I. tinctoria* ($17,88 \pm 2,38$ mgEQ/g) et *P. cyanescens* ($31,18 \pm 1,24$ mgEQ/g). Les teneurs les plus basses en flavonoïdes totaux ont été obtenues au niveau de *K. senegalensis* ($6,756 \pm 1,47$ mgEQ/g) et *P. biglobosa* ($6,52 \pm 1,05$ mgEQ/g) pour lesquelles, les organes utilisés sont des écorces. En effet, les plus faibles teneurs en flavonoïdes totaux ont été enregistrées au niveau des écorces.

1.3. Dosage des anthocyanes totaux

Les anthocyanes (du grec *anthos* signifiant fleur et *kyanos* signifiant bleu sombre) sont des pigments naturels qui dans le visible, participent à la coloration de certaines parties des plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (Brouillard, 1993). Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. Les anthocyanes sont employés pour améliorer la qualité des aliments en raison de leur contribution à la couleur et l'apparence. De même, il y a de plus en plus un intérêt croissant dans la teneur en anthocyanes des aliments et des nutraceutiques (alicament) en raison de ses avantages possibles pour la santé. En effet, la teneur en anthocyane peut constituer un critère exigible dans le contrôle de qualité et les spécifications d'achat de jus de fruits, des nutraceutiques et des colorants naturels. C'est dans ce cadre que Lee *et al.* (2005) ont actualisé, à travers une collaboration scientifique internationale, la méthode de dosage des anthocyanes monomères totaux.

1.3.1. Principe

Il repose sur le fait que les anthocyanes monomères changent réversiblement de couleur avec la variation du pH. En effet, on passe de la forme oxonium colorée à pH = 1,0 à la forme hémiacétale incolore à pH = 4,5 (**Figure I.2.5**). La différence entre l'absorbance des pigments anthocyanes à 520 nm est proportionnelle à la concentration en pigments présents dans l'échantillon. Une lecture de l'absorbance à 700 nm est effectuée pour corriger d'éventuelles erreurs dues aux brumes (troubles) dans les solutions testées.

La teneur en anthocyanes totaux est donnée en équivalent gramme de cyanidine-3-glucoside (mg ECyd-3-glu/g) d'échantillon. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Anthocyanes totaux (mg Ecyd-3-glu/g d'échantillon)} = \frac{A \times M \times F \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times Q}$$

où A = absorbance $\rightarrow A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}$

M = masse molaire de l'anthocyane prédominant dans l'échantillon (449,2 g/mol)

F = facteur de dilution

V = volume de l'extrait en L

ϵ = coefficient d'absorption molaire de l'anthocyane prédominant dans l'échantillon (26 900 L/cm \times mol)

d = largeur de la cuvette en cm

Q = quantité d'extrait ou poudre sèche homogénéisée, de feuilles ou d'écorce broyées en gramme (g)

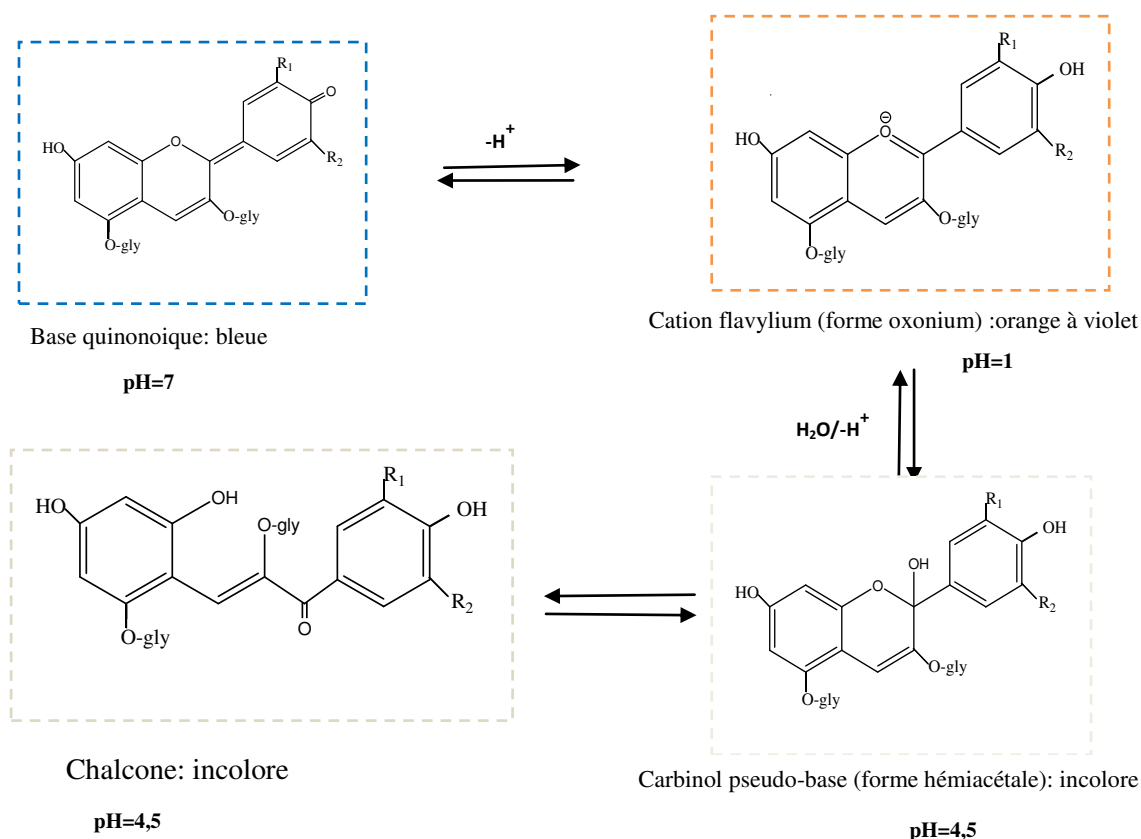


Figure I.2.5: Structure de la forme prédominante des anthocyanes suivant la variation du pH

1.3.2. Résultats

La **figure I.2.6** représente la courbe d'étalonnage de cyanidine-3-glucoside à partir de laquelle a pu être évaluée la proportion d'anthocyanes contenus dans les extraits de plantes dosés (**Figure I.2.7**)

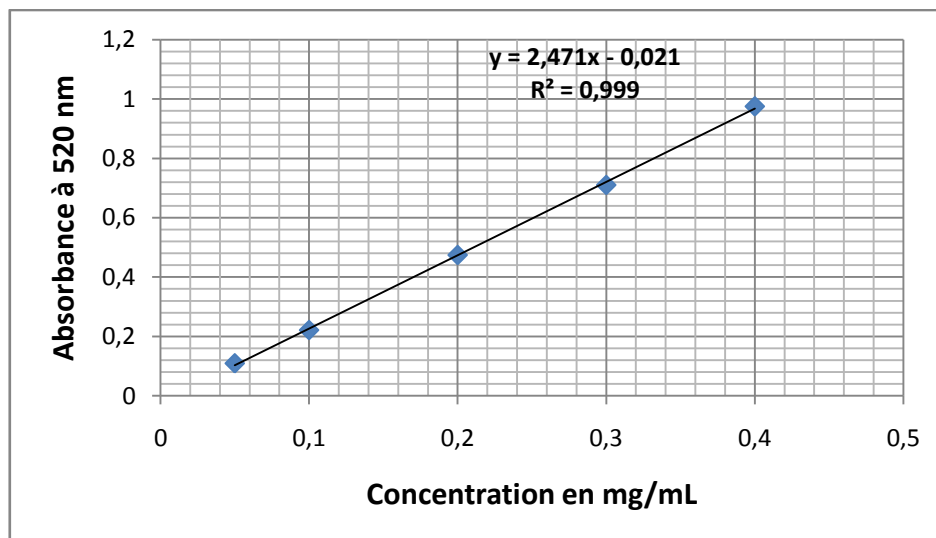


Figure I.2.6 : Courbe d'étalonnage réalisée avec le cyanidine-3-glucoside pour le dosage des anthocyanes totaux.

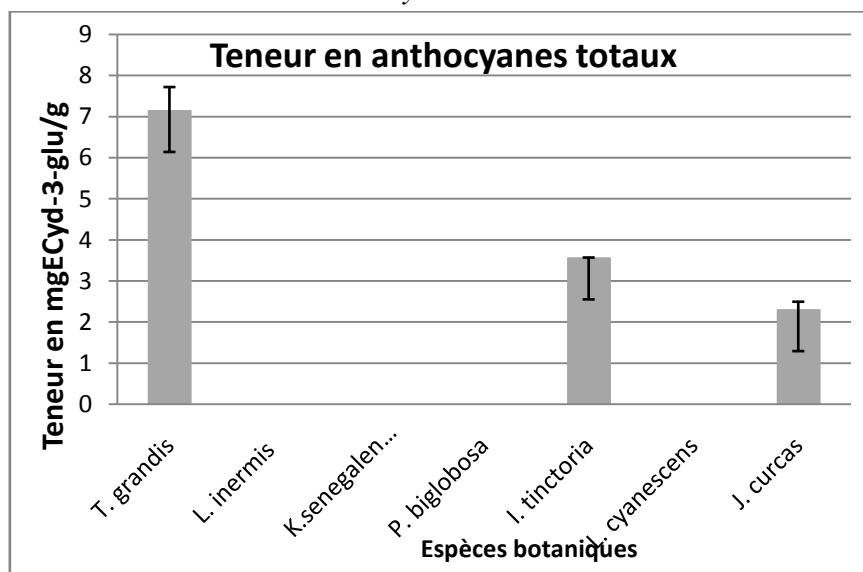


Figure I.2.7: Teneur en anthocyanes totaux en mgECyd-3-glu/g. Les extraits de plantes sont dosés à concentration initiale de 5 mg/mL. Les valeurs sont exprimées par la moyenne \pm Ecart-type ($n=3$)

Sur la figure I.2.7, on note que, seuls trois sur les 7 extraits de plantes dosés ont pu exprimer leur proportion en anthocyanes totaux. La teneur en anthocyanes totaux la plus élevée ($7,14 \pm 0,53$ mgECyd-3-glu/g) provient de *T. grandis*; elle fait deux fois celle obtenue au niveau de *I.*

tinctoria ($3,55 \pm 0,019$ mgECyd-3-glu/g) et environ trois fois celle de *J. curcas* ($2,29 \pm 0,2$ mgECyd-3-glu/g). Ces résultats vont de pair avec ceux du criblage phytochimique qui a relevé l'absence dans cette famille de composés chimiques au niveau de *L. inermis*, *K. senegalensis*, *P. biglobosa* et *P. cyanescens*. Par contre, bien qu'ayant présenté une forte teneur en anthocyanes, les feuilles de *T. grandis* caractérisées par criblage phytochimique, n'ont pas révélé la présence d'anthocyanes. Ce résultat serait influencé en partie par l'état de maturité et la date de récolte des feuilles de *T. grandis*. En effet, la récolte de ces feuilles a été effectuée deux fois de suite.

1.4. Dosage des tannins

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau. D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith (1973) : « des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes d'analyse récentes qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les tannins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (Haslam, 2007 ; Hagerman, 2002). Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes de tannins : les tannins hydrolysables (THs) et les tannins condensés (TCs). Les THs sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol comme l'acide gallique ou l'acide ellagique (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2001) (**Figure I.2.8**), tandis que les tannins condensés, ou proanthocyanidols, sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999). En général, les TCs ont des PMs plus élevés que ceux des THs. (**Figure I.2.9**).

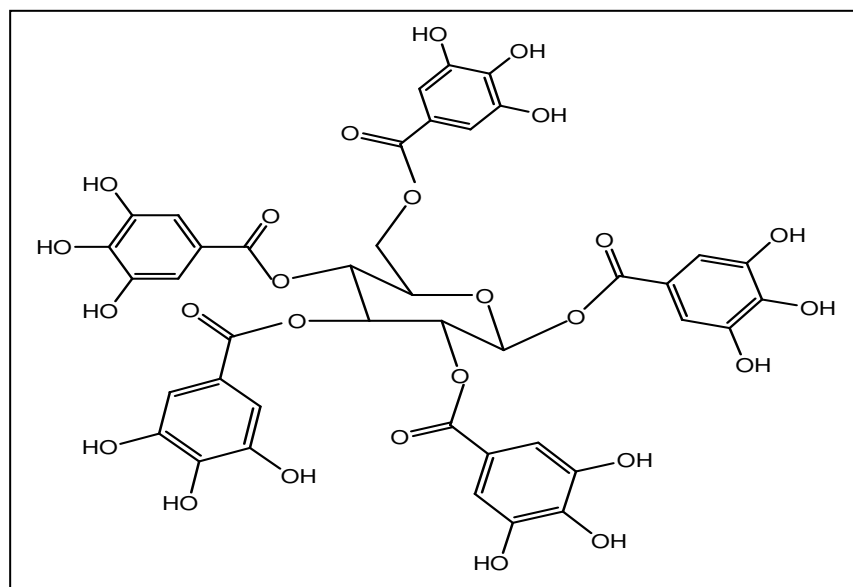


Figure I.2.8: Structure d'un tannin gallique (1,2,3,4,6-pentagalloyl-O-D-glucose)

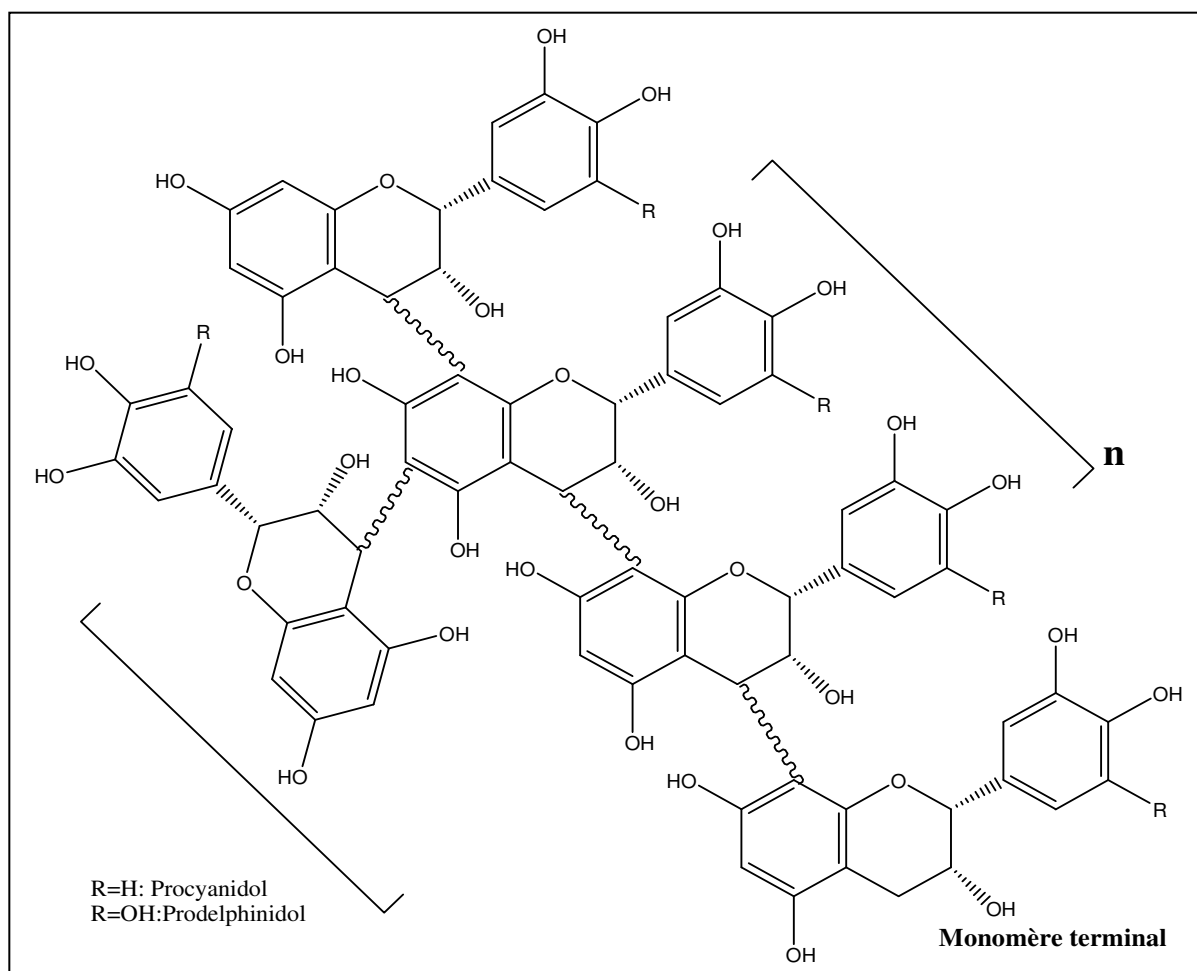


Figure I.2.9: Modèle de structure branchée des tannins condensés (Bruneton, 1999)

En raison de leurs structures complexes et variées, l'analyse des tannins est délicate et leur dosage souvent difficile. Néanmoins, des méthodes de dosage des tannins totaux (TTs) ont été développées, basées sur leurs propriétés physicochimiques ou biologiques. Parallèlement, des méthodes ont été proposées pour doser spécifiquement les THs (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2001) ou les TCs (Schofield *et al.*, 2001).

➤ **Méthode chimique**

La méthode de Folin-Ciocalteu (réactif spécifique des phénols) se décompose en deux dosages colorimétriques successifs : le dosage des phénols totaux puis le dosage des phénols non-tanniques d'un extrait acétonique (Bruneton, 1999). Ce second dosage est réalisé après la déplétion des tannins de l'extrait par le polyvinyl pyrrolidone (PVPP) (Schofield *et al.*, 2001). Le PVPP est une molécule capable de se lier aux tannins présents dans l'extrait et les complexes "tannin-PVPP" sont retirés de l'extrait par centrifugation (Makkar *et al.*, 1995). Indirectement, la teneur en TTs d'un échantillon est déterminée par la différence entre les teneurs en phénols totaux et en phénols non-tanniques.

➤ **Méthodes biologiques**

Il existe diverses méthodes de dosage des TTs fondées sur leur propriété à se fixer aux protéines :

- la méthode traditionnelle, utilisant de la poudre de peau, est appliquée dans le cas des drogues officinales (Bruneton, 1999);
- la méthode de la diffusion radiale (avec de l'albumine bovine ou du rubesco inclus dans un gel d'agarose) est une méthode simple qui permet le dosage simultané de nombreux échantillons (Hagerman, 2002; Mueller-Harvey, 2006) ;
- les techniques basées sur l'inhibition d'enzyme (β -glucosidase ; trypsine ; alcaline phosphatase) sont des méthodes très sensibles (Schofield *et al.*, 2001) ;
- une méthode basée sur la propriété des tannins à réduire la production de gaz lors de fermentations anaérobies a également été développée (Makkar *et al.*, 1995; Mueller-Harvey, 2006).

1.4.1. Principe

La méthode de dosage des tannins décrite par Hagerman et Butler (1978), est basée sur leur propriété à se fixer aux protéines. Le complexe tannin-protéine (BSA: Bovine Serum Albumine), présent dans le précipité formé et repris dans un tampon NaCl et dans un tampon

SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), est mesuré par spectrophotométrie à 510 nm suite à l'ajout du chlorure ferrique. C'est une méthode biologique simple qui permet le dosage simultané de nombreux échantillons. Les résultats sont exprimés en mg.L^{-1} Equivalent d'acide tannique (mg/L EAT) à partir des données d'absorbance et de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique réalisé entre (0,025 et 0,5 mg/mL).

1.4.2. Résultats

La quantité de tannins contenue dans les extraits de plantes testés est calculée à partir de la courbe d'étalonnage (**Figure I.2.10**) dont l'équation de régression est: $\text{Abs} = 0,9903q - 0,0157$; q est la quantité de tannins dans chaque extrait.

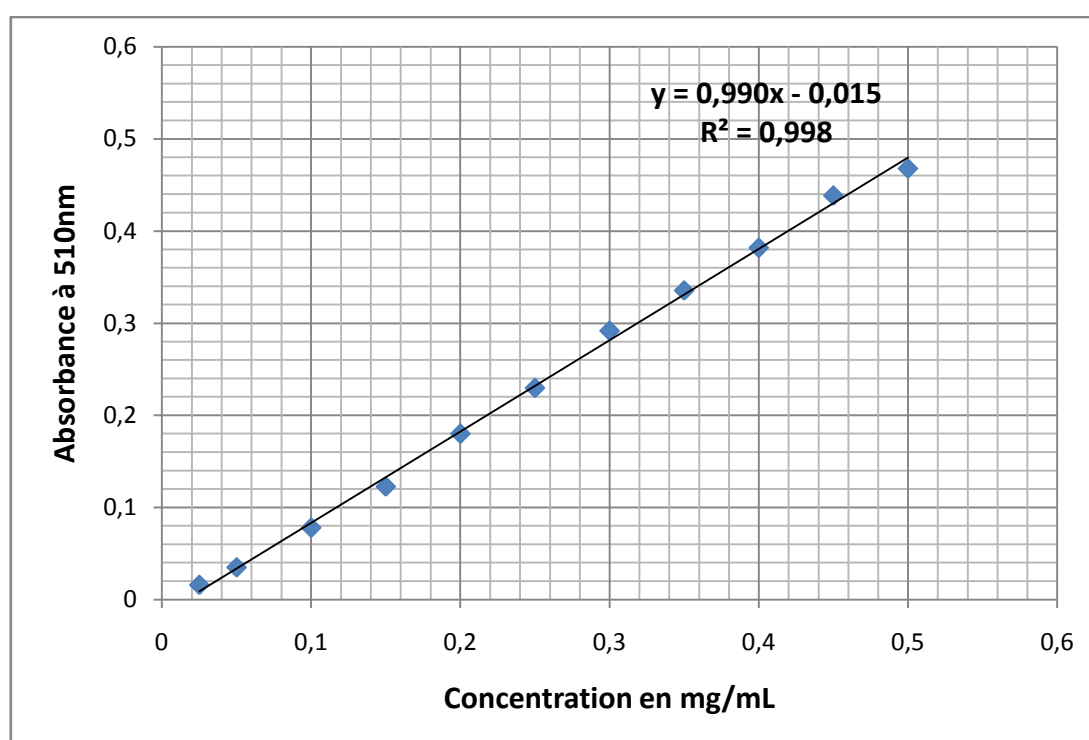


Figure I.2.10 : Courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique pour le dosage des tannins totaux.

La teneur en tannins totaux de chaque espèce, exprimée en mg.L^{-1} Equivalent acide tannique (EAT) (**Figure I.2.11**) est obtenue à partir de la formule:

$$\frac{2x(\text{Abs-Intersection})x\text{F}}{\text{pente}}$$

où F représente le facteur de dilution.

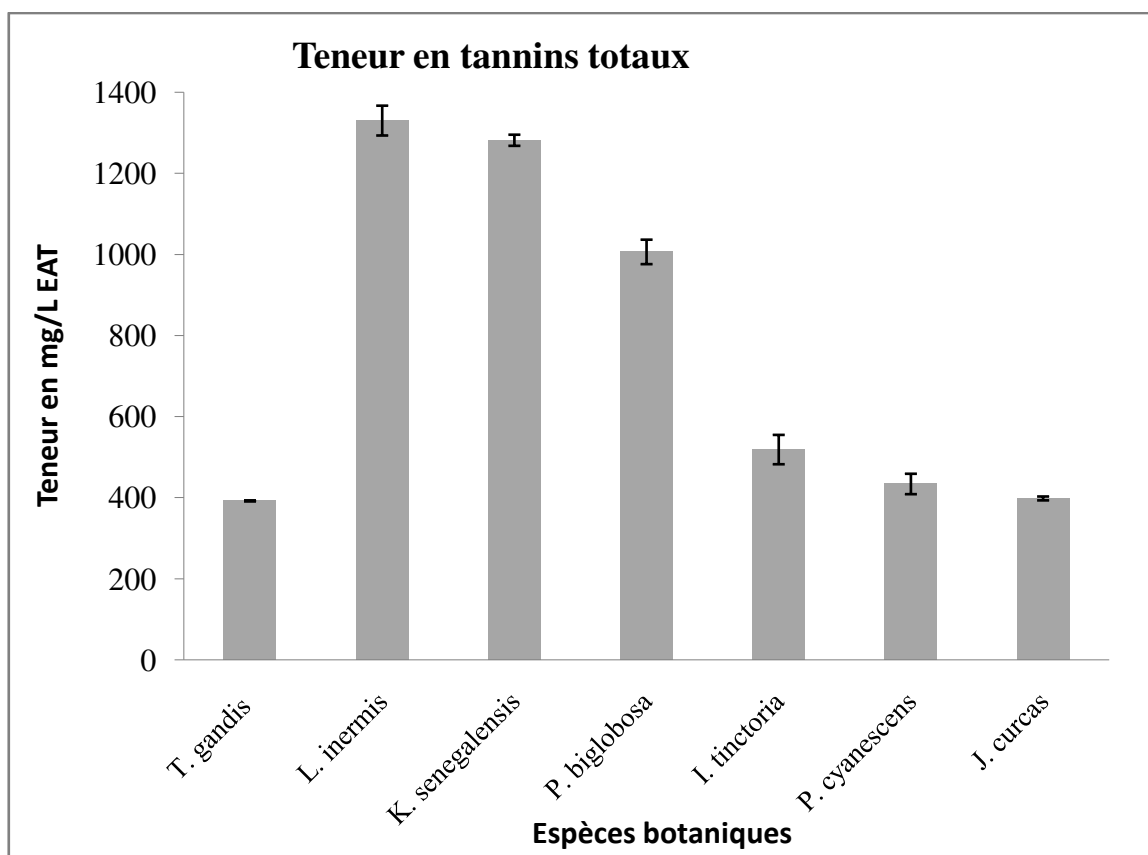


Figure I.2.11: Teneur en tannins totaux en mg.L^{-1} EAT. Les extraits de plantes sont dosés à concentration initiale de 2 mg/mL . Les valeurs sont exprimées par la moyenne des trois répétitions \pm Ecart-type

Les résultats de la figure I.2.11 montrent que les feuilles de *L. inermis* contiennent plus de tannins avec une teneur évaluée à $1330,3 \pm 32,49 \text{ mg.L}^{-1}$ EAT, suivies de près par les écorces de *K. senegalensis* ($1281,83 \pm 12,12 \text{ mg.L}^{-1}$ EAT) et ensuite de *P. biglobosa* ($1006,49 \pm 26,66 \text{ mg.L}^{-1}$ EAT). La plus faible teneur en tannins totaux a été enregistrée au niveau de *T. grandis* ($392,53 \pm 1,16 \text{ mg.L}^{-1}$ EAT); cette teneur est approximativement identique à celle issue de *J. curcas* ($398,59 \pm 4,75 \text{ mg.L}^{-1}$ EAT). Il ressort de ces résultats, deux groupes d'espèces tannantes. Le premier groupe d'espèces riches en tannins est constitué essentiellement des écorces de *P. biglobosa*, *K. senegalensis* et des feuilles de *L. inermis* dont les teneurs en tannins font environ deux à trois fois celles du second groupe constitué des feuilles de *T. grandis*, *J. curcas*, *P. cyanescens* et *I. tinctoria*.

2. Détermination de l'activité antioxydante par des tests chimiques *in-vitro*

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire (Aruoma, 1996). Les antioxydants

font l'objet de nombreuses études car en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles (Kouamé et al., 2009) et contre la photophoxydation ou photodégradation, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquelles le stress oxydant est incriminé. Il suffit juste de taper dans *Google* pour voir des dizaines de millions de liens en réponse à ce mot clé "antioxydant", accompagné d'un répertoire de plantes riches en ces substances; ce qui représente un atout commercial fréquemment mis en avant par les industries cosmétiques et de compléments alimentaires comme moyen de promotion de leurs produits. En raison de ce succès commercial, le terme «antioxydant» est fréquemment utilisé de manière abusive et inappropriée (Dangles, 2012). La capacité antioxydante d'une molécule peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs (Prior et al., 2005): soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physicochimiques des molécules, le type de test employé ou l'état d'oxydation des substrats, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité antioxydante (Prior et al., 2005; Frankel and Meyer, 2000). C'est pourquoi dans le présent travail, le choix s'est porté sur l'utilisation de deux tests chimiques: le test évaluant le piégeage des radicaux libres et employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH[•]), impliquant le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron, et le test déterminant le pouvoir réducteur antioxydant du fer III (FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power) basé sur le transfert d'électron.

2.1. Mesure du pouvoir antiradicalaire par piégeage des radicaux libres de DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)

2.1.1. Principe

La méthode du DPPH introduite par Blois (1958) est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H (**Figure I.2.12**).

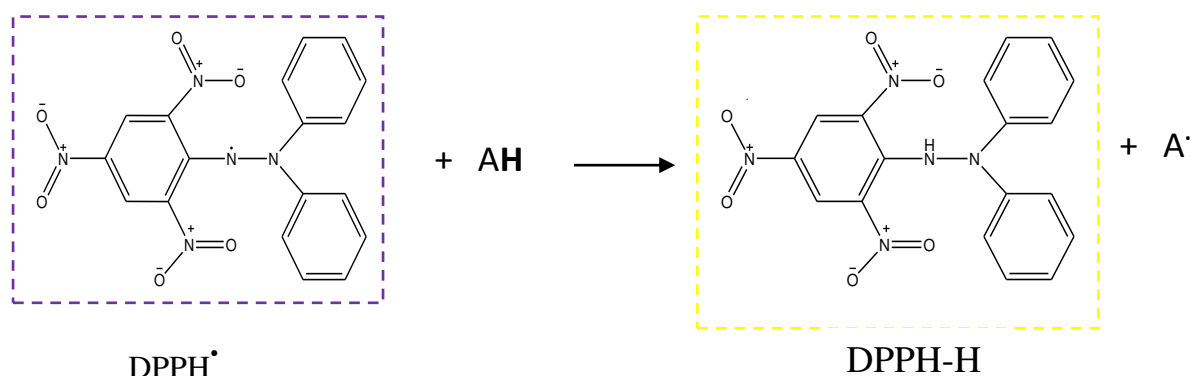


Figure I.2.12: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH).

La réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, initialement violet foncé sous sa forme libre, devient jaune pâle après transfert d'électron par des composés antioxydants. Cette réduction qui se traduit par une diminution de l'absorbance de la solution de DPPH[•] en présence d'antioxydant est suivie par spectrophotométrie à 517 nm par rapport à un témoin d'antioxydant commercial, le Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E), traité dans les mêmes conditions que les extraits testés. Chaque expérience est répétée trois fois.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre est généralement estimée par le pourcentage d'inhibition (%I) du DPPH[•], où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) en solution dans le méthanol selon la relation: [% I = (Abs_{control} - Abs_{test}) / Abs_{control}] × 100; Abs=absorbance à 517 nm] ou par la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH[•] (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Scherer et Godoy, 2009).

2.1..2. Résultats

Le potentiel réducteur des extraits testés a été mis en évidence par un dépistage préliminaire sur plaque CCM à l'aide du radical DPPH, utilisé comme révélateur. Par conséquent, les zones d'activités antiradicalaires apparaissent jaune-blanc ou jaune-orangé sur fond violet, témoin de la réduction du DPPH par le contenu des extraits testés (**Figure I.2.13**).

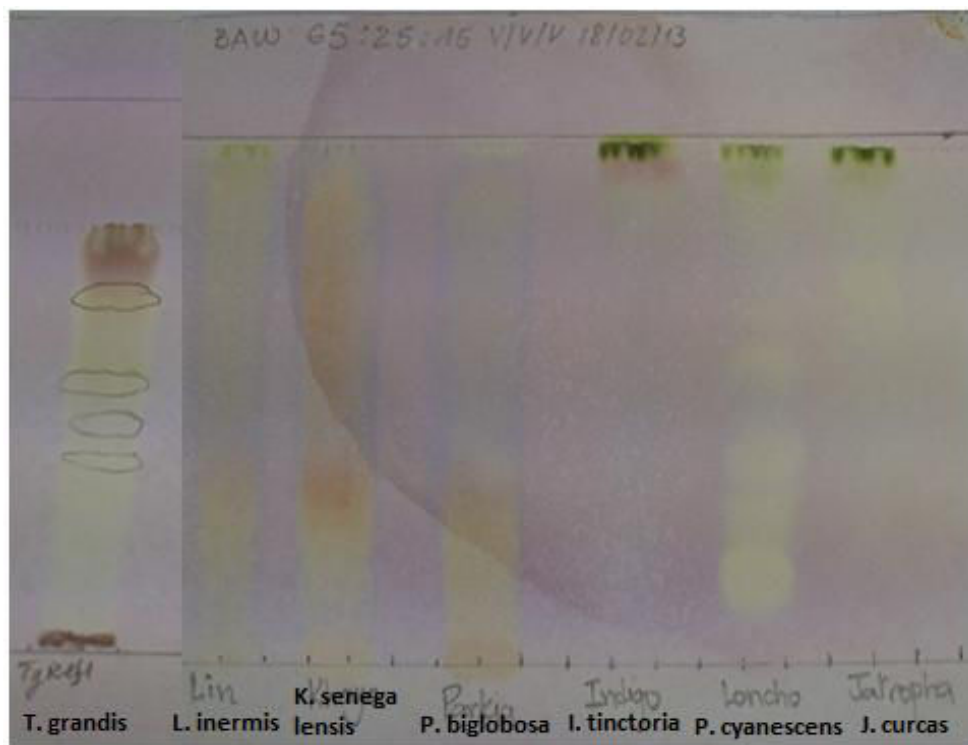
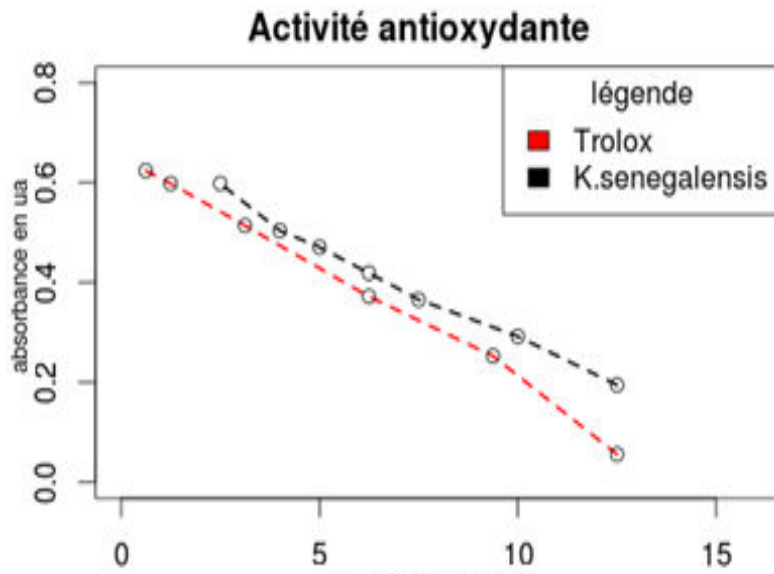


Figure I.2.13: Dépistage du potentiel réducteur des extraits testés sur plaque CCM

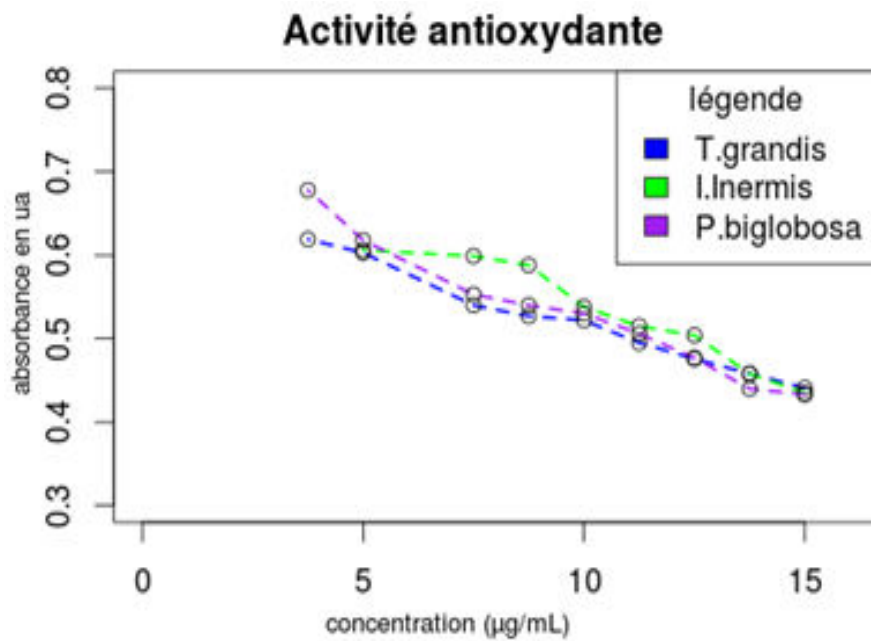
Il est à relever que, mis à part *I. tinctoria*, les autres espèces révèlent des plages jaunes plus ou moins perceptibles sur la plaque CCM. En effet, ces dernières espèces renferment des composés antioxydants dont on peut évaluer le potentiel.

Par conséquent, la capacité antioxydante des extraits méthanoliques des plantes sélectionnées (*T. gandis*, *L. inermis*, *K. senegalensis*, *P. biglobosa*, *I. tinctoria*, *P. cyanescens* et *J. curcas*) et du standard trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique) *vis-à-vis* du radical DPPH[•], est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (Majhenic et *al.*, 2007) présentes dans ces échantillons. Cette diminution se traduit par une chute rapide de l'absorbance du DPPH dans un intervalle très réduit de la dose de l'extrait brut, ce qui paraît bien lisible au niveau des graphes de la figure I.2.14.

A)



B)



C)

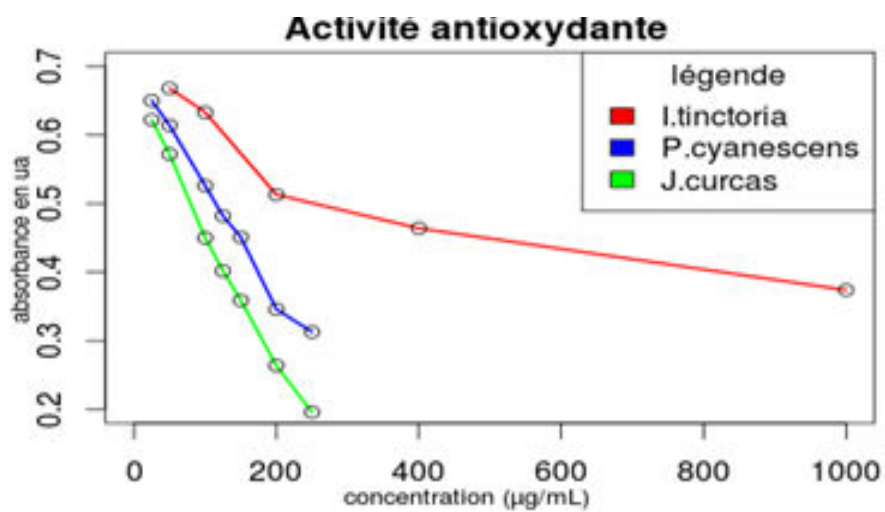


Figure I.2.14 : Résultats du test antioxydant par diminution de l'absorbance du DPPH (A, B et C)

Les graphes de la figure I.2.14 représentent les absorbances du DPPH résiduel en fonction de la concentration en $\mu\text{g/mL}$ de l'extrait, source d'antioxydant. Ces graphes montrent une diminution importante de l'absorbance du DPPH à des concentrations très faibles au niveau du standard trolox et de *K. senegalensis*. Par contre, cette diminution est induite par des concentrations nettement plus élevées des extraits issus de *P. cyanescens* et *I. tinctoria*.

L'activité antioxydante des extraits, exprimée en concentration efficace (EC_{50}) ou en pouvoir antiradicalaire ($ARP = 1/ EC_{50}$) est consignée dans le tableau I.2.1. La concentration efficace EC_{50} employée par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (Molyneux, 2004), ou encore, la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle (solution méthanolique de DPPH). Elle est déterminée graphiquement et exprimée par la moyenne des trois mesures \pm écart-type.

Tableau I.2.1: EC_{50} et ARP d'extraits méthanoliques des plantes et du standard trolox testés

Extraits de plantes testés	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ARP
<i>Trolox</i>	$7,18 \pm 0,41$	$0,139 \pm 0,0079$
<i>T. grandis</i>	$18,65 \pm 0,05$	$0,0533 \pm 0,00035$
<i>L. inermis</i>	$18,56 \pm 0,023$	$0,0538 \pm 5,77E-05$
<i>K. senegalensis</i>	$7,53 \pm 0,02$	$0,1323 \pm 0,00057$
<i>P. biglobosa</i>	$17,12 \pm 0,02$	$0,0583 \pm 5,77E-05$
<i>I. tinctoria</i>	$962 \pm 0,152$	$0,00103 \pm 5,77E-06$
<i>P. cyanescens</i>	$192,07 \pm 0,113$	$0,0052 \pm 0,00$
<i>J. curcas</i>	$146,6 \pm 0,54$	$0,0068 \pm 5,77E-05$

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques testées, montrent que la EC_{50} est d'autant plus faible que l'ARP est plus élevé donc que l'activité antioxydante. La EC_{50} de l'antioxydant commercial; le trolox, est la plus faible, par conséquent, son ARP est le plus élevé comparé aux extraits de plantes dosés. En effet, la EC_{50} et l'ARP expriment les mêmes résultats mais en sens inverse (**Figure I.2.15**).

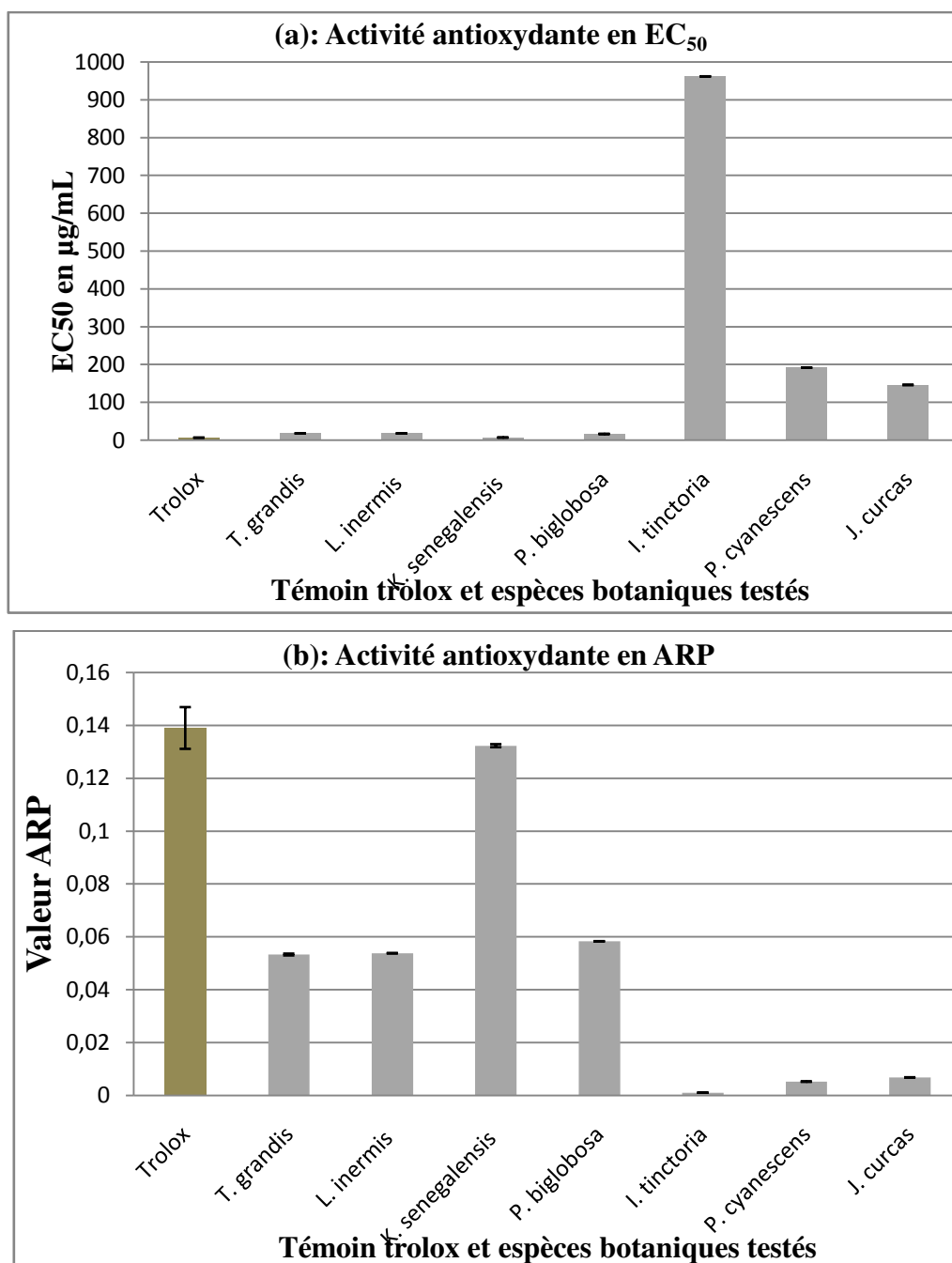


Figure 1.2.15: Activité antioxydante en EC₅₀ (a) et en ARP (b) du trolox et des extraits de plantes testées

Ces résultats démontrent en outre, que l'ARP de *K. senegalensis* est approximativement identique à celui du témoin trolox; il est deux fois supérieur à celui développé par chacun des extraits provenant de *T. grandis*, de *L. inermis* et de *P. biglobosa*. Comparé au trolox, les pouvoirs antiradicalaires de *J. curcas*, *P. cyanescens* et *I. tinctoria* sont très faibles et par conséquent leur activité antioxydante. Il ressort de ces résultats trois groupes d'espèces botaniques d'activité antioxydante variable. Le premier groupe constitué principalement de *K. senegalensis* développe un fort pouvoir antioxydant à peu près identique

au trolox; le second groupe doté d'un potentiel antioxydant modéré est constitué d'extraits de *T. grandis*, de *L. inermis* et de *P. biglobosa*. Le dernier groupe constitué de *J. curcas*, *P. cyanescens* et *I. tinctoria* est celui d'espèces présentant un faible pouvoir antioxydant. Ainsi le classement de la capacité antioxydante des extraits testés est dans l'ordre:

trolox \geq *K. senegalensis* > *P. biglobosa* > *L. inermis* \geq *T. grandis* > *J. curcas* > *P. cyanescens* > *I. tinctoria*. On remarque à travers ce classement que les trois premières espèces antioxydantes sont celles qui ont présenté une forte teneur en tannins totaux.

2.2. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power)

En parallèle au test de piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits méthanoliques des plantes sélectionnées a été évalué en utilisant la méthode FRAP suivant le protocole décrit par Oyaizu (1986). Ce test est un essai simple, rapide et reproductible (Benzie et Strain, 1996); il est universel et peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (Li *et al.*, 2008).

2.2.1. Principe

La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux (**Figure I.2.16**). Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al.*, 2002). En effet, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination «semi-quantitative» des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction rédox (Amarowicz *et al.*, 2004).

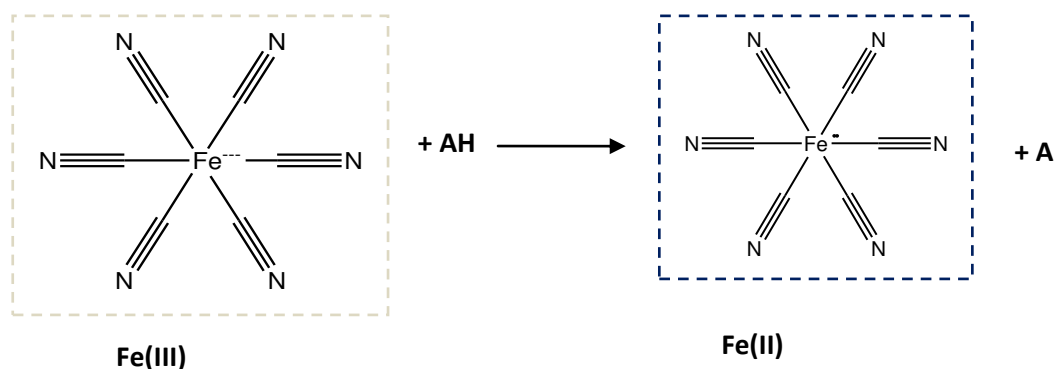


Figure I.2.16 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe(III) et un antioxydant (AH).

Le trolox est l'antioxydant standard utilisé pour le contrôle positif et son absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons testés. Le pourcentage de réduction de l'échantillon par rapport au standard trolox a été calculé selon la formule :

$$\text{Pourcentage (\%)} \text{ du pouvoir réducteur} = [1 - (1 - A_e/A_s)] \times 100 \text{ (Rohman et al., 2010)}$$

A_s = absorbance du standard pour la concentration maximale testée et

A_e = absorbance de l'échantillon à une concentration donnée.

2.2.2. Résultats

Le pouvoir réducteur des extraits de plantes testés par la méthode FRAP est dose dépendante (concentration dépendante). Trois concentrations successives d'extraits ont été évaluées (0,5; 1,0 et 2,0 mg/mL). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I.2.2.

Tableau I.2.2: Pouvoir réducteur des extraits de plantes testés en fonction de la concentration appliquée

Extraits de plantes testés	% Pouvoir réducteur à différentes concentrations C1-C3		
	C1 (0,5 mg/mL)	C2 (1,0 mg/mL)	C3 (2,0 mg/mL)
<i>T. grandis</i>	2,58 ± 0,007	7,7 ± 0,035	11,87 ± 0,007
<i>L. inermis</i>	2,16 ± 0,04	7,56 ± 0,077	11,78 ± 0,00077
<i>K. senegalensis</i>	4,18 ± 0,04	8,78 ± 0,006	15,73 ± 0,014
<i>P. biglobosa</i>	1,6 ± 0,14	6,29 ± 0,006	10,51 ± 0,021
<i>I. tinctoria</i>	0,75 ± 0,01	1,13 ± 0,006	4,98 ± 0,007
<i>P. cyanescens</i>	0,79 ± 0,014	3,94 ± 0,028	6,2 ± 0,014
<i>J. curcas</i>	1,08 ± 0,014	3,52 ± 0,007	8,21 ± 0,02

Les données issues de ce tableau sont traduites sous forme de diagrammes (**Figure I.2.17**).

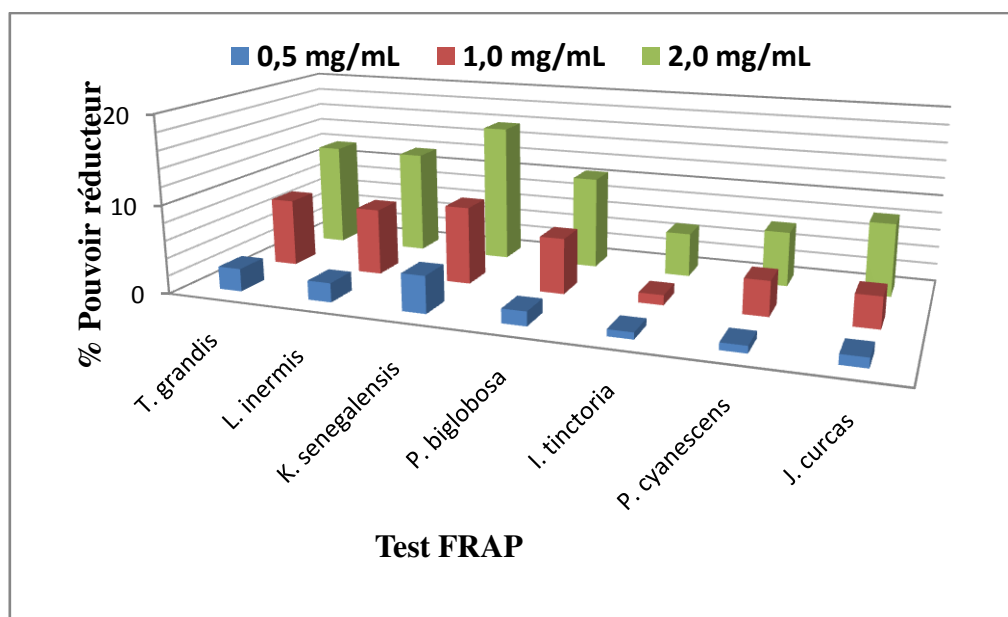


Figure I.2.17: Test FRAP traduisant le pouvoir réducteur des extraits de plantes testés suivant les doses appliquées

Les résultats obtenus montrent qu'au niveau de chaque espèce, la réduction du Fe(3+) en Fe(2+) est plus importante au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en extrait. De même, pour des concentrations identiques appliquées, le pouvoir réducteur des extraits testés varie en fonction des espèces. Cette variation conduit à un même ordre de classement des espèces que celui des résultats du test de piégeage de DPPH, sauf que dans ce cas, c'est le pouvoir réducteur de *T. grandis* qui est sensiblement supérieur celui de *L. inermis* (*K. senegalensis* > *P. biglobosa* > *T. grandis* ≥ *L. inermis* > *J. curcas* > *P. cyanescens* > *I. tinctoria*). En outre, pour s'assurer de la linéarité de la méthode utilisée, une gamme étalon a été réalisée avec la solution méthanolique de trolox entre 20-120 µg/mL (**Figure I.2.18**).

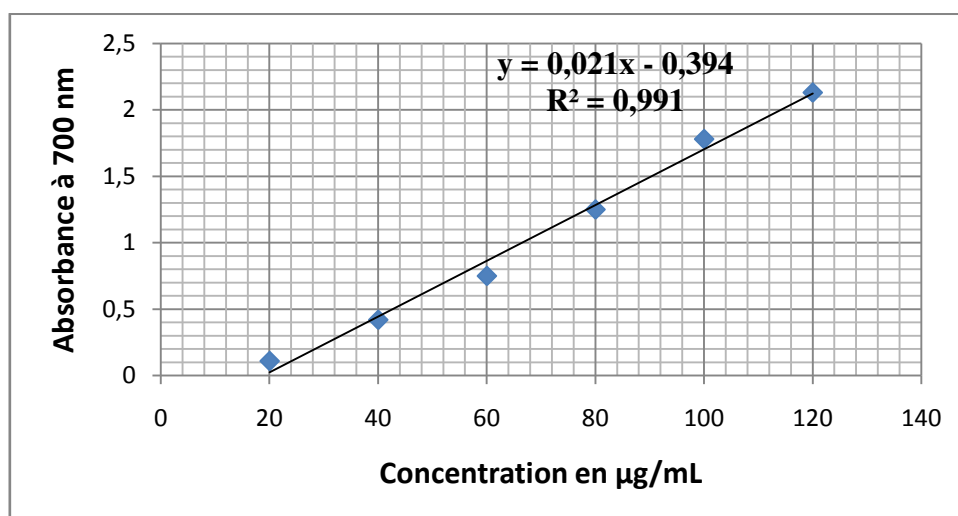


Figure I.2.18: Courbe d'étalonnage du trolox pour le test FRAP

Ce test montre en effet, que le pouvoir réducteur des espèces est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques contenus dans ces extraits qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs désactivant des oxydants. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong *et al.*, 2004; Kumaran et Karunakaran, 2007).

2.3. Corrélation activité antioxydante et teneur en polyphénols

Les données issues des différents dosages de composés polyphénoliques ont été mises en relation avec l'activité antioxydante à travers l'usage du logiciel mathématique R version 2.15.2. Une Analyse en Composante Principale (ACP) a été effectuée dans le but d'établir la corrélation entre les différentes familles de composés dosées dans les plantes d'une part et entre ces composés et l'activité antioxydante d'autre part.

2.3.1. Principe de l'Analyse en Composante Principale (ACP)

L'ACP est une méthode qui permet d'analyser un ensemble de données quantitatives dans un espace multidimensionnel. Son principe est basé sur un changement de variable qui réduit la dimensionnalité de l'espace et qui fournit en conséquence une représentation simplifiée de celui-ci. Une ACP est généralement utilisée lorsque les données étudiées sont issues de l'observation de n individus situés dans un espace E de p dimensions ($p > 3$); l'ensemble des données forme alors un nuage de n points dans E^p . L'objectif de l'ACP est de trouver la meilleure représentation graphique du nuage de n points à l'intérieur d'un sous espace H de E , et de dimension q (Besse et Baccini, 2011). La meilleure représentation est soit celle qui minimise les déformations du nuage de points, soit celle qui conserve au maximum la dispersion initiale de celui-ci à l'intérieur de l'espace E . Ainsi le sous espace H optimal est celui dont les q dimensions maximisent la somme des carrées des distances des points projetés et leur centre de gravité. En résumé, l'objectif de l'ACP est de fournir une image simplifiée d'un espace de données complexes, en conservant un maximum d'information.

2.3.2. Résultats

La figure I.2.19 montre l'ACP réalisée sur l'ensemble des données issues des différents dosages et du test antioxydant représenté par l'ARP.

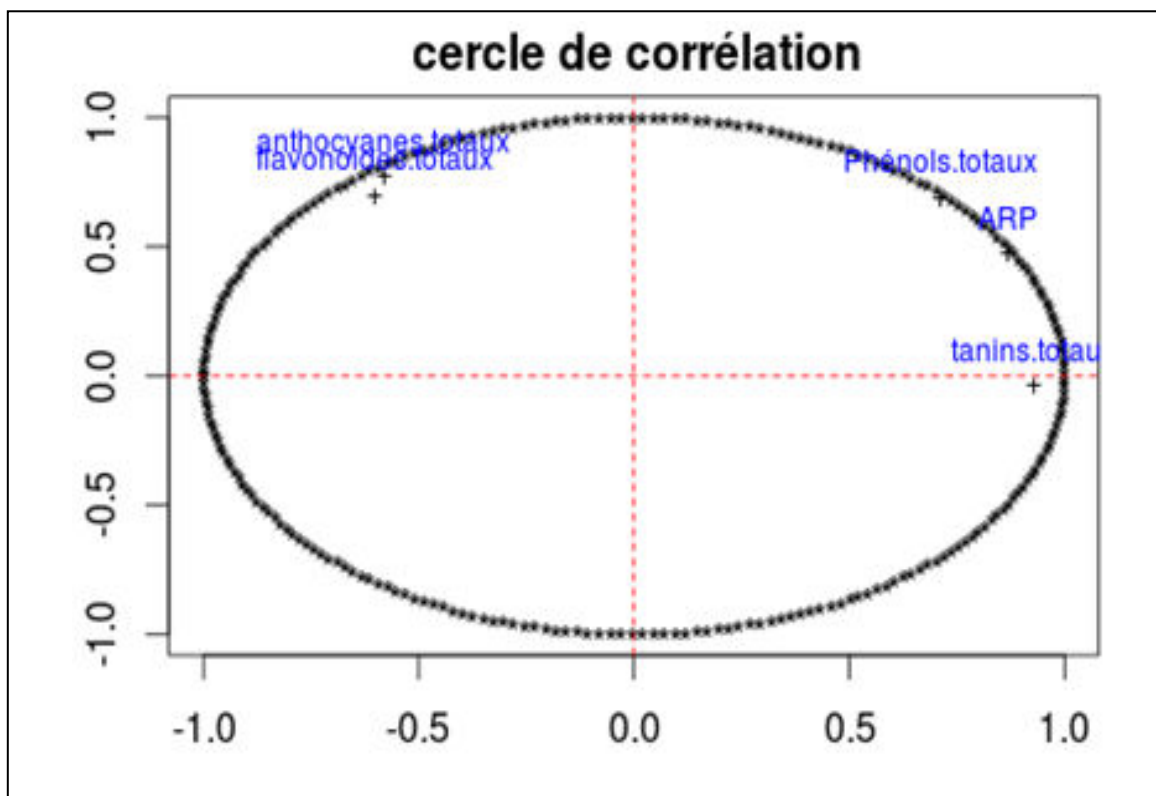


Figure I.2.19: Analyse en composantes principales basée sur la teneur en composés polyphénols et le pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes testés: graphique d'observations et des variables.

Il ressort de ce graphique, que l'ARP est fort positivement corrélé avec la teneur en phénols totaux ainsi qu'avec la teneur en tannins totaux présents dans les extraits de plantes dosés; tandis que les teneurs en phénols et en tannins totaux sont moyennement corrélées. De même, les teneurs en anthocyanes et en flavonoïdes totaux sont positivement corrélées entre elles mais négativement corrélées avec les teneurs en phénols et en tannins totaux ainsi qu'avec l'ARP.

On peut également observer ces faits dans la matrice de corrélation (**Tableau I.2.3**).

Tableau I.2.3: Matrice de corrélations entre les différents composés polyphénoliques dosés et l'activité antioxydante en ARP, avec le coefficient de corrélation de Pearson

	Phénols totaux	flavonoïdes totaux	anthocyanes totaux	tannins totaux	ARP
Phénols totaux	1	0,02	0,13	0,59	0,96
Flavonoïdes totaux	0,02	1	0,82	-0,49	-0,22
anthocyanes totaux	0,13	0,82	1	-0,58	-0,14
Tannins totaux	0,59	-0,49	-0,58	1	0,74
ARP	0,96	-0,22	-0,14	0,74	1

En effet, la forte corrélation ($R^2 = 0,96$) entre l'ARP et les teneurs en phénols totaux démontre que l'activité antioxydante des extraits testés est fortement liée à la teneur en composés phénoliques présents dans ces plantes. De même, le pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes testés est déterminé par la teneur en tannins totaux contenus dans ces plantes avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,74$. Par contre, les quatre familles de composés chimiques dosées, sont très peu corrélées entre elles, à part les teneurs en tannins et en phénols totaux ($R^2 = 0,59$) et les teneurs en flavonoïdes et en anthocyanes totaux ($R^2 = 0,82$). Il existe une grande variabilité en teneur de polyphénols contenus dans chaque échantillon testé; certains extraits sont plus riches en tannins alors que d'autres sont riches en flavonoïdes et pauvres en tannins.... Malgré, cette disparité de répartition en composés phénoliques présents dans les extraits de plantes testés, il apparaît clair d'après l'ACP que l'activité antioxydante de ces plantes est due à la teneur en composés phénoliques totaux qu'elles contiennent et plus loin à leur teneur en tannins totaux. Par ailleurs, il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, trolox, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (De Pooter et Schamp, 1986).

3. Test de toxicité "Brine Shrimp"

Le test de toxicité consiste à observer le comportement d'un individu (ou un groupe homogène d'individus) mis en contact, dans des conditions expérimentales bien définies, avec la substance étudiée afin d'évaluer le degré de sensibilité (ou de résistance) à cette dernière (Ainane, 2011).

Selon Truhaut cité par Ramade (1979), une substance est toxique si elle provoque des altérations ou des perturbations des fonctions de l'organisme vivant conduisant à des effets nocifs dont la plus grave, de toute évidence, est la mort de cet organisme.

Récemment, se sont développés de nombreux tests de toxicité pour lesquels la réponse a été mesurée chez les invertébrés. Ces tests sont souvent peu coûteux, reproductibles, de mise en œuvre facile (pas de conditions d'asepsie) et adaptés pour l'environnement (Calow, 1993). Par conséquent, les invertébrés sont utilisés dans des tests requis par les autorités pour l'estimation du risque environnemental de pesticides, médicaments et polluants (Favilla *et al.*, 2006). En effet, du fait de sa disponibilité commerciale, *Artemia salina* Leach est largement utilisée dans les applications toxicologiques ou en recherche. Dans la littérature, le test de toxicité sur *Artemia salina* est proposé comme une simple méthode de bio-essai d'évaluation préliminaire de toxicité dans la recherche de produits naturels actifs, (Solis *et al.*, 1993). Ainsi, il a été utilisé pour la détection des toxines fongiques (Harwig et Scott, 1971) et de cyanobactéries (Jaki *et al.*, 1999), toxicité d'extrait de plante, (McLaughlin *et al.*, 1991), des métaux lourds (Martinez *et al.*, 1998), des pesticides (Barahona et Sanchez-Fortun, 1999) et les tests de cytotoxicité des matériaux dentaires (Meyer *et al.*, 1982). Il y a une corrélation entre cytotoxicité sur les larves de crevettes et sur les cellules 9PS et 9KB (carcinome nasopharyngien humain) d'une part (Pelka *et al.*, 2000), les cellules A-549 du carcinome pulmonaire et les cellules HT-29 du carcinome du côlon d'autre part (Carballo *et al.*, 2002). Le test sur *Artemia salina* est surtout utilisé dans les pays en voie de développement, où 85% de la population utilise des plantes médicinales en médecine traditionnelle (Lagarto-Parra *et al.*, 2001). Bien qu'inadapté pour la détermination du mécanisme d'action, ce test est très utile pour établir la toxicité des extraits de plantes et a été largement employé dans ce sens (Sam, 1993).

3.1. Cycle vital d'*Artemia salina* (Crustacea-Anostroca)

Artemia salina est un petit crustacé vivant habituellement dans les étangs saumâtres. Le cycle biologique d'*Artemia salina* est tout à fait particulier : après la fécondation, les premières étapes du développement conduisent normalement à la formation d'une blastula puis d'une gastrula. La gastrula poursuit son développement, en conditions normales, pour conduire à la formation d'un adulte après passage par le stade prénauplius et nauplius. (**Figure I.2.20** et **Figure I.2.21**). Il existe une voie alternative de développement correspondant à l'apparition dans le milieu naturel de conditions vitales critiques (sécheresse et évaporation de l'eau des marais). Les gastrulas forment des kystes susceptibles d'être isolées du milieu

extérieur, car la quasi-totalité de l'eau de l'organisme est éliminée (95-98%) et l'ensemble des fonctions physiologiques et biochimiques entrent dans une phase de dormance. Lorsque les kystes sont réhydratés (soit naturellement, soit artificiellement), les différentes activités métaboliques reprennent successivement. Ce que l'on appelle improprement des " œufs " d'*Artemia* qui sont en réalité des gastrulas dormantes ou enkystées susceptibles de rester dormantes pendant plusieurs années (Le Gal et Gros, 1988).

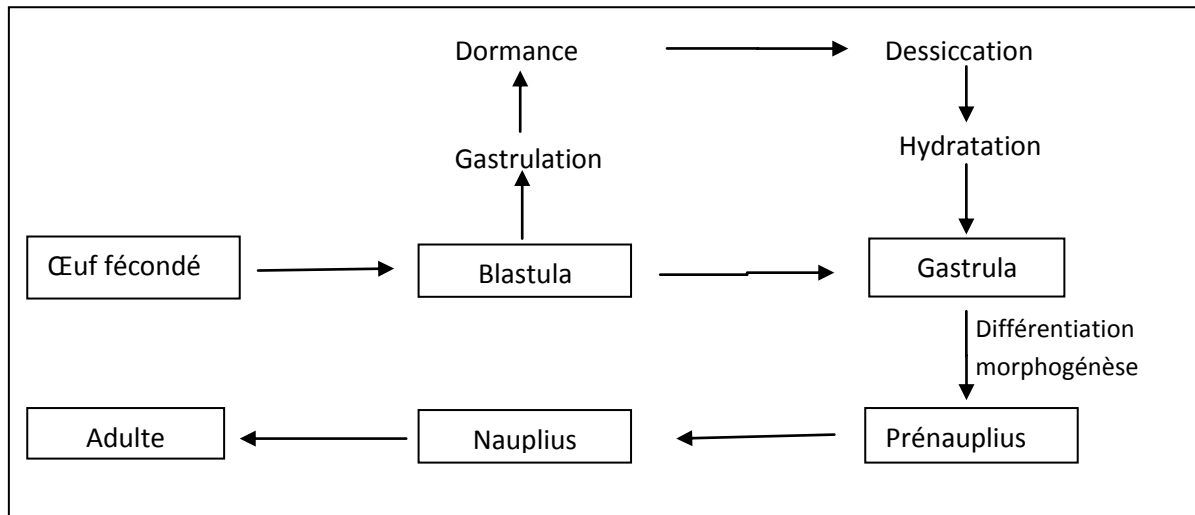


Figure I.2.20: Cycle de développement d'Artemia salina (Ainane, 2011)

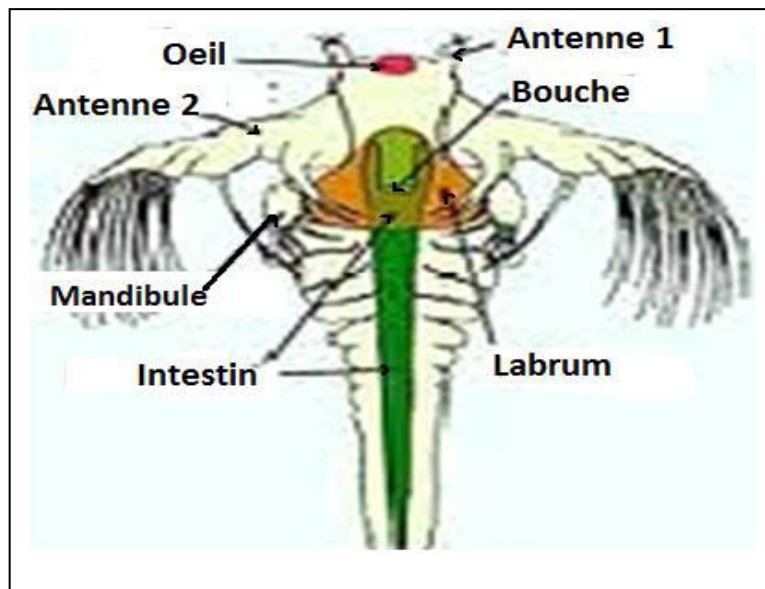


Figure I.2.21 : Anatomie schématique d'un nauplius d'Artemia

3.2. Principe du test "Brine Shrimp"

Ce test visant à mesurer l'activité toxique des produits testés par leurs effets sur les larves de crevettes d'eau salée : *Artemia salina*, a été réalisé selon la méthode mise au point par Vanhaecke et *al.* (1981). Il consiste à déterminer la concentration qui tue 50 % des *Artemia nauplius* en 24 heures sous des conditions standardisées (température ambiante). Cette concentration est connue comme la dose létale ou concentration létale LC₅₀ qui peut déterminer le pouvoir de toxicité des extraits de plantes testés par rapport à des standards de colorants commerciaux ou à d'autres produits de référence. La lecture des résultats se fait par comptage sous loupe binoculaire du nombre de larves survivantes.

Au cas où le témoin contient des larves mortes, le pourcentage de mortalité est corrigé en utilisant la formule d'Abbott : % décès = [(Test-Témoin)/Témoin]×100 (Carballo et *al.*, 2002). Les données dose-réponse sont transformées par logarithme et la LC₅₀ est ainsi déterminée par régression linéaire.

3.3. Résultats

Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé après une exposition de 24 heures aux extraits testés, rapportée à la mortalité moyenne à 10 concentrations entre 0,024 à 12,5 mg/mL, à raison de 3 réplicas par concentration (**Figure I.2.22**). Aucune mortalité n'a été observée dans la solution de solubilisation des extraits et des témoins (2% et 5% de DMSO). La mortalité des larves augmente suivant la dose de produits appliquée jusqu'à 1,56 mg/mL où aucun produit ne présentait de mortalité sans effet-dose observable.

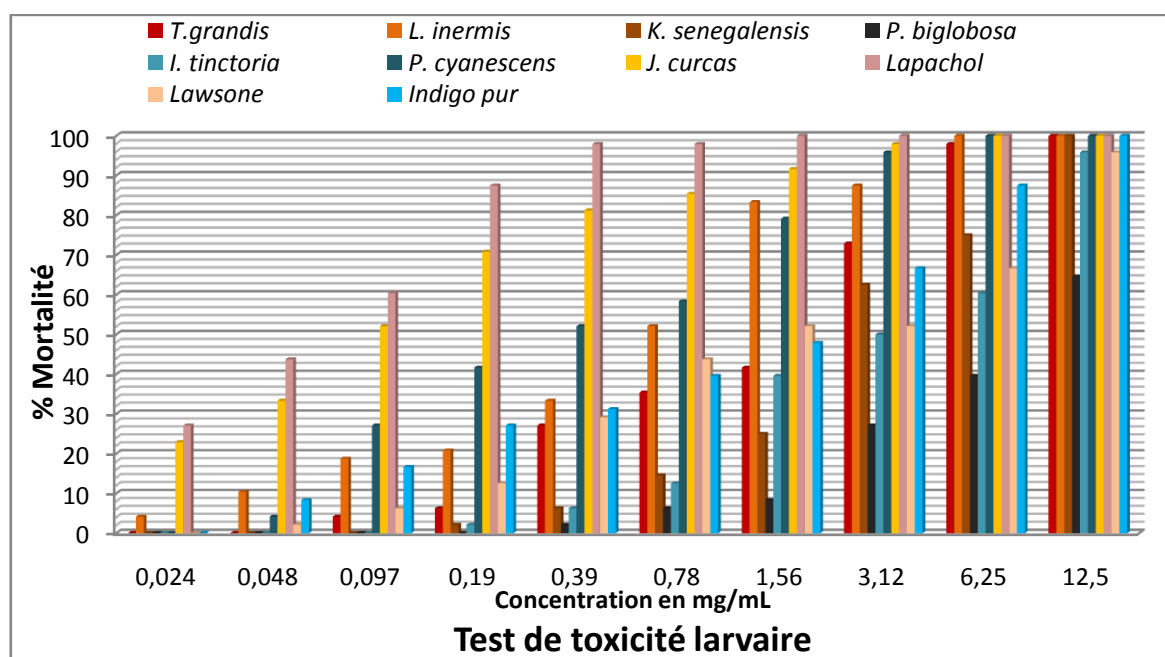


Figure I.2.22 : Toxicité des extraits vis à vis d'*Artemia salina* du même âge (24 h)

La dose létale LC_{50} est déterminée à partir de la courbe de régression qui exprime le pourcentage des larves tuées en fonction de la concentration des extraits ainsi que des composés colorants de référence à savoir le lapachol, la lawsone et l'indigo purifié (**Figure I.2.23**).

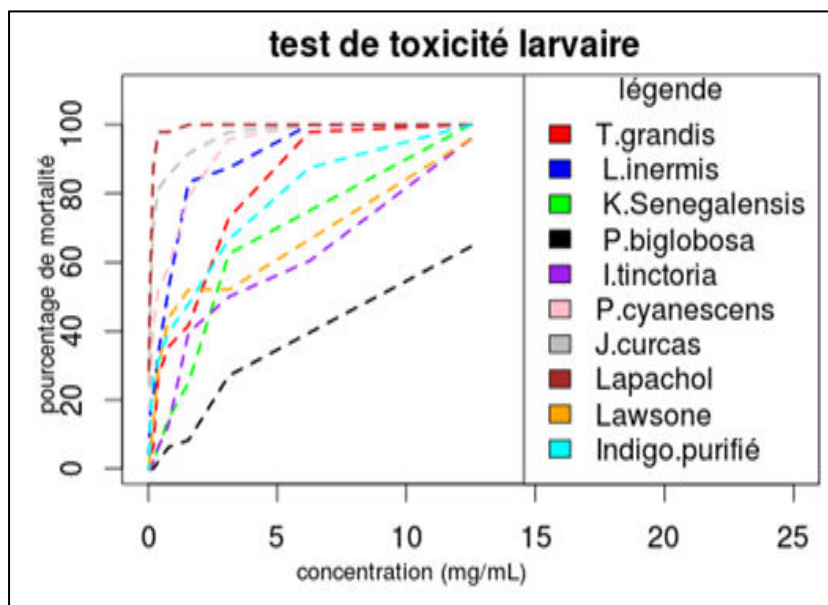


Figure I.2.23 : Courbe représentant le pourcentage de mortalité en fonction de la concentration des échantillons testés.

A partir de ces courbes sont extraites par régression linéaire les valeurs de LC_{50} des différents produits testés. Elles sont affichées dans le tableau I.2.4.

Tableau I.2.4: Valeurs LC_{50} des extraits de plantes et composés colorants testés

Extraits de plantes testés	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>T. grandis</i>	$1043 \pm 2,08$
<i>L. inermis</i>	$517 \pm 1,58$
<i>K. senegalensis</i>	$2130 \pm 4,93$
<i>P. biglobosa</i>	$9013 \pm 3,6$
<i>I. tinctoria</i>	$3120 \pm 15,96$
<i>P. cyanescens</i>	$394 \pm 3,51$
<i>J. curcas</i>	$85,8 \pm 0,15$
Composés colorants testés	
Lapachol	$72.5 \pm 0,5$
Lawsone	$1420 \pm 5,29$
Indigo purifié	$890 \pm 2,08$

Pour interpréter ces résultats, des grilles de corrélation associant le degré de toxicité à la LC_{50} ont été proposées (Moshi *et al.*, 2004; Mousseux, 1995). (**Tableau I.2.5**)

Tableau I.2.5 : Correspondance entre LC_{50} et toxicité

LC_{50}	Toxicité
$LC_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$	non toxique
$100 \mu\text{g/mL} > LC_{50} \geq 50 \mu\text{g/mL}$	faible
$50 \mu\text{g/mL} > LC_{50} \geq 10 \mu\text{g/mL}$	moyenne
$LC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$	forte

Au vu des résultats obtenus, on note que le lapachol et l'extrait brut méthanolique des feuilles de *J. curcas* sont faiblement toxiques alors que les autres échantillons testés se révèlent non toxiques. Le test "brine shrimp" constitue un screening préliminaire pour déterminer non seulement le degré de toxicité d'un produit, mais aussi la présence de potentiels composés anticancéreux. En effet, lors d'une évaluation toxicologique d'extraits de plantes par ce test de toxicité, une valeur de $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ est considérée comme bioactive (Meyer *et al.*, 1982). Par conséquent, le lapachol, l'indigo purifié ainsi que les extraits de *J. curcas*, de *P. cyanescens* et de *L. inermis* pourraient s'avérer cytotoxiques *vis-à-vis* des cellules cancéreuses. En effet, la cytotoxicité du lapachol, naphthoquinone isolée de *T. grandis* et de ses dérivés a été approuvée (Rao *et al.*, 1968; Khan et Mlungwana, 1999). Ainsi le lapachol est actuellement utilisé dans le traitement de l'adénocarcinome et le carcinome épidermoïde (Rao, 1974; Almeida *et al.*, 1990). La toxicité observée au niveau de *J. curcas* pourrait être liée aux facteurs antinutritionnels détectés dans cette plante (Martinez-Herrera *et al.*, 2006). De même, la lawsone, principe premier de *L. inermis* apparaît non toxique alors que l'extrait brut méthanolique de la plante, présente un certain caractère cytotoxique ($LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$) ; ce résultat est quelque peu mitigé car des activités cytotoxique, cytoprotectrice et antioxydante ont été attribuées à la lawsone (Rani *et al.*, 2007).

Pour certains auteurs, il n'existerait pas de corrélation entre ce test et les effets toxicologiques sur un animal entier (Sanchez *et al.*, 1993). Néanmoins, pour 20 extraits de plantes testées en utilisant des méthodes *in vivo* (sur souris) et *in vitro* (Lagarto-Parra *et al.*, 2001), les résultats ont montré une bonne corrélation ($r = 0,85$; $p < 0,05$), suggérant que le test sur *Artemia* est un modèle de toxicité alternatif relativement utile. Le point crucial pour discuter de la pertinence

des valeurs de LC₅₀ obtenues par le biais du test sur larves de crevettes est de savoir si les données de mortalité peuvent être reliées à une activité plus spécifique. Une corrélation générale de ce test avec des types spéciaux de bioactivités ne semble pas admise. Néanmoins, dans de nombreux cas cela s'est avéré possible (Hartl *et al.*, 2000). Mc Laughlin *et al.* (1993), dans une étude sur l'utilité de ce test comme un préscreening antitumoral des extraits de plantes, a été capable de déterminer une corrélation positive entre la mortalité des larves d'*Artemia* et la cytotoxicité contre les cellules KB. Il a permis la découverte d'acétogénines d'Annonaceae comme une nouvelle classe de pesticides naturels et d'agents antitumoraux actifs (Laughlin *et al.*, 1998). De la même façon, Solis *et al.* (1993) ont trouvé ce test prédictif de la toxicité sur cellules KB excepté pour les composés demandant une activation métabolique, les larves d'*Artemia* ne possédant pas les enzymes nécessaires au cytochrome P450. Richardson et Hamilton (1990), considèrent ce test adapté pour prédire la toxicité des trichothécènes (mycotoxines) dans les poulets grillés.

4. Conclusion

L'étude quantitative des extraits bruts méthanoliques de *T. grandis*, *L. inermis*, *K. senegalensis*, *P. biglobosa*, *I. tinctoria*, *P. cyanescens* et *J. curcas* au moyen des dosages spectrophotométriques ont permis de déterminer leur teneur en polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes et tannins totaux). Les résultats obtenus ont montré une importante variabilité en teneur de ces composés contenus dans les plantes analysées. De même, l'évaluation du potentiel antioxydant de ces extraits par piégeage du radical DPPH, complété par le test de réduction du fer (FRAP), a révélé que l'activité antioxydante de ces plantes est liée à la teneur en phénols totaux contenus dans celles-ci. Cette activité reste néanmoins inférieure à celle du trolox, mais il s'agit d'extraits bruts contenant un grand nombre de composés différents. Il est donc très probable qu'ils contiennent des composés qui, une fois purifiés, peuvent présenter une activité supérieure ou égale à celle du trolox. En effet, le dosage des phénols totaux basé sur les réactions d'oxydoréduction peut être considéré en lui-même comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante. En résumé, les espèces testées peuvent être désignées comme les plus intéressantes en termes de capacité antioxydante, fortement liée à la présence de composés phénoliques suivant l'ordre: *K. senegalensis* > *P. biglobosa* > *T. grandis* ≥ *L. inermis* > *J. curcas* > *P. cyanescens* > *I. tinctoria*. Par ailleurs, hormis *J. curcas* qui s'est révélé faiblement toxique vis-à-vis des larves d'*Artemia salina*, les autres extraits de plantes testés sont non toxiques par référence à la grille de toxicité du test brine shrimp.

En se basant sur les résultats des 3 tests chimiques (dosage, activité antioxydante et test de toxicité) associés aux résultats précédents liés à l'enquête ethnobotanique, les espèces tinctoriales à savoir: *K. senegalensis*, *L. inermis*, *T. grandis*, *P. cyanescens* et *I. tinctoria* seront prioritairement traitées pour la suite à travers des études chimique plus approfondies. En effet, ce choix relève de leur importance tinctoriale, de leur fréquence d'utilisation et de leur toxicité. Cependant, *P. biglobosa* est utilisé comme mordant; ceci s'explique par sa richesse en tannins, tandis que *J. curcas* est plus ou moins toxique *vis-à-vis* d'un organisme vivant.

PARTIE II
PRESENTATION DES PLANTES
ET ETUDE ANALYTIQUE

Chapitre 1: Présentation des plantes étudiées

1. *Tectona grandis* L. f. (Lamiaceae)

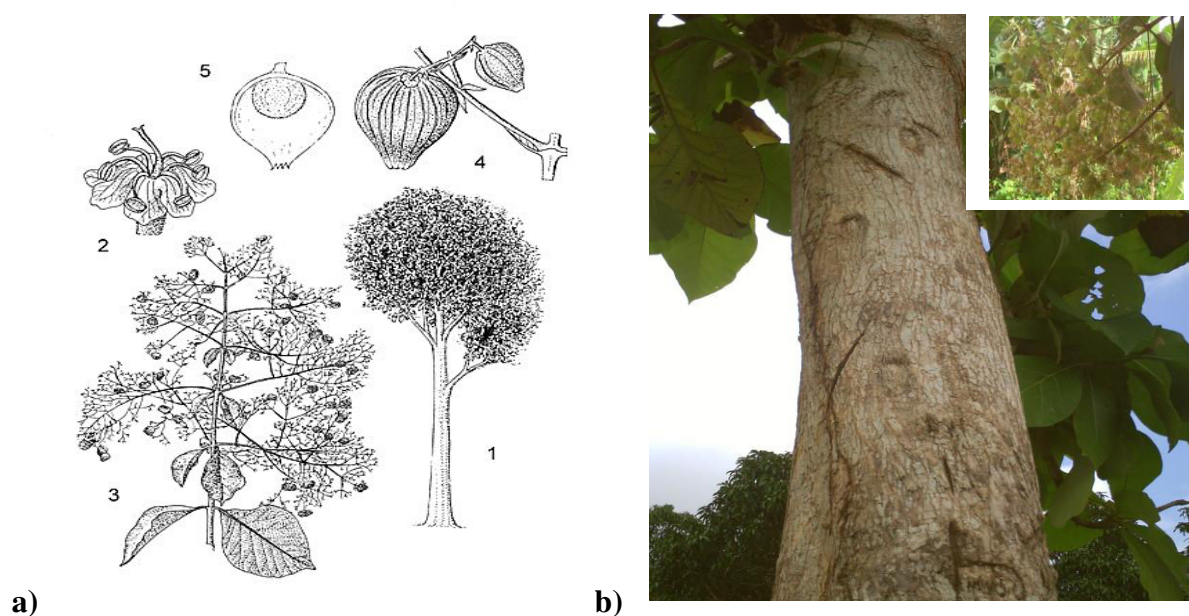
1.1. Distribution botanique et géographique

Lamiacée, originaire des forêts tropicales du Sud et du Sud-Est asiatique, entre 9-26°N et 70-100°E; *Tectona grandis* Linn f. est une espèce connue sous les noms commun, vernaculaire ou commercial de teck en français et teak tree ou Bangkok teak en anglais. Le genre *Tectona* comprend 4 espèces, toutes originaires de l'Asie tropicale où il forme parfois des peuplements presque purs; son positionnement au sein de la famille semble plutôt isolée. La position systématique du teck (Daysson, 1967; Aradhana *et al.*, 2010), en classification botanique classique et phylogénétique, harmonisée avec The Plant List (2010) est la suivante (Tableau II.1.1) :

Tableau II.1.1 : Classification classique et phylogénétique de *Tectona grandis*

Classification classique	Classification phylogénétique
Règne: <i>Plantae</i>	Règne: <i>végétal</i>
Sous-règne: <i>Tracheobionta</i>	Embranchement: <i>Spermaphytes</i>
Division : <i>Magnoliophyta</i>	Sous-embranchement: <i>Angiospermes</i>
Classe: <i>Magnoliopsida</i>	Classe: <i>Dicotylédones vraies</i>
Sous-classe: <i>Asteridae</i>	Sous-classe: <i>Astéridées (Gamopétales)</i>
Ordre: <i>Lamiales</i>	Série: <i>Lamidées (superovariées tétracycliques)</i>
Famille: <i>Lamiaceae Ex-Verbenaceae</i>	Ordre: <i>Lamiales</i>
Genre: <i>Tectona</i>	Famille: <i>Lamiaceae</i>
Nom binomial: <i>Tectona grandis</i>	Genre: <i>Tectona</i>
	Espèce: <i>Tectona grandis</i>
	Groupe: <i>Feuillu</i>
	Propagation: <i>Semi, rejet.</i>

Le teck est un arbre caducifolié de taille moyenne atteignant 40-45 m de haut ; le fût est généralement droit, souvent cannelé et sans branche jusqu'à 15-20 m, avec un diamètre pouvant atteindre 150 cm et exceptionnellement 200 cm (Yedmel, 2004). Les feuilles, très larges et grossièrement elliptiques à entières et veloutées, sont opposées, décussées, simples et entières, mesurant 30 à 60 cm. Les nervures sont saillantes et le feuillage est caduc en saison sèche (Dupuy, 1991). Le fruit est une drupe charnue enveloppée lâchement par le calice accrescent. Il est globuleux, densément poilu et composé d'un épicarpe spongieux et d'un endocarpe très dur comportant quatre loges pouvant contenir chacune un embryon. Généralement les fruits ne comportent qu'une à deux graines fertiles, rarement quatre (Dupuy, 1991). (**Figure II.1.1**)



1- port de l'arbre; 2- fleur; 3- rameau en fruits; 4- les fruits entourés de calice; 5- fruit avec calice ouvert.

Source: (a): PROSEA, (b): Fagbohoun L.

Figure II.1.1: Représentation de *Tectona grandis* L. f. (Lamiaceae)

Le teck est une essence des forêts tropicales denses semi-décidues. On le trouve à l'état naturel sur environ 26 millions d'hectares se répartissant dans quatre pays du Sud-Est asiatique: Myanmar, Inde, Thaïlande et Laos (FAO, 2001) et aussi en Chine et au Cambodge mais sur de très faibles superficies. Le teck est une des espèces les plus plantées sous les tropiques, entre 30°N et 23°S. Ce sont principalement les allemands qui l'ont introduite en Afrique tropicale. Les surfaces plantées se trouvent en Côte d'Ivoire, au Nigeria, au Ghana, au Bénin, au Soudan, au Togo et à Madagascar (**Figure II.1.2**). Malgré un manque certain de statistiques, on estime que les teckeraies couvrent 5,7 millions d'hectares sur le plan mondial.

En Afrique tropicale, elles font près de 250 000 ha, surtout dans les pays suivants : Nigeria (70 000 ha), Côte d'Ivoire (60 000 ha), Bénin (21 000 ha), Ghana (17 000 ha), Togo (16 000 ha), Soudan (14 000 ha), Tanzanie (10 000 ha) et Sénégal (2500 ha). En Amérique tropicale, près de 68000 ha sont plantés au Costa Rica, Panama, Brésil, Trinidad et Tobago (Behaghel, 1999). Au Bénin, plus précisément dans le Sud et le centre, les teckeraies occupent deux régions phytogéographiques : la zone d'affinité guinéo-congolaise au Sud et la zone guinéo-soudanienne au centre (Cossi Ganglo *et al.*, 1999).

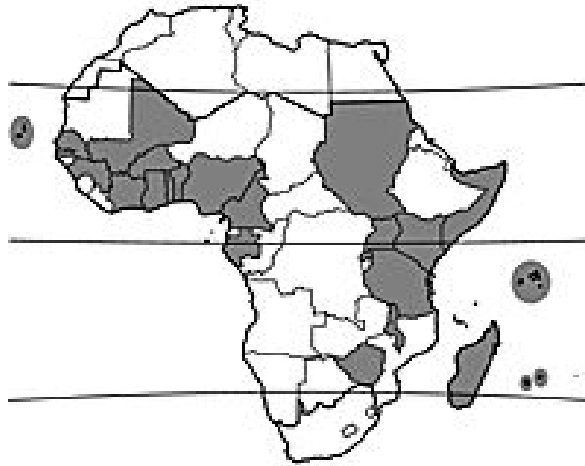


Figure II.1.2: Répartition géographique du teck en Afrique. (Louppe, 2005).

1.2. Historique

Le teck est un bois d'œuvre très apprécié depuis des siècles dans sa zone d'origine. Il existe des poutres de teck âgées de plus de 1 000 ans. En effet, après plus de 1000 ans, on trouve encore des ouvrages en bois sculpté, des portes et des caveaux intacts dans des temples indiens et perses (Louppe, 2005). Hormis, son bois parfait, tous les organes du teck, de la racine aux fruits en passant par les feuilles ont été largement utilisés par les populations autochtones dans les domaines artisanal et pharmacologique. Les premières plantations sont recensées au VII^{ème} siècle en Indonésie où elles semblent s'imposer à partir du XIV^{ème} siècle. Dès le XVII^{ème} siècle, les plantations se multiplient avec succès en Asie. Au début du XX^{ème} siècle, des graines d'Inde et de Birmanie traversent les océans pour les plantations d'Afrique et d'Amérique tropicales (extraits de CIRAD-Forêt, 1997). Ce sont principalement les Allemands qui l'ont introduit en Afrique tropicale depuis l'époque coloniale, au Nigeria (1889), en Tanzanie (1898), au Ghana (1905), au Cameroun et au Togo (1907–1912). Depuis les plantations du Togo, des semences ont été envoyées dans les pays voisins comme le Bénin en 1916 où les plantations domaniales ont réellement démarré en 1949 (Cossi Ganglo *et al.*, 1999), ainsi que la Côte d'Ivoire (où les premières grandes plantations ont été réalisées dès

1929 en zone de savanes près de Bouaké) et le Sénégal en 1933. En effet, pour suppléer à l'insuffisance des ressources forestières naturelles et satisfaire les besoins des populations en bois d'œuvre de qualité, le gouvernement béninois a réalisé, à partir de 1949, de vastes plantations de *Tectona grandis* L. f. (Cossi Ganglo *et al.*, 1999). Dès lors, cette espèce fût adoptée par la population indigène et s'est très tôt insérée dans les habitudes quotidiennes de la population en particulier dans l'artisanat (sculpture, teinture, menuiserie...) et en pharmacopée. La preuve est que, cette espèce, bien qu'introduite a été désormais la plus utilisée (82,61%) parmi toutes les espèces répertoriées au cours de l'enquête ethnobotanique réalisée dans le cadre de cette étude (Fagbohoun *et al.*, 2014). De même, la sciure de teck a remplacé progressivement la poudre de bois de *Pterocarpus osun* ou du kaolin utilisée traditionnellement par les prêtres de l'oracle Fâ communément appelés Babalawo, lors des consultations du Fâ. Cette poudre, devenue rare à cause de la disparition de cette espèce, recouvrait la surface du plateau de divination de Fâ à hauteur d'un centimètre de façon à pouvoir y tracer les signes à l'aide des doigts. Par ailleurs, dans l'aire nago du Sud Bénin, il n'est pas rare d'entendre des slogans et des chants populaires dédiés à la gloire des feuilles de teck "*Ewe i tèki, tèkiniki*". qui signifie "*les feuilles de teck = technique*". En effet, au cours des compétitions scolaires ou des jeux divers comme des parties de caleta (spectacle de masques plastiques ambulants organisé par les élèves et scolaires à l'approche des fêtes de fin d'année), l'équipe victorieuse vante souvent son succès à travers ce slogan comme pour dire qu'elle a exploité les secrets des feuilles de teck. Outre son bois, les feuilles de teck participent activement à l'animation des marchés béninois.

1.3. Composition chimique

Tectona grandis L.f. est sans contexte l'espèce ligneuse tropicale dont le bois est le plus apprécié et le plus utilisé au niveau mondial en raison de ses propriétés technologiques exceptionnelles (Kokutse, 2002). A ce titre, elle a fait l'objet de nombreuses recherches allant dans le sens de la caractérisation de ces propriétés mécaniques ainsi que ces propriétés pharmacologiques (Khan *et al.*, 1999 ; Chengping Xie *et al.*, 2011; Niamké *et al.*, 2012); en l'occurrence, les travaux menés par Chengping Xie *et al* (2011) sur les bois de cœur du teck en provenance de 3 pays (Inde, Thaïlande et Nigéria), ont permis de trouver 109 composés et d'en identifier 74 dont 27 sont communs aux 3 provenances. Hormis son bois, quelques travaux ont également porté sur la composition chimiques des autres parties du teck notamment sur les feuilles, utilisées traditionnellement en pharmacopée et dans la production des teintures naturelles (Aguinaldo *et al.*, 1993 ; Bhuyan et Saikia, 2005; Aradhana *et al.*;

2010 ; Mahesh et Jayakumar, 2010). Le teck renferme des terpénoïdes, des lignanes et principalement des polyphénols. Ces derniers peuvent être des polymères (tanins) ou des molécules de faibles poids moléculaires telles que les quinones, et les flavonoïdes. Ces composés caractérisent fortement la couleur du bois de cœur du teck ainsi que des substances extractibles de ses feuilles. Les colorants rouges, orangés ou jaune-orangés du teck ont une origine biosynthétique commune. Ils sont constitués d'une structure chimique de base correspondant au noyau anthracène-9,10-dione (anthraquinone), ou au noyau naphthalène-1,4-dione (naphthoquinone) (**Figure II.1.3**).

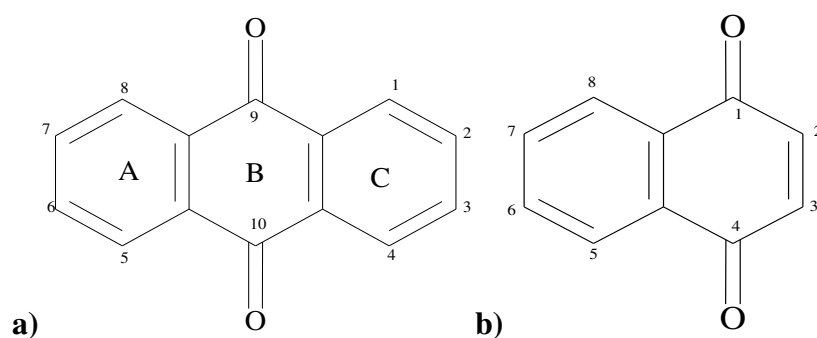


Figure II.1.3 : Structure du noyau anthraquinone(a) et naphthoquinone (b)

Les structures anthraquinoniques dites “aglycones”, présentes dans le teck, diffèrent selon la nature et le positionnement des substituants sur les noyaux A et C de la structure de base. La plante biosynthétise principalement la tectoquinone (2-méthylanthraquinone) (Bhargava *et al.*, 1991). Les composés quinoniques isolés des feuilles de *T. grandis* sont principalement la tectograndone (10-(2',5',8'-trihydroxy-naphthoquinon-3'-yl)-5,12-dihydroxy-2,2,8-triméthyl-2(H)-pyrano[2,3-b]anthracen-6,11-dione) (Aguinaldo *et al.*, 1993); la tectone (3,8-dihydroxy-2-méthylanthraquinone) (Shukla *et al.*, 2010), la tectoleafquinone (1,4,5,8-tétrahydroxy-2-isopentadienylantraquinone) (Agarwal *et al.*, 1965); la 1,5-dihydroxy-2-méthylanthraquinone (Bhuyan et Saikia, 2005) , la 5-hydroxy-2-méthylanthraquinone, le lapachol (2-hydroxy-3-(3'-méthylbut-2'-enyl)-1,4-naphthoquinone et le déoxylapachol (Bhuyan et Saikia, 2005; Aradhana *et al.*; 2010). Les structures de ces composés quinoniques sont détaillées dans la figure II.1.4.

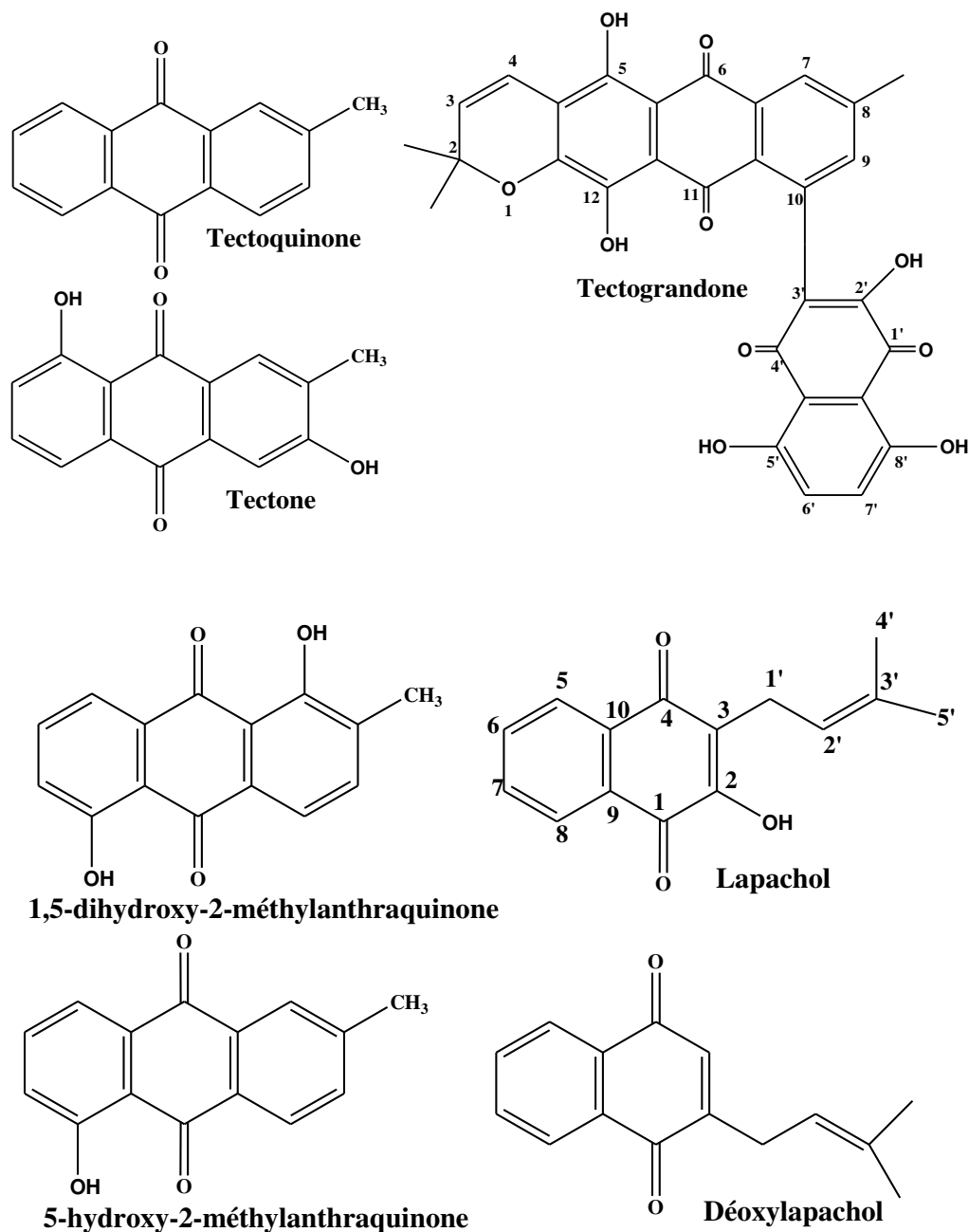


Figure II.1.4: Structures des quinones isolées des feuilles de *T. grandis*

Outre les quinones, la biosynthèse des polyphénols flavonoïdiques passe en général par un intermédiaire commun, tétrahydroxychalcone, à partir duquel, on différencie les 4-oxo-flavonoïdes, les tanins et les anthocyanidines (Remesy *et al.*, 1996)

(**Figure II.1.5**).

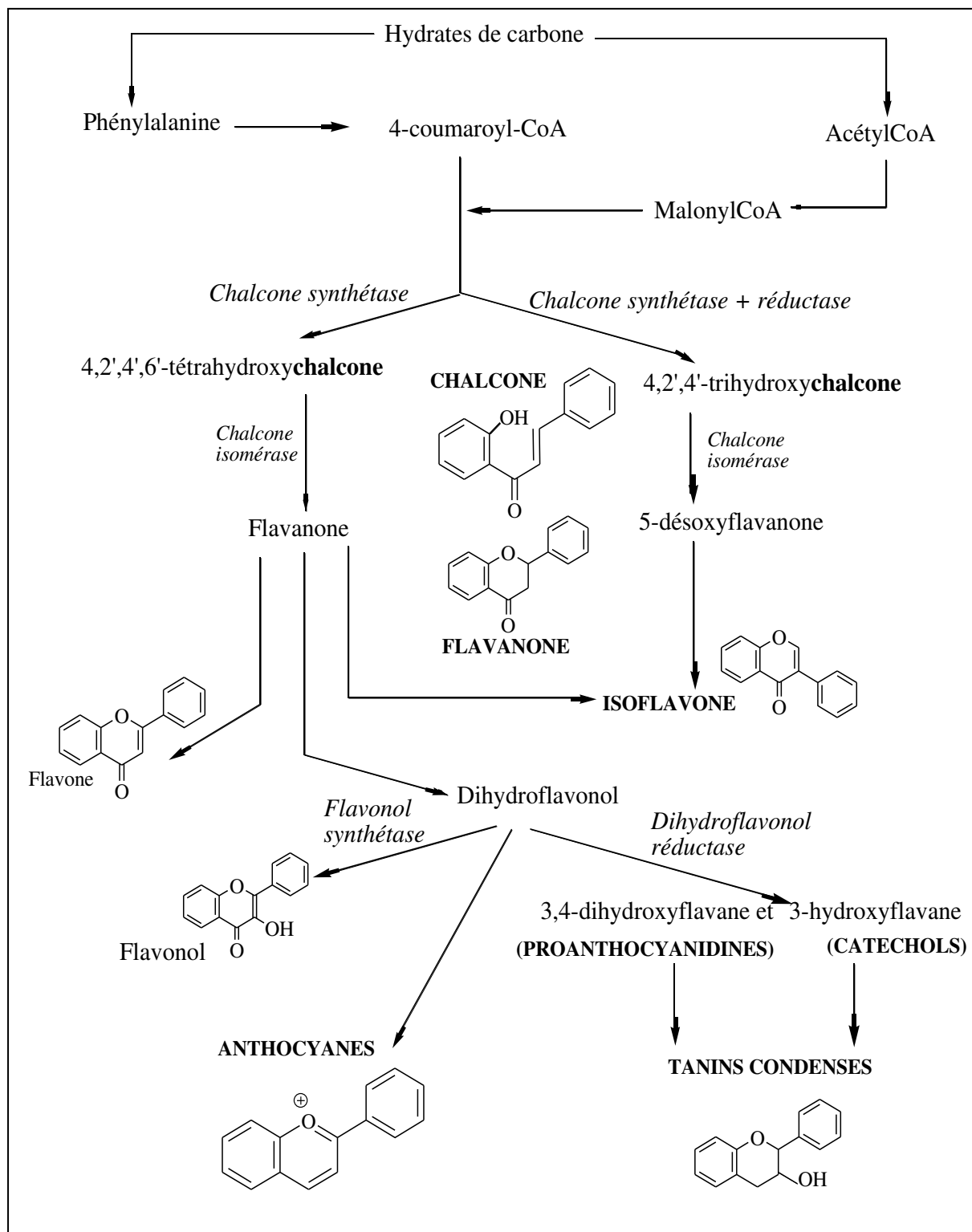


Figure II.1.5: Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy et al., 1996)

Les flavonoïdes et les acides phénoliques constitutifs des tanins identifiés au niveau des feuilles de teck (**Figure II.1.6**) sont la rutine, la quercétine, l'acide gallique, l'acide ellagique, l'acide ferulique, l'acide caféique (Naira et Karvekar 2010 ; Aradhana *et al.*,2010 ; Ramesh et Mahalakshmi 2014).

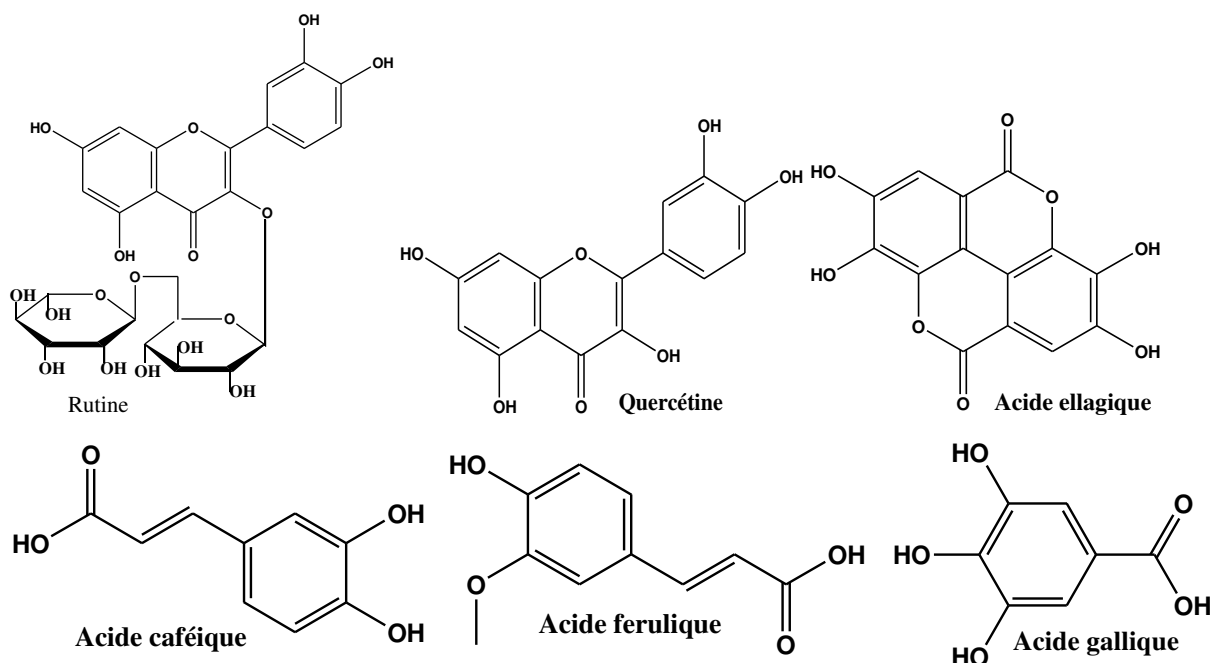


Figure II.1.6: Structure des flavonoïdes et acides phénoliques isolés des feuilles de *T. grandis*

Par ailleurs, plusieurs autres composés bioactifs ont été isolés des feuilles de teck au côté des molécules de nature colorante (Macias *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2010 ; Lacret *et al.*,2012 ; Ramesh *et al.*,2014). Il s'agit principalement de quatre composés phénoliques: acétovanillone, E-isofuraldéhyde, le 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3, 5 -diméthoxyphényl) propan-1-one, evofoline A, d'un verbascoside, de huit lignanes: syringarésinol, médiorésinol, le 1-hydroxypinorésinol, laricirésinol, balaphonin, zhebeirésinol, dont deux nouveaux norlignanes: tectonoelin A ou (7Z)-9'-nor-3',4,4'-trihydroxy-3-méthoxylign-7-ène-9,7'-lactone et tectonoelin B (7Z)-9'-nor-3',4,4'-trihydroxy-3,5-diméthoxylign-7-ène-9,7'-lactone (Lacret *et al.*, 2012); de sept apocaroténoïdes (T₁-T₇) dont deux sont nouvellement isolés: tectoionol A ou (3R,5R,6S,9R)-6,9-époxiionane-3,5-diol (T₆) et tectoionol B ou 2-hydroxy-7,8-dihydro-β-ionol (T₇) (Macias *et al.*, 2008) (**Figure II.1.7**).

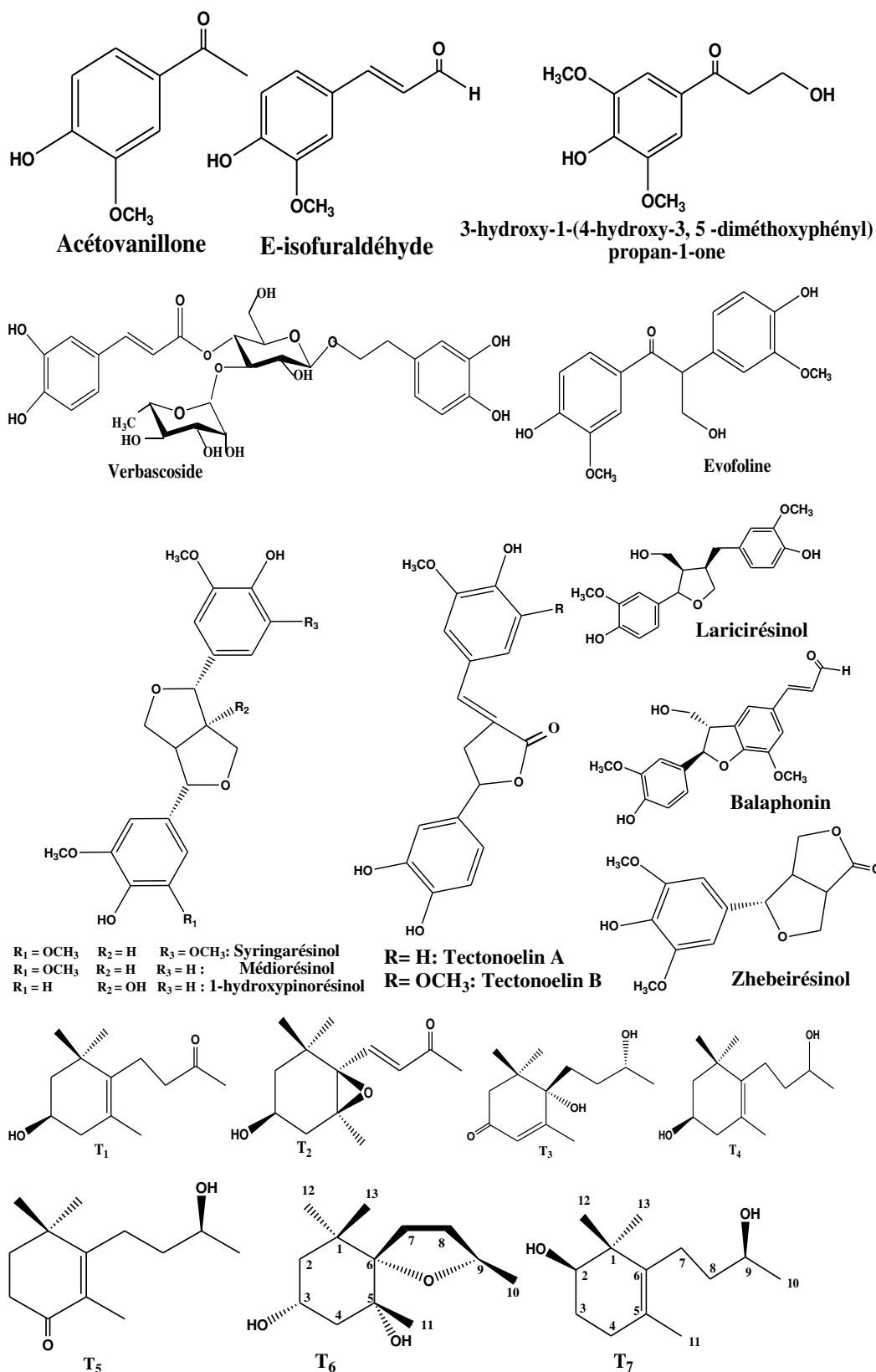


Figure II.1.7: Structures des autres composés isolés dans les feuilles de *T. grandis*

1.4. Propriétés et utilisations

1.4.1. Dans le domaine tinctorial

L'écorce de racine; les jeunes feuilles et le bois du teck produisent un colorant brun jaunâtre, orangé ou rougeâtre, qui est utilisé pour la teinture des textiles (soie, coton ou laine) et des nattes, mais qui nécessite un mordant (Loupe, 2005). Au Bénin, les jeunes feuilles sont plus usitées pour la teinture. L'utilisation des colorants anthraquinoniques du teck comme de nombreuses molécules colorantes plus anciennes extraites à partir de matières végétales et animales, nécessitait des savoir-faire particuliers, permettant l'obtention d'une couleur rouge, stable et durable dans le temps: formation de laque en peinture et mordantage en teinture. En effet, dans le but d'imiter voire d'enrichir la palette de couleurs offerte par les pigments minéraux, les artistes ont su très tôt fabriquer des pigments laqués (ou laques) par précipitation des colorants organiques sur un support minéral inerte ou charge. Les laques, mises en suspension dans un liant, pouvaient ensuite constituer des peintures d'excellente qualité. Le terme "laque" ne fait ici nullement allusion à un aspect de surface et pour mieux comprendre son sens, il faut remonter à une ancienne légende indienne. En effet, selon celle-ci, le Bouddha aurait reçu l'illumination sous un figuier-banien. Arrivé au terme du cycle des réincarnations, il pouvait percevoir les cent mille avatars qu'il avait été dans ses multiples vies antérieures, tout comme le bourdonnement des minuscules cochenilles qui pullulent sur les branches de cet arbre. Ces insectes, dont l'une des particularités est de concentrer des colorants rouges très intenses, furent nommés *lak* (les cent mille en sanskrit). Ces colorants servirent à fabriquer un pigment qu'on appela laque. Ce terme désigna ensuite non seulement les pigments rouges mais aussi tout pigment obtenu à partir d'une solution de colorant organique végétal ou animal (Garcia, 2005). L'artiste voit dans le mot laque un pigment organique utilisé en peinture, alors que pour le chimiste, il s'agit d'un complexe de coordination entre les colorants (ici les dérivés anthraquinoniques) et un cation métallique (le plus souvent l'aluminium). Le choix de la plante, les paramètres d'extraction (température, durée, pH) ainsi que la nature du précipitant basique (K_2CO_3 , Na_2CO_3 , $CaCO_3$...) peuvent faire varier la composition et l'aspect de la laque. La quantité de charge par rapport à celle du colorant joue un rôle sur la couleur finale de la laque. De plus, la base ajoutée va non seulement précipiter les complexes colorés mais aussi réagir sur la charge qui n'a pas servi lors de la complexation et qui se trouve, par conséquent, en excès :



On peut remplacer le sel d'aluminium par d'autres cations métalliques, comme par exemple le sel d'étain (IV), de baryum, de fer (III), de plomb, de magnésium, de calcium ou de cuivre. On obtient alors des laques de différentes couleurs allant du brun doré ou jaune au brun noir (Bhuyan *et al.*, 2005; Prusty *et al.*, 2010).

Pour ce qui concerne, l'emploi de certains colorants comme les feuilles de teck dans la teinture, il est nécessaire d'effectuer un mordantage préalable de la fibre textile. Cette opération est basée sur l'utilisation d'un sel métallique appelé "mordant", augmentant l'affinité des fibres textiles pour les colorants et donc la capacité des matériaux fibreux à fixer les molécules colorantes. Parmi les éléments métalliques les plus employés, l'aluminium (*via* l'alun), du fait de son abondance naturelle, occupe une place majeure. Son origine est généralement minérale mais parfois végétale. En effet, plusieurs lycopodes (*Lycopodiaceae* : Ptéridophyte; cryptogame sans fleurs, porteuse de spores), principalement des arbustes appartenant aux genres *Symplocos* spp. (*Symplocaceae*) et *Memecylon* spp. (*Melastomataceae*), possèdent la capacité d'accumuler l'aluminium (Hutchinson et Wollack, 1944; Taylor, 2002). Mais d'autres métaux pouvaient être également utilisés. Il se forme dans tous les cas, un complexe de coordination très solide où les liaisons fibre-sel et sel-colorant sont du type acide-base de Lewis (**Figure II.1.8**).

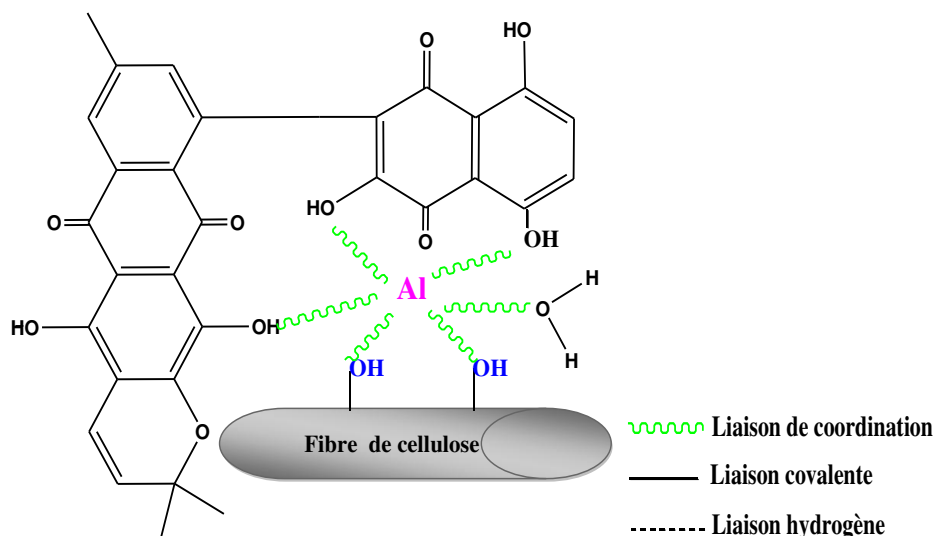


Figure II.1.8: *Complexe de coordination probable, formé par une teinture à la tectograndone (teck) et d'une fibre de coton avec mordantage à l'aluminium*

Cependant la nature exacte des liaisons colorant-mordant-fibre est encore discutée. Il semble que l'on s'oriente plutôt aujourd'hui vers un complexe de coordination formé avec le colorant, le cation métallique et des molécules d'eau (un peu comme lors de la formation de la laque). Ce complexe se fixe ensuite sur la fibre par l'intermédiaire de liaisons hydrogène

(**figure II.1.9**). Ce modèle pose cependant un problème car il n'explique pas le mordantage lorsqu'il est réalisé avant la teinture.

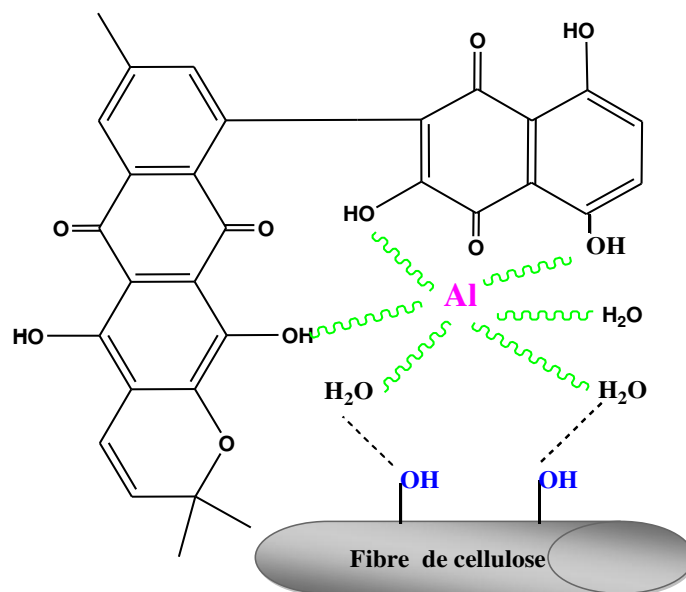


Figure II.1.9: Structure probable du complexe de coordination tecto-grandone-aluminium-eau-fibre

Par ailleurs, la couleur est un facteur crucial dans la détermination des propriétés physico-chimiques de teck. En effet, les composés colorants donnent au bois une couleur caractéristique et sont à l'origine de la durabilité naturelle du bois de cœur *vis-à-vis* des êtres lignivores (Bergström, 2000 ; Dumonceaud, 2001). La durabilité naturelle du bois de teck, reconnue depuis des siècles est attribuée à la présence de deux substances, la naphthoquinone et l'antraquinone (Pahup *et al.*, 1989). Ces composés retrouvés en partie au niveau des feuilles seraient également responsables de leur utilisation pharmacologique.

1.4.2. Dans le domaine pharmacologique

Les constituants quinoniques et flavonoïdiques présents dans les feuilles de teck s'illustrent également par leurs propriétés pharmacologiques. Les quinones, notamment la tectoquinone, la tecto-grandone, la tectone, le lapachol..., ont permis à la plante d'occuper une place importante en médecine dans la prévention et l'élimination des bactéries et microbes pathogènes (Prusty *et al.*, 2010 ; Mahesh et Jayakumar, 2010; 2011). La tectoquinone en particulier est une substance répulsive *vis-à-vis* des termites (Simatupang et Yamamoto, 1999). Associés aux flavonoïdes, ces composés confèrent aux extractibles du teck, une activité antioxydante très éprouvée (Ramesh et Mahalakshmi, 2014). En général, les feuilles de teck sont réputées diurétiques, dépuratives, stimulantes, anti-dysentériques, vermifuges, et

servent en médecine traditionnelle à soigner l'anémie, l'asthénie, les fièvres et le paludisme, les amibiases, la bilharziose et la tuberculose (Ramesh et Mahalakshmi, 2014). Une huile extraite des jeunes pousses servirait à soigner la gale. Les fleurs soignent les affections bilieuses, la bronchite et les maladies urinaires; elles sont diurétiques tout comme les graines. L'huile des graines est appliquée comme tonifiant pour les cheveux. L'écorce est astringente et soigne la bronchite. La sciure de teck peut servir d'encens. Elle est aussi utilisée dans la fabrication du charbon actif (Loupe, 2005). Dans le domaine traditionnel, cette sciure, employée comme poudre dans la divination du Fâ, est ensuite utilisée dans la préparation d'une potion qui aurait la capacité d'éliminer ou de remédier un sortilège.

1.4.3. Intérêt économique et écologique

Les feuilles de teck, larges et coriaces, fournissent des emballages (utilisés comme sachets), des sachets pour faire pousser les semis (Tewari, 1992), des assiettes et des parapluies bon marché et également des toitures pour habitats dans certaines régions (Kone, 2006). A Java, les feuilles les plus rugueuses sont utilisées comme abrasif pour polir le bois. Au Bénin, elles sont principalement utilisées dans le secteur agroalimentaire pour emballer divers produits comme les différentes pâtes de maïs ou de manioc (akassa, « lio », « akpan », « gowé », « abla », « ablo », « kandji »), la moutarde des graines de néré (« afitin »), les poissons fumés, frits ou séchés, les beignets, les légumes cuits ou la viande... mais aussi des produits non alimentaires comme les savons traditionnels (Sogbossi, 2004). En effet, pour la plupart des emballages feuilles, des opérations de prétraitement sont réalisées dans le but de réduire leur teneur en eau et leur épaisseur, de les rendre plus souples et plus malléables, plus perméables et plus résistantes au déchirement. Mais les feuilles de teck échappent de par leurs caractéristiques intrinsèques, à ces traitements. Cependant, une réduction de la nervure principale de ces feuilles peut être requise. Ce qui favorise un gain de temps pour leur usage ajouté à leur récolte très facile. Ainsi, les feuilles de teck font de nos jours l'objet de commercialisation de la récolte à la vente en passant par le transport. De plus, elles sont utilisées dans la coloration des denrées alimentaires (fromages, ignames...); la teinture des feuilles de teck empêche le noircissement des ignames après la cuisson.

En outre, le teck, réputé pour ses nombreux usages et la qualité de son bois, a été adopté par la SODEFOR comme principale essence de reboisement (Amonkou, 1998). Le teck est le bois préféré pour la construction navale, les éléments de coque et de pont des bateaux, à cause de l'extraordinaire insensibilité du bois au pourrissement et à l'action corrosive de l'eau. C'est

un bois qui convient pour des utilisations variées : menuiserie, meubles et ébénisterie en bois massif, parquets, escaliers, charpentes, mobilier de jardin, traverses de chemins de fer, ponts et autres constructions en contact avec l'eau ou avec le sol, poteaux électriques et téléphoniques, piquets de clôture, wagons de chemin de fer, tonneaux et cuves pour liquides même corrosifs, ustensiles divers, tournage et sculpture. Il est également utilisé comme bois de feu. Le teck est souvent planté par des agriculteurs autour de leurs champs pour servir de piquets de clôture et pour supporter les fils de fer barbelés. C'est aussi un arbre ornemental planté dans les villes et le long des routes.

2. Les plantes à indigo: *Indigofera tinctoria* et *Philenoptera cyanescens*

Longtemps considéré à tort comme une substance minérale, l'indigo du latin *indicum* (bleu des Indes), de par sa faible solubilité, se situe à la frontière des colorants et des pigments organiques. Dans la nature, les sources organiques de bleu sont extrêmement rares comparativement aux nombreux principes tinctoriaux minéraux tels que les bleus de smalt et de cobalt (respectivement CoO , $n\text{K}_2\text{SiO}_3$ et CoO , Al_2O_3), l'azurite (2CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$) et le lapis-lazuli ($\text{Si}_6\text{Al}_6\text{Na}_{10}\text{S}_2\text{O}_{24}$). Par conséquent, les différentes espèces de plantes à indigo constituent pratiquement les seules sources organiques naturelles utilisables par les hommes depuis des millénaires, ce qui a contribué à leur conférer une prestigieuse valeur. Au Bénin, les colorants indigoïques proviennent essentiellement de deux espèces végétales: *Indigofera tinctoria* et *Philenoptera cyanescens* respectivement connues sous les noms **indigotier** et **indigo liane** ou **liane indigo**.

2.1. Distribution botanique et géographique

On trouve les plantes à indigo sur presque toute la surface de la Terre. Parmi toutes ces plantes, ce sont les indigotiers (*Indigofera* spp.) qui occupent la première place, non seulement pour la diversité des espèces qui ont été exploitées dans le monde mais également pour la masse importante d'indigo qui en a été extraite (Epstein *et al.*, 1967). De plus le genre *Indigofera* comprend un grand nombre d'espèces tropicales (entre 200 et 800 espèces environ) qui se répartissent sur plusieurs continents. D'autres genres botaniques ont également été exploités. Ils regroupent plusieurs espèces comme le pastel (*Isatis* spp.) en Europe et la renouée des teinturiers (*Polygonum* spp.) en Chine et au Japon. (Hovaneissian, 2005) (**Figure II.1.10**).

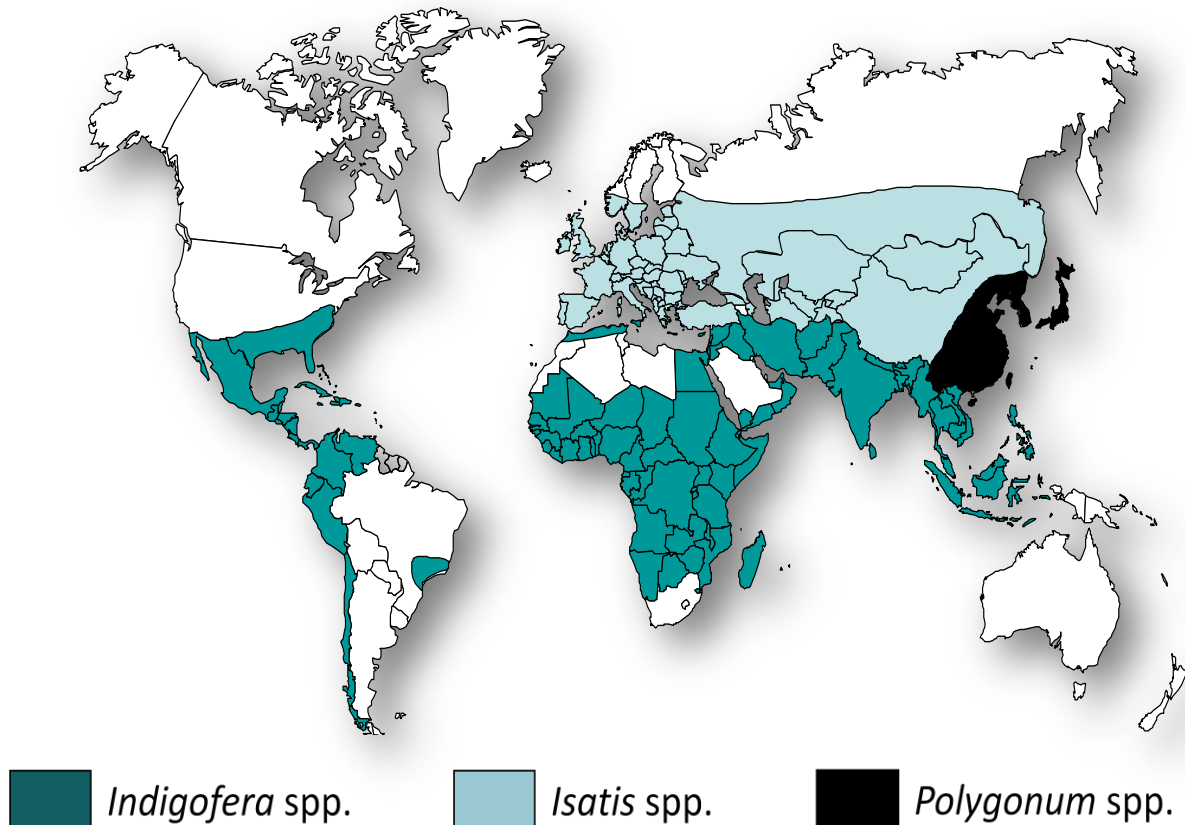


Figure II.1.10: Répartition géographique des principales plantes à indigo (Hovaneissian, 2005)

Outre les trois grandes catégories de plantes les plus répandues (les indigotiers, les pastels et les renouées), il est également possible de rencontrer des lauriers à indigo en Indonésie ainsi que d'autres plantes à indigo propres à l'Afrique noire.

En effet, "si tous les autres continents offrent des végétaux sources d'indigo, l'Afrique se distingue par la faible diversité de ses plantes bleues, mais aussi par leur grande qualité". Cette citation est tirée de l'article de Nadia Souyah, paru dans la revue *Terre Sauvage* (mai 2002), consacré à l'indigo au Bénin. Les espèces retrouvées au Bénin sont notamment:

-*Indigofera tinctoria* L. de la famille des Légumineuses (Leguminosae - Papilionoideae, Fabaceae). C'est une plante herbacée annuelle vivace ou sous-arbrisseau pouvant atteindre 2 m de haut, à feuilles imparipennées alternes. Le radis porte 4 à 6 paires de folioles généralement bien opposées. Ces dernières sont obovales, à base en coin large ou arrondi. Fleurs en racèmes axillaires long de 3 à 10 cm, les ailes de la corolle sont roses alors que l'étendard et la carène sont verdâtres. Le calice et les boutons floraux ont une pubescence blanchâtre. Les gousses sont légèrement arquées, longues de 25 à 30 mm, larges de 2 à 2,5

mm; elles contiennent 12 à 13 graines. (Diedhiou, 1998 ; Takawira et Cardon, 2005) (**Figure II.1.11**)



1-rameaux en fleurs; 2-branches fructifiées; 3-fruit

Figure II.1.11. Représentation d'*Indigofera tinctoria* (Takawira et Cardon, 2005)

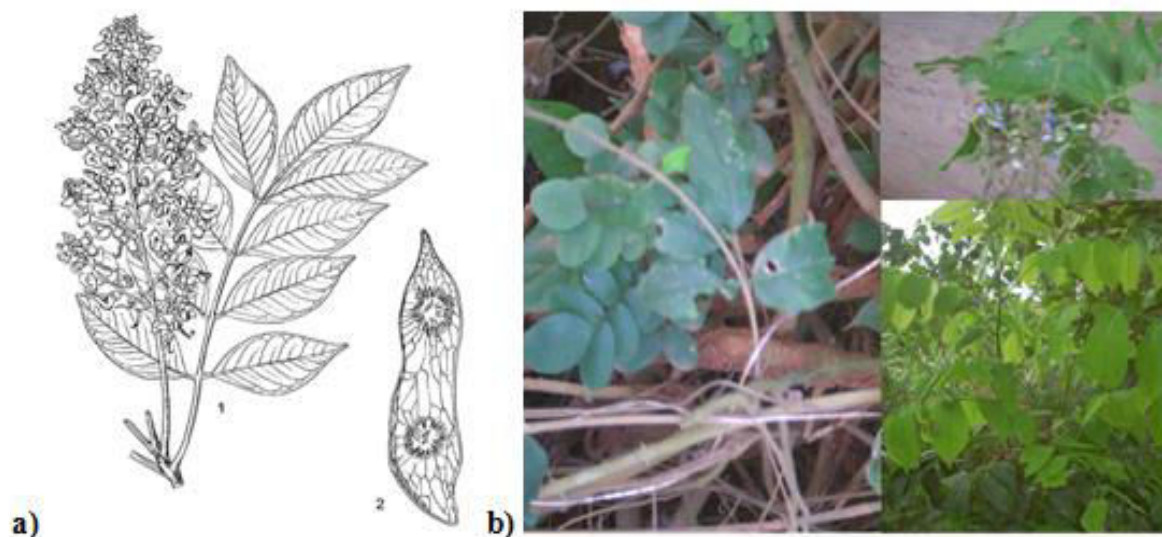
Il faut signaler par ailleurs, qu'il est parfois difficile de distinguer *Indigofera tinctoria* de *Indigofera erracta* que l'on retrouve aussi en Afrique tropicale. En effet, *I. tinctoria* diffère généralement de ce dernier par ses grandes et moins nombreuses folioles et des fruits plus longs contenant plusieurs graines.

L'origine de *I. tinctoria* n'est pas véritablement établie; il provient peut être des Indes. Son aire de répartition a été considérablement élargie par sa culture et sa naturalisation. Il se trouve à l'état sauvage ou naturalisé dans la plupart des pays d'Afrique, de l'Arabie vers l'Asie du Sud-Est et en Australie, alors que dans la plupart des îles de l'océan Indien, il a probablement été introduit et parfois naturalisé. En Amérique tropicale, il a certainement été introduit. En raison de son exploitation et de sa culture historique, il est maintenant distribué dans presque tous les pays d'Afrique situés sous les tropiques (**Figure II.1.12**).



Figure II.1.12: Répartition géographique d'*Indigofera tinctoria* en Afrique (Takawira et Cardon, 2005)

-Philenoptera cyanescens (Schum. & Thonn.) Roberty est aussi une légumineuse (Leguminosae - Papilionoideae, Fabaceae) à l'instar de *I. tinctoria*. C'est un arbuste grimpant à feuilles caduques atteignant 4 m de haut (généralement 2,5 m s'il est cultivé); ou liane ligneuse atteignant 20 m de long. Ses feuilles alternes, imparipennées à 3–5 paires de folioles opposées, glabres, elliptiques ou ovales à sommet pointu ou courtement acuminé à base largement arrondie, bleuissent souvent au séchage. Inflorescence : panicule terminale ou axillaire atteignant 90 cm de long, avec de courts rameaux latéraux. Fleurs bisexuées, papilionacées ; corolle atteignant 1 cm de long, blanche avec des taches bleues à violacées ou bleu foncé, glabre, odorante. Fruit : gousse plate, plus ou moins oblongue, de 10-15 cm × 3-4 cm, pointue aux deux bouts, à nervation réticulée particulièrement proéminente sur les graines, persistant longtemps sur la plante, bleuissant souvent au séchage, contenant 1-5 graines oblongues latéralement aplaties (Arbonnier, 2002) (**Figure II.1.13**).



1- partie d'un rameau en fleurs; 2- fruit.

Source: (a) Cardon et jansen (2005) ; (b): Fagbohoun L.

Figure II.1.13: Représentation de *Philenoptera cyanescens*

Le genre *Philenoptera* comprend 12 espèces confinées à l'Afrique. Auparavant, ces espèces étaient regroupées sous *Lonchocarpus*, un genre maintenant considéré comme limité à l'Amérique tropicale, sauf *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Humb., Bonpl. & Kunth, que l'on trouve à la fois en Amérique tropicale et en Afrique. *Lonchocarpus* diffère par ses inflorescences présentant des fleurs groupées en paires ou en fascicules (solitaires chez *Philenoptera*), sa corolle poilue et son calice souvent tronqué.

Philenoptera cyanescens est répandu en Afrique occidentale, du Sénégal au Cameroun et à la Guinée équatoriale (Bioco) en passant par le Nigéria, le Bénin, le Ghana....(**Figure II.1.14**). Il est aussi cultivé, notamment en Sierra Leone et au Ghana.

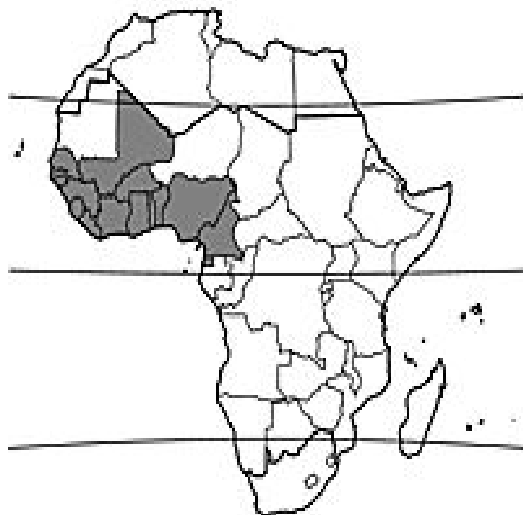


Figure II.1.14: Répartition géographique de *Philenoptera cyanescens*
(Cardon et Jansen, 2005)

2.2. Historique

L'histoire de l'indigo commence en Inde aux environs du IV^{ème} millénaire avant notre ère où il y était employé comme une peinture corporelle, appliquée en cas d'affections cutanées (Jaussaud, 1993). Les plantes et la teinture à indigo étaient déjà mentionnées dans les plus anciens documents sanscrits. En effet, l'utilisation de l'indigo extrait d'espèces d'*Indigofera* a une longue histoire. Il semble que les Egyptiens connaissaient son existence; une chose est sûre, ils étaient capables de reconnaître plusieurs types de bleus notamment le pastel (*Isatis tinctoria* L) qui figure parmi les plantes tinctoriales mentionnées sur les inscriptions hiéroglyphiques d'époque ptolémaïque faisant référence à des textes qui remontent principalement au Nouvel Empire (Période la plus prospère de l'histoire égyptienne qui s'étend sur trois dynasties : la XVIII^e (1552-1292 av J-C), la XIX^e (1292-1186 av J-C) et la XX^e (1186-1069 av J-C) (Hovaneissian, 2005). Ainsi, le colorant bleu utilisé pour les textiles de momies égyptiennes peut, dans certains cas, provenir d'un indigotier. De même, les colorants bleus fréquemment retrouvés dans ces tombes sont toujours éclatantes et coruscantes car ils représentaient le souffle divin qui décorait la coiffure de ceux qui sont partis dans l'éternité (König, 2009). En outre, les plus anciens textiles archéologiques découverts en Afrique de l'Ouest, les "textiles Tellem", ont été trouvés dans des grottes

funéraires dans la falaise de Bandiagara en pays Dogon du Mali (Bedaux et Bolland, 1980). Certains d'entre eux remontent au XI^{ème} siècle et déjà comprennent rayures, carreaux et autres motifs faits avec de l'indigo à partir d'espèces d'*Indigofera* ou *Philenoptera*. Une première description du processus d'extraction de l'indigo locale d'une espèce d'*Indigofera* en Guinée a été laissée par l'explorateur portugais André Alvares de Almada en 1566 (Cardon et Jansen, 2005). Par ailleurs, la culture de l'indigotier est l'une des premières à avoir été introduite par les colons européens dans le Nouveau Monde. Durant les XVI^{ème} et XVII^{ème} siècles, les Hollandais se chargent d'acheminer l'indigo vers l'Europe tandis que les Espagnols et les Français développent la culture de l'indigotier au Mexique et aux Antilles. L'importation massive de l'indigo vers l'Europe, engendre un bouleversement économique considérable, puisque les régions européennes qui prospéraient grâce au pastel, se trouvent confrontées au déclin de leur filière de production et de commercialisation, malgré le combat protectionniste mené par les gouvernements des pays concernés (Hovaneissian, 2005). En outre, la diffusion ou la transmission de l'artisanat tinctorial et surtout celle des étoffes teintées à l'indigo à travers toute l'Afrique noire a dû s'effectuer à partir de deux foyers primaires indépendants l'un de l'autre (Boser-Sarivaxévanis, 1975): le foyer soudanais (haut Sénégal, boucle du Niger) et le foyer du Sud-Ouest nigérian. En effet, depuis l'Inde lointaine, en passant par l'Egypte, la Nubie et l'Abyssinie, les grandes routes commerciales antiques ont emporté en Afrique leurs lots de techniques et de plantes à indigo. Leur commerce, associé à celui du coton occupa une grande place dans les échanges entre l'Ancien et le Nouveau Monde. Cependant, les vestiges de pagne en étoffes teintées à l'indigo sont des traditions sans doute très anciennes qui montrent que la maîtrise de la teinture à indigo propres à l'Afrique noire, a fort bien pu précéder le développement du tissage et la connaissance du coton (Cardon, 2003). A part quelques mentions isolées et certains recensements permettant d'avoir une idée de l'évolution de l'utilisation de l'indigo, les principales sources écrites anciennes restent d'ordre général; elles décrivent les installations nécessaires à cette production, les différentes étapes de fabrication accompagnées éventuellement de gravures d'indigoteries illustrant la disposition des cuves. Certains de ces récits concernent directement le Bénin. Ils sont toutefois loin d'être dénués d'intérêt puisque la technique de production reste, dans les grandes lignes, identiques aux pratiques originales du centre yoruba. En effet, dans l'histoire du peuple Fon et des dynasties des rois, se retrouvent les échanges et les influences de l'unité religieuse de toute la région de l'Afrique occidentale, laissant à penser que du foyer Yoruba d'origine, la pratique de la liane-indigo fut adoptée par les pays voisins. Dès lors, cette plante se retrouva, sur les marchés de l'ancien royaume de Danhomè (où pousse aussi la liane-indigo) sous la forme de

boules de feuilles pour l'usage des teinturiers. Par ailleurs, l'historique de la connaissance de l'indigo est lié à la culture traditionnelle des peuples de l'Afrique noire. Au Ghana une très belle légende raconte la naissance du bleu indigo (Varichon, 2005). Jadis [...] "*cette tâche est de l'indigo, et elle vient des feuilles que tu as rassemblées pour coucher ton enfant. Pour que le bleu survienne, il fallait l'urine de ta fille et les cendres que tu as reversées sur ton corps. Maintenant, l'indigo sacré colorera la terre, mais seules les mères pourront le faire naître*" [...]; depuis la couleur bleue est associée à l'amour et à la tendresse de la femme. Dans la culture yoruba (Nigéria et Bénin), la teinture à l'indigo est associée au culte d'une divinité nommée *Ita Mapo* qui protège le monde féminin et ses activités, telles que la poterie, le pressage de l'huile ou la fabrication du savon. Tous les quarante jours, les femmes interrompent les teintures pour lui faire offrande de mets de haricots, de maïs et de baies de caféier au cours de cérémonies où elles dansent et chantent en son honneur. Cette brève présentation du cours de l'histoire de la production de l'indigo permet de mieux comprendre la situation actuelle car en Afrique, pas plus qu'ailleurs, le temps ne s'est arrêté. Le cas de l'indigo est tout à fait exemplaire; puisque diffusé dès 1885, l'indigo synthétique peut se travailler de la même façon que l'indigo naturel: la molécule dérivée du pétrole est une copie conforme de celle qui s'extrait des plantes et se travaille de la même façon. Ainsi historiquement, la continuité des gestes du métier de teinturier de l'indigo fut-elle assurée sans dommage (ou presque), à tel point que la distinction entre l'indigo naturel et synthétique devient d'intérêt secondaire pour la plupart des amateurs d'indigo africain. En tout cas si la tradition de teinture à l'indigo de l'Afrique de l'Ouest revêt un indéniable caractère d'originalité c'est notamment à cause des plantes utilisées, du montage des cuves, des teintes de qualité obtenues et de son implication dans la culture de la région. Quoi qu'il en soit, les anciens teinturiers et artistes semblent ignorer le problème et la tradition originelle s'être perdue.

2.3. *Composition chimique des plantes à indigo*

Dans la plante, les substances qui vont donner le bleu indigo sont présentes sous la forme d'hétérosides hydrosolubles incolores de l'indoxyle (β -hydroxyindole). Les deux principaux précurseurs de l'indigo (**Figure II.1.15.**) sont l'indicane (3-O- β -D-glucoside d'indoxyle) et l'isatan B (3-O- β -D-5-cétogluconate d'indoxyle) (Gilbert *et al.*, 2000).

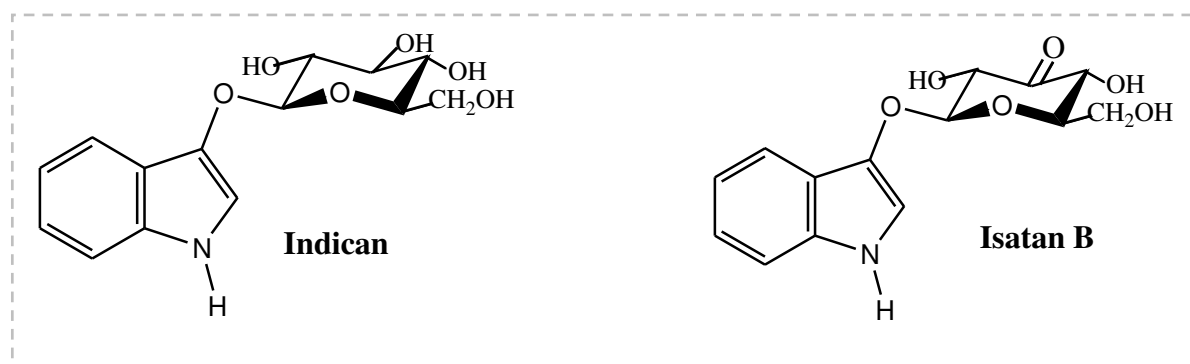


Figure II.1.15: Structure de l'indican et de l'isatan B

L'indican a longtemps été tenu pour le seul précurseur de l'indigo dans toutes les plantes fournissant cette teinture. Sa présence a été mise en évidence dans de nombreuses espèces de différentes familles notamment les légumineuses (*Leguminosae- Fabaceae*). A noter que l'indican est présent dans toutes les plantes à indigo alors que l'isatan B n'est présent que dans les feuilles de pastel (*Isatis tinctoria* L). Quels que soient les précurseurs présents et leurs proportions, toute plante à indigo produit de l'indoxyle qui à son tour conduit à l'indigo. Dans les jeunes feuilles, l'indoxyle qui est un intermédiaire extrêmement instable, est protégé par glycosylation. Néanmoins, lorsque les feuilles sont vieillissantes ou abîmées, les précurseurs glycosidiques sont décomposés par hydrolyse enzymatique en indoxyle incolore et en oses (Achyuthan, 2004; Maugard *et al.* 2002). Par groupement de deux molécules d'indoxyle, en présence de dioxygène, se forme l'indigo ou indigotine (Xia et Zenk, 1992). A partir de l'indoxyle, un autre colorant rouge fuchsia ou plus violacé, l'indirubine, isomère de l'indigotine, peut également se former. (**Figure II.1.16**)

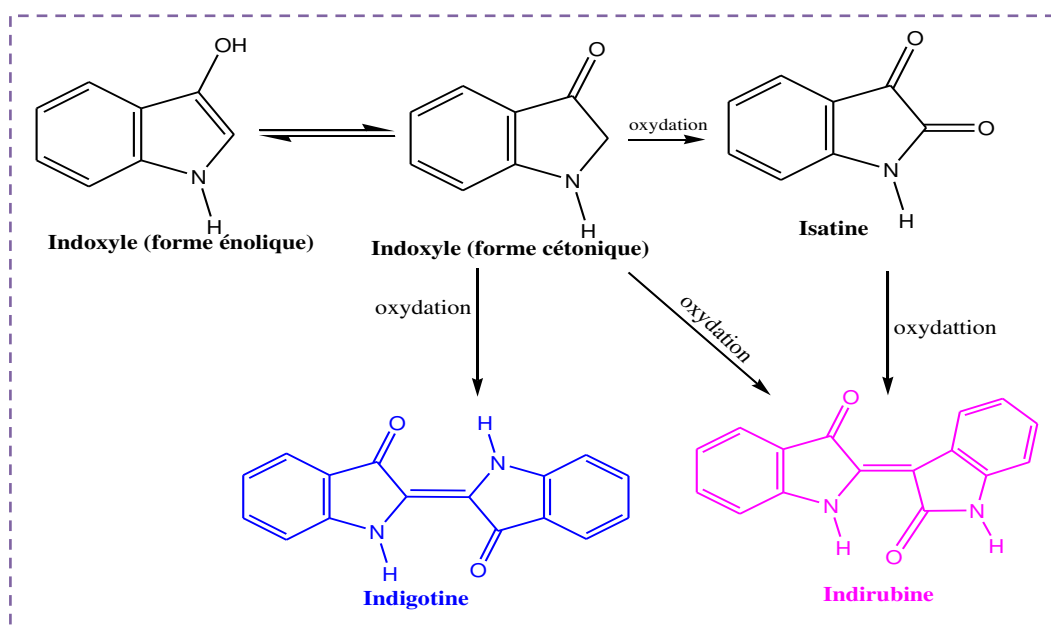


Figure II.1.16: Biosynthèse de l'indigotine et de l'indirubine à partir de l'indoxyle (Xia et Zenk, 1992)

Le schéma biosynthétique spécifique à *Indigofera tinctoria* est donc complété par l'hydrolyse de l'indican en indoxyle. Ce dernier peut s'oxyder en isatine qui pourrait donner en plus de l'indirubine un composé mineur, l'isoindirubine (rouge); isomère de ce dernier (**Figure II.1.17**).

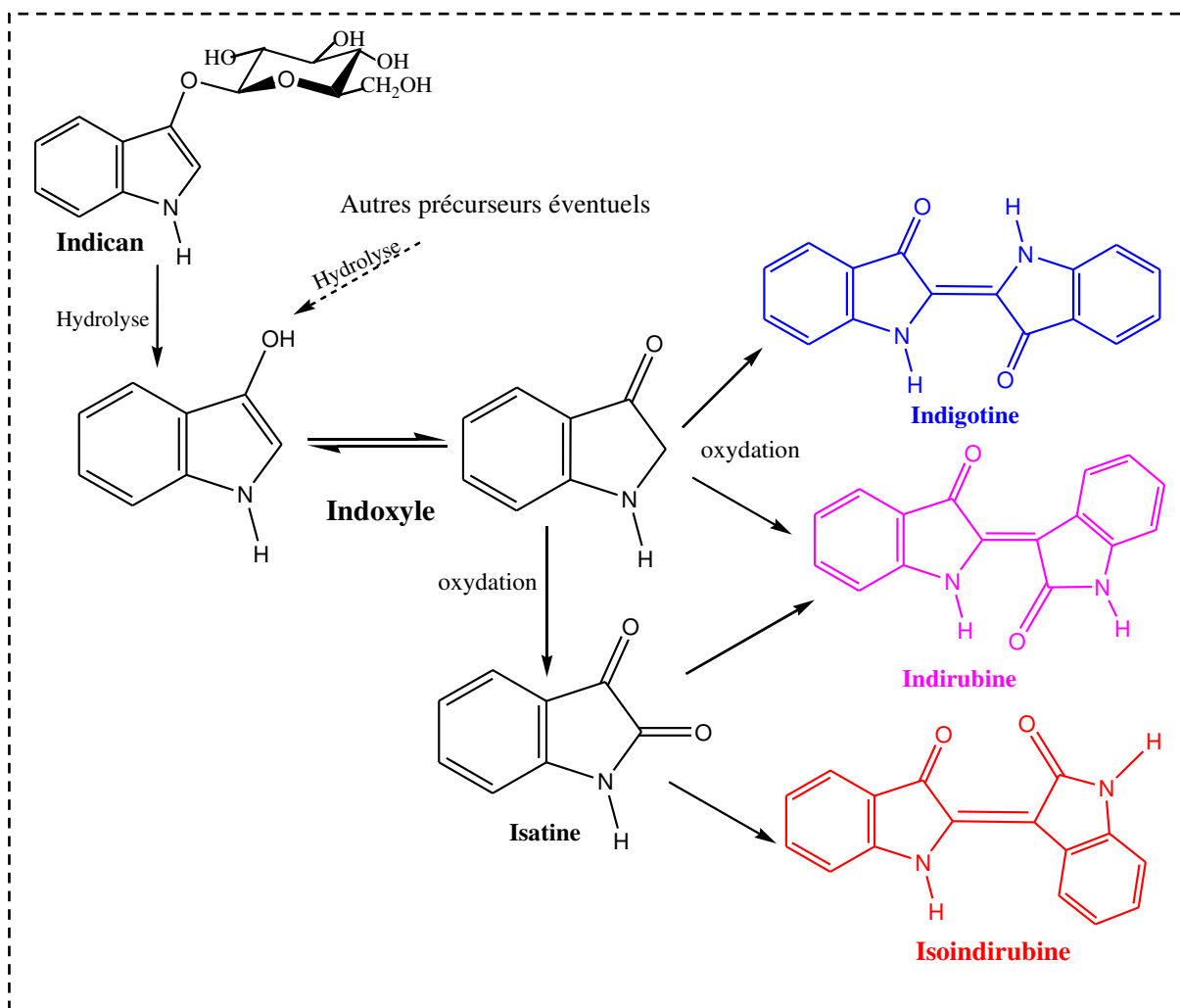


Figure II.1.17: Biosynthèse des indigoïdes dans les feuilles d'indigotier (*I. tinctoria*)

Hormis les indigoïdes biosynthétisés par *I. tinctoria*, d'autres composés ont été isolés de cette espèce d'indigotier; il s'agit de trois furano-flavonoïdes: pseudosemiglabrine, semiglabrine, glabretephrine et d'un flavonoïde; le kaempferol-4',7-dirhamnoside (Tadigoppula *et al.*, 2006); de six roténoïdes: deguelin, déhydrodeguelin, roténol, roténone, téphrosine et sumatrol (Kamal et Mangla, 1992) (**Figure II.1.18**). Les feuilles d'*Indigofera tinctoria* contiennent pour 100 g de matière sèche, environ: 5,1 g d'azote; 0,35 g de phosphore; 1,4 g de potassium et 3,9 g de calcium. Le résidu obtenu après extraction de colorant contient environ: 1,8 g d'azote, 0,2 g de phosphore et 0,25 g de potassium; il peut donc servir d'engrais verts. (Takawira-Nyenyanya et Cardon, 2005).

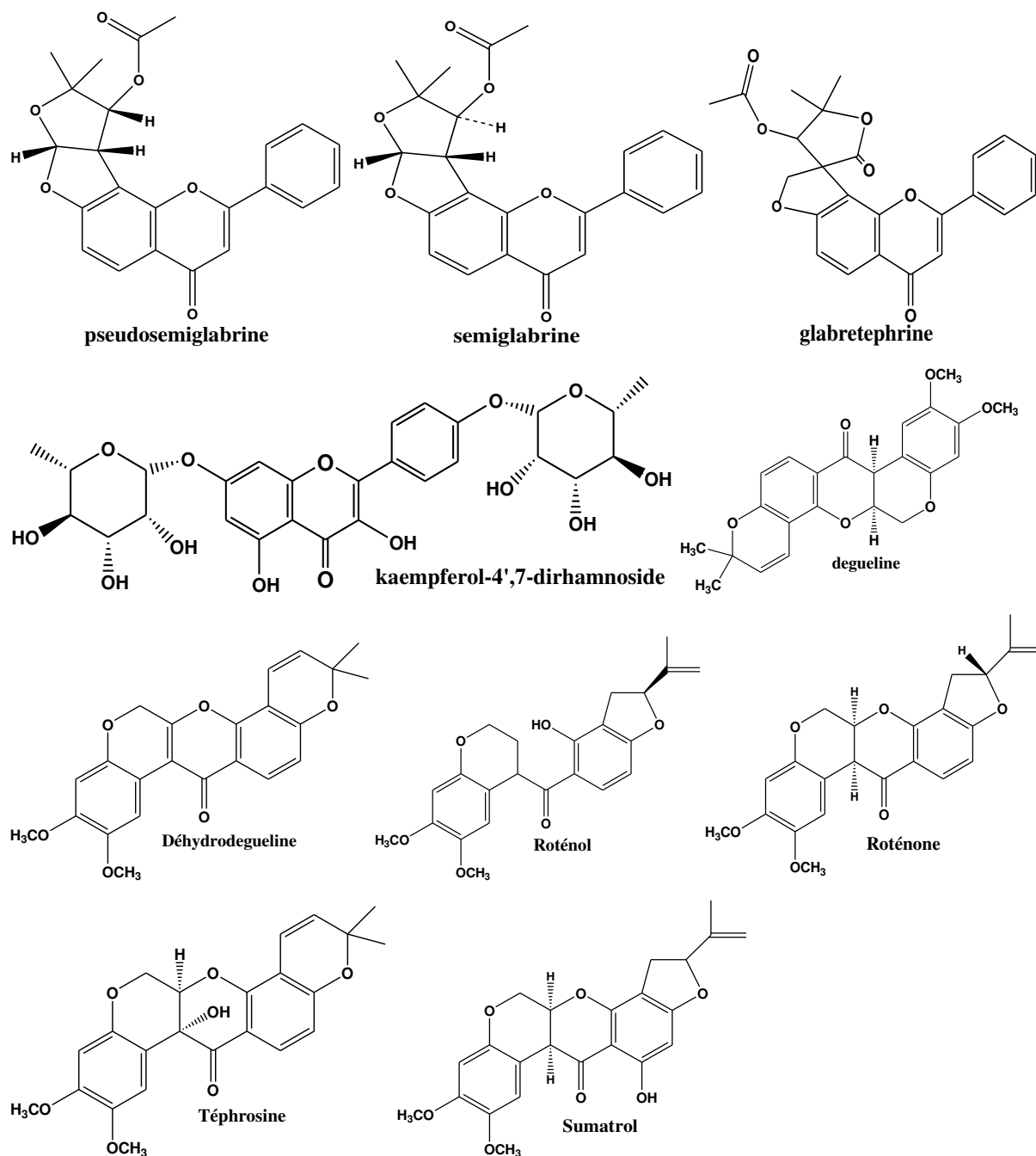


Figure II.1.18: Structures des autres composés isolés des feuilles de *I. tinctoria*

Par ailleurs, la biosynthèse des indigoïdes au niveau de *Philenoptera cyanescens* est similaire à celle de *I. tinctoria* et conduit aux mêmes produits finaux (**Figure II.1.17**). En effet, ces feuilles contiennent 0,1–0,3% de précurseurs de l'indoxyle et peuvent fournir un indigo contenant jusqu'à 43% d'indigotine. En plus de l'indigotine et de l'indirubine, une série de colorants flavonoïdiques jaunes comme la quercétine, un hétéroside de quercétine, le kaempférol et la rhamnétine ont été identifiés dans cette espèce (Cardon, 2003). Une analyse de la composition chimique des feuilles de *P. cyanescens* réalisée par Moronkola et Oladosu

(2013) a montré que ces dernières contiennent également des huiles volatiles comme: le 1-tétradécanol; le pentadécanal; la 6,10,14-triméthyl-2-pentadécanone; le méthylhexadécanoate l'acide hexadécanoïque; le phytol et l'heneicosane. De même, cette analyse leur a permis d'isoler deux triterpénoïdes (P1-P2) (**Figure II.1.19**).

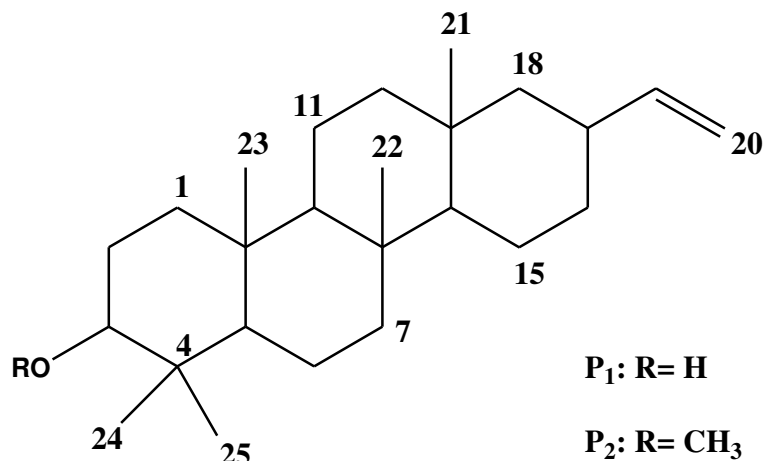


Figure II.1.19: Structures des triterpénoïdes isolées de *P. cyanescens* (Moronkola et Oladosu, 2013)

2.4. Propriétés et utilisations

2.4.1. Dans le domaine tinctorial

En Afrique de l'Ouest, l'indigo est de loin le plus important colorant d'origine végétale. Il est d'ailleurs considéré comme "*le roi des colorants*" en raison de sa couleur bleue attrayante, éclatante et coruscante; de sa grande résistance à la lumière et le large panel de couleurs obtenues par combinaison avec d'autres colorants naturels (Takawira-Nyenyanya et Cardon, 2005). Il n'y a pas d'autres plantes tinctoriales qui ont eu une place aussi importante dans de nombreuses civilisations comme l'*indigotier et son voisin de liane indigo*. En effet, le pigment bleu tiré de l'indigotier a servi à colorer le bois notamment dans la statuaire africaine (Varichon, 2005). De même, la couleur tirée de *P. cyanescens* sert toujours à teindre en bleu ou en bleu noir le coton, l'étoffe d'écorce (autrefois), le raphia et autres fibres végétales, ainsi que le cuir, les cheveux et les sculptures sur bois. Les femmes yorùba utilisent cette plante, localement appelée "elu" ou "Gara" en haoussa, comme source d'indigo dans la fabrication du tissu "*adire*"; technique décorative semblable au batik (méthode de teinture suivant laquelle on recouvre les parties du tissu que l'on ne souhaite pas teindre de cire détachable), ce qui a pour effet de créer des motifs bleu pâle sur un fond bleu foncé (Cardon et Jansen, 2005). Traditionnellement, les étoffes tissées connues sous le nom de "tissu de pays" ou "Asho ibilè"

et teintes au gara étaient réservées aux chefs pour les tenues de cérémonie, les dots, les vêtements de sépulture, les amendes de la cour et les cadeaux aux visiteurs de marque (Barbour et Simmonds, 1971). De nos jours, ce tissu est porté par un plus grand nombre de personnes pour des raisons esthétiques et culturelles. Il est utilisé pour les uniformes de tous les jours et de cérémonie dans certaines écoles et certains bureaux. Dans l'industrie hôtelière, le gara sert énormément pour les serviettes de table, les nappes, les dessus de lit, les rideaux ainsi que pour les toiles de fond dans les halls et les salons de conférences. Par ailleurs, les feuilles de liane-indigo mâchées avec de la potasse colorent les dents en noir; ce système est utilisé pour induire temporairement le vieillissement des dents par les artistes comédiens dans la cinématographie yoruba.

Dans tous les cas, les techniques de teinture à l'indigo n'exigent pas l'utilisation de mordants, mais imposent de rendre l'indigotine hydrosoluble afin qu'elle puisse imprégner les fibres textiles. Ces techniques impliquent un processus de réduction en milieu alcalin qui produit de la leuco-indigotine (Voss, 2000), forme peu colorée se transformant en sel par l'action de bases (**Figure II.1.20**). Cet intermédiaire se transforme à nouveau en indigotine en présence du dioxygène de l'air lors de la sortie du bain de teinture.

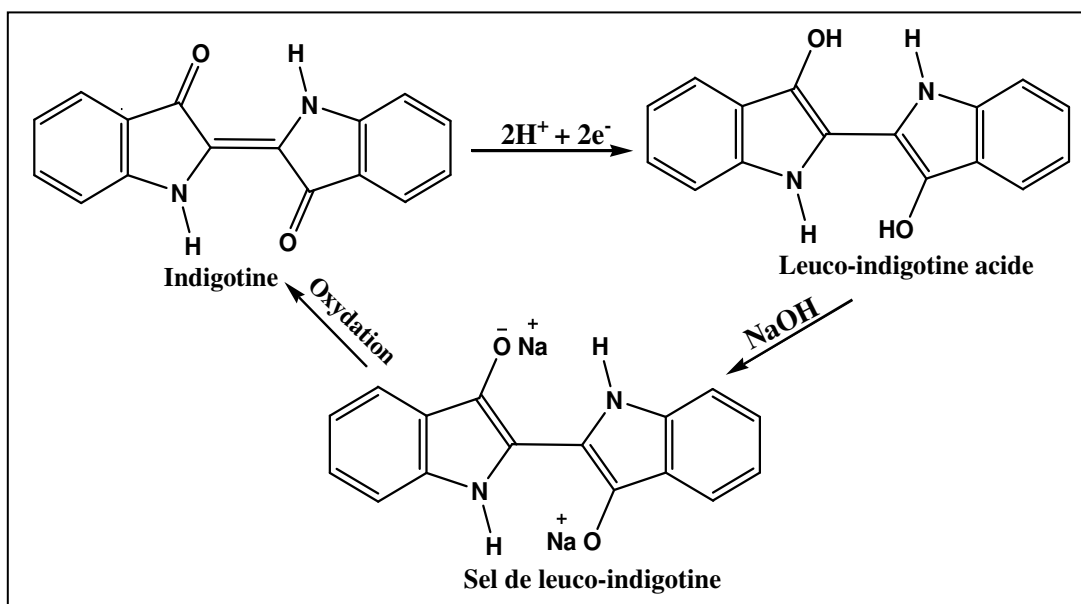


Figure II.1.20 : Réduction de l'indigotine en sel de leuco-indigotine (Cardon, 2003)

2.4.2. Dans le domaine pharmacologique

Principalement utilisés pour la teinture, les dérivés indigoïques présentent aussi des propriétés pharmacologiques très importantes. Ainsi l'indigo était employé comme une peinture corporelle, appliquée en cas d'affections cutanées il y a quatre millénaires avant notre ère (Hovaneissian, 2005). De même, certains colorants passaient pour conférer des qualités

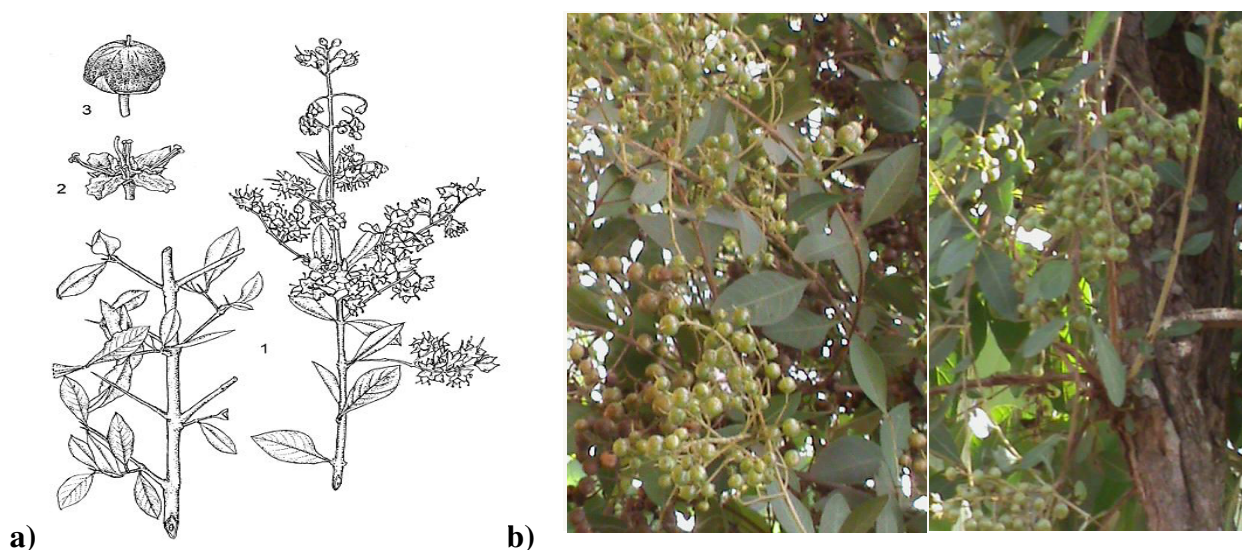
protectrices aux vêtements qu'ils teignaient; au Japon l'indigo donnait aux tissus une odeur censée servir de protection contre les morsures de serpent (Varichon, 2005). Par ailleurs, de récents travaux menés sur les feuilles d'*Indigofera tinctoria* ont permis de mettre en évidence ses propriétés anti-inflammatoires (Tyagi, 2010); antibactérienne, antioxydante et cytotoxique (Renukadevi et Suhani, 2011; Anusuya et Manian, 2013); anti-hépatoprotectrice (Muthulingam et al., 2010); antiépileptique (Ashuntha et al., 2010); antiproliférative *vis-à-vis* des cellules cancéreuses A-549 (Thiruvanmiyoor et Ravichandran, 2008); anti-hyperglycémique (Amarnath et Saralaya, 2011). En effet, l'extrait éthanolique des feuilles de *I. tinctoria* pourrait remédier aux diabètes du type 1 et 2 pour un traitement à long terme, ainsi que son extrait méthanolique (Verma et al., 2010). De même, ses propriétés insecticides ont été attribuées aux roténoïdes qu'elles renferment. En effet, les roténoïdes isolées de *I. tinctoria* sont toxiques *vis-à-vis* des larves d'*Anopheles stephensi* et des adultes de *Callosobruchus chinensis* (Kamal et Mangla, 1993).

Philenoptera cyanescens est aussi employé en médecine traditionnelle. Ses feuilles et ses racines sont appliquées en cataplasme ou comme pansement dans le traitement des maladies de peau et des ulcères. En Sierra Leone et en Guinée Bissau, on estime que les feuilles et les racines pourraient soigner la lèpre. Les feuilles et l'écorce servent également de laxatif. Au Bénin, le jus de feuilles est consommé pour lutter contre les troubles intestinaux et la dysenterie. Une décoction de ramilles feuillées et de racines est prescrite aux femmes pendant ou après l'accouchement et passe aussi pour aphrodisiaque; au Nigeria, cette décoction sert à traiter l'arthrite, les maladies vénériennes et la diarrhée. Au Sénégal, les feuilles constituent un condiment consommé avec le couscous (Cardon et Jansen., 2005). En effet, quelques études ont contribué à relier les propriétés antiarthritiques, anti-inflammatoires et antiulcéreuses d'extraits de feuilles de *P. cyanescens* aux triterpènes, aux huiles volatiles et aux indigoïdes qu'elles contiennent (Iwu and. Anyanwu, 1982 ; Promsattha et al., 1987 ; Iwu, 2006 ; Adewuyi et al., 2012).

3. *Lawsonia inermis* Linn.

3.1. Distribution botanique et géographique

Lythracée appartenant à l'ordre des Myrtales; *Lawsonia inermis* est une plante pérenne communément appelée Henné en français ou Henna en anglais. C'est une espèce native d'Afrique du Nord et du Sud Est Asiatique (Malekzadeh, 1968), cultivée extensivement en haies vives ou comme plantes ornementales en Inde, en Iran et le long des côtes africaines et méditerranéennes (Malekzadeh, 1968). *Lawsonia inermis* est un arbuste ou petit arbre fortement ramifié, glabre, atteignant 6 m de haut, à écorce marron-grise. Ses feuilles opposées décussées, simples et entières, sont presque sessiles à stipules minuscules; limbe elliptique à oblong ou largement lancéolé; inflorescence: panicule terminale de grande taille, pyramidale, atteignant 25 cm de long, à nombreuses fleurs bisexuées régulières et odorantes. Son fruit est une capsule globuleuse de 4-8 mm de diamètre, violet-vert, indéhiscente ou s'ouvrant irrégulièrement, contenant de nombreuses graines longues de 2-3 mm, à tégument épais (Aweke et Tapapul, 2005 ; Chauhan et Pillai, 2007) (**Figure II.1.21**). Ses longues grappes dégagent une odeur extrêmement puissante et extrêmement diffusible qui rappelle, lorsqu'elle est diluée et perçue de loin, celle de plusieurs fleurs blanches, le troène ou l'aubépine, mais qui donne, lorsqu'elle est dense et perçue de près, une impression très vive de sperme, de mucus vaginal ou de liquide amniotique (Lemordant et Forestier, 1983).



1- partie inférieure et supérieure d'un rameau en fleurs; 2- fleur ; 3- fruit

Source: (a): PROSEA ; (b): Fagbohoun L.

Figure II.1.21 : Présentation de *Lawsonia inermis*

Le genre *Lawsonia* comporte une seule espèce; *L. inermis*, ayant plusieurs synonymes : *L. alba* Lam; *L. falcata* Lour; *L. speciosa* L. et *L. spinosa* L. (The Plant List, 2010). Il serait originaire du Sud de l'Iran et de la Mésopotamie. Il aurait été introduit en Égypte sous la XX^{ème} dynastie (Aubaile-Sallenave, 1982). Il pousse à l'état naturel dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, d'Asie du Sud et d'Australie sous des latitudes comprises entre 15 et 25° aussi bien Nord que Sud, de l'Afrique au Pacifique. En effet, la région d'origine du henné correspond à la savane tropicale et aux régions arides depuis l'Afrique jusqu'à la zone Ouest Pacifique, d'où sortent les meilleures qualités tinctoriales quand il est cultivé dans les températures comprises entre 35°C et 45°C. En Afrique, il s'est souvent naturalisé, notamment sur des sols alluviaux le long des rivières (**Figure II.1.22**). A Madagascar, il est devenu tellement commun le long de certaines rivières qu'il n'a pas besoin d'être cultivé. Au Bénin, il est distribué dans toutes les régions du Nord au Sud et surtout cultivé auprès des maisons (Akoègninou *et al.*, 2006), mais sa culture est plus abondante au Nord qu'au Sud.

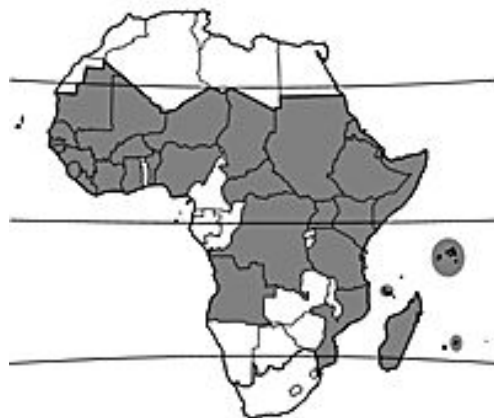


Figure II.1.22: Répartition géographique de *Lawsonia inermis* (planté et naturalisé) en Afrique (Aweke et Tapapul, 2005)

3.2. Historique

Le henné est l'un des plus anciens produits de beauté du monde. Son origine semble inconnue. Les données linguistiques accèdent la thèse d'une origine dans la région du Baloutchistan (Iran/Pakistan) jusqu'en Inde occidentale, où il pousse toujours à l'état sauvage (Aweke et Tapapul, 2005). De là, il se serait propagé vers l'Est jusqu'au reste de l'Inde et à l'Indonésie, et vers l'Ouest jusqu'au Proche-Orient où il devint l'une des plantes phares de l'islam (Scarone, 1939). Toutefois, il était déjà mentionné dans la Bible pour son essence "kopher" (Cantique 1:4; 3:13 et Genèse 6:14), ainsi que dans l'Ancienne Égypte "kwpr". En

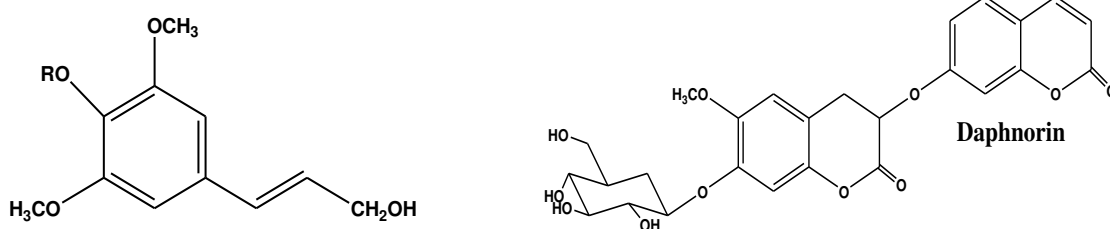
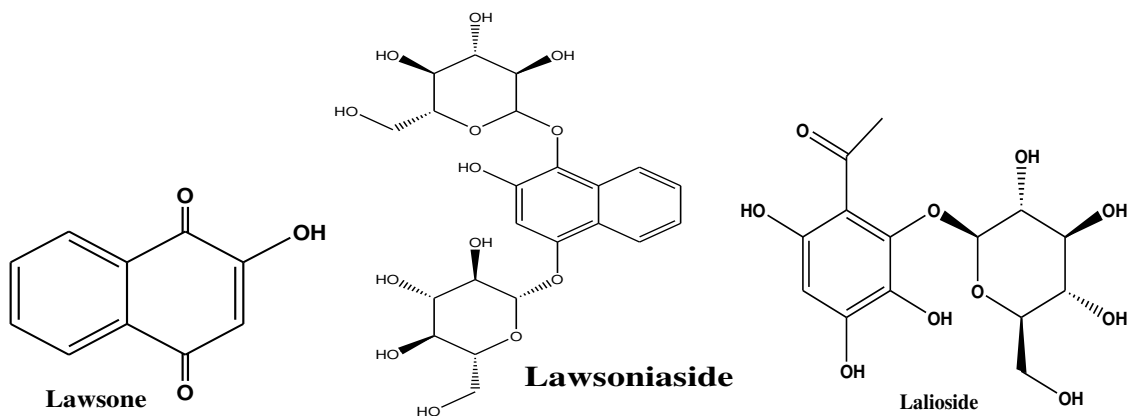
effet, "Kwpr" apparaît dans les papyrus égyptiens hellénistiques (antiques) comme médicaments et comme une plante odorante, douce utilisée dans un contexte funéraire (Fletcher, 2002 ; Smith, 2009); les momies de Ramsès II et Ramsès III avaient les mains et les pieds teints au henné (Maspero, 1886). Son usage aurait atteint le Sahara du Sud-Est et l'Afrique tropicale (Kawar et Tchad) par le canal de l'Égypte pharaonique bien avant l'arrivée des Arabes (Gast, 2000). Plus tard, il suivit les armées et les marchands islamiques depuis l'Arabie jusqu'à l'Espagne andalouse, l'Afrique du Nord, en Mauritanie au Mali puis s'est répandu dans toute l'Afrique islamisée. Ainsi s'expliquerait l'aire d'emploi de la racine arabe "*hinna*" du mot henné et les vertus qu'on lui accorde en pays musulmans (Scarone, 1939 ; Gast, 2000). Dans ces pays, la fleur du henné ou "l'arbre qui pousse au paradis" a aussi une connotation religieuse (Maurin, 1992) puisque sa fleur passe pour avoir été la favorite du Prophète Mohammed (Gobert, 1961; Camps-Fabrer et Souville, 1974) et en Mauritanie, cet arbre aurait poussé à l'intention de la fille du Prophète et qu'elle fût la première femme à faire de sa teinte rouge une parure (Tauzin, 1998). Par ailleurs, l'usage du henné est diversement apprécié suivant les continents. Pour les Européens, la fleur du henné n'est pas tenue agréable ; par contre les Tunisiens comme les peuples du Proche Orient, en font au contraire leurs délices. Un buisson de henné, dans les petits jardins des villes, dans la cour centrale des maisons est souvent cultivé pour sa fleur, et ses multiples vertus: prophylactiques, thérapeutiques et médicales, cosmétiques, décoratives.... Au Bénin, le henné est utilisé dans de nombreuses régions et surtout par les musulmans ainsi que par les artisans pour la teinture de la soie, des cuirs et dans la sculpture (Bosseaux, 1965).

3.3. Composition chimique

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur la composition chimique de *L. inermis* ainsi que ses activités pharmacologiques. Les composés chimiques isolés sont des dérivés naphtoquinoniques, des composés phénoliques, des terpénoïdes, des stérols, des dérivés aliphatiques, des xanthones, une coumarine, des acides gras, et des acides aminés (Makhija *et al.*, 2011). Ceux isolés des feuilles sont répertoriés dans le tableau II.1.2, suivis des quelques principales structures (**Figure II.1.23**).

Tableau II.1.2: Composés isolés des feuilles de Lawsonia inermis

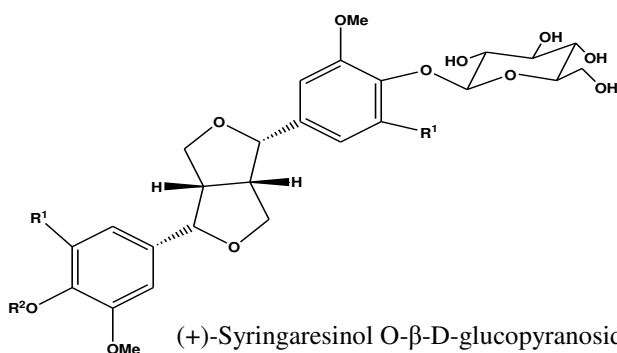
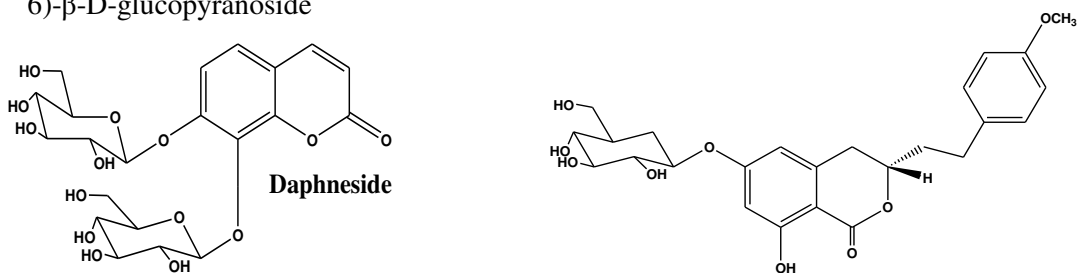
Composés	Références
Dérivés naphthoquinoniques	Dixit <i>et al.</i> (1980)
Lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)	
1,3-dihydroxynaphthalène; 1,4-naphthoquinone;	Afzal <i>et al.</i> (1984)
1,2-dihydroxy-4-glucosylnaphthalène	
2-méthoxy-3-méthyl-1,4-naphthoquinone	
Composés phénoliques	
Lawsoniaside (1,3,4-trihydroxynaphthalène-1,4-di-β-D-glucopyranoside)	
Lalioside (2,3,4,6-tétrahydroxyacetoxy-2-β-D-glucopyranoside)	Takeda et
Lawsoniaside B (3-(4-O-α-D-glucopyranosyl-3,5-dimethoxy) phenyl-2E-propénol)	Fatope(1988) Cuong <i>et al.</i> (2010)
Syringinose; daphneside; daphnorin; agrimonolide -6-O-β-D-glucopyranoside; (+)-syringarésinol O-β-D-glucopyranoside, (+)- pinorésinol di-O-β-D-glucopyranoside; syringarésinol di-O-β-D-glucopyranoside et isoscutellarin	
Stéroïdes	
Lawsaritol (24β-ethycholest-4-en-3β-ol)	Gupta <i>et al.</i> (1992)
Stigmastérol et β-sitostérol	
Flavonoïdes	Pratibha et Korwar (1999)
Apigénine-7-O-glucoside (cosmosiin), apigénine-4'-O-glucoside, lutéoline-7-O-glucoside, lutéoline-3-O-glucoside, apigénine, lutéoline,	Afzal <i>et al.</i> (1980)
Huiles Essentielles	Chakraborty <i>et al.</i> (1977)
(Z)-2-hexénol; linalol; α-ionone, β-ionone, α-terpinéol, terpinolène, δ-3-carène et γ-terpinéol	Wong et Teng (1995) Reichling <i>et al.</i> (1999)
Xanthones, Coumarine et autres constituants	Bhardwaj <i>et al.</i> (1977)
Laxanthone I (1,3-dihydroxy-6,7-diméthoxy-xanthone)	Bhardwaj <i>et al.</i> (1978)
Laxanthone II (1-hydroxy-3,6-diacétoxy-7-méthoxyxanthone)	Bhardwaj <i>et al.</i> (1976)
Laxanthone III (1-hydroxy-6-acétoxyxanthone)	
Lacoumarine (5-allyoxy-7-acétoxy coumarine)	
Scopolétine; esculétine, fraxétine	Muhammad HS et Muhammad S. (2005)
Acide hennotannique ; acide gallique, acide para-coumarique	Chaudhary <i>et al.</i> , 2010
Trace de métal: Cu, Ni, Mo,V, Mn, Sr, Ba, Fe et Al.	
Minéral: Na ₂ O; CaO et K ₂ O	



Lawsoniaside B : R = α -D-glucopyranoside

Syringin : R = β -D-glucopyranosyl-(1-

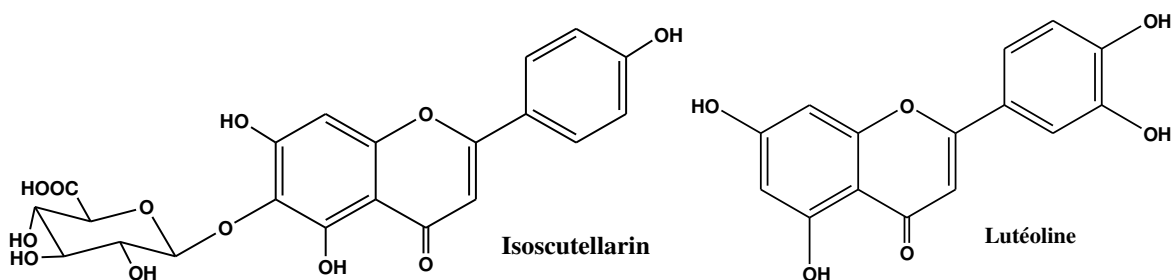
6)- β -D-glucopyranoside



(+)-Syringaresinol O- β -D-glucopyranoside, R¹ = OCH₃, R² = H

(+)-Pinoresinol di-O- β -D-glucopyranoside, R¹ = H, R² = β -D-glucopyranoside

Syringaresinol di-O- β -D-glucopyranoside, R¹ = OCH₃, R² = β -D-glucopyranoside



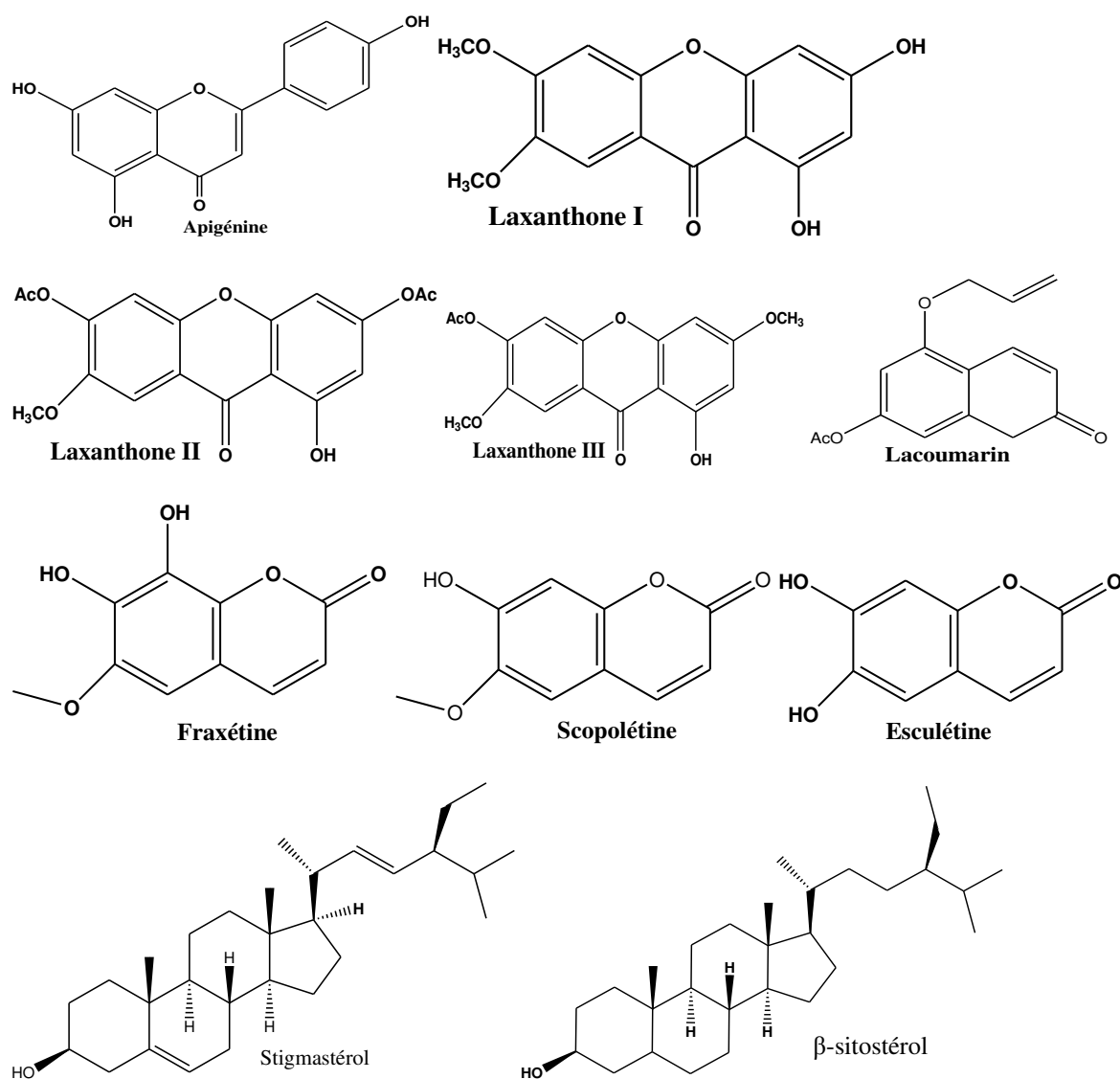


Figure II.1.23: Structure de quelques molécules isolées des feuilles de *L. inermis*

3.4. Propriétés et utilisations

3.4.1. Dans le domaine tinctorial

Le mot *henné* désigne également le colorant tiré de *Lawsonia inermis* et dont l'usage est très ancien. Le henné a un double langage, celui de la séduction et de la magie, à travers les différents rituels auxquels il participe (Badreddine, 1976 ; Steer et Goudet, 2004). En effet, le tatouage au henné est utilisé depuis des siècles dans diverses cultures : juive, chrétienne, musulmane, indoue et bouddhiste à des fins rituelles, sociales ou esthétiques lors des événements tels que les mariages (Kluger *et al.*, 2008). Il est actuellement en vogue dans les pays occidentaux pour des raisons multiples comme son utilisation facile, son caractère indolore, sa durée éphémère et le faible risque de transmission virale (Lamchahab *et al.*,

2011). Le henné est aussi utilisé dans la teinture artisanale (soie, cuir, sculpture...) avec addition de mordants en l'occurrence l'alun (Bosseaux, 1965).

3.4.2. Dans le domaine pharmacologique

Dans la tradition, on dit que le henné est un signe de bonne chance; une tache de henné dans la main droite permet de se protéger contre le mauvais sort (Steer et Goudet, 2004). En plus de ses vertus tinctoriales (antipelliculaire, anti-séborrhéique, cicatrisante...), le henné est aussi reconnu pour beaucoup d'autres qualités pharmacologiques dont notamment celles testées au niveau des feuilles et énumérées dans le tableau II.1.3.

Tableau II.1.3: Principales propriétés pharmacologiques répertoriées des feuilles de *L. inermis*

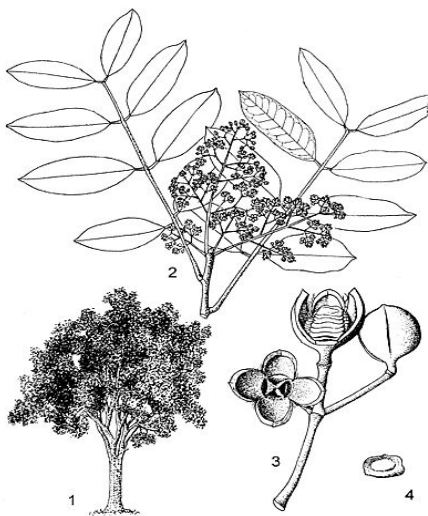
Forme d'utilisation	Activités	Références
Décoctée des feuilles et tiges feuillées	Contre les dysménorrhées	Akoègninou <i>et al.</i> , (2006)
Extrait éthanolique des feuilles Extrait aqueux des feuilles	Antioxydante	Anis <i>et al.</i> ; (2011) Hosein et Zinab, (2007)
Extrait chloroformique des feuilles Extraits aqueux et alcooliques des feuilles	Anti cancérigène	Endrini <i>et al.</i> , (2002)
Infusion des feuilles avec <i>Senna alata</i>	Antipaludique	Oladele et Adewunmi (2008)
Extraits bruts de feuilles fraîches ou séchées	Antimicrobienne	Babu et Subhasree (2009) El-Hag <i>et al.</i> , (2007)
Extraits aqueux et méthanoliques des feuilles	Antibactérienne	Ghosh <i>et al.</i> , (2008)
Extraits éthanoliques bruts des feuilles	Anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique	Ali <i>et al.</i> , (1995) Gupta <i>et al.</i> , (1986)
Extraits de feuilles	Antitrypanosomienne	Atawodi <i>et al.</i> , (2002)
Extrait hydro-éthanolique des feuilles	Hépatoprotectrice	Sanni <i>et al.</i> , (2010)

Par ailleurs, le henné ingéré, contient des composés cytotoxiques (Uygun-Bayramicli *et al.*, 2005), mais il n'est pas réputé toxique pour les adultes en bonne santé, en usage externe et sur une peau saine; cependant, il peut se montrer hémotoxique (toxique pour le sang) chez le jeune enfant (Kok *et al.*, 2004).

4. *Khaya senegalensis* (Ders.) A. Juss. (Meliaceae)

4.1. *Distribution botanique et géographique*

Khaya senegalensis communément appelé Caïlcédrat ou acajou du Sénégal en français et african mahogany en anglais, appartient à la famille des Malvacées. C'est une espèce endémique de nombreux pays africains (Abiodun et Osahon, 2009). Il fait partie des plus importants grands arbres du Bénin. Son fut peut dépasser 10 mètres de haut et un mètre de diamètre. Sa cime s'élève jusqu'à 25 mètres de haut en sol profond et humide. Les feuilles sont composées, paripennées et alternes. Le rachis est long de 12 à 20 cm et peut porter 4 à 6 paires de folioles oblongues, généralement 2 à 3 fois plus longues que larges. Leur base est cunéiforme et un peu dissymétrique. Leur sommet se termine en une courte pointe brusque et arrondie. Les fleurs blanches sont groupées en une grande inflorescence axillaire complète appelée panicules. Le fruit est une capsule dressée, globuleuse à tégument épais et ligneux. Cette capsule large de 4 à 5 cm est dehiscente et s'ouvre par 4 valves en commençant par le sommet et laisse voir les graines plates étroitement appliquées les unes contre les autres. Les graines sont entourées d'une aile membraneuse et contiennent un albumen réduit. (**Figure II.1.24**).



1-port de l'arbre ; 2- rameau en fleurs ; 3- fruits ;4-graine.

Sources: (a) :Nikiema and Pasternak, (2008) (b) : Fagbohoun L.

Figure II.1.24: Représentation de *khaya senegalensis*

Khaya senegalensis se retrouve naturellement en zone soudanienne et guinéo-soudanienne (Ouinsavi, 2000). Il est ainsi natif du Bénin, Burkina Faso, Cameroun, République centrafricaine, Tchad, Côte-d'Ivoire, Gabon, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée-Bissau, Mali,

Niger, Nigeria, Sénégal, Sierra Leone, Soudan, Togo et l'Ouganda (The plant List, 2010) (**Figure II.1.25**). Les formations constituant son habitat naturel sont les galeries forestières, les forêts denses sèches et les forêts claires (Ouinsavi, 2000). Il est couramment planté sur son aire de répartition naturelle. Ainsi, au Bénin des plantations de *Khaya senegalensis* s'étendent des régions du sud (Toffo), jusqu'au nord-est (Kandi) et nord-ouest (Natitingou) en passant par le centre (Savè) (Sokpon et Ouinsavi, 2004).



Figure II.1.25: Répartition géographique de *Khaya senegalensis* (Nikiema et Pasternak, 2008)

4.2. Historique

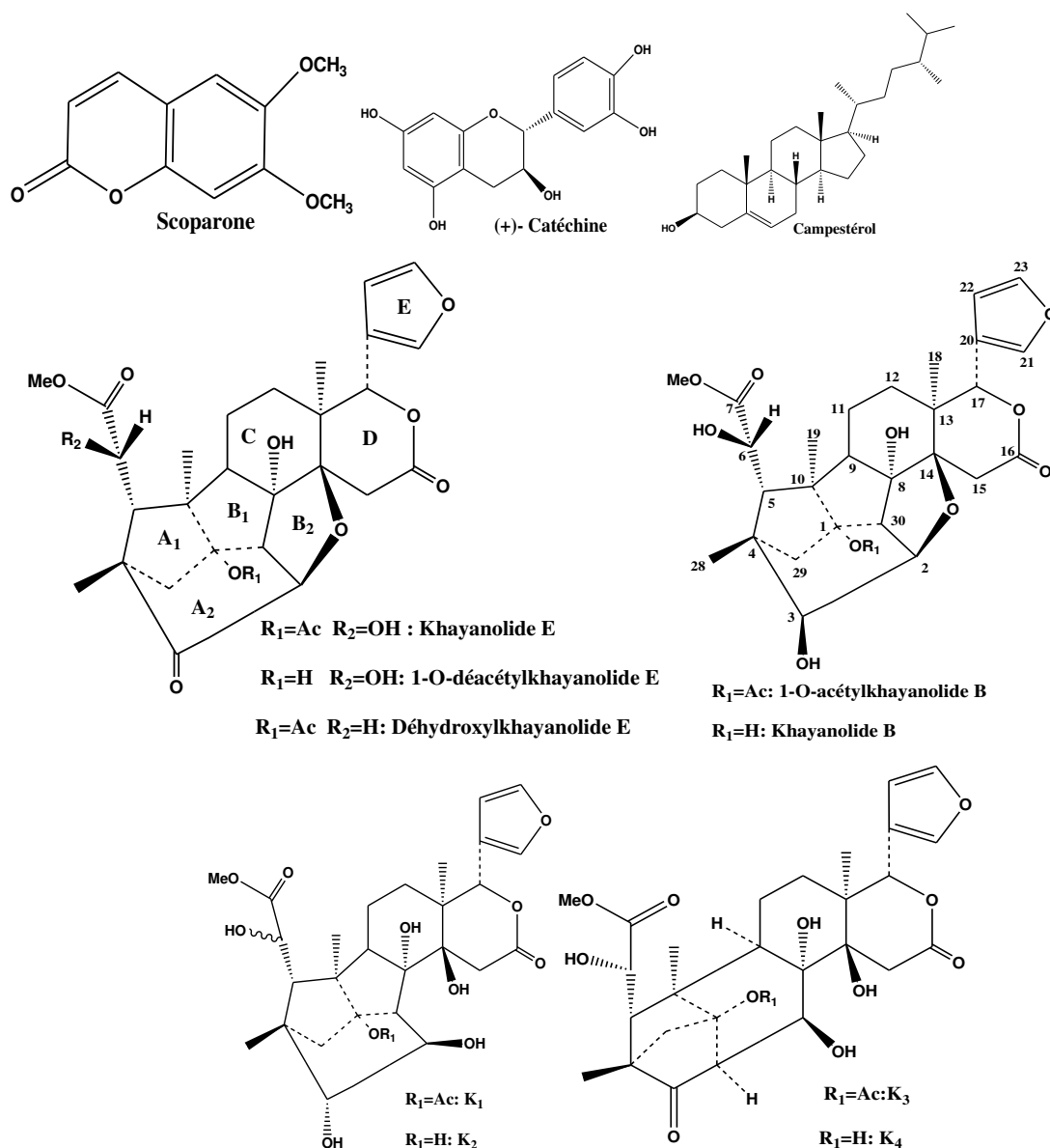
L'écorce du caïlcédrat est d'autant utilisée anciennement en teinture qu'elle l'est en médecine traditionnelle. Alors qu'un pas fut franchi, lorsque les pharmaciens français Pelletier et Caventou (1820) isolèrent du quinquina, l'alcaloïde qui contient le principe actif qu'ils nommèrent quinine; aussi, Caventou-fils marchant sur les traces de son père entreprit une thèse sur le caïlcédrat (*khaya senegalensis*) soutenue en 1849 (Caventou, 1849), dans laquelle il fait écho à l'idée qu'une maladie présente dans un lieu doit avoir son remède en ce lieu : “ Comme la Providence a placé le quinquina dans un pays qui souffre des fièvres, il doit donc exister, dans les pays où la fièvre existe aussi des plantes, des arbres connus des indigènes et qui les guérissent [...] C'est dans cette persuasion que j'écrivis à M. Servant, directeur des Ponts et Chaussées au Sénégal, pour [...] lui demander s'il n'existerait pas dans cette colonie un fébrifuge assez puissant usité chez les noirs. M. Servant [...] m'envoya l'écorce du caïlcédrat comme étant le fébrifuge le plus estimé par la population indigène” (Buisson, 1854). Dans le cas du caïlcédrat comme dans d'autres plantes testées comme substitut, la recherche s'orienta d'abord vers des végétaux ayant une ressemblance morphologique avec la plante

produisant le remède connu : un grand arbre dont l'écorce est rouge comme celle du quinquina, susceptible donc de contenir les mêmes vertus. C'est d'ailleurs cette couleur rouge de l'écorce qui justifie son utilisation tinctoriale par la population autochtone (ce principe, selon lequel les plantes appartenant à un même genre ont les mêmes propriétés, avait été énoncé par Linné). On pensait même que des remèdes ayant des caractéristiques identiques devaient avoir des propriétés thérapeutiques similaires. Ces raisonnements analogiques à caractère empirique, associés à l'observation des usages locaux, orientaient préférentiellement le choix de ressources thérapeutiques à étudier (Laine, 2003). L'idée de promouvoir cette essence naturelle a donc retenu l'attention de l'administration forestière coloniale. C'est ainsi qu'en 1935, l'installation des plantations de *Khaya senegalensis* a commencé au Bénin. Il s'agit essentiellement d'essais de plantations (Toffo, Atchérigbé, Kandi, Kouandé, Tanguiéta), de plantations d'école (Birni, Kouaba) et de plantations de bord de route. Différents dispositifs de semis et différentes combinaisons (pure, mélange *Khaya senegalensis*-*Tectona grandis*, *Khaya senegalensis*-*Senna siamea*) ont été testés. Cependant, pour diverses raisons, parmi lesquelles on peut citer l'attaque du foreur *Hypsipyla robusta* et la lenteur de croissance, les premiers résultats ont été décevants (Moumouni, 1980). Avec le deuxième plan d'équipement, de 1953 à 1959, tous les efforts vont converger vers le teck, au détriment de multiples essences autochtones dont *Khaya senegalensis* (Service des eaux, forêts et chasse, 1959). Par manque d'entretien et de suivi, et pour des raisons d'urbanisation, plusieurs plantations de caïlcédrats ont ensuite disparu. C'est le cas des plantations de Guéné (environ 7 ha), réalisées entre 1935 et 1943, des plantations de bord de route de Cotonou (actuel boulevard Saint-Michel et avenue Mgr Steimez), d'Allada (route de Tori), de la route Dassa-Savalou, de l'ancienne route Tchatchou-Parakou....(Sokpon et Ouinsavi, 2004).

4.3. Composition chimique

Contrairement au quinquina, les travaux effectués sur le caïlcédrat ont révélé que ce dernier ne contient pas d'alcaloïde (Kerharo et Adam, 1974; Fagbohoun *et al.*, 2014), mais plusieurs auteurs signalent la présence des limonoïdes dans les écorces, (Khalid *et al.*, 1998; Samir *et al.*, 2001 ; Huaping *et al.*, 2009). En effet, *Khaya senegalensis* est une source riche de limonoïdes, avec une grande variété de types structuraux; environ 45 limonoïdes ont été isolés à partir des différentes parties de la plante notamment dans les écorces. (Adesida *et al.*, 1971; Mulholland *et al.*, 2000). En plus des limonoïdes, ces écorces renferment également des polyphénols principalement des tannins, la catéchine et des coumarines (scopolétine et

scoparone) et des stérols (sitostérol, stigmastérol et campestérol). Les principaux composés isolés dans les écorces de *K. senegalensis* sont présentés dans la figure II.1.26.



K₁: 1 α -acétoxy-2 β ,3 α ,6,8 α ,14 β -pentahydroxy-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-tricyclomeliac-7-oate

K₂: 1 α ,2 β ,3 α ,6,8 α ,14 β -hexahydroxy-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-tricyclomeliac-7-oate

K₃: méthyl 1 α -acétoxy-6,8 α ,14 β ,30 β -tétrahydroxy-3-oxo-[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]- tricyclomeliac-7-oate

K₄: methyl 1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β -pentahydroxy-3-oxo-[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]-tricyclomeliac-7-oate

Figure II.1.26: Principaux composés isolés des écorces de *Khaya senegalensis*

4.4. Propriétés et utilisations

4.4.1. Dans le domaine tinctorial

L'écorce de *K. senegalensis* servait autrefois à teindre en brun-kaki ou en jaune-brun les étoffes, les fibres végétales et le coton (Nikiema et Pasternak, 2008 ; Sore *et al.*, 2012). Sa cendre était employée pour mordancer les masques sculptés afin d'augmenter sa résistance aux acariens. L'écorce du caïlcédrat est aussi utilisée en combinaison avec d'autres plantes tinctoriales dans l'intérêt d'augmenter les tons et la ténacité des teintures obtenues.

4.4.2. Dans le domaine pharmacologique

Sur le plan médicinal, *Khaya senegalensis* contribue au traitement de 55 maladies recensées au Bénin (Sokpon et Ouinsavi, 2002). Des décoctions ou des macérations d'écorce se prennent couramment contre la fièvre due à la malaria et contre les maux d'estomac, la diarrhée, la dysenterie et l'anémie, comme antalgique dans les cas de rhumatismes et de maux de tête, et comme tonique, emménagogue et vermifuge. Elles s'emploient aussi comme purgatif, antidote et abortif, et pour traiter la syphilis, la lèpre, la varicelle et l'angine. En usage externe, l'écorce s'applique comme désinfectant dans les cas d'inflammation et pour traiter les maladies de peau, éruptions cutanées, gale, plaies, ulcères, furoncles, et les hémorroïdes, œdèmes et maux de dents.... Ainsi, il a fait l'objet de plusieurs screening pour la recherche de ses propriétés pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*. En effet, ces travaux ont montré que les extraits d'écorces sont dotées d'importantes activités antiplasmodiales (ElTahir *et al.*, 1998), anti-inflammatoires (Lompo *et al.*, 1998) ainsi que des activités antibactériennes (Koné *et al.*, 2004; Abiodun et Osahon, 2009), anthelminthiques ou vermifuge (Ademola *et al.*, 2004; Ademola *et al.*, 2009), anti-tumorales, antioxydantes (Androulakis *et al.*, 2006), antiappétante (Samir *et al.*, 2001) confirmant leur utilisation ethnomédicale.

4.4.3. Intérêt écologique et économique

Khaya senegalensis est couramment planté comme arbre d'avenue et arbre d'ombrage ornemental dans les villes, et parfois pour la stabilisation des sols contre l'érosion. Dans de nombreuses régions, il est considéré comme un arbre magique utilisé dans les rituels, et donc exempt de coupure. Ses feuilles permettent aux éleveurs de faire face à la pénurie de fourrage pendant la saison sèche. Les paysans utilisent avec succès la poudre de l'écorce pour la conservation des récoltes (Sokpon et Ouinsavi, 2004). De même, les cendres de bois de *Khaya senegalensis* servent occasionnellement à conserver les graines de mil et ses écorces sont

utilisées dans la fabrication de la bière locale au Cameroun (Ctft, 1988). Traditionnellement, le bois est utilisé pour fabriquer des pirogues monoxyles, des ustensiles ménagers tels que mortiers et cuillers et des tambours. Il est utilisé comme bois de feu et pour la production de charbon de bois. De même il est beaucoup apprécié pour la charpente, la menuiserie, la fabrication de meubles, l'ébénisterie, la construction navale et les placages décoratifs.

Nous venons de décrire l'importance historique ainsi que les propriétés tinctoriales et pharmacologiques des plantes tinctoriales à étudier. Il s'agit pour la suite de mettre au point les conditions analytiques d'étude spécifique des colorants présents dans ces différentes plantes à l'aide des molécules de référence dans le but de les appliquer aux échantillons muséaux issus du patrimoine béninois.

Chapitre 2: Etude analytique

1. Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF)

1.1. Principe et plan d'analyse

La spectroscopie IR-TF est basée sur l'étude de l'absorption, par l'échantillon, des radiations électromagnétiques comprises dans le domaine de l'IR (entre 10000 et 10 cm^{-1}). Cette bande spectrale est elle-même divisée en proche IR (de 10000 à 4000 cm^{-1}), moyen IR (de 4000 à 400 cm^{-1}) et lointain en deçà (Rouessac A. et F, 1998). La partie la plus riche en informations et la plus accessible d'un point de vue expérimental est celle du moyen IR. Dans ce domaine, des absorptions correspondant à des nombres d'onde inférieurs à 800 cm^{-1} forment une sorte d'empreinte digitale des composés permettant de les reconnaître et celles supérieures à 800 cm^{-1} sont caractéristiques des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon, ce qui permet l'analyse fonctionnelle et structurale. Dans certains cas, l'observation de l'écart avec la valeur de référence permet même de préciser l'environnement du groupe (Bellamy, 1954). Notamment, la délocalisation électronique ainsi que la formation de liaison hydrogène abaissent les valeurs des nombres d'onde des fonctions concernées. Dans le présent travail, hormis la banque de données du laboratoire très riche et très diversifiée en composés organiques et minéraux de référence, un nombre important (une quarantaine) constitué d'une diversité de molécules de référence a été également utilisée. Il s'agit des quinones, des flavonoïdes et acides phénoliques, des indigoïdes et leur produit de dégradation ainsi que d'autres produits colorants directement achetés sur le marché au Sud-Bénin sous forme de cossette rouge ou de poudre comme le bleu de lessive. Cependant, tous les produits de référence analysés en IR ne pourront faire objet de discussion, mais ils seront utilisés dans la recherche de corrélation éventuelle avec les échantillons muséaux et ceux de plantes analysées. La discussion va concerner les colorants caractéristiques des espèces végétales étudiées. Par conséquent, le principe énoncé va permettre de discuter principalement des cas des indigoïdes (indigotine et indirubine) et de deux quinones (lawsone et tectoquinone).

1.2. Etude et discussion des molécules de référence

Cette étude concerne deux grandes familles de colorants naturels d'origine végétale: les indigoïdes (indigotine et indirubine) et les quinones (lawsone et tectoquinone). Le tableau récapitulatif toutes les molécules standards exploitées ainsi que leur provenance commerciale à l'exception de l'indirubine ayant été isolée au sein du laboratoire, est consigné en **Annexe 1**.

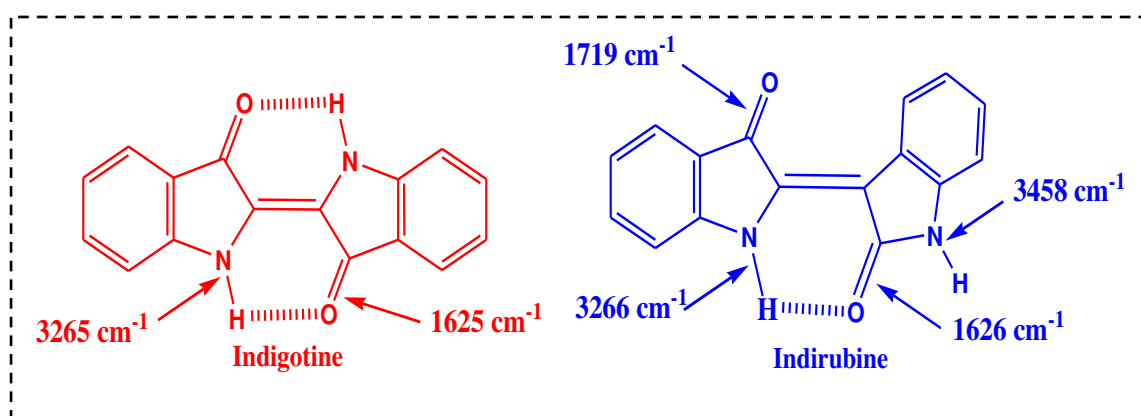
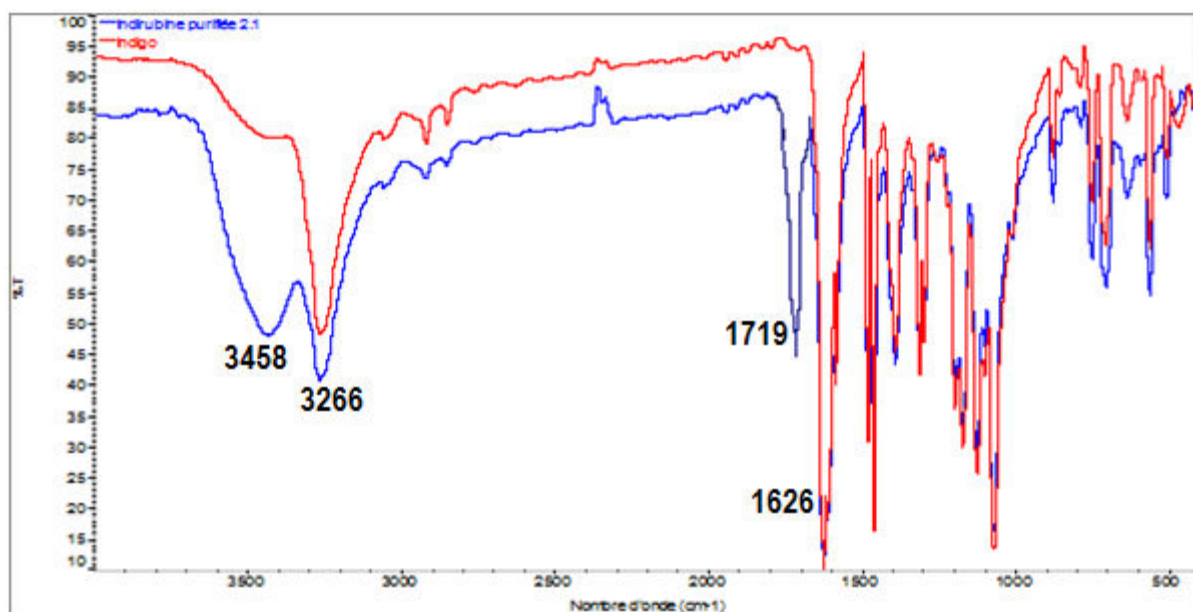
Le tableau II.2.1 regroupe les principales bandes d'absorption observées sur les différents spectres IR des dérivés indigoïques.

Tableau II.2.1: Principales bandes d'absorption IR des indigoïdes (vibrations de déformation δ et d'élongation ν)

Vibration	Indigotine	Indirubine
ν N-H	3265 cm^{-1}	3458 cm^{-1}
		3266 cm^{-1}
ν C=O	1625 cm^{-1}	1719 cm^{-1}
		1626 cm^{-1}
δ N-H	1615 cm^{-1}	1615 cm^{-1}
ν C=C	1584 cm^{-1}	1492 cm^{-1}
ν C-N	1316 cm^{-1}	1316 cm^{-1}
	1298 cm^{-1}	1290 cm^{-1}

L'observation des fréquences vibrationnelles des principales bandes d'absorption IR des indigoïdes montre que l'indigotine ne dispose que d'une seule bande d'absorption caractéristique de vibration de d'élongation (ν) des liaisons N-H (3265 cm^{-1}) et C=O (1625 cm^{-1}) tandis que l'indirubine en possède deux respectivement à 3435 et 3266 cm^{-1} pour les liaisons N-H ainsi que 1719 et 1626 cm^{-1} pour les liaisons C=O. Ces structures se traduisent par la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires entre l'hydrogène de la fonction amine et l'oxygène du carbonyle, qui, par conséquent abaisse le nombre d'onde des fonctions concernées (**Figure II.2.1**). Ce phénomène est d'ailleurs corroboré par une information supplémentaire puisque des études antérieures ont montré que des valeurs des nombres d'ondes caractéristiques des liaisons N-H impliquées dans cette interaction peuvent être abaissées d'environ 200 cm^{-1} -(Tatsch et Schrader, 1995).

a)



b)

Figure II.2.1: Spectre IR (a) et attribution des fréquences vibrationnelles des liaisons N-H et C=O des indigoïdes (b)

Par ailleurs, l'interprétation du déplacement du nombre d'onde des carbonyles vers des valeurs inférieures dans le cas des quinones est l'objet de controverses dans la littérature spécialisée. Cependant, certains auteurs (Bernède *et al.*, 1995) s'accordent à penser que ce phénomène proviendrait également de la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les fonctions carbonyles et les atomes d'hydrogène provenant des diverses fonctions hydroxyles situées en position 1 et/ou 4 dans le cadre des travaux réalisés sur les anthraquinones (quinizarine et acide anthraflavique). Ainsi, serait-il de même avec les fonctions hydroxyles situées en position 2, 3, 5 et/ou 8 des naphthoquinones. Les principales

bandes d'absorption observées sur les spectres IR de la lawsone et de la tectoquinone sont résumées dans le tableau II.2.2.

Tableau II.2.2: Principales bandes d'absorption IR de la lawsone et de la tectoquinone

Vibration	Lawsone	Tectoquinone
ν O-H	3174 cm^{-1}	-
ν C=O	1678 cm^{-1} 1641 cm^{-1}	1674 cm^{-1} 1665 cm^{-1}
ν C=C	1592 cm^{-1}	1593 cm^{-1}

De manière analogue aux indigoïdes, l'observation des fréquences vibrationnelles des liaisons C=O permet de déterminer l'environnement de ces quinones. Il est intéressant de noter dans ce cas, la présence de deux bandes d'absorption correspondant à la liaison C=O, aussi bien pour la lawsone que pour la tectoquinone (**Figure II.2.2**).

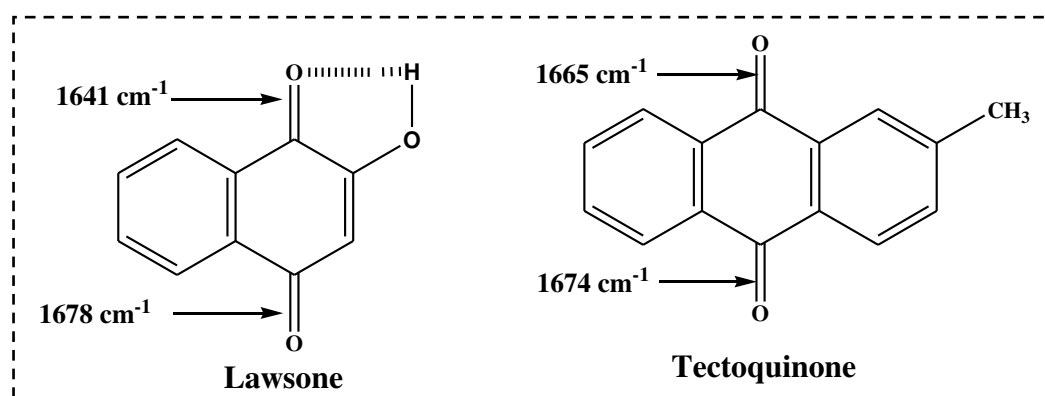


Figure II.2.2 : Attribution des fréquences vibrationnelles des liaisons C=O des quinones

L'abaissement du nombre d'onde au niveau de la lawsone serait dû à la formation de liaison hydrogène entre le carbonyle et l'hydroxyle en position 2 de la naphthoquinone. Néanmoins, ce phénomène n'explique pas la différence de 9 cm^{-1} observée entre les fréquences vibrationnelles des liaisons carbonyles de la tectoquinone (1674 et 1665 cm^{-1}). Il est donc probable que cet écart soit lié à la modification de la répartition de la densité électronique sous l'effet du radical méthyle induisant un effet inductif donneur au voisinage du carbonyle le plus proche. Cet effet serait d'autant plus fort avec les donneurs par mésomérie. En effet, certains auteurs (Bloom *et al.*, 1959 ; Hovaneissian, 2005) considèrent que le déplacement de la valeur du nombre d'onde des fonctions carbonyles proviendrait également de la modification de la constance de force de la liaison C=O par un phénomène de résonance. Des travaux réalisés sur la 2-aminoanthraquinone (Bloom *et al.*, 1959) montrent que des fonctions

carbonyles non liées mais électroniquement délocalisées présentent des nombres d'ondes assez abaissés de l'ordre de 1625 cm^{-1} . (**Figure II.2.3**)

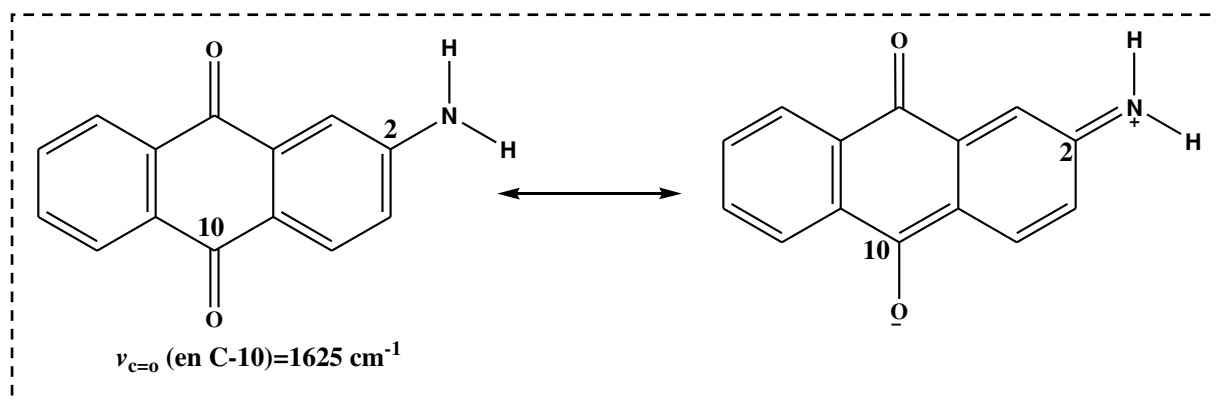


Figure II.2.3: Résonance entre l'azote en C-2 et l'oxygène du carbonyle en C-10 de la 2-aminoanthraquinone (Bloom et al., 1959)

Ainsi, les valeurs des fréquences de vibrations des liaisons C=O observées sur les quinones étudiées dépendent non seulement de la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires mais également de la densité électronique induite par les substituants électrodonneurs présents sur le système aromatique.

1.3. Conclusion

L'étude des molécules de référence principalement des indigoïdes et des quinones par l'analyse des fréquences d'absorption caractéristiques des liaisons carbonyles en spectroscopie IR-TF, permet de préciser leur environnement électronique et de caractériser la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires. Par ailleurs, ces structures pourraient influencer sur les propriétés chromatographiques intrinsèques de ces molécules et des interactions intermoléculaires avec leur environnement lorsqu'elles se retrouvent dans une matrice extractible. Il s'avère donc nécessaire de mettre au point des conditions analytiques par CLHP tenant compte de plusieurs interactions.

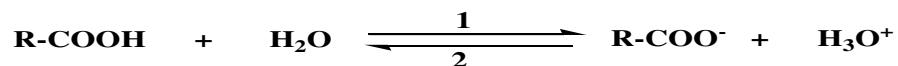
2. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Cette technique séparative est utilisée depuis de nombreuses années au sein de l'équipe ingénierie de la restauration des patrimoines naturel et culturel de l'UAPV, pour l'étude de divers matériaux résineux (Mathe, 2003 ; Hovaneissian, 2005) et colorants (Cuoco, 2009) ainsi qu'au laboratoire de pharmacognosie et des huiles essentielles du Bénin dans la recherche de nouvelles molécules pharmacologiquement actives de sources naturelles (Fagbohoun, 2009). Dans le cadre de l'étude des colorants organiques naturels, elle représente la technique analytique de choix (Quye et Wouters, 1991 ; Gonzalez *et al.*, 2003; Karapanagiotis *et al.*, 2005) loin devant la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et l'électrophorèse capillaire (Weng et Sheu, 2000).

2.1. Mise au point des conditions analytiques

En général, la chromatographie repose sur la réalisation d'un tri entre les différentes espèces moléculaires d'un mélange, entre deux phases non miscibles dont l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Ainsi, la qualité d'une séparation en CLHP dépend du type de phase stationnaire employé ainsi que de la nature de la phase mobile utilisée. Deux colonnes apolaires ont été exploitées dans la réalisation de cette étude. Il s'agit de la colonne C18-e (Symmetry Shield RP-18, Waters 5 μ m; 4,6 \times 250mm) appliquée à l'analyse des colorants rouges et jaunes des espèces tinctoriales étudiées; et de la colonne C18 nouvelle génération (Kinetex Core-Shell RP-18, Phenomenex 2,6 μ m ;100 mm x 4,60 mm). En effet, cette dernière est employée dans le but d'une optimisation des conditions analytiques des colorants bleus dont le traitement a fait l'objet de plusieurs analyses. Le choix du mélange d'élution est tout aussi essentiel dans la qualité d'une séparation. Il s'agit souvent d'un mélange binaire de faible viscosité, miscible avec les autres solvants et inerte *vis-à-vis* des solutés. Cette propriété orienta vers le choix du mélange acétonitrile-eau car sa viscosité plus faible (Hovaneissian, 2005) engendre des pressions moindres et augmente ainsi la durée de vie du matériel (colonne). En outre, l'acétonitrile et l'eau possèdent des "cut-off" (longueur d'onde à laquelle, dans une cellule de 1 cm de long et par référence à l'air, l'absorbance mesurée est égale à 1) relativement faibles, ce qui diminue les perturbations occasionnées sur les spectres UV des analytes (Seaver et Sadek, 1994). L'optimisation de la séparation est également favorisée par la mise au point d'un gradient d'élution dont l'efficacité dépend de l'acidification des solvants (Lewis *et al.*, 1992), de la température de l'enceinte thermostatée (Dolan *et al.*, 2000), de la durée d'analyse et du débit. L'acidification des solvants permet d'améliorer la

résolution. En effet, en milieu neutre, les formes R-COOH et R-COO⁻ coexistent, ce qui provoque un élargissement des pics du chromatogramme. En milieu acide (pH <<pKa de la fonction acide), la dissociation des fonctions carboxyliques régresse (déplacement de l'équilibre acido-basique dans le sens 2). De ce fait, la forme R-COOH est prédominante, ce qui tend à affiner le pic.



Cependant, l'acidification doit être réalisée avec un agent n'interférant pas avec la phase stationnaire. Par conséquent, il est préférable d'utiliser l'acide trifluoroacétique par rapport à l'acide acétique, ce dernier étant susceptible de se fixer plus facilement sur la colonne. Par ailleurs, l'acidification n'est nécessaire que dans le cas d'un mélange acétonitrile-eau. En effet, en milieu exclusivement organique, seule la forme R-COOH existe. En pratique, c'est donc seulement l'eau bidistillée qui sera acidifiée. Le pH a été fixé aux environs de 3 (0,01% TFA) dans le but de disposer d'un écart suffisant par rapport à l'acidité maximale (pH= 2) supportée par la phase stationnaire greffée contenue dans la colonne. La phase éluante est donc composée d'acétonitrile et d'eau bidistillée acidifiée à 0,01% (pH=3) avec de l'acide trifluoroacétique, dégazée par un dégazeur en ligne placé en amont de la pompe. L'enceinte thermostatée est maintenue à une température de 40°C afin de favoriser la reproductibilité des temps de rétention des analytes et de disposer d'une meilleure séparation qu'à température ambiante. En effet, la température joue un rôle déterminant dans le cas des phases greffées et plus particulièrement celles de type C₁₈ car les greffons s'organisent différemment selon la température. La phase greffée possède une transition de phase autour de 30°C et c'est pour s'affranchir de ce phénomène qu'il est judicieux de travailler à 40°C. Ainsi, deux gradients d'éluant tenant compte des propriétés physico-chimiques des divers dérivés aromatiques (tinctoriaux) extraits des plantes étudiées, ont été mis au point. L'extrait méthanolique de *T. grandis* a été exploité pour l'élaboration des conditions analytiques des colorants rouges et jaunes (**Tableau II.2.3**). Elles se sont également avérées propices à la séparation des espèces moléculaires présentes dans les autres plantes étudiées.

Tableau II.2.3 : Gradient CLHP n°1 employé pour l'étude des colorants rouges et jaunes

Temps (min)	0	10	12	22	32	40	45	50	Débit: 0,7 mL/min T (colonne) = 40°C
% MeCN	30	50	70	90	90	100	100	100	
% H₂O (0,01 % TFA)	70	50	30	10	10	0	0	0	

Néanmoins l'étude des colorants bleus ayant fait l'objet de plusieurs traitements, a nécessité l'optimisation des conditions d'élution dans le but d'obtenir une résolution élevée des séparations en un temps très court, sachant qu'avec le premier gradient les principes colorants des plantes à indigo sont pratiquement les derniers élués de la colonne. En effet, ces traitements concernent l'extraction de ces colorants par une variété de solvants, la quantification et la mise au point des paramètres pouvant permettre de différencier les deux espèces de plantes à indigo utilisées au Bénin. Les molécules tinctoriales de ces deux plantes ont été donc séparées à l'aide d'un gradient d'élution mis au point dans ce cadre, en utilisant la colonne C18 (2,6 μ m Kinetex Core-Shell) qui offre en plus d'une réduction significative de la durée d'analyse (10 min vs 50 min), l'avantage d'une réduction significative de la consommation en solvants ainsi qu'une amélioration de la durée de vie de la colonne (**Tableau II.2.4**).

Tableau II.2.4: Gradient CLHP n°2 employé pour l'étude des plantes à indigo

Temps (min)	0	0,6	1	3	3,5	5	10	Débit: 1 mL/min T(colonne) = 40°C
%MeCN	30	30	80	80	100	100	100	
%H₂O (0,01 % TFA)	70	70	20	20	0	0	0	

2.2. *Etude des molécules standards*

Les molécules de référence exploitées varient suivant les types de colorants présents dans les plantes étudiées et par référence à leur bibliographie. Ces molécules correspondent principalement à des aglycones dérivés d'acides phénoliques, de flavonoïdes, d'anthraquinones, de naphthoquinones, d'indigoïdes..., de nature différente et de quelques composés flavonoïdiques glycosylés. Par conséquent, leur analyse en CLHP/UV-Visible a été réalisée à des longueurs d'onde caractéristiques de chaque type de composés. Les tableaux suivants (II.2.5; 6 et 7) regroupent par ordre croissant d'élution, les standards ainsi que les maxima d'absorption de chacune de ces molécules. A noter que ces colorants sont séparés à l'aide d'une colonne chromatographique possédant une phase stationnaire C₁₈ et sont donc élués par ordre de polarité décroissante. Leur provenance est donnée en **Annexe 1**.

Tableau II.2.5: Données chromatographiques des composés phénoliques de référence (gradient n°1)

Ordre d'éluion	Composé	Temps de rétention (min)	λ_{\max} (nm)
1	Acide tannique	3,26	217 ; 277
2	Isorhamnétine-3-O-rutinoside	4,23	204,2 ; 254,8 ; 354,6
3	Acide chlorogénique	4,25	245 ; 325,9
4	(-)- Epicatéchine	4,28	204,2 ; 279,6
5	Isorhamnétine-3-O-glucoside	4,4	204,2 ; 254,8 ; 357
6	(+)- Catéchine	4,56	204,2 ; 279,6
7	Acide para-coumarique	4,58	226,5 ; 310,5
8	Rutine	4,61	204,2 ; 255,9 ; 358
9	Lutéoline-7-O-glucoside	4,70	205,3 ; 253,6 ; 348
10	Acide gallique	4,73	214,7 ; 272,5
11	Quercétine-3-O-glucopyranoside	6,15	204,2 ; 255,9 ; 357
12	Acide vanillique	6,53	219 ; 260,7 ; 293
13	Acide caféique	6,8	218 ; 241,8 ; 324,8
14	Kaempférol-3-O-glucoside	7,66	265,4 ; 349,8
15	Acide ellagique	8,00	253,6 ; 365,1
16	Apigénine-7-O-glucoside	8,21	207,7 ; 267,8 ; 340,3
17	Acide ferulique	8,46	218 ; 324,8
18	Scopolétine	8,47	204 ; 228,8 ; 345
19	Acide méta-coumarique	9,7	213 ; 278
20	Scoparone	11,5	204 ; 230 ; 343
21	Lawsone	15,18	250 ; 278 ; 339
22	Lutéoline	19,71	207,7 ; 253,6 ; 347,4
23	Quercétine	20,03	203 ; 255,9 ; 367,5
24	Diosmétine	21,83	208,9 ; 251,2 ; 345
25	Apigénine	22,5	196 ; 267,8 ; 336,7
26	Isorhamnétine	22,68	203 ; 254,8 ; 371,1
27	Kaempférol	22,95	197,1 ; 266,6 ; 363,9
28	Rhamnétine	23,06	200 ; 255,9 ; 372,3
29	Lapachol	27,21	193 ; 251,2 ; 282 ; 334,3

Tableau II.2.6: Données chromatographiques des anthraquinones de référence (gradient n°1)

Ordre d'élution	Composé	Temps de rétention (min)	λ_{\max} (nm)
I	2-hydroxyméthylanthraquinone	20,73	205 ; 255,9 ; 328
II	2,6-dihydroxyanthraquinone	20,93	217 ; 274 ; 301 ; 349
III	Aloe-emodine	23,28	224 ; 257 ; 287 ; 430
IV	Purpurine	27,21	203 ; 256 ; 482
V	Tectoquinone	28,16	205 ; 255,9 ; 328
VI	1,8-dihydroxyanthraquinone	28,28	224 ; 254 ; 426
VII	Quinizarine	29,11	224 ; 249 ; 280 ; 468
VIII	Emodine	30,80	222 ; 288 ; 438

Tableau II..2.7: Données chromatographiques des indigoïdes et composés de dégradation de référence (gradient n°1 et gradient n°2)

Ordre d'élution	Composé	t_R (min) gradient 1	t_R (min) gradient 2	λ_{\max} (nm)
A	Isatine	7,55	1,65	243 ; 301 ; 419
B	Acide anthranilique	11,60	1,83	218 ; 245 ; 333
C	Indigotine	25,63	7,43	199 ; 243 ; 285 ; 608,7
D	Indirubine	26,73	7,55	191 ; 239 ; 360 ; 545

Les composés de référence possèdent des chromophores dont les longueurs d'absorption caractéristiques se situent dans l'ultraviolet entre 250 et 350 nm pour les acides phénoliques, les flavonoïdes et les coumarines; dans l'ultraviolet-visible entre 350-500 nm pour les anthraquinones et dans le visible entre 500-600 nm pour les indigoïdes. En effet, le choix de la longueur d'onde d'excitation de chaque de type de composés, se fait généralement à partir de celle correspondant à l'absorption maximale observée sur le spectre UV-Visible. Toutefois, dans le cadre de molécules disposant de plusieurs bandes d'absorption comme c'est le cas des colorants, il est plus judicieux de considérer uniquement celle située dans le domaine du visible ou proche du visible même si elle présente souvent une intensité inférieure à celle observée en UV. Ainsi, les flavonoïdes et les anthraquinones sont étudiés respectivement à des longueurs d'onde caractéristiques de 350 nm et 450 nm (Cuoco, 2009).

Néanmoins, bien que ces dernières bandes sont spécifiques des colorants jaunes et rouges, une détection en UV à 250 nm permet de disposer d'une sensibilité suffisante pour la

visualisation de ces colorants à l'état de traces. Il en est de même pour les colorants bleus et bleu-violet où des longueurs d'onde correspondant à des bandes d'absorption d'intensité nettement inférieure vers 285 nm permettent de visualiser d'éventuelles traces d'indigoïdes.

Il ressort par ailleurs, de ces tableaux, que les premiers composés élués de la colonne *via* le gradient n°1 sont les acides phénoliques, les hétérosides flavonoïdiques qui sont évidemment plus polaires que les aglycones analysés. Par contre, l'élution des différents aglycones analysés dépend des caractéristiques structurales intrinsèques à chaque molécule en rapport avec les phases mobile et stationnaire. Par exemple, l'existence de liaisons hydrogène modifie de manière significative les propriétés chromatographiques et spectroscopiques de ces aglycones. La présence d'un groupe hydroxyle en position 3, caractéristique des flavonols, induit une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle voisin (position 4). Cette liaison hydrogène n'existe pas en l'absence de cet hydroxyle en position 3 des flavones ou quand le groupement -OH est substitué par un glycosyle. En effet, les liaisons électrostatiques entre le groupement hydroxyle en position 4' et un hydroxyle ou un méthoxyle en position 3' comme c'est le cas pour la quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), la rhamnétine (7-méthoxy-3,3',4',5-tétrahydroxyflavone), et l'isorhamnétine (3'-méthoxy-3,4',5,7-tétrahydroxyflavone), engendrent un effet bathochrome au niveau de ces flavonols. *A contrario*, l'effet hypsochrome provoqué par la présence d'un substituant glycosyle en position 3 de ces composés est décrit dans la littérature (Mabry *et al.*, 1970). Par ailleurs, la lutéoline, apparemment moins polaire que la quercétine et la rhamnétine est élue avant ces dernières (**Figure II.2.4**).

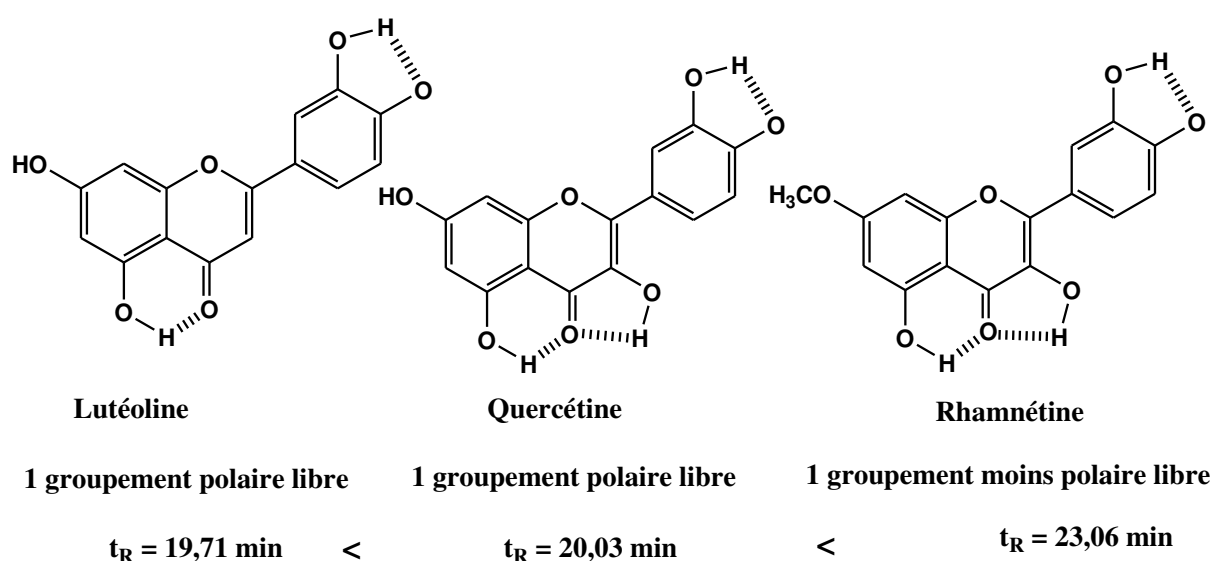


Figure II.2.4 : Liaisons hydrogène et leur influence sur l'ordre d'élution de quelques flavonoïdes

Toutefois l'ordre d'élution de ces composés semble être régi par la polarité disponible après formation des interactions électrostatiques. C'est du moins ce que l'on constate entre la quercétine et la rhamnétine. Il est donc utile de distinguer la polarité libre de la polarité liée.

De même, pour ce qui concerne les anthraquinones, la cyclisation intramoléculaire monopolise les groupements polaires impliqués dans la formation des liaisons hydrogènes, ce qui modifie également le comportement de ces molécules *vis-à-vis* de la phase stationnaire apolaire de type C₁₈ employée. Ainsi la 1,4-dihydroxyanthraquinone (quinizarine) est plus retenue par la colonne par rapport à la 2-méthylanthraquinone (tectoquinone) et la 2-hydroxyméthylanthraquinone (Figure II.2.5). En effet, les spectres UV-Visible de la 2-hydroxyméthylanthraquinone et de la tectoquinone sont parfaitement identiques tandis qu'on note une forte augmentation de λ_{\max} au niveau de la quinizarine (effet bathochrome).

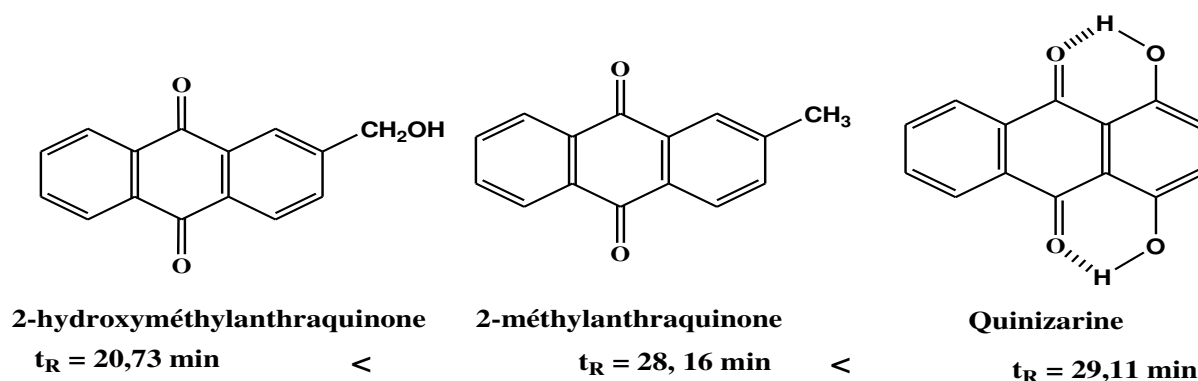


Figure II.2.5: Liaisons hydrogène et leur influence sur l'ordre d'élution de quelques anthraquinones

A la différence, des aglycones flavonoïdiques et anthraquinoniques qui pourraient disposer de plusieurs sites distincts de cyclisation intramoléculaire, les indigoïdes ne peuvent engendrer des liaisons hydrogène intramoléculaires que d'une seule nature, impliquant les atomes d'hydrogène des fonctions amines et les oxygènes des liaisons cétoniques (Brode *et al.*, 1954) (Figure II.2.6).

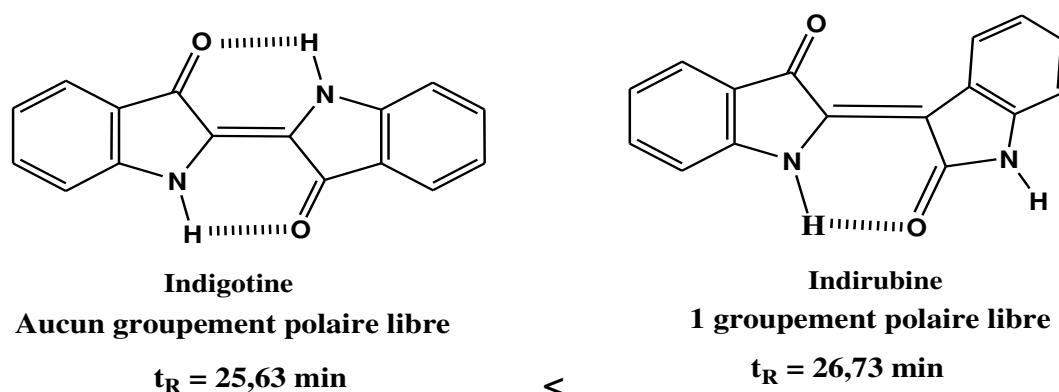


Figure II.2.6: Ordre d'élution des indigoïdes (gradient n°1)

Il apparaît clair avec les indigoïdes que l'ordre d'éluion dépend non seulement du nombre de groupements polaires disponibles mais surtout des particularités stériques. En effet, l'indirubine diffère principalement de son isomère par une structure non linéaire moins rapidement éluee au travers de la phase stationnaire malgré une polarité libre plus importante. Bien que concurrencées par l'encombrement stérique lors de l'éluion en chromatographie, les conséquences de la formation de liaisons hydrogène au niveau spectroscopique restent conformes à celles précédemment discutées sur les flavonoïdes et les anthraquinones. En effet, l'observation des spectres UV-Vis de l'indigotine et de l'indirubine confirme l'existence d'un effet bathochrome directement lié à la présence d'interactions électrostatiques. L'indirubine qui ne possède qu'une seule liaison hydrogène intramoléculaire, absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 545 nm tandis que l'indigotine qui dispose de deux liaisons hydrogène, présente une bande d'absorption dont la longueur d'onde atteint 608 nm soit une variation d'environ 63 nm (**Figure II.2.7**).

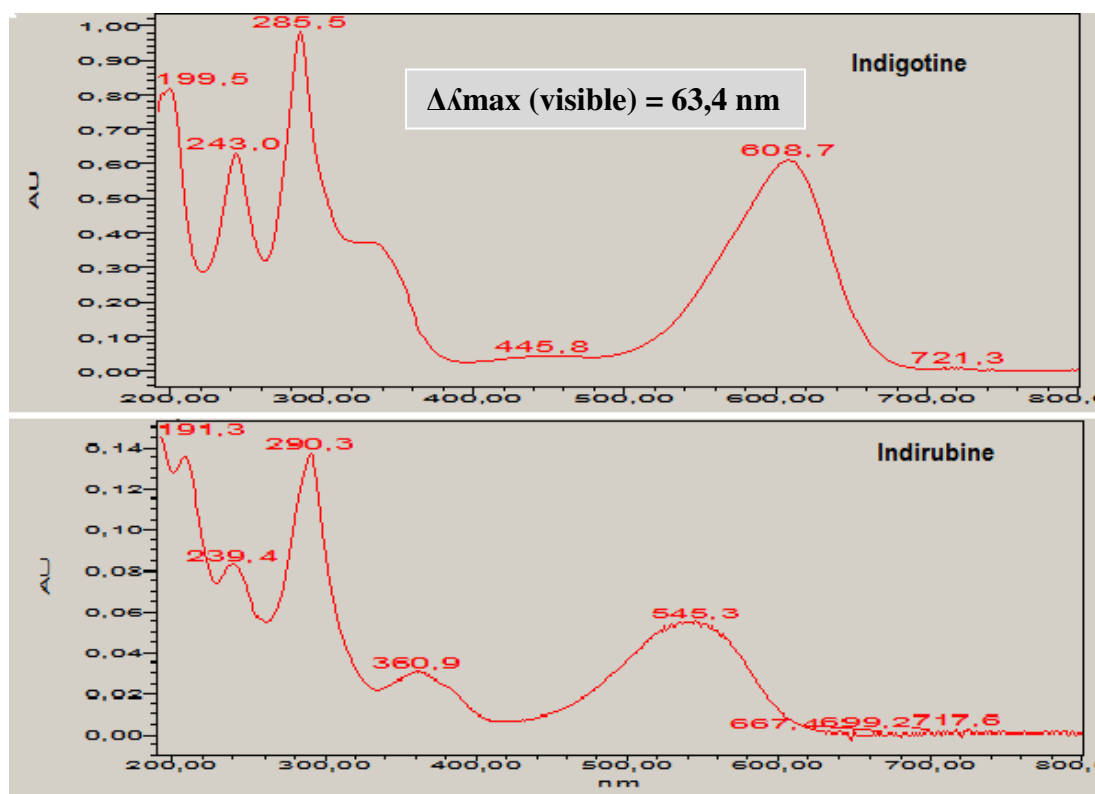


Figure II.2.7 : Spectres UV-Vis de l'indigotine et de l'indirubine

La chromatographie est une technique dans laquelle les constituants se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés par la phase mobile au travers de la phase stationnaire. La rétention d'un analyte résulte donc des différents équilibres existant entre le soluté et la phase mobile, la phase stationnaire et l'éluant ainsi que celui réalisé entre le soluté

et la phase stationnaire. L'étude des principales molécules de référence exploitées, implique que l'ordre d'élution expérimentale observé avec des phases apolaires n'est plus régi par la polarité absolue des molécules mais bien par celle disponible après formation de ces interactions électrostatiques ou par leur particularité stériques. Toutes ces considérations seront donc appliquées à l'identification des différents colorants présents dans les espèces végétales étudiées.

2.3. Procédés d'extraction et analyse des divers extraits obtenus

Les techniques d'extraction exploitées au cours de ces travaux, correspondent à des procédés classiques (traditionnels) et alternatifs (modernes) d'extraction. Les procédés classiques pour l'extraction par solvants de molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Ceux, employés pour l'extraction de colorants naturels incluent: la macération, le Soxhlet et le reflux. L'extraction par Soxhlet a été employée pendant longtemps comme une technique standard et de référence pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. A ce titre, Luque et Garcia-Ayuso (1998) estiment qu'elle est une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles. Cette dernière limite de la technique, ajoutée à la longue durée de l'opération conduisent à la recherche de techniques modernes d'extraction alternatives. Le récapitulatif des procédés modernes d'extraction est élaboré dans le tableau II.2.8.

Tableau II.2.8 Récapitulatif des procédés alternatifs d'extraction

	UAE	MAE	SFE	ASE
Nom	Extraction assistée aux ultrasons	Extraction assistée aux micro-ondes	Extraction par fluide supercritique	Extraction accélérée par solvant
Brève description et principe	L'échantillon est immergé dans le solvant et soumis à des ultrasons à l'aide d'une sonde US ou une cuve, générant des implosions de bulle de cavitation implorant la matière	L'échantillon est immergé dans le solvant et soumis aux micro-ondes offrant un transfert rapide d'énergie suivi du chauffage simultané solvant-matrice	L'échantillon est placé dans un récipient à haute pression et traversé en continu par le fluide supercritique, qui entraîne avec lui les composés extraits vers les séparateurs	L'échantillon est chauffé par un four conventionnel et traversé par le solvant d'extraction sous pression (10-15MPa) et température (50-200°C) élevées, le solvant étant en dessous de son état critique.
Temps d'extraction	10-60 min	3-30 min	10-60 min	10-20 min
Taille de l'échantillon	1-30 g	1-10 g	1-5 g	1-30 g
Utilisation des solvants	50-200 mL	10-40 mL	2-5 mL (piège solide) 30-60ml (piège liquide)	15-60 mL
Investissement ou coût	Faible	modéré	élevé	élevé
Avantages	Facile à utiliser	Rapide, facile à utiliser, consommation modérée de solvant	Rapide, faible consommation de solvant, Concentration de l'extrait, Ne nécessite de filtration, haute sélectivité possible	Rapide, faible consommation de solvant, Ne nécessite pas de filtration
Inconvénient ou limites	Consommation de solvant, étape de filtration requise	Solvant d'extraction doit absorber l'énergie des micro-ondes. Étape de filtration requise	Plusieurs paramètres à optimiser (température, pression, temps...)	Dégradation possible des analytes thermolabiles

Parmi les procédés alternatifs énumérés, l'usage de l'UAE peut être intéressant sur le plan d'investissement, de la rapidité et de la simplicité de l'opération. Elle est en outre, ouverte à tout solvant et matrice en se passant de l'énergie thermique conventionnelle et en plus conduit à un bon rendement (Luque de Castro et Priego-Capote, 2007; Chemat *et al.*, 2011). Par conséquent, l'UAE sera utilisée en comparaison avec les procédés classiques d'extraction dans le cadre de cette étude. (en vue d'adopter la méthode la plus adaptée à l'extraction des différentes espèces étudiées).

➤ *Principe d'extraction UAE*

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) (Wang et Weller, 2006). Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression (**Figure II.2.8**). La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie (Pétrier *et al.*, 2008). En effet, l'implosion des bulles de cavitation est un phénomène qui s'étend à tout le liquide et qui constitue un lien direct avec la puissance du son (Mason, 1990).

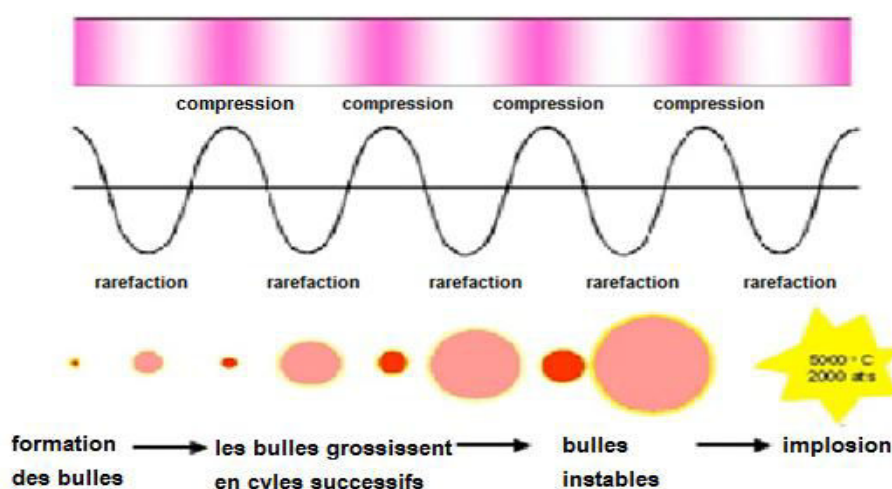


Figure II.2.8 : Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation initiées par les ondes ultrasonores (Mason, 1990)

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide (**Figure II.2.9**) elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (Wang et Weller,2006)

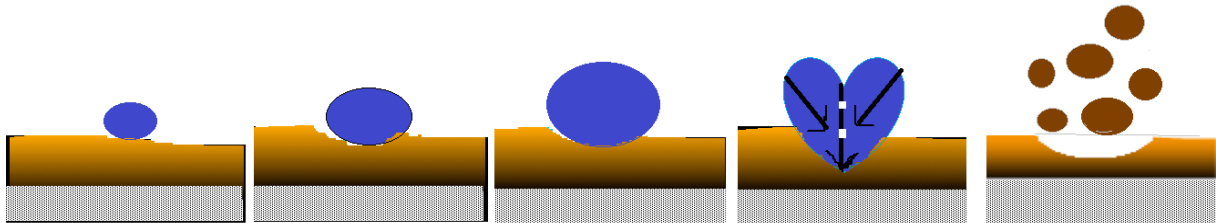


Figure II.2.9 : Evolution et implosion d'une bulle de cavitation à la surface d'un solide (matrice végétale)

2.3.1. Analyse des extraits de *Tectona grandis*

2.3.1.1. Essai d'optimisation des conditions d'extraction

Une étude d'optimisation des conditions d'extraction assistée par les ultrasons, appliquée aux colorants rouges de la garance a été précédemment effectuée au laboratoire (Cuoco, 2009). Ce travail a montré que le solvant d'extraction (méthanol) est le facteur qui influence le plus l'extraction quantitative des colorants. Bien que le végétal étudié soit différent de la garance, il ne s'agit plus de reprendre l'expérience dans un plan composite centré (PCC), mais de réaliser un certain nombre d'essais incluant la variation de solvant, la température et le temps d'extraction. A noter que ce travail s'inscrit également dans une approche économique, écologique et santé.

2.3.1.1.1. Rendements en colorants

L'extraction des colorants rouges et jaunes de *T. grandis* a été effectuée par des solvants alcooliques (méthanol et éthanol absolus) et leur mélange avec l'eau dans les proportions 70/30 v/v, correspondant aux solvants de référence pour l'extraction des substances polaires (Agunialdo *et al.*, 1993 ; Bhuyan et Saikia, 2005 ; Purushotham *et al.*, 2010). Une étude préliminaire du choix du ratio liquide/solide (volume du solvant/masse de l'échantillon : v/m) a été effectuée en utilisant comme solvant l'éthanol absolu dans un procédé d'extraction assisté par les ultrasons (UAE). Les résultats obtenus sont traduits dans le graphe de la figure II.2.10.

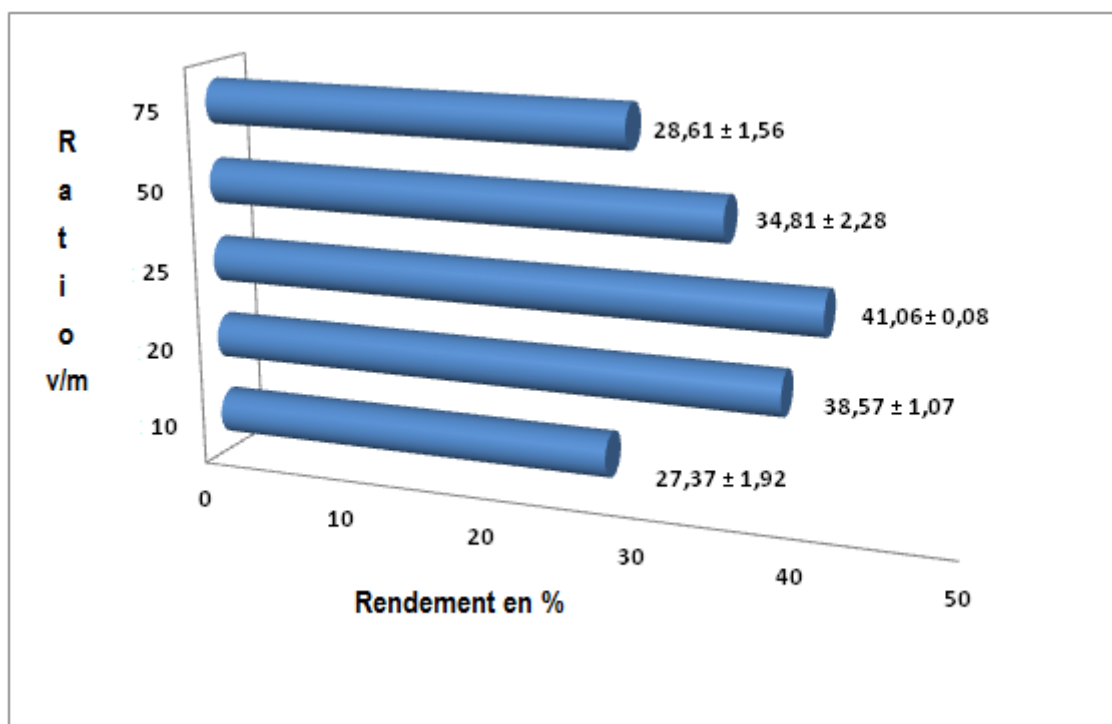


Figure II.2.10: Pourcentage du rendement d'extraction conduit aux ultrasons et à l'éthanol absolu issu des différents ratio appliqués (volume du solvant/ masse de matrice végétale). Chaque expérience étant répétée trois fois ($n=3$).

Il ressort de ces résultats que le ratio 25:1 (v/m) est celui qui a fourni le meilleur rendement ($41,06 \pm 0,08$ %). La régression des rendements en deçà ou au-delà de ce rapport pourrait s'expliquer par une dispersion non homogène de la phase solide due à la quantité de solvant utilisée. En effet, une dispersion non homogène de la phase solide peut contribuer à l'atténuation des ondes ultrasons, et la zone qui subit les ultrasons est alors restreinte à une zone localisée près de l'émetteur, ce qui peut réduire le rendement d'extraction (Wang et Weller, 2006). Il est aussi intéressant de noter que ce ratio corrobore avec celui utilisé par Cuoco *et al.*, (2009) et celui issu des travaux de Rajaei *et al.*, (2010) où les rapports 20:1 et 25:1 (v/m) dégagés, ne présentaient pas de différence significative entre eux. La différence par rapport à ce travail, se situe au niveau des solvants utilisés par ces derniers (eau et MeOH 80%). Ainsi le ratio 25:1 (v/m), soit 6 g de matière végétale pour 150 mL de solvant, est appliqué à tous les procédés d'extraction exploités dans ce processus d'optimisation. La seule variable est la durée d'extraction au niveau de chaque technique utilisée. Trois essais ont été effectués pour chaque procédé et les résultats obtenus sont consignés dans le tableau II.2.9.

Tableau II.2.9: Récapitulatif des rendements d'extraction issus des différents procédés employés avec le méthanol et l'éthanol absolu (a) et leur mélange à 30 % d'eau (b)

Solvant (a)		EtOH absolu	MeOH absolu
Méthodes	Durée	% Rdt	% Rdt
	10min	19,025 ± 1,19	12,83 ± 0,95
Ultrasons	20min	30,73 ± 0,42	14,86 ± 0,17
	30 min	41,06 ± 0,08	26,06 ± 0,84
	60min	40,09 ± 0,76	26,11 ± 1,72
Soxhlet	2h	36,26 ± 1,23	17 ± 1,74
	1h	5,81 ± 0,1	12,15 ± 0,25
	24h	16,88 ± 0,08	15,65 ± 1,23
Macération	48h	25,08 ± 0,12	15,41 ± 0,78
	72h	25,09 ± 0,17	16,68 ± 0,99
	1h	22,05 ± 0,39	12,69 ± 0,59
Reflux	2h	38,18 ± 0,08	12,98 ± 0,03
	4h	38,21 ± 0,49	16,17 ± 1,97
	5h	38,35 ± 0,25	18,09 ± 0,33

Solvant (b)		EtOH70%	MeOH70%
Méthodes	Durée	% Rdt	% Rdt
Ultrasons	20min	20,16 ± 1,22	11,5 ± 0,64
Soxhlet	3h	21,8 ± 1,85	13,95 ± 0,73
Macération	48h	15,83 ± 0,32	10,67 ± 0,23
Reflux	4h	25,97 ± 1,51	13,16 ± 0,33

Les résultats d'extraction montrent que, les rendements obtenus au niveau de l'UAE, la macération et le reflux augmentent avec le temps d'extraction jusqu'à un maximum où ils varient très peu. Les meilleurs rendements proviennent presque à chaque fois de l'extraction

menée avec l'éthanol absolu pour une même expérience, tandis que les plus faibles, sont issus de l'extraction au MeOH 70%. De même, pour ce qui est des procédés exploités, les meilleurs rendements proviennent de l'UAE, suivi de près du reflux et du Soxhlet et enfin la macération. Le rendement le plus élevé $41,06 \pm 0,08$ % est obtenu par l'UAE conduite durant 30 min avec l'éthanol absolu. On constate que l'ajout de 30% d'eau au méthanol ou à l'éthanol absolu abaisse le rendement en colorants de *T. grandis*. Ceci pourrait être lié à une perte de masse due à la durée d'évaporation du solvant hydroalcoolique utilisé. Par ailleurs, dans l'intérêt d'un suivi qualitatif des divers procédés exploités, chaque extrait brut de colorants de *T. grandis* obtenu, a été analysé par CLHP/UV-Vis. En se basant sur les conditions expérimentales élaborées précédemment, 5 mg/mL de chaque extrait (**Ext**) ont été injectés en CLHP avec pour objectif de visualiser un maximum de molécules à des longueurs d'onde caractéristiques des composés phénoliques. Ainsi les molécules ont été détectées à 350 nm *via* le gradient n°1. Les principaux profils chromatographiques obtenus sont présentés dans les figures II.2.11 et II.2.12.

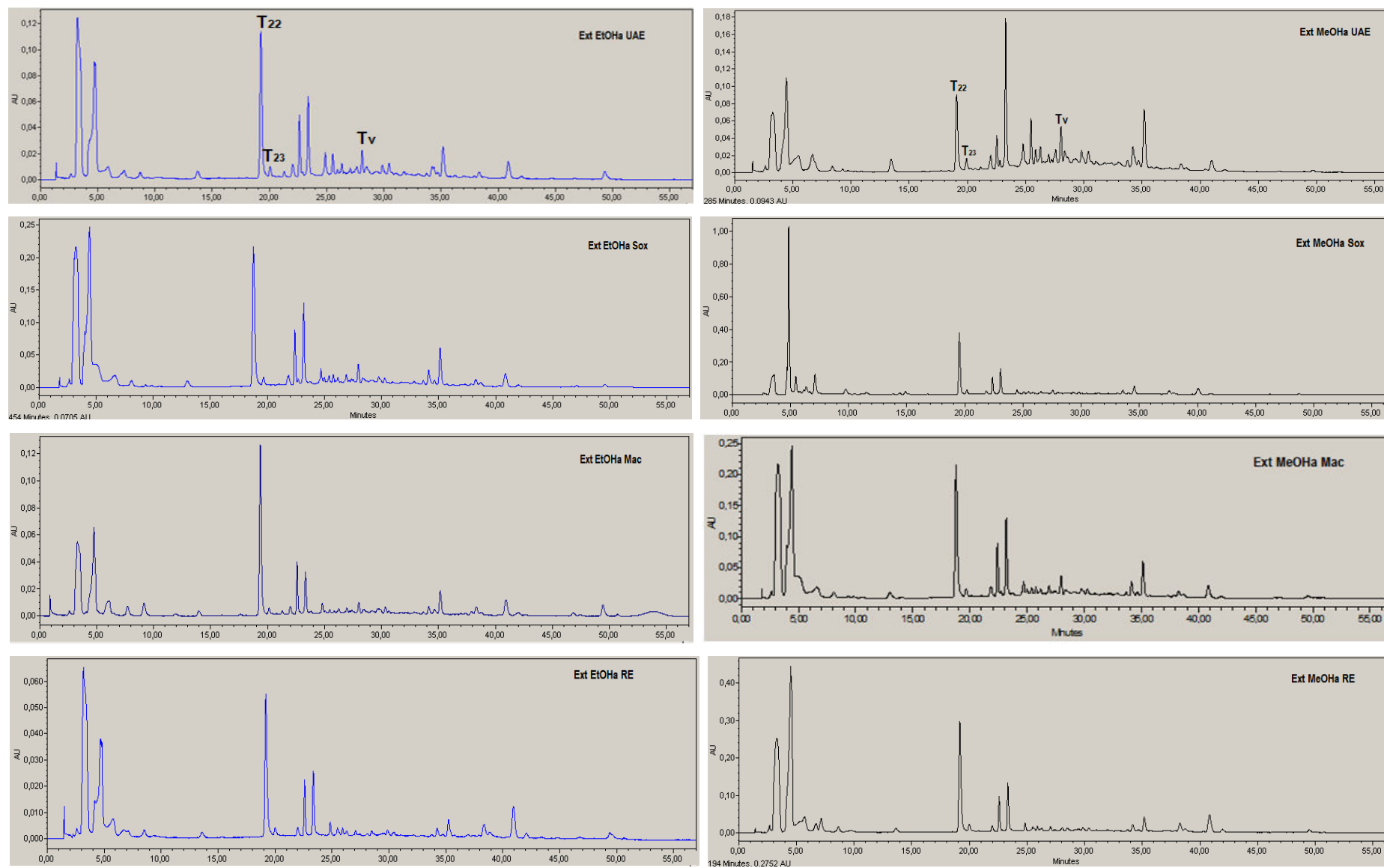


Figure II.2.11 : Profils chromatographiques à 350 nm d'extraits bruts réalisés avec le méthanol et l'éthanol absolu (MeOHa et EtOHa)

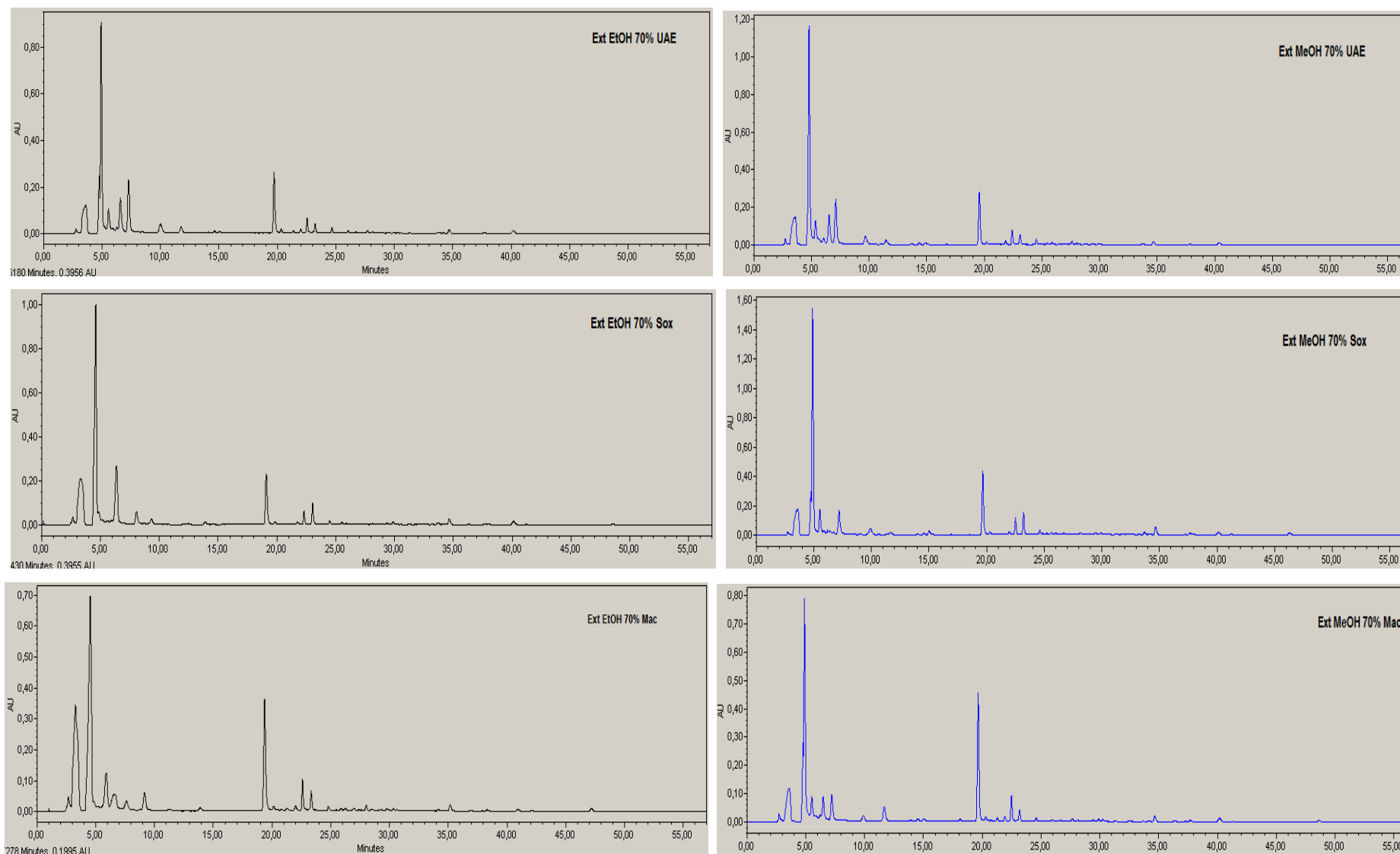


Figure II.2.12 : Profils chromatographiques à 350 nm d'extraits bruts réalisés avec le méthanol et l'éthanol absolus (MeOH 70% et EtOH 70%)

Ces figures révèlent que les empreintes chromatographiques sont très semblables sinon identiques au niveau de tous les extraits conduits à l'alcool absolu (**Ext MeOHa et Ext EtOHa**) d'une part ainsi qu'au niveau de leur mélange à 30% d'eau (**Ext MeOH 70% et Ext EtOH 70%**) d'autre part. Seule l'intensité relative des pics diffère. En effet, on note une absorbance élevée au niveau des pics d'extraits menés au méthanol comparativement à ceux réalisés avec l'éthanol, ce qui est tout à fait contraire à l'augmentation du rendement d'extraction issue des extraits éthanoliques. Il ressort de ce fait, que le méthanol peut être considéré comme un solvant qualitatif d'extraction des colorants rouges et jaunes de *T. grandis* tandis que l'éthanol peut servir pour une extraction quantitative. Par ailleurs, on remarque un écrasement des pics qui pourrait se traduire par une perte ou une dégradation de molécules entre 25 et 30 min au niveau des profils chromatographiques issus des extraits hydroalcooliques 70% (**Figure II.2.12**) comparativement aux extraits alcooliques (**Figure II.2.11**). L'obtention de tels profils due à la présence d'eau induisant une contrainte d'évaporation du solvant ne favorise pas une interprétation qualitative de la composition chimique des extraits bruts. Toutefois, à noter qu'on reviendra de façon plus détaillée sur l'identification par CLHP/UV-Vis des composés tinctoriaux de *T. grandis*, il faut mentionner que des molécules spécifiques détectées à 350 nm au niveau des extraits bruts MeOHa et EtOHa, sont la lutéoline (**T₂₂**) à $t_R = 22,68$ min, la quercétine (**T₂₃**) à $t_R = 23,01$ min et la tectoquinone (**T_V**) à $t_R = 28,16$ min. Par ailleurs, une visualisation à 450 nm des extraits bruts MeOHa de *T. grandis* a été requise dans le but d'évaluer spécifiquement leur composition en colorants rouges anthraquinoniques suivant les différentes techniques d'extraction exploitées (**Figure II.2.13**).

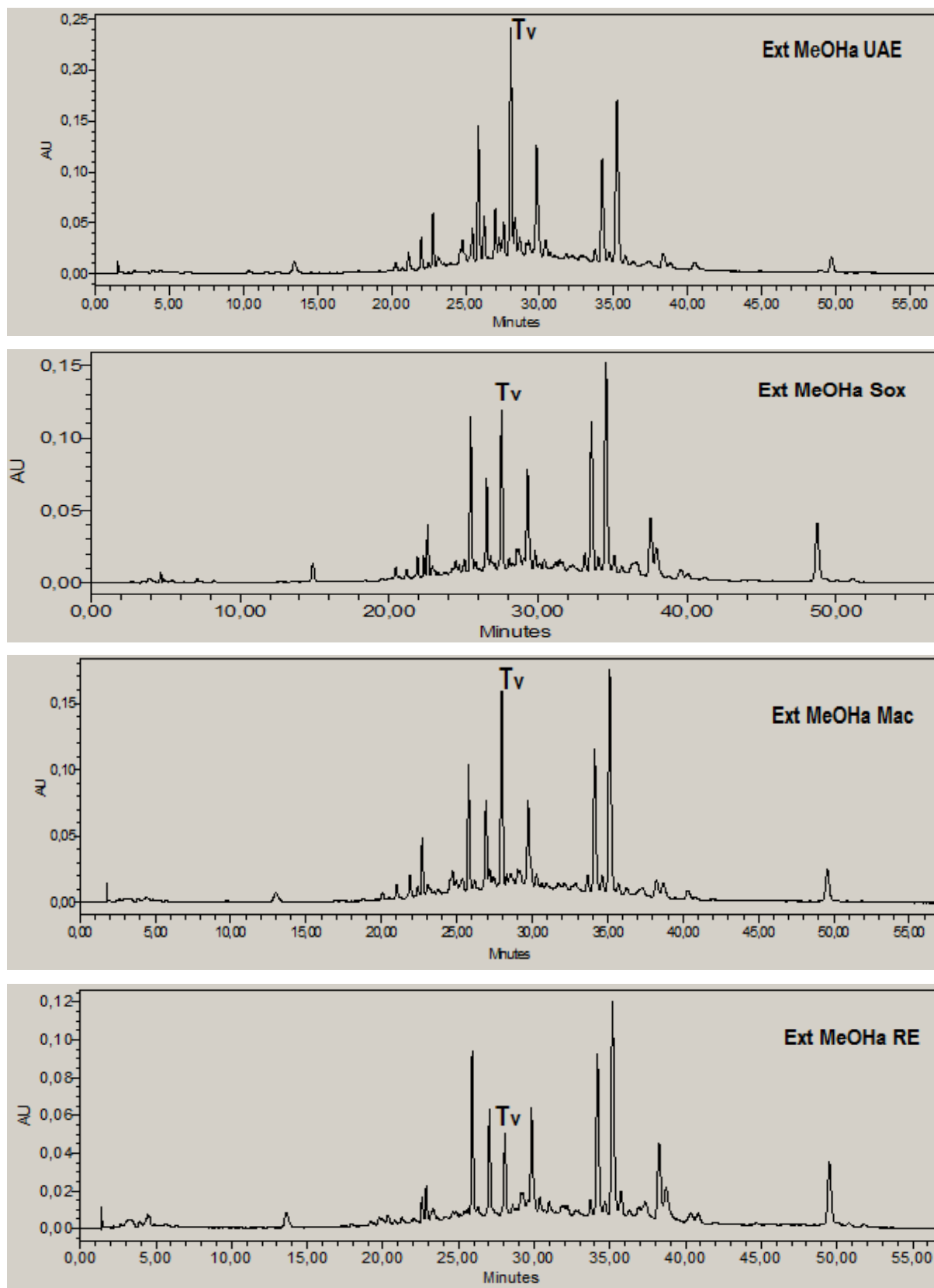




Figure II.2.13 : Profils chromatographiques à 450 nm des extraits bruts MeOHa de *T. grandis*

Les empreintes chromatographiques des extraits analysés par CLHP/ UV-Vis à 450 nm sont très semblables. En effet, elles présentent une similitude qui confirme, à l'instar de celles observées à 350 nm, une composition chimique identique des extraits bruts de *T. grandis* provenant des quatre procédés d'extraction. Cependant, seule la tectoquinone (Tv) a pu être détectée au niveau de ces extraits comparativement à leur homologue analysé à 350 nm. En outre, une analyse de l'approche coût, environnement et santé lié aux solvants utilisés dans ce processus d'optimisation a été effectué.

2.3.1.1.2. Approche écologique, économique et santé

Le regain d'intérêt croissant pour les colorants naturels depuis quelques années, vise entre autres à réduire l'impact environnemental des colorants synthétiques en exploitant au mieux ces produits naturels. En effet, ces dernières années, certaines inquiétudes ont été émises *vis-à-vis* de la nature dangereuse de certains solvants, de leur impact sur l'atmosphère, l'environnement et la santé humaine, et sur les coûts que peuvent engendrer le traitement de ces déchets toxiques. Cela a conduit à la notion de chimie « verte », laquelle a pris de plus en plus d'importance dans les laboratoires de chimie et les industries (Armenta *et al.*, 2008). Ainsi, la démarche environnementale devient nécessaire dès l'amorce du processus d'extraction, et d'analyse des matrices végétales productrices de ces colorants naturels. C'est dans cette optique qu'une analyse des données collectées sur les solvants exploités a été effectuée (**Tableau II.2.10**).

Tableau II.2.10 : .Récapitulatif des données collectées sur le méthanol et l'éthanol

	Méthanol	Ethanol
Référence	N° CAS : 67-56-1 N° ONU : 1230 N° CE : 603-001-00-X	N° CAS : 64-17-5 N° ONU : 1170 N° CE : 603-002-00-5
Symbole de danger (Pictogramme)		
Prix 1L	Méthanol pour analyses ACS, ISO, Reag.Ph.Eur. (flacon verre) : 35,10 € Méthanol pour analyses ACS,ISO,Reag. Ph Eur (flacon plastic) : 31,90 €	1-Ethanol, absolu EMPROVE® Ph Eur,BP,USP : 44,80 € 2-Ethanol absolu pour analyses ACS, ISO, Reag: 43,90 € 3-ETHANOL 70% TECHNISOLV® PUR : 14,60€
Toxicité	Toxique (effet irréversible) par inhalation, par contact cutané et en cas d'ingestion. Et comme corollaires (corrosion et irritation de la peau Lésions oculaires graves et / ou irritations oculaires. Sensibilisation des voies respiratoires ou de la peau, mutagénéité des gamètes.)	Toxique par inhalation et par ingestion (maux de tête, fatigue, Somnolence), par contact avec la peau (peau sèche, brûlure, rougeur, douleur). Pas d'effet cancérigène, ni mutagène, ni tératogène, ni sur la reproduction
Ecologie et environnement	Cette substance n'est pas considérée comme persistante, ni bioaccumulable ni toxique (PBT).Cette substance n'est pas considérée comme très persistante ni très bioaccumulable (vPvB). Ne pas déverser dans des eaux de surface ou dans les égouts. La substance est faiblement toxique pour les organismes aquatiques et terrestres	Eviter la pénétration dans le sous-sol. Ne pas déverser dans des eaux de surface ou des égouts. La substance est faiblement toxique pour les organismes aquatiques et terrestres
limites d'exposition professionnelle (lep)	TLV: 200 ppm; 262 mg/m ³ TWA (peau) (ACGIH 1997) TLV (STEL): 250 ppm; 328 mg/m ³ (peau) (ACGIH 1997)	TLV: 1000 ppm; 1880 mg/m ³ (TWA) (ACGIH 1997) MAK: 1000 ppm; 1900 mg/m ³ ; IV (MAK 1992). MAK: classe D (MAK 1992).
Propriétés physiques	Point d'ébullition : 65°C Point de fusion : -98°C Densité relative (eau = 1) : 0.79 Solubilité dans l'eau : miscible Tension de vapeur à 20°C : 12.3 kPa Densité de vapeur relative (air = 1) : 1. Densité relative du mélange air/vapeur à 20°C (air = 1) : 1.01 Point d'éclair : 12°C c.f. Température d'auto-inflammation : 385°C Limites d'explosivité en volume % dans l'air : 6-35.6	Point d'ébullition : 79°C Point de fusion : -117°C Densité relative (eau = 1) : 0.8 Solubilité dans l'eau : miscible Tension de vapeur à 20°C : 5.8 kPa Densité de vapeur relative (air = 1) : 1.6 Densité relative du mélange air/vapeur à 20°C (air = 1) : 1.03 Point d'éclair : 13°C c.f. Température d'auto-inflammation : 363°C Limites d'explosivité en volume % dans l'air : 3.3-19

Sources principales données utilisées: <http://ecb.jrc.it> / VWR : www.vwr.com catalogue des produits chimiques

Les données fournies par ce tableau montrent que le méthanol absolu utilisé pour l'extraction, dans ce processus d'amélioration des rendements en colorants, coûte moins cher que l'éthanol absolu. Cependant, sa toxicité est considérablement élevée et irréversible sur le fonctionnement de l'organisme notamment la mutagénéité des gamètes comparativement à l'éthanol. Mais du point de vue environnemental et écologique, les deux solvants n'ont pratiquement pas d'effet néfaste. Néanmoins, ils peuvent être faiblement toxiques pour les organismes aquatiques et terrestres. Ces données, associées aux rendements d'extraction permet de relever les avantages et les limites à utiliser chacun de ces solvants. Bien que l'éthanol fournisse de bons rendements en colorants, les composés extraits absorbent faiblement dans l'UV-Vis. C'est du moins ce qu'a montré l'analyse des extraits en CLHP/ UV-Vis. De plus, son prix au litre est plus élevé comparativement au méthanol qui se révèle être un solvant adapté pour une analyse qualitative des colorants de *T. grandis*, mais sa toxicité peut être fatale sur la santé humaine (surtout pour le manipulateur). Par ailleurs, il faut noter que l'utilisation du mélange alcool-eau 70% (v/v) dans ces procédés d'extraction présente des limites à l'étape d'évaporation du solvant sous vide. En effet, ceci demande plus de temps et une consommation évidente d'énergie. De plus les profils chromatographiques obtenus ne favorisent pas une interprétation qualitative de la composition chimique des extraits bruts en raison de l'écrasement des pics entre 25 et 30 min.

2.3.1.1.3. Conclusion

L'étude d'extraction des colorants présents dans les feuilles de *T. grandis* a été réalisée en exploitant trois procédés traditionnels (macération, reflux et Soxhlet) et un procédé alternatif d'extraction assistée aux ultrasons. Ce travail dont l'intérêt est d'élaborer et d'utiliser un procédé d'extraction simple, rapide et efficace pouvant être employé à fin analytique et industrielle, a été effectué en concomitance avec une analyse d'impact des solvants utilisés sur l'environnement, la santé et le coût du procédé ainsi qu'une analyse des extraits obtenus par CLHP/UV-Vis. Les résultats obtenus ont montré que toutes les techniques d'extraction employées permettent d'extraire les mêmes composés chimiques pour un même type de solvant utilisé. En outre, les empreintes chromatographiques obtenues présentent deux profils distincts à 350 nm et 450 nm, qui révèlent qu'en général, les flavonoïdes sont élués de la colonne avant les anthraquinones. Bien que l'extraction menée à l'éthanol absolu fournisse quantitativement le meilleur rendement, celle conduite au méthanol absolu offre des meilleurs profils chromatographiques (absorbance relative élevée des pics) pour une interprétation qualitative de la composition chimique des extraits. D'après ces résultats, il apparaît plus

judicieux d'adopter le méthanol absolu pour la suite des analyses, car-ce dernier présente aussi l'avantage d'être écologique et plus économique par rapport aux extractions à l'éthanol absolu, tout en extrayant les mêmes molécules. Cependant il peut être très nuisible pour la santé humaine. Il est urgent de prendre des précautions d'usage. Par ailleurs, étant donné que la méthode par ultrasons produit le meilleur rendement avec un temps d'extraction très réduit et une température ambiante, elle sera également privilégiée pour la suite des analyses. Par conséquent, les nouvelles conditions optimales pour l'extraction des colorants de *T. grandis* qui seront utilisées sur le plan qualitatif sont : l'UAE conduite au méthanol absolu, pendant 30 min et à température ambiante. En effet, elles seront appliquées à la caractérisation des molécules cibles des feuilles de Teck.

2.3.1.2. Caractérisation des molécules cibles

Les données bibliographiques ainsi que les analyses chromatographiques réalisées sur l'étude d'extraction des colorants de *T. grandis*, révèlent la richesse et la diversité de composés chimiques présents dans ses extraits bruts. Dans ces conditions, il est difficile d'effectuer une identification qualitative directe de ses principes colorants aux moyens des standards commerciaux disponibles. Il est donc nécessaire d'alléger les analyses en passant par des étapes de fractionnement et de purification afin de mieux caractériser les molécules cibles de *T. grandis*.

2.3.1.2.1. Fractionnement et purification

Divers procédés organiques destinés à favoriser la différence de réactivité des molécules possédant des temps de rétention et des données spectroscopiques semblables mais pouvant correspondre à des structures distinctes, ont été employés. Ils concernent la séparation des constituants acides et neutres des mélanges; des fractions cétoniques et non cétoniques de *T. grandis*, afin de simplifier les chromatogrammes dans l'optique d'une interprétation plus fine mais également de tester ces protocoles précédemment développés au laboratoire sur les plantes tinctoriales du Bénin.

➤ Comparaison des fractions acides et neutres

Les fractions acides (**Fr acide**) et neutres (**Fr neutre**) ont été obtenues suivant le protocole expérimental décrit en **Annexe 1** et sont comparées avec l'extrait brut MeOHa UAE (**Figure II.2.14**). 2 mg/mL de chaque fraction ont été injectés en CLHP.

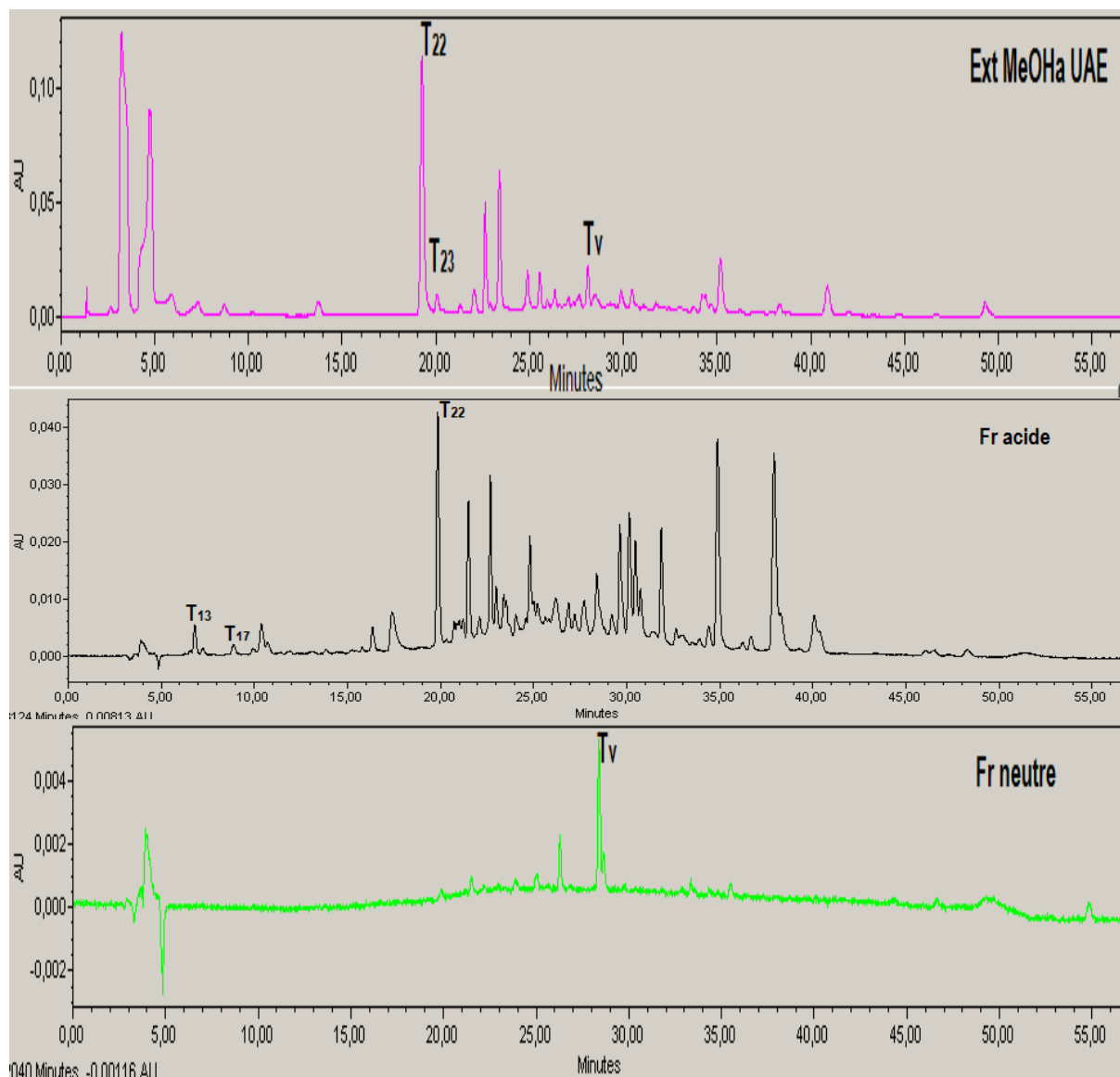


Figure II.2.14 : Chromatogramme CLHP UV-Vis à 350 nm de l'extrait brut MeOHa et des fractions acide et neutre de *T. grandis*

Les résultats montrent une fraction acide aussi riche en composés chimiques que l'extrait brut MeOH. Par contre les profils chromatographiques obtenus ne sont pas pour autant superposables. On note une importante modification des spectres chromatographiques entre 6 et 18 min au niveau de la fraction acide avec apparition de 5 composés acides dont deux nouvelles introductions entre 16 et 18 min. Les composés **T₁₃** ($t_R = 6,87$ min) et **T₁₇** ($t_R = 8,91$ min) ont pu être identifiés respectivement à l'acide caféique et à l'acide ferulique au niveau de **Fr acide**, par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre UV avec ceux des standards commerciaux ainsi que la lutéoline (**T₂₂**) à $t_R = 19,98$ min. Cependant, hormis la tectoquinone (**Tv**) qu'on a pu identifier dans la fraction neutre (**Fr neutre**), on note que, peu de composés ont un caractère neutre. Ce qui pourrait justifier la faible quantité de la

fraction sèche obtenue (sous forme de trace) et par conséquent sa faible composition chimique comparée à l'extrait brut **MeOH** UAE

➤ **Comparaison des fractions cétonique et non cétonique**

Les feuilles de *T. grandis* ont été traitées avec le réactif de T de Girard suivant le protocole expérimental décrit en **Annexe 1**. La figure suivante (**Figure II.2.15**) regroupe les chromatogrammes à 350 nm des différentes fractions injectées à une concentration de 5 mg/mL et comparés à celui de l'extrait brut MeOH

Les profils chromatographiques issus des deux fractions, permettent de distinguer deux portions spectrales. Une portion parfaitement superposable des deux fractions entre 19 et 45 min et semblable à celle de l'extrait brut MeOH UAE et une portion bien distincte entre 4 et 15 min. Les 4 pics moléculaires perceptibles entre 4 et 10 min au niveau de la fraction cétonique (**Fr cétonique**) sont sans doute des composés cétoniques dont les structures n'ont pu être identifiées au moyen des standards injectés. Cependant, hormis, l'acide caféique (**T₁₃**) identifié à $t_R = 6,87$ min au niveau de la fraction non cétonique (**Fr non cétonique**), 4 composés flavonoïdiques **T₂₂**, **T₂₃**, **T₂₅** et **T₂₈** présentant des temps de rétention respectivement égaux à 19,98 ; 20,6 ; 22,83 et 23,53 min ont pu être identifiés au niveau des deux fractions et correspondent respectivement à la lutéoline, la quercétine, l'apigénine et la rhamnétine.

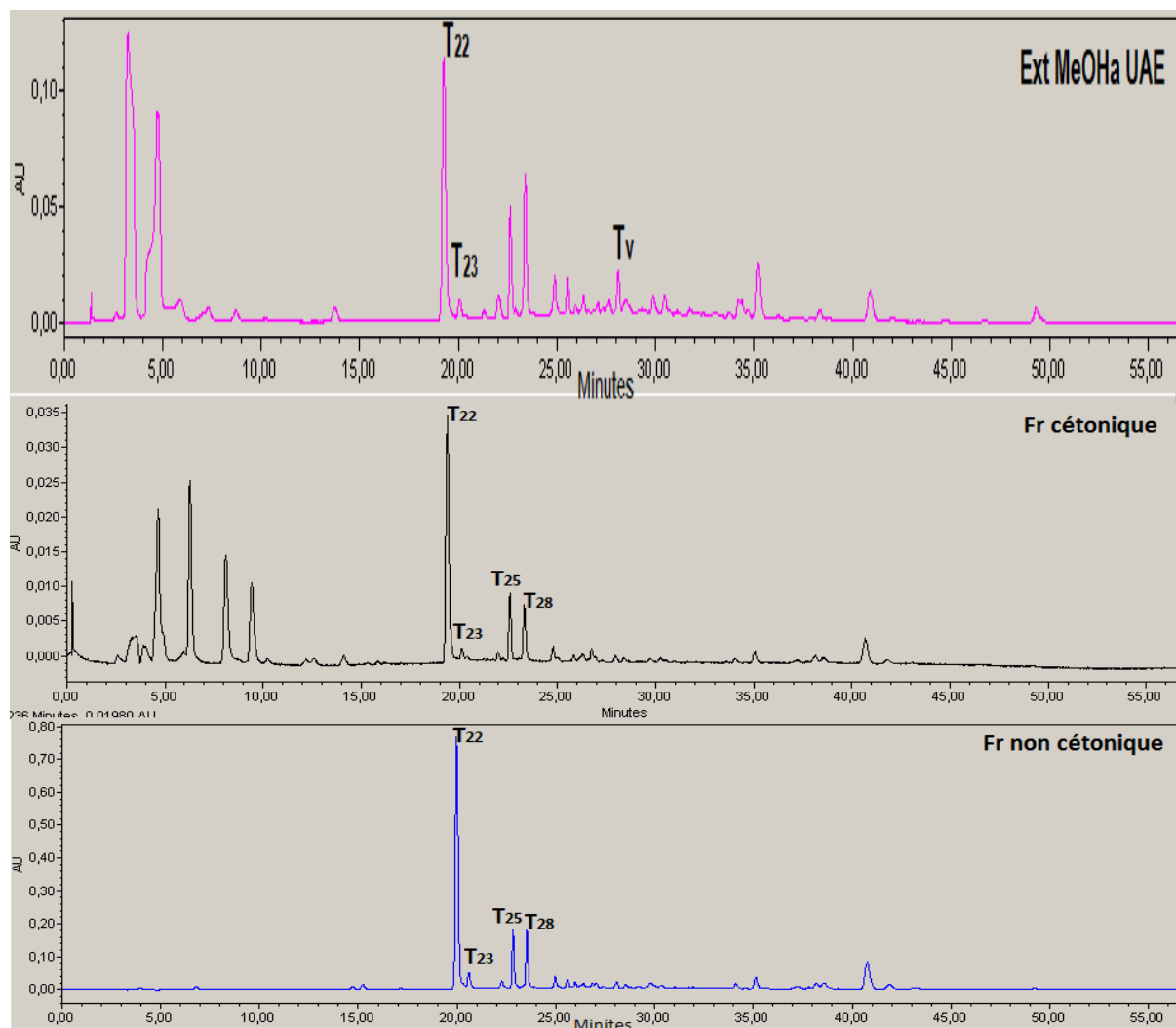


Figure II.2.15 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 350 nm de l'extrait brut MeOHa UAE et des fractions cétonique et non cétonique.

➤ **Fractionnement au Combiflash[®] Rf TELEDYNE ISCO**

Le passage à un fractionnement au combiflash s'inscrit dans l'intérêt de disposer de toutes les empreintes chromatographiques et des spectres UV-Vis correspondant à chaque composé présent dans les feuilles de *T. grandis* dans l'objectif d'une application ultérieure à l'identification des échantillons muséaux, sachant bien qu'on ne pourra purifier tous ces composés ni pouvoir tous les identifier au moyen des standards. Par ailleurs, ce fractionnement est effectué dans des conditions orientées vers l'isolement de quinones, étant donné que d'autres anthraquinones n'ont pu être identifiées jusque-là au moyen des standards anthraquinoniques disponibles, hormis la tectoquinone. L'ensemble du fractionnement est une alternance de chromatographie sur colonne et de chromatographie sur couche mince permettant l'optimisation des séparations réalisées. L'appareil utilisé est un automate du type

colorés en lumière visible. En outre, les anthraquinones pourraient afficher une fluorescence orangée ou blanche dans l'UV à 365 nm. Les empreintes chromatographiques issues de l'analyse des 19 fractions par CLHP/ UV-Vis, ont permis de détecter environ 87 spectres UV-Vis bien distincts témoignant de la richesse et de la diversité de composés présents dans les feuilles de teck. Ce qui va de pair avec les travaux réalisés par Chengping Xie *et al.*, (2011) sur le bois, où 109 composés ont été trouvés. L'ensemble de ces résultats ont été stockés dans la base de données du laboratoire. Néanmoins, les principales données liées aux colorants jaunes, orangés ou rouges identifiables à l'aide de standards commerciaux ainsi que la purification de fractions ciblées seront discutées. Ainsi, l'analyse des fractions en CLHP, a permis de détecter des molécules fortement concentrées absorbant dans le visible notamment dans les fractions F₃-F₅ (**Figure II.2.17**). Leurs spectres UV-Vis peuvent être attribués aux composés anthraquinoniques. En effet, à noter que les composés sont élués suivant leur polarité croissante, les anthraquinones moins polaires que les flavonols et acides phénoliques seront donc éluées en première de la colonne de silice exploitée lors du fractionnement vu la nature peu polaire du solvant éluant. Par conséquent les premières fractions constituent la source privilégiée de purification et d'isolement de molécules anthraquinoniques.

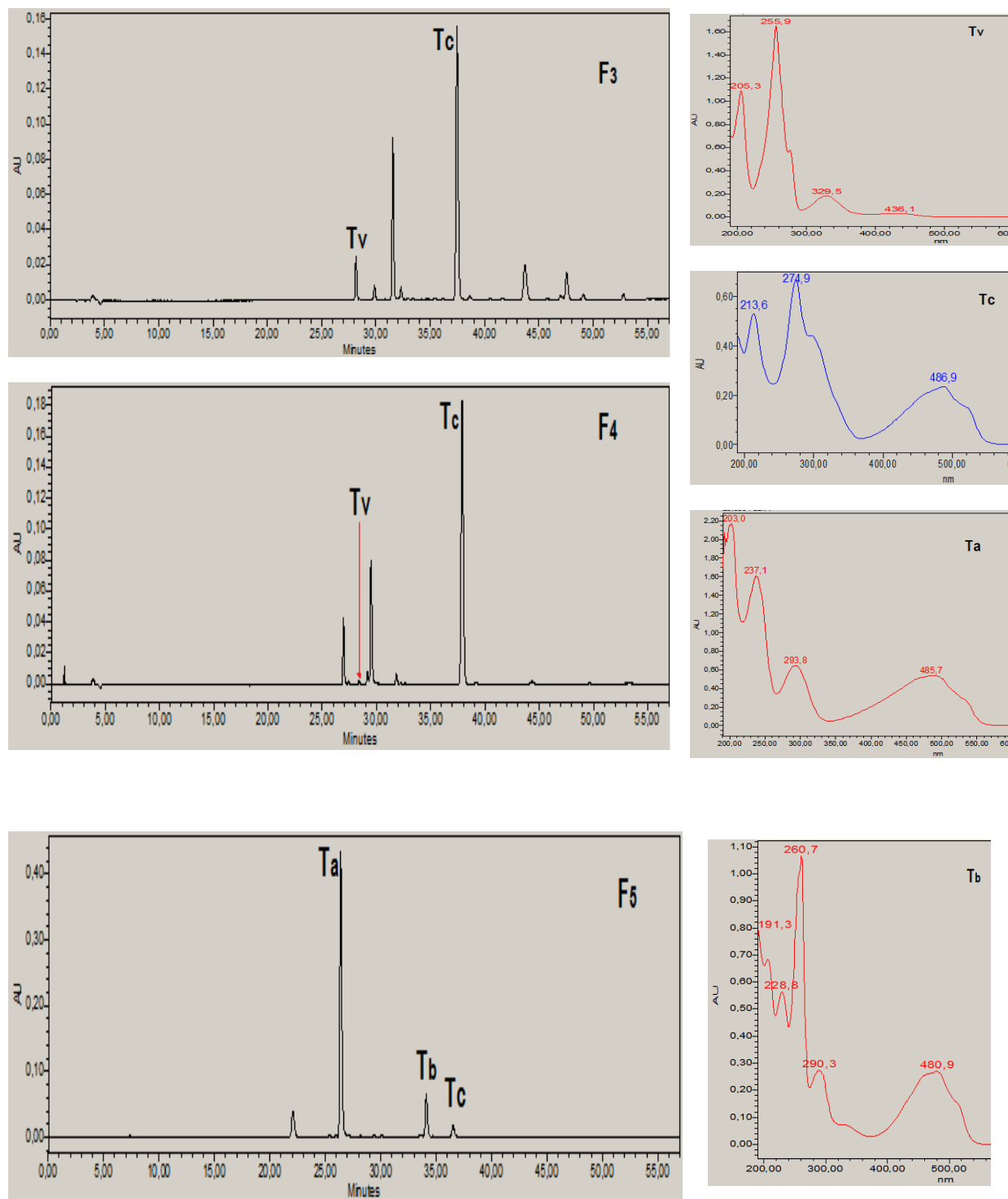


Figure II.2.17 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 450 nm des fractions **F₃**, **F₄** et **F₅** et les spectres UV-Vis de composés ciblés (**Ta**: $t_R=26,38$ min ; **Tv**: $t_R=28,16$ min ; **Tb**: $t_R=35,5$ min et **Tc**: $t_R=37,41$ min)

➤ **Purification de molécules ciblées**

A l'entame de cette étude, un scan global de l'extrait MeOHa UAE de *T. grandis* en UV-Vis a été effectué au spectrophotomètre (Cary 300. Version 9.00) dans un système de balayage entre 190 et 800 nm, avec un débit de 600 nm/min (**Figure II.2.18**).

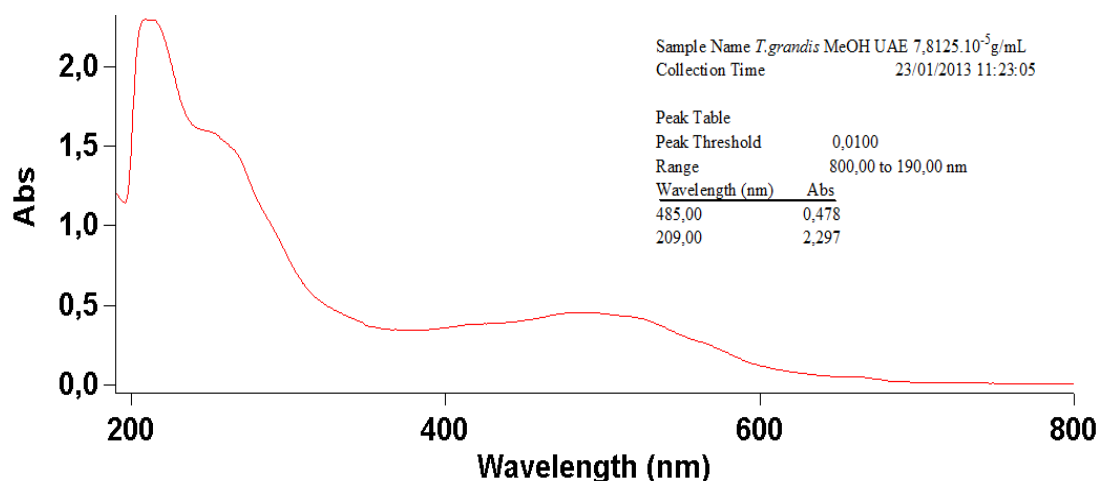


Figure II.2.18: Spectre UV-Vis issu du scan global de l'extrait MeOH UAE de *T. grandis* à $7,8125 \cdot 10^{-5}$ g/mL

Il ressort de ce spectre que, les principes colorants de *T. grandis* absorbent globalement dans le visible au environ de 485 nm. Par conséquent, hormis la tectoquinone (**Tv**), la recherche d'autres molécules colorantes de *T. grandis* passera par la purification de molécules présentant une similarité avec le spectre UV-Vis global de l'espèce. Ainsi, les molécules **Ta**, **Tb** et **Tc** ont été ciblées. La purification de ces molécules a été effectuée de la fraction **F₅** (64,8 mg) par une chromatographie sur couche mince préparative (CCM préparative) sur gel de silice, avec un mélange de cHex-ACE (8:2, v/v) comme phase mobile. Une dernière purification à été réalisée sur phase solide (SPE) dans le but d'éliminer toute impureté résiduelle. Cette démarche a permis de révéler par CCM que la fraction **F₅** est essentiellement constituée de colorants jaune orangé (**Tb**), rouge violet (**Ta**) et orangé (**Tc**). En outre, deux composés ont pu être purifiés. Les résultats qualitatifs obtenus sont regroupés dans la figure II.2.19

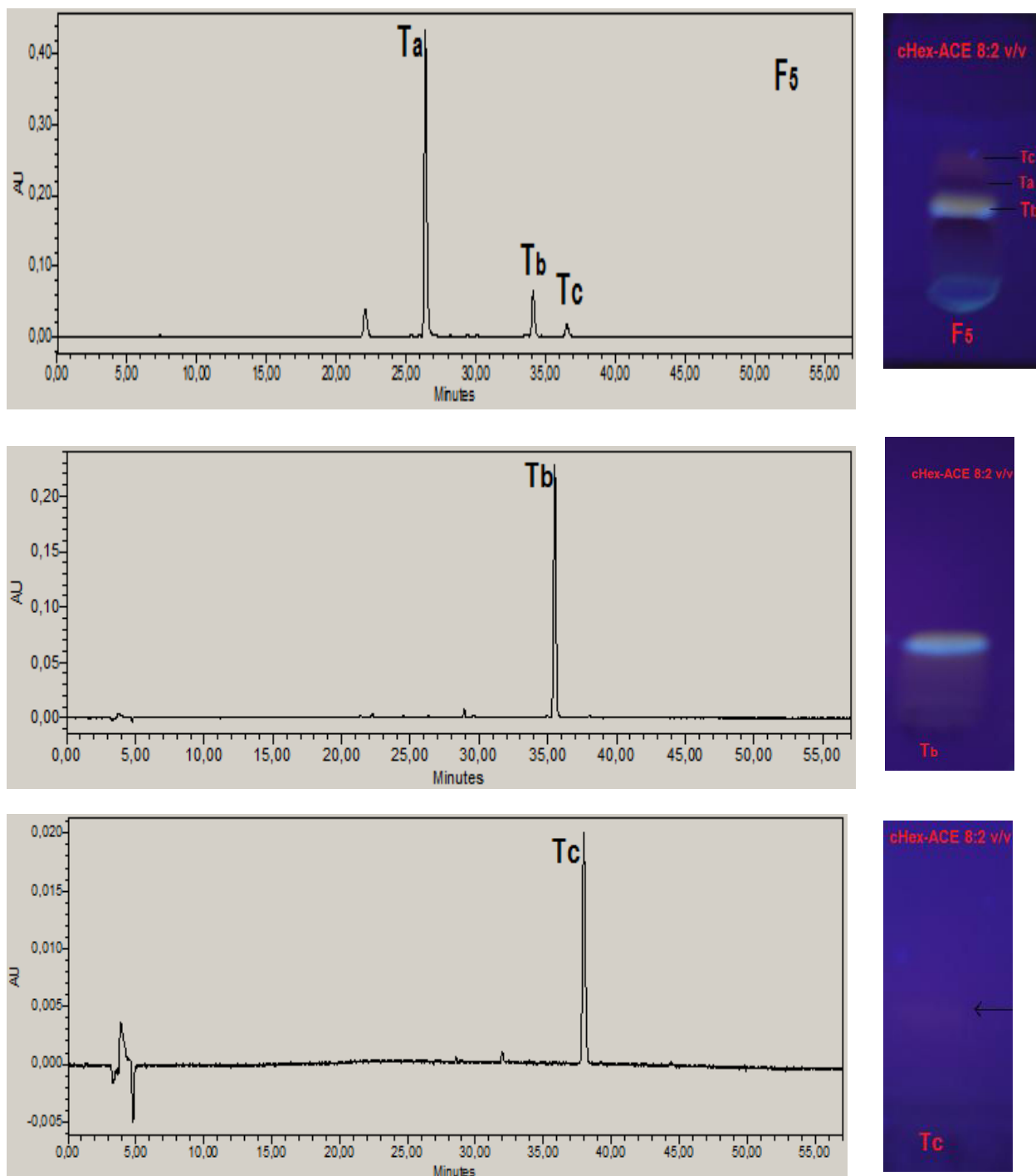


Figure II.2.19: CCM sous UV à 365 nm et chromatogrammes CLHP UV-Vis à 450 nm de la fraction F5 et des composés purifiés **Tb** (R_f : 0,32 ; t_R = 35,5 min) et **Tc** (R_f : 0,45 ; t_R = 37,41 min)

Les rendements en produits secs obtenus sont de 11,1% soit 7,2 mg pour **Tb** et 6% soit 3,9 mg pour **Tc**.

2.3.1.2.2. Identification des composés et empreintes chromatographiques des fractions

Comme il a été souligné antérieurement, l'identification des principes chimiques de *T. grandis* a été essentiellement réalisée aux moyens des standards commerciaux disponibles. Néanmoins, une caractérisation des colorants **Tb** et **Tc** par la réaction de Borntträger (en présence de KOH 0,5 M) a été effectuée en vue de s'assurer qu'il s'agit bien des aglycones anthraquinones. Il a été observé une coloration rouge intense qui se traduit par la formation d'un polyanion anthraquinonique dans un système aromatique conjugué. En effet, l'espèce responsable d'une telle coloration est au minimum un dianion dont les charges anioniques participent à la délocalisation sur l'ensemble du système aromatique. Ce qui signifierait donc que les anthraquinones purifiées sont des composés polyhydroxylés par anticipation aux analyses spectroscopiques de leur caractérisation structurale. En outre, cette structure polyhydroxylée pourrait être confirmée par le fait, que leur temps de rétention ($t_R = 35,5$ et $37,41$ min) supérieur à celui de la quinizarine ($29,11$ min), dénote qu'ils développent une forte interaction électrostatique intrinsèque influant sur leur rétention par la colonne, à l'instar de la formation des liaisons hydrogène intramoléculaires discutée précédemment au niveau de la quinizarine. Par ailleurs, on note une fluorescence jaune orangée en UV à 365 nm au niveau de la molécule **Tb**. Cette molécule revêt par conséquent une importance capitale car elle pourrait constituer un marqueur de fluorescence, contribuant à l'identification de colorants issus du teck à l'instar de la purpurine pour les garances et l'acide carminique pour les coccidés (Hovaneissian, 2005). Hormis la tectoquinone, les composés **Tb** et **Tc** ainsi que d'autres composés comparables aux anthraquinoniques dont on dispose sous forme d'empreintes UV-Vis, quelques flavonoïdes ont pu être identifiés dans les fractions collectées. En effet, la détection de colorants flavonoïdiques a débuté à partir de la fraction **F₁₂** où ils y sont d'ailleurs très concentrés. Les composés identifiés sont la lutéoline (**T₂₂**), la quercétine (**T₂₃**), la diosmétine (**T₂₄**), l'apigénine (**T₂₅**)-et la rhamnétine(**T₂₈**). Les fractions **F₁₃** et **F₁₅** ont permis de compléter la liste des colorants identifiés respectivement par l'isorhamnétine(**T₂₆**) et la rutine (**T₈**). Il est intéressant de souligner que la présente étude permet de caractériser pour la première fois les composés **T₂₂**, **T₂₄**, **T₂₅**, **T₂₆** et **T₂₈** dans les feuilles de teck. Bien que les flavonoïdes soient reconnus comme étant des colorants jaunes, l'obtention de coloration rouge sombre ou rouge clair des fractions **F₁₂**, **F₁₃** et **F₁₅** s'explique, par la présence des colorants rouges anthraquinoniques dans ces fractions comme le cas du colorant **Tc** identifié une fois encore dans la fraction **F₁₂** à 450 nm. Les différentes empreintes chromatographiques afférentes aux composés identifiés sont présentées dans la figure II.2.20.

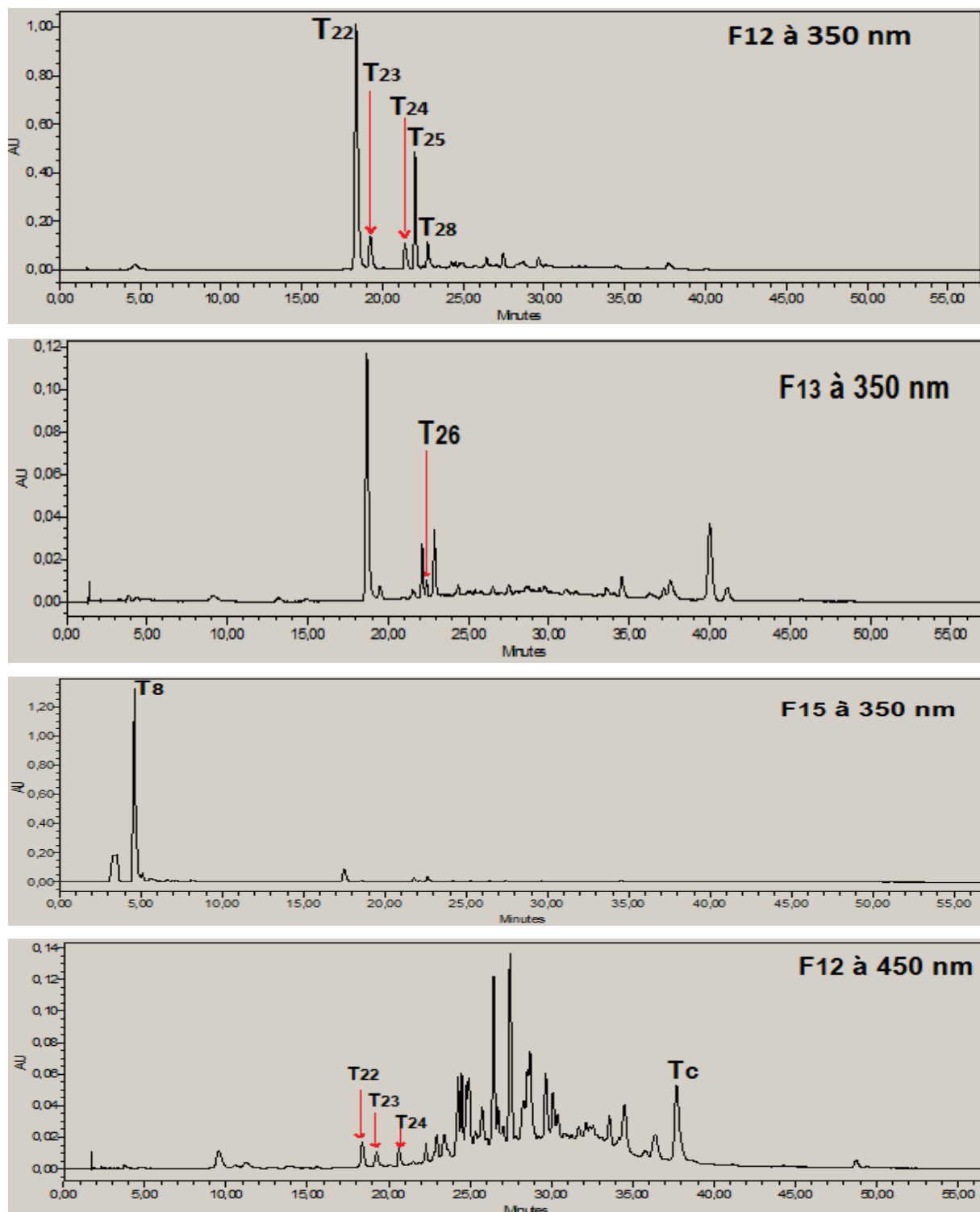


Figure II.2.20: Empreintes chromatographiques CLHP/UV-Vis des fractions **F₁₂**, **F₁₃** et **F₁₅**
T₈ ($t_R=4,61$ min) ; **T₂₂** ($t_R=18,98$ min) ; **T₂₃** ($t_R=19,67$ min) ; **T₂₄** ($t_R=21,8$ min) ; **T₂₅** ($t_R=22,4$ min) ; **T₂₆** ($t_R=22,7$ min) ; **T₂₇** ($t_R=23,06$ min) **T_c** ($t_R=37,4$ min)

Par ailleurs, on remarque qu'en dehors de la rutine, les molécules spécifiques détectées sont principalement des aglycones flavonoïdiques et anthraquinoniques. En effet, en comparaison avec le composé aglycone quercétine, un effet hypsochrome est observé au

niveau de λ_{max} de la rutine dans son spectre UV-Vis (**Figure II.2.21**). Cet effet provoqué par la présence d'un substituant glycosyle en position 3 du flavonol est décrit dans la littérature (Mabry *et al.*, 1970).

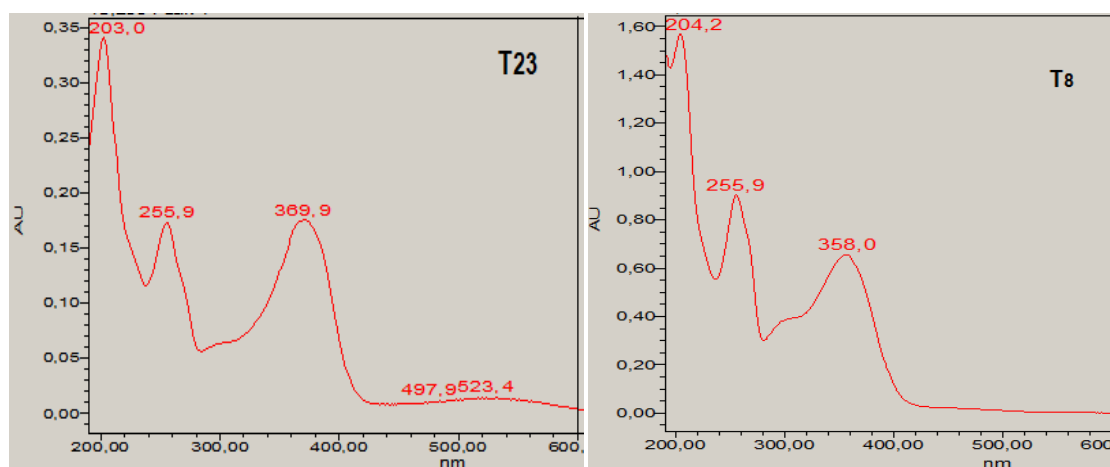


Figure II.2.21 : Spectres UV-Vis de la quercétine (T_{23} : $\lambda_{max}= 369,9$ nm) et de la rutine (T_8 : $\lambda_{max}= 358$ nm)

2.3.1.2.3. Conclusion

L'étude fondamentale des colorants extraits des feuilles de *T. grandis* révèle une composition chimique très riche et complexe. Leur caractérisation est basée sur une identification sélective, par usage des procédés favorisant leur séparation et leur partage en fractions. Ainsi, les composés ont été identifiés par CLHP/UV-Vis dans les diverses fractions obtenues en utilisant principalement des standards commerciaux. Par conséquent, deux acides cinnamiques; l'acide caféique et l'acide ferulique ont pu être identifiés dans la fraction acide tandis que les flavonoïdes :lutéoline, quercétine, diosmétine, apigénine, isorhamnétine, et rhamnétine ont été en majorité identifiés dans les fractions cétonique et non cétonique ainsi que dans les fractions **F**₁₂, **F**₁₃ ainsi que la rutine dans la **F**₁₅. Une seule anthraquinone, la tectoquinone a pu être identifiée, alors que deux autres (**Tb** et **Tc**) ont pu être purifiées parmi celles qui ont présenté une forte concentration dans les extraits. Hormis la lutéoline, la diosmétine, l'apigénine, l'isorhamnétine et la rhamnétine caractérisés pour la première fois dans les feuilles de teck, tous les autres composés ont été décrits dans la littérature spécialisée (Naira et Karveka, 2010; Aradhana *et al.*, 2010 ; Ramesh et Mahalakshmi, 2014). Bien que cette étude n'ait pas permis de connaître tous les composés chimiques présents dans les feuilles de *T. grandis* du Bénin, l'identification de la tectoquinone qui constitue un marqueur chimique important du teck ainsi que la disponibilité des empreintes chromatographiques issues de ses extraits constituent des informations fondamentales à l'identification de l'espèce.

2.3.2. Analyse des extraits de plantes à indigo

2.3.2.1. Etude comparative des procédés d'extraction

La mise en œuvre depuis l'aube de l'humanité, de diverses recettes d'extraction de l'indigotine, sur différents continents à partir de différentes plantes à indigo, a été l'une des plus passionnantes découvertes de l'histoire de l'application traditionnelle de la chimie. Dès lors, l'amélioration de ces techniques est devenue une préoccupation majeure des artisans, des industriels, des scientifiques et même de certains gouvernements qui n'ont ménagé d'effort à financer et à encourager des recherches dans ce cadre (Société de pharmacie de Paris, 1839 ; www.spindigo.net). En effet, les techniques utilisées sont principalement basées sur la réalisation des cuves dont les noms évoquent principalement le composé réducteur ou l'alcali employé dans le processus d'extraction. Il s'agit notamment de la cuve bactérienne, où la plante est utilisée sous forme de compost ou de coque (boulette de pâte de feuilles broyées, rassemblées, pressées entre les deux mains et mises à sécher) servant à la fois de source de colorant et d'apport de matière organique végétale dont la digestion par les bactéries, favorise la réduction de l'indigo en poudre ; de la cuve alcaline, de la cuve sucrée ; de la cuve à l'urine, et ensuite de la cuve chimique montée soit au sulfure d'arsenic soit à l'hydrosulfite. En effet, découverte en 1871 par Schützenberger et de Lalande, juste avant l'apparition sur le marché de l'indigo synthétique, la cuve d'indigo à l'hydrosulfite ou dithionite de sodium représente le dernier stade de milliers d'années de recherches techniques (Cardon, 2003). C'est en effet, ce puissant réducteur chimique qui sera employé dans le processus d'optimisation d'extraction d'indigotine proposé dans cette étude. En outre, les résultats obtenus seront comparés à ceux utilisant les solvants organiques classiques.

2.3.2.1.1. Optimisation des procédés traditionnels par réduction chimique

2.3.2.1.1.1. Principe

La technique de cuve d'indigo utilisée au Bénin repose principalement sur la macération de coques de feuilles par addition d'eau de potasse obtenue par mélange de cendres de plantes (riches en potasse) et d'eau à température ambiante. L'opération dure entre 6 et 10 jours. Il arrive que le bain se gâte par pourrissement au bout de six jours lorsque l'eau de potasse utilisée pour monter les cuves, n'est pas assez forte. En outre, deux sources possibles de contamination de l'indigo formé à partir de feuilles exploitées peuvent être identifiées, à savoir : la composition de feuille elle-même, ou son sol ainsi que d'autres matières étrangères telles que les organes d'insectes qui pourraient adhérer à la surface des

feuilles. A noter que la chute de l'indigo naturel au profit de l'indigo synthétique dès la fin du XIX^{ème} siècle n'est pas seulement liée au faible coût de la matière synthétique mais surtout à sa constante pureté comparée à la matière naturelle. Le principe utilisé consiste donc à débarrasser en grande partie, les feuilles de ses impuretés de base et de ses composés secondaires par un lavage à chaud suivi d'une réduction par le dithionite de sodium en milieu basique. On récupère ensuite l'indigo par précipitation en utilisant de l'acide chlorhydrique qui rétablit par surcroît la neutralité du milieu. Le protocole expérimental mis au point est détaillé en Annexe 1.

2.3.2.1.1.2. Avantages et limites

Comparativement aux cuves traditionnelles, ce protocole élaboré sur la base de l'hydrosulfite dont l'emploi se généralise de plus en plus, peut être considéré comme le type de réduction où il ne se forme pas de fermentation, l'agent réducteur prenant naissance par simple réaction chimique. Ce qui favorise une réduction considérable de la durée d'extraction qui peut passer de 6 jours à moins d'une heure avec un rendement avoisinant 30 % et une pureté comparable à celle de l'indigo synthétique notamment pour l'espèce *Philenoptera cyanescens*. En outre, l'emploi de l'acide chlorhydrique pour faciliter la sédimentation de l'indigo, contribue également à l'augmentation du rendement et surtout à la pureté de l'indigo obtenu. En effet, il a été démontré, dans une série d'expérimentations comparées à un milieu alcalin, que l'acide citrique peut faire passer la pureté de l'indigo de 17% à 68% et de façon similaire l'acide chlorhydrique peut la faire passer de 19% à 72% (Stoker *et al.*, 1998 ; Bechtold *et al.*, 2002). Cependant, les limites de ce procédé résident dans l'utilisation des produits chimiques dangereux en particulier la soude caustique. Il est donc important de trouver une solution ou une alternative par rapport à l'usage de ces produits.

2.3.2.1.1.3. Alternatives

La recherche d'alternatives par rapport à l'usage de la soude caustique conduit à se référer à l'emploi de l'eau de postasse utilisée dans le montage des cuves traditionnelles. En effet, cette eau basique provient de la cendre des enveloppes fructifères du palmier à huile. De même, une autre source de potasse est la cendre des épis de maïs ou la cendre du péricarpe de la cabosse de cacaoyer sec, utilisée à la campagne pour faire du savon. Ces cendres traitées à l'eau chaude permettront d'extraire de la potasse de qualité pouvant substituer la soude chimique. Par ailleurs, l'acide chlorhydrique utilisé pour favoriser la précipitation de l'indigo,

pourrait être substitué par les acides organiques provenant des organes de plantes riches en vinaigre ou en acide acétique tout en évitant l'introduction d'autres substances étrangères.

2.3.2.1.2. Etude et discussion des rendements

Hormis le procédé d'extraction par réduction chimique (**ERC**), les méthodes utilisant le reflux, le Soxhlet et les ultrasons ont été exploitées en essayant divers solvants (DCM, acétone, MeOH, DMF) dans le but d'évaluer la technique pouvant extraire, des feuilles de *Philenoptera cyanescens* (**PcF**) et d'*Indigofera tinctoria* (**IdT**), la plus grande quantité d'indigo dans une qualité optimale. A noter que 6 g de matière sèche ont été extraits dans 150 mL de solvant dans les mêmes conditions analytiques que celles de *T. grandis*. Les rendements moyens issus des trois répétitions (\pm écart type) de chaque extraction réalisée sont regroupés dans le tableau II.2.11.

Tableau II.2.11 : Rendements d'extraction des plantes à indigo par divers procédés

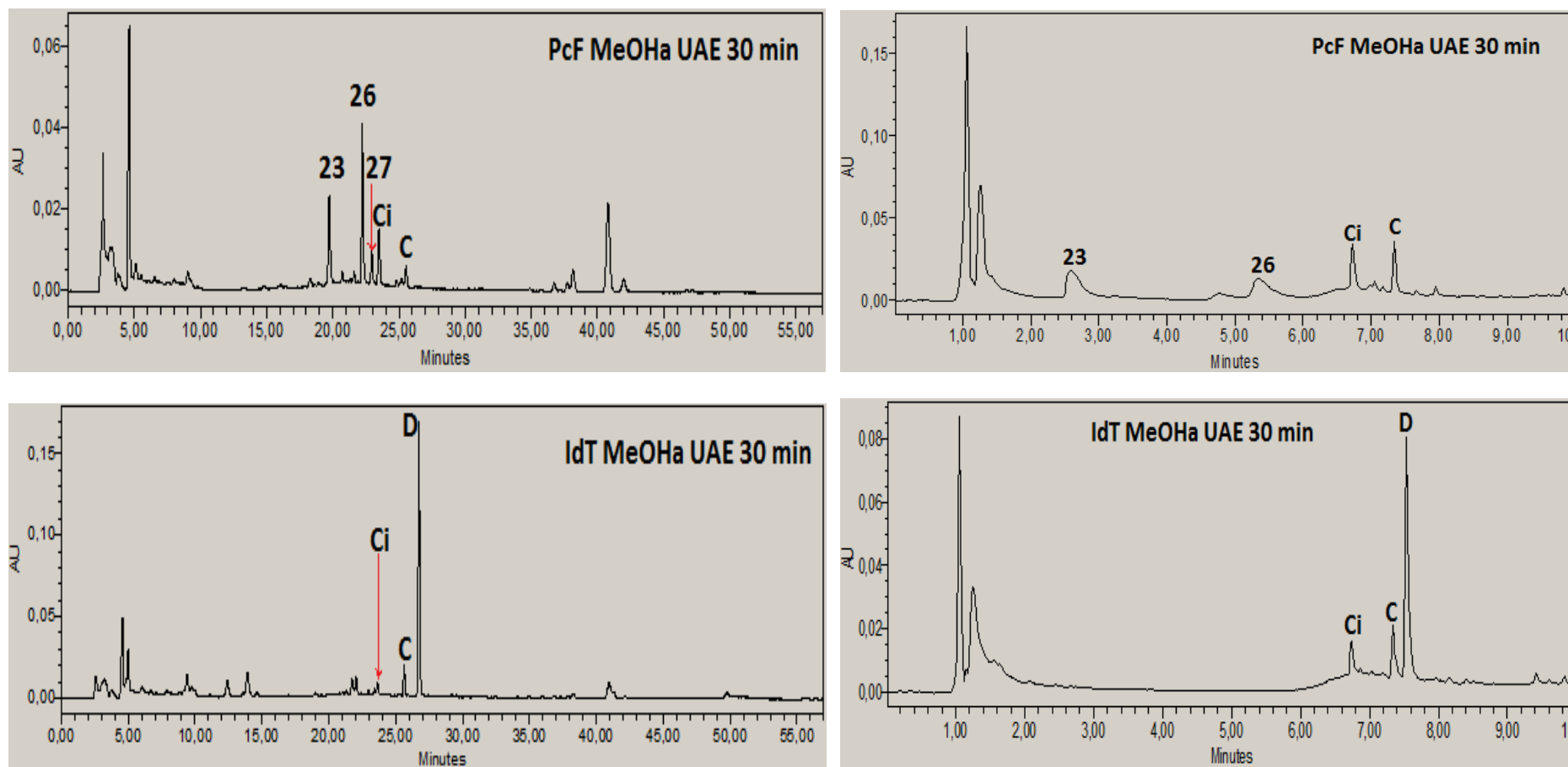
<i>Philenoptera cyanescens</i> (PcF)	Rendement (%)	<i>Indigofera tinctoria</i> (IdT)	Rendement (%)
PcF DCM UAE 5min	13,75 \pm 0,91	IdT DCM UAE 5min	3,69 \pm 0,72
PcF DCM UAE 10min	9,215 \pm 2,38	IdT DCM UAE 10min	6,07 \pm 0,42
PcF DCM UAE 15min	11,41 \pm 1,76	IdT DCM UAE 15 min	6,27 \pm 0,33
PcF DCM UAE 30min	9,54 \pm 1,71	IdT DCM UAE 30min	7,005 \pm 0,16
PcF Acétone UAE 5min	-	IdT Acétone UAE 5min	0,485 \pm 0,09
PcF Acétone UAE 10min	0,835 \pm 0,04	IdT Acétone UAE 10min	2,715 \pm 0,55
PcF Acétone UAE 15min	8,005 \pm 2,25	IdT Acétone UAE 15 min	11,765 \pm 1,26
PcF Acétone UAE 30min	4,9 \pm 0,98	IdT Acétone UAE 30 min	12,19 \pm 1,03
PcF DCM RE 1h	9,52 \pm 0,31	IdT DCM RE 1h	10,67 \pm 2,86
PcF DCM RE 4h	21,85 \pm 5,58	IdT DCM RE 4 h	6,19 \pm 0,84
PcF Acétone RE 1h	12,75 \pm 2,19	IdT Acétone RE 1h	14,23 \pm 1,22
PcF DCM Sox 2h	10,98 \pm 1,59	IdT DCM Sox	8,71 \pm 0,22
PcF Acétone Sox 1h15min	9,95 \pm 3,32	IdT Acétone Sox 1h 15min	7,81 \pm 0,96
PcFMeOHa UAE 30min	14,02 \pm 0,83	IdTMeOHa UAE 30min	11,19 \pm 0,43
PcF2 DCM RE 1h	6,995 \pm 0,02	IdT 2 DCM RE 1 h	8,505 \pm 0,74
PcF ERC	30,69 \pm 2,27	IdT ERC	4,89 \pm 0,3
PcF DMF UAE 10 min	9,46 \pm 0,44	IdT DMF UAE 10 min	7,34 \pm 0,46

On note une grande disparité au niveau des rendements obtenus. Néanmoins, l'extraction par réduction chimique (**ERC**) se démarque par son rendement très élevé ; $30,69 \pm 2,27\%$, au niveau de l'espèce *P. cyanescens* alors qu'il est très faible pour *I. tinctoria* ($4,89\%$). Lorsqu'on compare l'UAE DCM à différents temps chez *P. cyanescens*, on remarque que le rendement moyen le plus important de $13,75 \pm 0,91\%$ est celui pour lequel les feuilles de la liane indigo ont été soumises aux ultrasons pendant 5 min. On remarque en plus que c'est à ce temps d'extraction que la manipulation est la plus reproductible au regard de son écart type $0,91\%$ comparé à ceux obtenus entre 10 et 30 min. Il se peut qu'une exposition trop longue aux ultrasons influe négativement sur les molécules d'indigoïdes contrairement à ce qu'on observe au niveau de *I. tinctoria* où le rendement augmente mais très faiblement. C'est à peu près le même constat qui est effectué avec l'emploi de l'acétone, à la différence que l'augmentation des rendements obtenus cette fois-ci au niveau de **IdT** est relativement élevée par rapport à **PcF** et peut atteindre $12,19 \pm 1,03\%$ après 30 min d'extraction aux ultrasons. De même, quel que soit le solvant utilisé, le rendement d'extraction issu du reflux 1 h est moyennement élevé au niveau de **IdT** comparé à **PcF**. Cependant, après 4 h de reflux mené avec le DCM, les rendements obtenus sont complètement inversés, avec une valeur de $6,19 \pm 0,84\%$ pour **IdT** et $21,85\%$ pour **PcF** avec un écart type assez élevé de $\pm 5,58\%$. Il n'est donc pas utile pour ces plantes de faire une extraction trop longue au reflux, la chaleur influant négativement sur les rendements. Aussi, la méthode UAE conduite au MeOH et au DMF (N,N-diméthylformamide), montre-t-elle des rendements relativement élevés au niveau de **PcF** comparé à **IdT**. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que l'essai d'extraction au reflux DCM réalisée sur des matrices végétales (**PcF2** et **IdT2**) récoltées un an environ après les premières, révèle des rendements dont les valeurs sont abaissées d'environ 2% par rapport aux feuilles normalement utilisées pour cette étude.

2.3.2.2. Caractérisation des composés tinctoriaux des deux espèces à indigo

La caractérisation des composés tinctoriaux extraits des feuilles de *P. cyanescens* et de *I. tinctoria* se traduit par une étude comparative de la composition, de la teneur et de la pureté en molécules tinctoriales présentes dans ces deux espèces. L'analyse CLHP des différents extraits a été effectuée principalement en utilisant le gradient n°2 afférent à la colonne C18 nouvelle génération (Kinetex Core-Shell RP-18, Phenomenex $2,6 \mu\text{m}$; $100 \text{ mm} \times 4,60 \text{ mm}$). Néanmoins, une évaluation des séparations a été réalisée sur l'extrait MeOH UAE en exploitant les deux colonnes évoquées en sous-titre 2. En effet, cette analyse a porté sur

l'extrait méthanolique, non seulement en raison de son rendement moyennement élevé mais surtout parce qu'il pourrait favoriser l'identification des colorants jaunes présents dans ces espèces. Les empreintes chromatographiques issues de cette analyse ont été présentées dans la figure II.2.22.



a) Analyse CLHP via le gradient n°1 :(23: $t_R = 19,90$ min ; 26: $t_R = 22,68$ min ; 27: $t_R = 22,95$ min ; Ci: $t_R = 23,48$ min ; C: $t_R = 25,54$ min ; D: $t_R = 26,74$ min) **b) Analyse CLHP via le gradient n°2:** (23: $t_R = 2,58$ min ; 26: $t_R = 5,34$ min ; Ci : $t_R = 6,76$ min , C: $t_R = 7,33$ min ; D: $t_R = 7,55$ min)

Figure II.2.22 : Chromatogrammes CLHP/ UV-Vis à 350 nm des extraits MeOH UAE de *PcF* et *IdT* sous gradient n°1 (a) et gradient n°2 (b):

L'analyse de la composition en colorants de l'extrait méthanolique des espèces étudiées *via* le gradient n°1 a permis d'identifier quatre colorants dont trois flavonoïdes, la quercétine (**23**), l'isorhamnétine (**26**) et le kaempférol (**27**) et un indigoïde : l'indigotine (**C**) au niveau de l'espèce **PcF**. Par contre, on note une absence totale de ces trois flavonoïdes au niveau de l'espèce **IdT**. Cependant, deux indigoïdes, l'indigotine (**C**) et l'indirubine (**D**), ont pu être identifiés au niveau de cette dernière. En outre, les deux espèces présentent en commun, hormis l'indigotine, un composé **Ci** qui n'a pu être identifié. L'exploitation de la colonne C18 nouvelle génération Kinetex *via* le gradient n°2, fournit des résultats similaires à ceux issus du gradient n°1, avec comme avantage, une réduction considérable de la durée d'analyse. Néanmoins, le kaempférol, n'a pu être identifié dans l'extrait **PcF MeOHa UAE** comparé aux résultats obtenus précédemment avec l'emploi du gradient n°1. Il se peut qu'en raison de cette courte durée d'analyse, des interactions électrostatiques concurrentielles entre l'isorhamnétine et le kaempférol dont les temps de rétention sont très proches, soient en faveur du composé le plus concentré. Par ailleurs, un criblage par l'identification des colorants de chaque extrait de *P. cyanescens* et de *I. tinctoria*, a été effectué en CLHP/UV-Vis. En effet, cette démarche s'inscrit dans l'objectif de purifier l'indirubine à partir d'extrait qui présenterait une forte concentration en ce colorant, par simple estimation des aires relatives des colorants à l'UV 285 nm. On reviendra de façon plus détaillée sur cette estimation, dans la différenciation des deux espèces par le rapport de leur proportion relative en indigoïdes. Les principaux résultats présentés concernent la composition des extraits **DCM RE 1h**, **acétone RE 1h** et **ERC** des deux espèces **PcF** et **IdT** (**Figure II.2.23**).

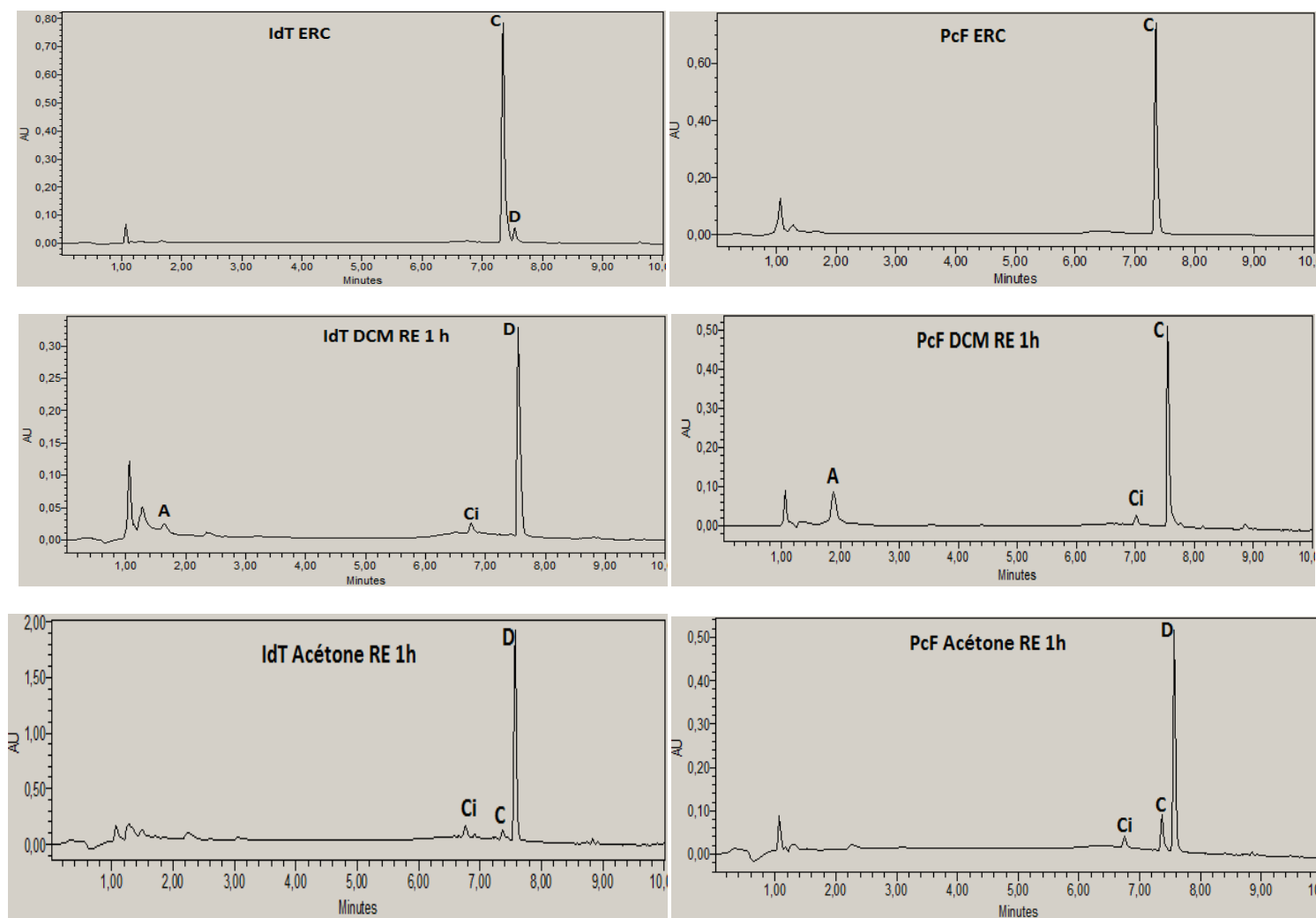


Figure II.2.23 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 285 nm des extraits *ERC*, *DCM RE 1h* et *acétone RE 1h* des espèces *PcF* et *IdT*

Il ressort des résultats présentés que, tous les extraits, contiennent de l'indigotine (**C**: $t_R=7,43$ min) hormis l'extrait **IdT DCM RE 1h**. Inversement, l'extrait **PcF DCM RE 1h** ne contient pas de l'indirubine (**D**: $t_R=7,55$ min) de même que l'extrait **PcF ERC**, tandis que les autres en contiennent. Ainsi, peut-on dire que l'extraction menée au reflux durant 1 h avec le dichlorométhane permet d'extraire sélectivement l'indigotine de *P. cyanescens* et l'indirubine d'*I. tinctoria*. En outre, ce procédé permet d'extraire l'isatine (**A**: $t_R=1,68$ min) des deux espèces ainsi qu'un autre composé **Ci** ($t_R=6,76$ min) qui n'a pu être identifié. Par ailleurs, les extraits **PcF acétone RE1h** et **IdT acétone RE 1h** contiennent pratiquement les mêmes colorants (**Ci**, **indigotine** et **indirubine**). Toutefois, on note que l'indirubine est nettement plus concentrée dans les deux extraits que l'indigotine. Cette technique utilisant l'acétone au reflux favorise donc l'extraction spécifique de l'indirubine des espèces étudiées. Il est également intéressant de noter que l'extraction par réduction chimique de l'espèce **PcF** fournit de l'indigotine apparemment à l'état pur. Au regard de ces analyses, il convient de purifier l'indirubine soit à partir de l'extrait **IdT DCM RE 1h** ou celui de **IdT acétone RE 1h**. Toutefois, il faut mentionner que le rendement de ce dernier est relativement élevé comparé à celui de l'extrait **IdT DCM RE 1h**. Il serait plus judicieux d'exploiter l'extrait **IdT Acétone RE** lors de cette purification.

2.3.2.2.1. Fractionnement et purification des molécules cibles

La purification des indigoïdes notamment celle de l'indirubine a été effectuée *via* le fractionnement au combiflash. Pour identifier le système d'éluant favorable à la séparation de ces colorants, un criblage préliminaire par CCM des extraits a été réalisé (**Figure II.2.24**).

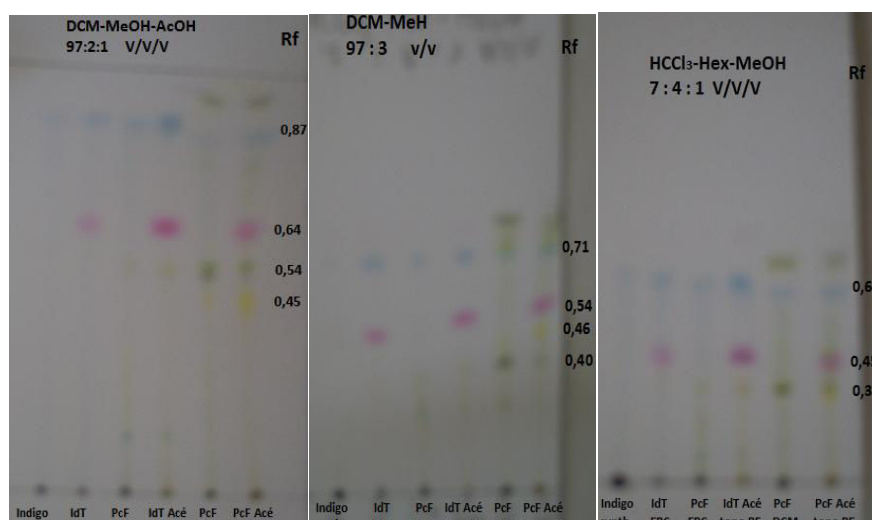


Figure II.2.24 : Empreintes CCM en colorants des différents extraits, développés par divers systèmes d'éluant et lus à la lumière visible.

Il peut être remarqué que, les trois conditions de séparation appliquées offrent une séparation acceptable entre le colorant bleu (indigotine) et le rouge fuchsia (indirubine) dont on ne dispose pas de témoin. La meilleure séparation des colorants provient du système d'éluant DCM-MeOH-AcOH (97:2:1, v/v/v) exploité par Margot *et al.* (2008) avec un rapport frontal ($R_f = 0,86$) en indigotine similaire à celui trouvé dans cette étude (0,87). Bien que le système d'éluant $\text{HCCl}_3\text{-Hex-MeOH}$ (7:4:1, v/v/v) employé, n'offre pas la même qualité de séparation comparé au précédent, les R_f en indigotine (0,69) et en indirubine (0,45) corroborent les travaux de Chanayath *et al.* (2002). Par ailleurs, on note que l'éluant DCM-MeOH (97: 3 v/v), testé dans sa simplicité pour contourner le système d'éluant à trois solvants, -fournit un résultat plus satisfaisant à cette séparation, comparé au précédent. Par conséquent, il sera appliqué en mode isocratique pour le fractionnement au combiflash de l'extrait **IdT Acétone RE 1h** en vue de la purification de l'indirubine, dont la procédure utilisée est récapitulée dans la figure II.2.25.

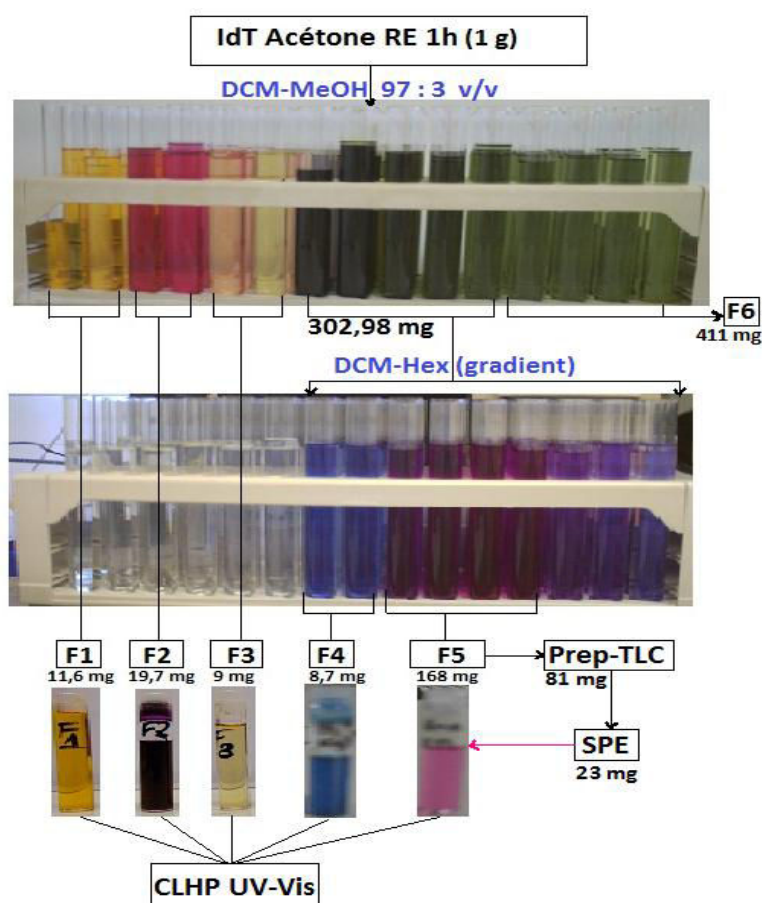


Figure II.2.25 : Schéma récapitulatif du fractionnement des colorants de *I. tinctoria* au combiflash et de purification de l'indirubine

Bien qu'aucun standard flavonoïdique exploité n'a pu être identifié dans les extraits bruts d'*indigofera tinctoria* analysés par CLHP, le fractionnement au combiflash a montré cependant, que cette espèce renferme des colorants jaunes, rouge-violet, orangés et naturellement des colorants bleus et roses. A noter que la fraction **F₅** contenant l'indirubine a nécessité un passage complémentaire sur plaque CCM préparative et sur colonne SPE avant d'être caractérisée par CLHP et RMN ; la fraction **F₄**, par contre, a été directement caractérisée par IRTF, tandis que les fractions **F₁**, **F₂** et **F₃** ont été analysées par CLHP et disposées sous forme d'empreintes.

2.3.2.2.2. Identification des molécules cibles des deux espèces et empreintes chromatographiques des fractions

La signature de l'indigo en spectroscopie infrarouge étant bien connue, la caractérisation de l'indigotine issue du fractionnement en flash chromatographie a consisté à vérifier l'analogie chimique entre ces deux composés. La superposition du spectre IRTF de l'indigotine purifiée (**F₄**) à celui de l'indigo synthétique révèle une similitude parfaite entre les deux produits ainsi que leur pureté (**Figure II.2.26**).

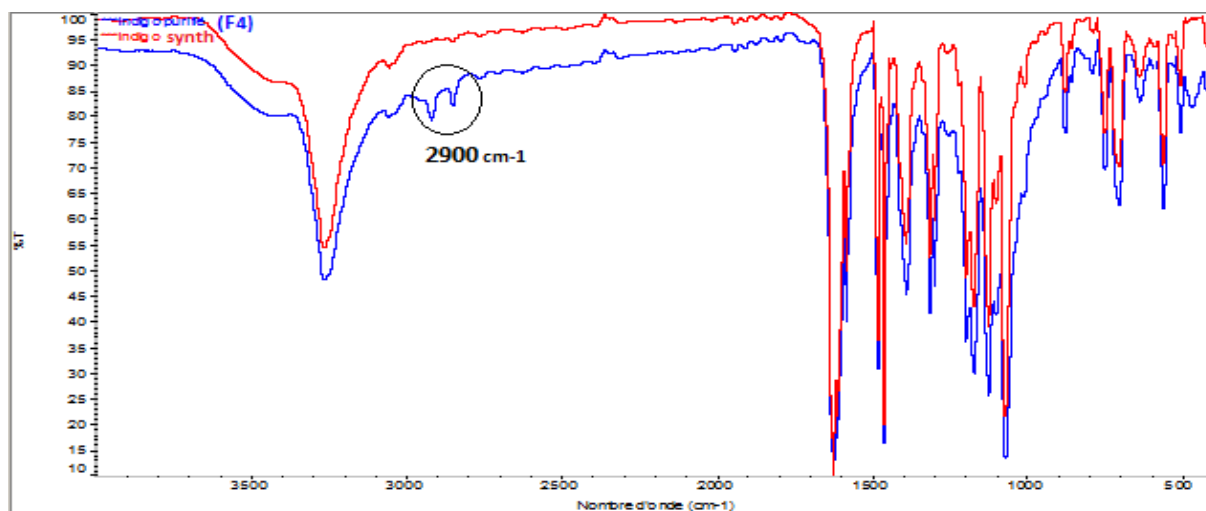


Figure II.2.26 : Comparaison des spectres IRTF de l'indigo synthétique et de l'indigotine (**F₄**) purifiée.

La bande d'absorption à 2900 cm^{-1} environ, présente sur le spectre de l'indigo purifié contrairement au spectre du témoin (indigo synthétique), serait due à une contamination par de traces d'éluant résiduel persistantes dans le composé pur obtenu. Cependant, la similitude entre les deux indigos s'exprime autant dans les intensités que dans les largeurs des bandes. Ainsi, la spectroscopie IR apparaît comme une preuve suffisante de confirmation de l'identité indigotine de la fraction **F₄** examinée. Ce résultat rappelle celui de l'indigotine dérivée de

l'extraction par réduction chimique de l'espèce *P. cyanescens*. En effet, cette molécule obtenue par précipitation en milieu acide se révèle pure. C'est du moins ce qu'a montré l'analyse des cristaux bleus (**PcF ERC**) obtenus par CLHP (**Cf Figure II.2.23**). La pureté de l'indigo obtenu par sédimentation en milieu acide a été d'ailleurs prouvée par les travaux antérieurs (Stoker *et al.*, 1998 ; Bechtold *et al.*, 2002). Par ailleurs, la fraction **F₁** doit sa coloration à un colorant jaune (**F**: $t_R = 9,32$ min) dont l'empreinte UV-Vis présente un aspect tout particulier (**Figure II.2.27**).

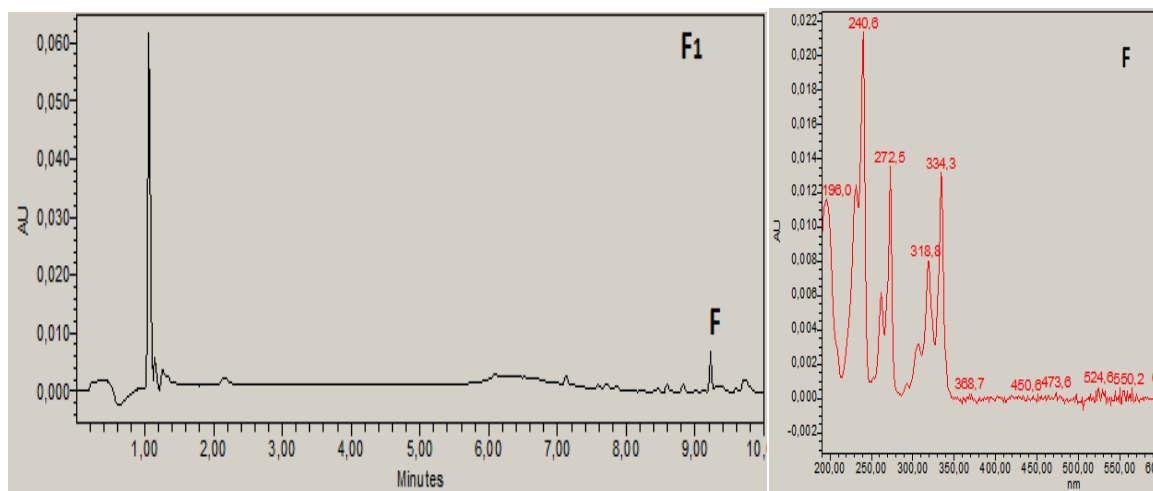


Figure II.2.27: Empreinte chromatographique et spectre UV-Vis du colorant jaune de la fraction **F₁**

En outre, la couleur pourpre de la fraction **F₂** résulte d'un ensemble de composés: **E**: $t_R = 2,68$ min ; **Ci**: $t_R = 6,72$ min et **Cii**: $t_R = 9,65$ min que renferme cette fraction (**Figure II.2.28**).

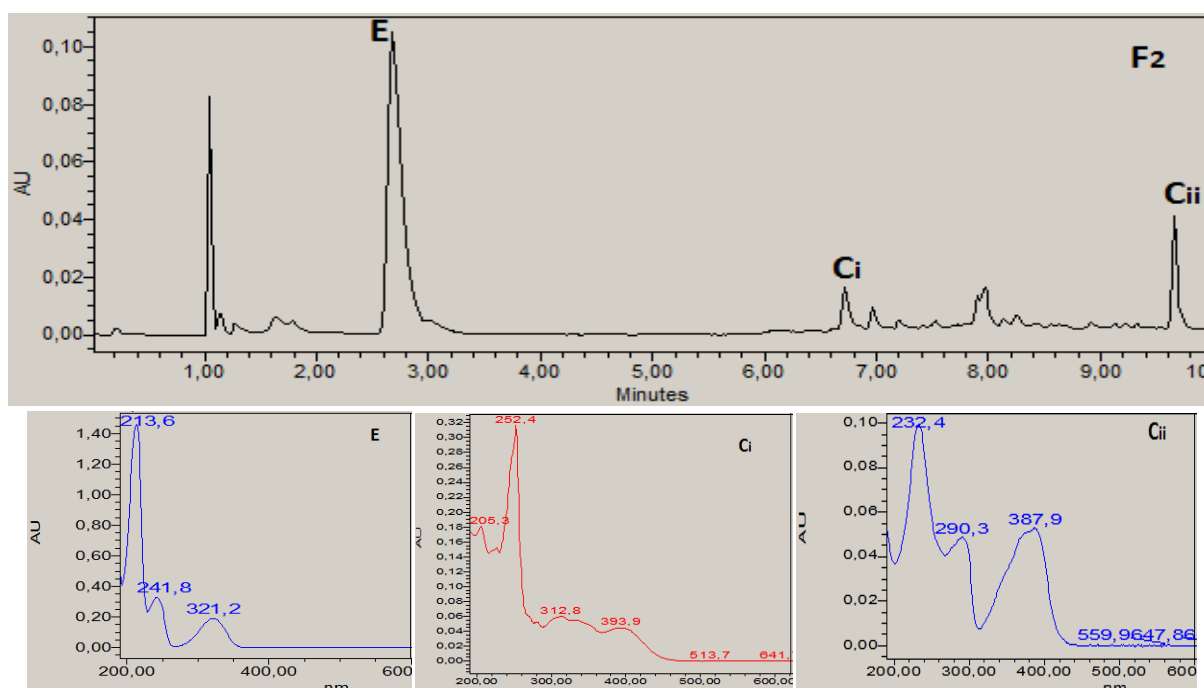


Figure II.2.28 : Empreinte chromatographique et spectres UV-Vis des colorants de la fraction **F₂**

Par ailleurs, la purification de l'indirubine a été réalisée en vue de disposer de standard pour la quantification de cet indigoïde dans les deux espèces de plantes à indigo étudiées. Ainsi, l'identification de ce composé au cours du processus de purification, a été guidée essentiellement par sa couleur rouge fuchsia (ou rose) qui suit directement celle d'indigotine, étant donné qu'une coloration similaire (**F**₂) précédant l'indigotine a été observée lors du fractionnement au combiflash ou par CCM éventuellement. Cependant, l'indirubine se différencie nettement par son absorption dans le visible à 545 nm, ce qui n'a pas été le cas des composés détectés dans la fraction **F**₂. Le profil chromatographique et le spectre UV-Vis issu de l'analyse par CLHP, ainsi que la CCM de l'indirubine purifiée est présenté dans la figure II.2.29.

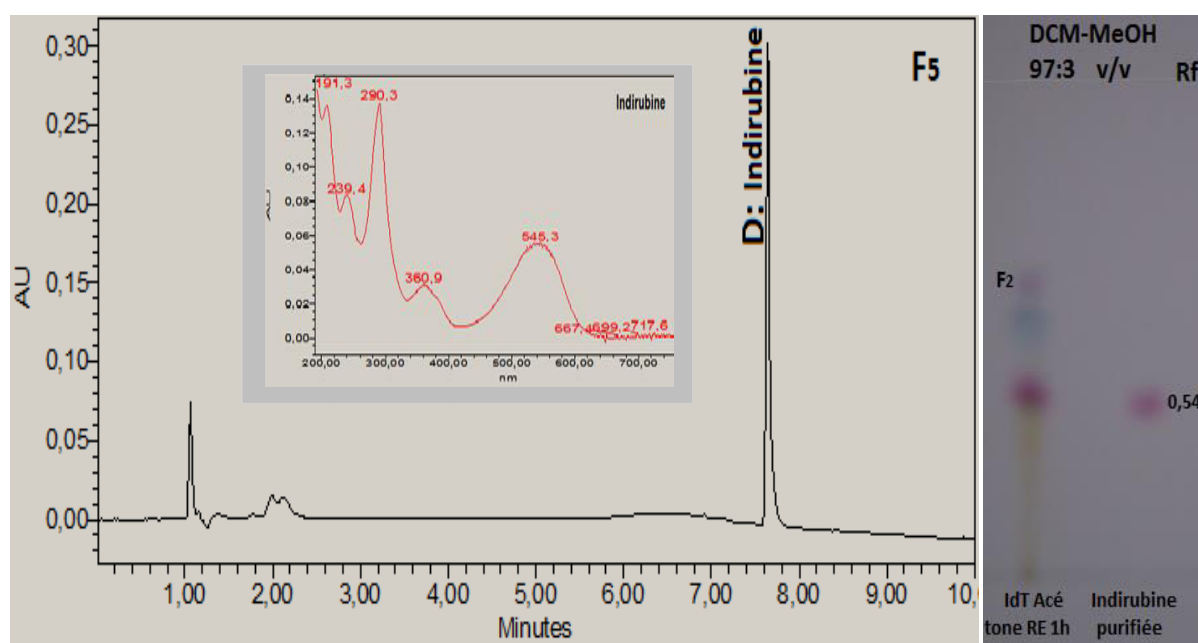


Figure II.2.29 : Chromatogramme CLHP UV-Vis et CCM sous lumière visible de l'indirubine purifiée (**F**₅)

La caractérisation en IR des fréquences vibrationnelles des liaisons rattachées aux grands groupes fonctionnels de l'indirubine a été réalisée conjointement avec celle de l'indigotine au niveau de l'étude des molécules du standard. La confirmation structurale du colorant purifié est effectuée par spectroscopie RMN ¹H et COSY(¹H-¹H) (**Annexe 2**). Les résultats des déplacements chimiques des protons à travers un couplage homonucléaire ¹H sont donnés en ppm par rapport au pic de solvant résiduel (CDCl₃).

Tableau II.2.12 : Déplacement chimique (ppm) des protons issus de la RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du colorant rouge fuchsia (indirubine) purifié

N° du pic	Position du proton ^1H	Déplacement chimique δ (ppm)	Type de proton et couplage	Structure de l'indirubine
1	H-6	8,57	1H,d	
2	H-8'	8,38	1H,d	
3	H-5'	7,97	1H,d	
4	H-9	7,85	1H,d	
5	H-6'	7,80	1H,t	
6	H-7	7,76	1H,t	
7	H-7'	7,60	1H,t	
8	H-8	7,37	1H,t	

Les données RMN ^1H du colorant purifié décrivent quatre signaux à δ_{H} 8,57 ppm, 8,38 ppm, 7,97 ppm et 7,885 ppm tous 1H correspondant aux protons aromatiques 6, 8', 5' et 9 et apparaissant tous sous forme d'un doublet du fait d'un couplage vicinal respectivement par rapport aux protons aromatiques 7 (7,76 ppm), 7' (7,60 ppm), 6' (7,80 ppm) et 8 (7,37ppm) tous 1H, qui apparaissent à leur tour sous forme de triplet par couplage vicinal entre les deux protons en méta, respectivement 6 et 8 ; 6' et 8' ; 5' et 7' et 7 et 9. En effet, ces données traduisent vraisemblablement la structure de l'indirubine, un indigoïde rouge fuchsia présent dans les plantes étudiées.

2.3.2.2.3. Conclusion

L'étude chimique des plantes à indigo; *P. cyanescens* et *I. tinctoria*, repose sur la mise au point d'une méthode d'extraction par réduction chimique comparée aux procédés utilisant les solvants organiques classiques, ainsi que sur l'emploi des méthodes de séparation et de caractérisation des colorants extraits par fractionnement au combiflash, par CCM, CLHP et par RMN ^1H dans l'objectif d'une étude comparative de la composition chimique des deux espèces. Cette étude a permis de montrer que l'ERC est plus adaptée à l'extraction de l'indigotine de *P. cyanescens* alors que l'acétone favorise l'extraction de l'indirubine de *I. tinctoria*. Par ailleurs, le DCM permet d'extraire sélectivement l'indigotine de PcF et l'indirubine de IdT. Quant à l'analyse par CLHP/UV-Vis, elle a permis d'identifier des colorants tels que l'isatine, l'indigotine, l'indirubine et un composé **Ci** communs aux deux

espèces. En outre, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol ont été identifiées dans l'espèce *P. cyanescens* tandis que le colorant jaune présent dans l'espèce *I. tinctoria* n'a pu être identifié. Néanmoins son spectre UV-Vis présente un aspect très particulier. Enfin les données issues de la caractérisation par RMN ^1H et COSY (^1H - ^1H) sont assez suffisantes pour la confirmation structurale de l'indirubine purifiée en vue de son dosage dans les deux espèces étudiées.

2.3.2.3. Quantification

De par leur présence, les composés isatine, indigotine et indirubine ne peuvent pas distinguer les espèces PcF et IdT, contrairement aux flavonoïdes quercétine, isorhamnétine et kaempférol qui caractérisent l'espèce PcF. Cette considération reste valable à l'étape caractérisation intrinsèque des plantes, puisque, les flavonoïdes sont assez sensibles et peuvent disparaître en fonction du procédé d'extraction ou à l'usage, dès que ces plantes sont appliquées à des objets artisanaux ou artistiques comparativement aux indigoïdes. Ainsi, il est envisagé qu'une quantification des indigoïdes ainsi que celle de l'isatine, un marqueur de dégradation des deux indigoïdes, pourra contribuer à la différenciation des deux espèces de plantes à indigo étudiées.

2.3.2.3.1. Préparation des solutions du standard et de la gamme d'étalon

Le dosage des trois composés présents dans les deux espèces, a été effectué par calibration externe. Ces composés ont été préparés en les solubilisant dans le DMSO 99,9% et dilués à cinq voir huit concentrations différentes. Une partie des solutions diluées (10 μL) a été injectée en CLHP/UV-Vis. Chaque analyse est répétée six fois et permet d'établir par régression linéaire la courbe d'étalonnage de chaque standard à partir de l'aire moyenne issue du pic correspondant sur le chromatogramme à sa longueur d'absorption maximale (608 nm pour l'indigotine; 540 nm pour l'indirubine et 300 nm pour l'isatine). La courbe d'étalonnage pour chaque standard a donc pu être tracée afin de déterminer son équation et son coefficient de détermination (R^2). Enfin, la limite de détection (LD) ainsi que la limite de quantification (LQ) ont pu être calculées (**Tableau II.2.13**).

Tableau II.2.13 : Données de régression linéaire, limite de détection et limite de quantification pour les composés étudiés

Composés	Equation	Gamme de concentration (mg/L)	R^2	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Indigotine	$y = 25561x + 43573$	1-120	0,996	1,10	7,65
Indirubine	$y = 10931x + 6173$	8-40	0,995	0,18	1,42
Isatine	$y = 13556x + 41848$	5-150	0,998	0,98	8,15

2.3.2.3.2. Détermination de la teneur en indigoïdes et en isatine des extraits

Les teneurs en composés standards ont été déterminées au sein des deux espèces étudiées. Pour ce faire, les valeurs des aires de pic du composé présent dans l'extrait ont été reportées sur les courbes d'étalonnage précédemment déterminées. En effet, 0,5 mg/mL de chaque extrait préparé à partir du DMSO a été injecté en CLHP. Pour chaque échantillon, trois analyses ont été réalisées. La teneur en pourcentage de chaque composé standard présent dans les différents extraits de plantes a pu ainsi être calculée (**Tableau II.2.14**).

Tableau II.2.14 : Teneur (%) en indigoïdes et en isatine des différents extraits des deux espèces étudiées (*Philenoptera cyanescens* et *Indigofera tinctoria*)

- *Philenoptera cyanescens* (PcF)

<i>Philenoptera cyanescens</i> (PcF)	Teneur en indigotine (%)	Teneur en indirubine (%)	Teneur en isatine (%)
PcF DCM UAE 5min	17,03 ± 0,311	- ^a	0,645 ± 0,132
PcF DCM UAE 10min	20,31 ± 1,046	-	0,1025 ± 0,002
PcF DCM UAE 15min	18,66 ± 2,354	-	0,48 ± 0,014
PcF DCM UAE 30min	16,34 ± 1,407	-	1,005 ± 0,063
PcF Acétone UAE 5min	1,25 ± 0,002	-	-
PcF Acétone UAE 10min	1,31 ± 0,042	-	-
PcF Acétone UAE 15min	1,38 ± 0,014	-	-
PcF Acétone UAE 30min	1,38 ± 0,021	-	-
PcF DCM RE 1h	28,97 ± 0,098	-	1,05 ± 0,417
PcF DCM RE 4h	1,26 ± 0,007	0,68 ± 0,014	+
PcF Acétone RE 1h	0,51 ± 0,006	0,638±0,002	0,97 ± 0,014
PcF DCM Sox 2h	4,08 ± 0,021	0,205 ± 0,007	-
PcF Acétone Sox 1h15min	0,08 ± 0,002	0,34 ± 0,014	-
PcF MeOH UAE 30min	8,19 ± 0,021	-	0,0625 ± 0,002
PcF2 DCM RE 1h	29,24 ± 0,424	-	0,0445 ± 0,001
PcF DMSO UAE 5min	9,14 ± 0,077	-	0,0585 ± 0,002
PcFERC	17,17 ± 0,094	-	-
PcF DMF UAE 10 min	7,25 ± 0,035	-	-

- *Indigofera tinctoria* (IdT)

<i>Indigofera tinctoria</i> (IdT)	Teneur en indigotine (%)	Teneur en indirubine (%)	Teneur en isatine (%)
IdT DCM UAE 5min	0,0023 ± 0	1,33 ± 0,028	- ^a
IdT DCM UAE 10min	0,216 ± 0,008	1,37 ± 0,007	-
IdT DCM UAE 15 min	+ ^b	1,26 ± 0,014	-
IdT DCM UAE 30min	0,106 ± 0,007	1,35 ± 0,049	-
IdT Acétone UAE 5min	+	0,56 ± 0	-
IdT Acétone UAE 10min	0,051 ± 0,002	0,646 ± 0,008	-
IdT Acétone UAE 15min	0,125 ± 0,007	0,684 ± 0,005	-
IdT Acétone UAE 30min	0,45 ± 0,106	1,012 ± 0,017	-
IdT DCM RE 1h	-	13,3 ± 0,021	1,78 ± 0,070
IdT DCM RE 4 h	0,735 ± 0,007	10,5 ± 0,042	-
IdT Acétone RE 1h	0,44 ± 0,007	28,74 ± 0,014	-
IdT DCM Sox 2h	0,725 ± 0,007	18,17 ± 0,084	-
IdT Acétone Sox 1h 15 min	5,04 ± 0,007	31,83 ± 0,268	-
IdTMeOH UAE 30min	0,525 ± 0,021	8,579 ± 0,057	-
IdT 2 DCM RE 1 h	-	8,61 ± 0,042	1,02 ± 0,028
IdT DMSO UAE 5min	0,09 ± 0,015	0,813 ± 0,009	-
IdTERC	11,98 ± 0,134	1,115 ± 0,035	-
IdT DMF UAE 10 min	0,19 ± 0,021	1,165 ± 0,035	-

^a Non détecté

^b Sous limite de quantification

Les résultats montrent que la quantité des indigoïdes varie fortement en fonction des extraits et des espèces. En effet, l'indigotine présente des teneurs différentes en fonction de l'espèce. Ces valeurs s'étendent de 0,08 à 29,24% pour PcF et de 0,051 à 5,04% pour IdT et exceptionnellement 11,98% pour l'extraction par réduction chimique de IdT, tandis que la teneur en indirubine varie de 0,205 à 0,68% pour PcF et de 0,56 à 31,83% pour IdT. Par

contre la teneur en isatine des extraits des deux espèces est très faible et varie très peu (0,04 à 1,78%). Ainsi donc, la plus grande teneur en indigotine 29,24% \pm 0,04 est issue de l'espèce PcF (**PcF DCM RE 1h**), alors que celle de l'indirubine 31,83% \pm 0,27% provient de l'espèce IdT. On peut également noter que la teneur en indigotine et en indirubine dépend du procédé et du solvant d'extraction exploités. En ce qui concerne les extraits de PcF, les teneurs en indigotine varient entre 16,34 et 20,31% pour l'extraction conduites aux ultrasons (UAE) avec le DCM entre 5 et 30 min alors qu'elles sont très faibles avec celle issue des ultrasons à l'acétone ainsi qu'avec celle menée au RE Acétone. De même, qu'elle soit conduite au DCM ou à l'acétone, les teneurs en indirubine des extraits IdT sont très faibles par extraction aux ultrasons mais très élevées par extraction au reflux et au soxhlet conduite au DCM ou à l'acétone. La plus forte teneur en indirubine 31,83 \pm 0,27% étant celle de l'extrait IdT Acétone Sox suivi de près par l'extrait IdT Acétone RE (28,74 \pm 0,01). En outre, les procédés d'extraction conduits aux ultrasons avec les solvants MeOH, DMSO et DMF fournissent une teneur en indigotine moyennement élevée au niveau de l'espèce PcF comparativement à l'espèce IdT où les teneurs en indirubine issues de ces procédés sont faibles. A noter que, l'isatine représentant aussi bien un précurseur de biosynthèse de l'indirubine qu'un marqueur de dégradation des deux indigoïdes dosés, est en très faible quantité dans les extraits ; on remarque également qu'une augmentation de sa teneur entraîne une diminution de celle de l'indigotine. C'est du moins ce qui est constaté au niveau des extraits PcF UAE DCM entre 5 et 30 min. Cette fluctuation postérieure à l'extraction serait liée à une dégradation de l'indigotine due aux ultrasons. Devant la richesse des résultats, une figure récapitulative sous forme d'histogrammes traduit la proportion de chaque standard dans les différents extraits dosés (**Figure II.2.30**).

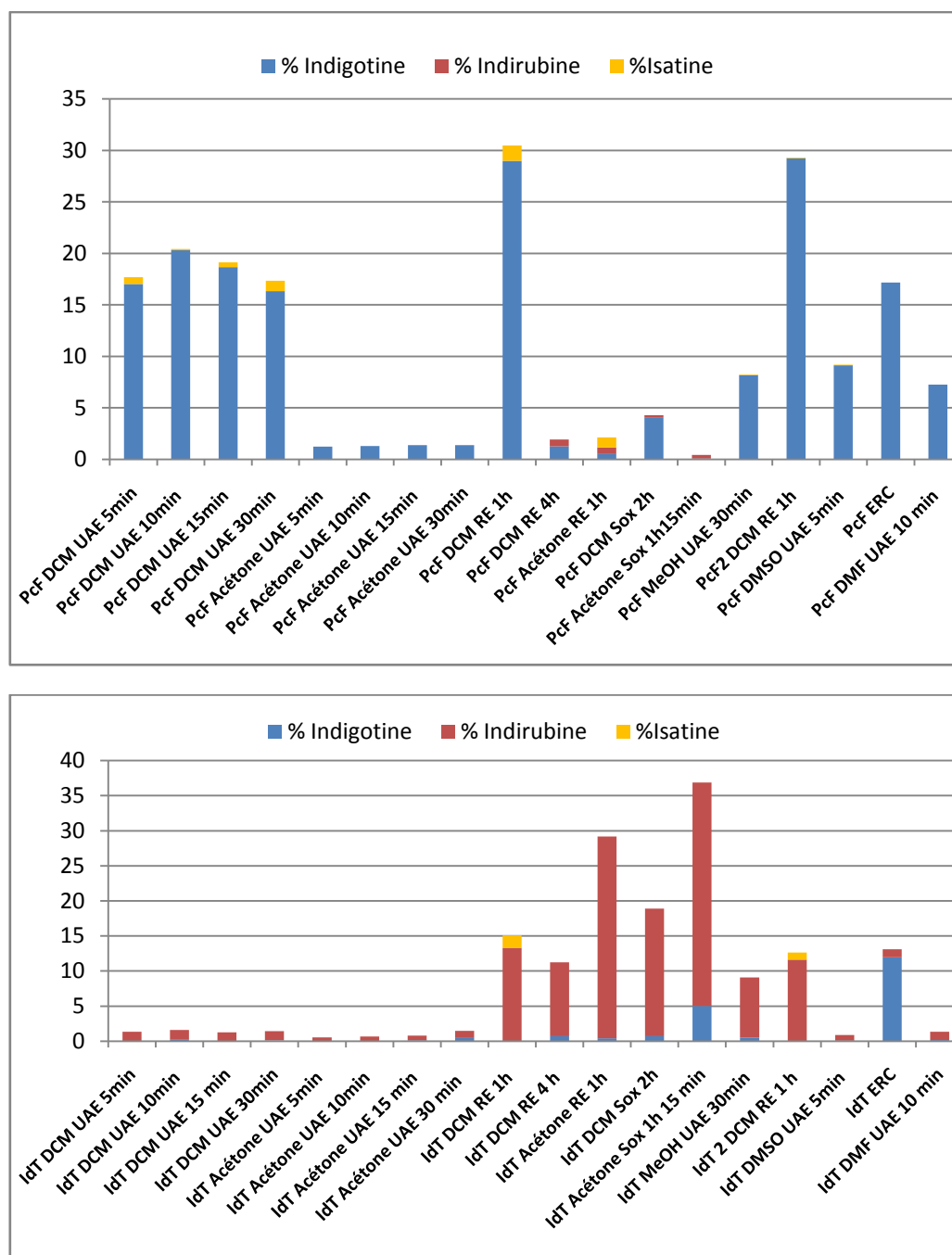


Figure II.2.30 : Analyse comparative de la teneur en indigoïdes et en isatine en fonction des différents extraits de *P. cyanescens* et d'*I. tinctoria*

Il ressort de cette figure que, le procédé d'extraction par réduction chimique permet d'extraire spécifiquement l'indigotine des deux espèces avec une teneur de PcF ($17,17 \pm 0,09\%$) moyennement élevée comparativement à celle de IdT ($11,98 \pm 0,02\%$), contrairement aux techniques utilisant les solvants organiques. Au niveau de ces dernières, on constate que la teneur en indigotine est en faveur de PcF alors que celle d'indirubine est en faveur de IdT. Aussi peut-on mentionner que la teneur en indigotine varie très peu entre PcF et PcF2 récoltée un an après. Il en est de même pour la teneur en indirubine entre IdT et IdT2.

2.3.2.3.3. Conclusion

La quantification des indigoïdes et de l'isatine dans les différents extraits de plantes étudiées permet de noter de façon globale, que l'espèce *P. cyanescens* est plus riche en indigotine qu'en indirubine et inversement l'espèce *I. tinctoria* est plus riche en indirubine qu'en indigotine et que la teneur en indigoïdes et en isatine des différents extraits dépend du procédé d'extraction exploité. En effet, l'extraction d'une quantité importante d'indigotine de l'espèce *P. cyanescens* provient du procédé conduit au reflux avec le dichlorométhane pendant une heure. Par contre, l'acétone ne favorise pas l'extraction de l'indigotine. Cependant, il est le solvant le plus adapté à l'extraction de l'indirubine par la technique utilisant le Soxhlet ou le reflux. Par ailleurs, les ultrasons ne favorisent pas l'extraction de l'indirubine ; néanmoins, on peut l'utiliser avec le DCM en courte durée (10-15 min) pour extraire l'indigotine de *P. cyanescens*. En outre, la meilleure méthode d'extraire l'indigotine de *I. tinctoria* n'est pas celle qui utilise les solvants organiques mais plutôt celle conduite par réduction chimique qui correspond à une recette améliorée du protocole traditionnellement utilisé au niveau des cuves à indigo. Bien que son pourcentage soit assez faible par rapport à celle conduite par le DCM RE 1h, ce protocole permet également d'extraire une grande quantité d'indigotine et de qualité pure de l'espèce *P. cyanescens*. C'est ce qui justifie d'ailleurs l'utilisation de la technique de cuve à indigo aussi bien pour l'espèce *P. cyanescens* que pour *I. tinctoria* malgré que cette dernière fournisse une teneur assez faible en indigotine.

2.3.2.4. Paramètres d'application et de différenciation des deux espèces à indigo

2.3.2.4.1. Dégradation photochimique des extraits

Il ne s'agit pas d'une étude exhaustive de la dégradation photocatalytique des indigoïdes. Cette analyse résulte plutôt d'un simple constat effectué après un mois d'exposition à la lumière d'un vial contenant un extrait d'*I. tinctoria* obtenu par réduction chimique (IdT ERC). En effet, il a été remarqué physiquement une régression de la coloration bleue d'origine. C'est ainsi que le vial a été réintroduit dans le passeur automatique puis l'extrait réinjecté tel quel en CLHP. Ensuite il a été réinjecté une fois encore après deux mois d'exposition. En effet, la connaissance des marqueurs de dégradation des indigoïdes ou de leurs empreintes, présente un intérêt majeur en prévision à la caractérisation des échantillons muséaux anciens et naturellement vieillis. Ainsi, les résultats issus de ces essais ont été présentés dans la figure II.2.31

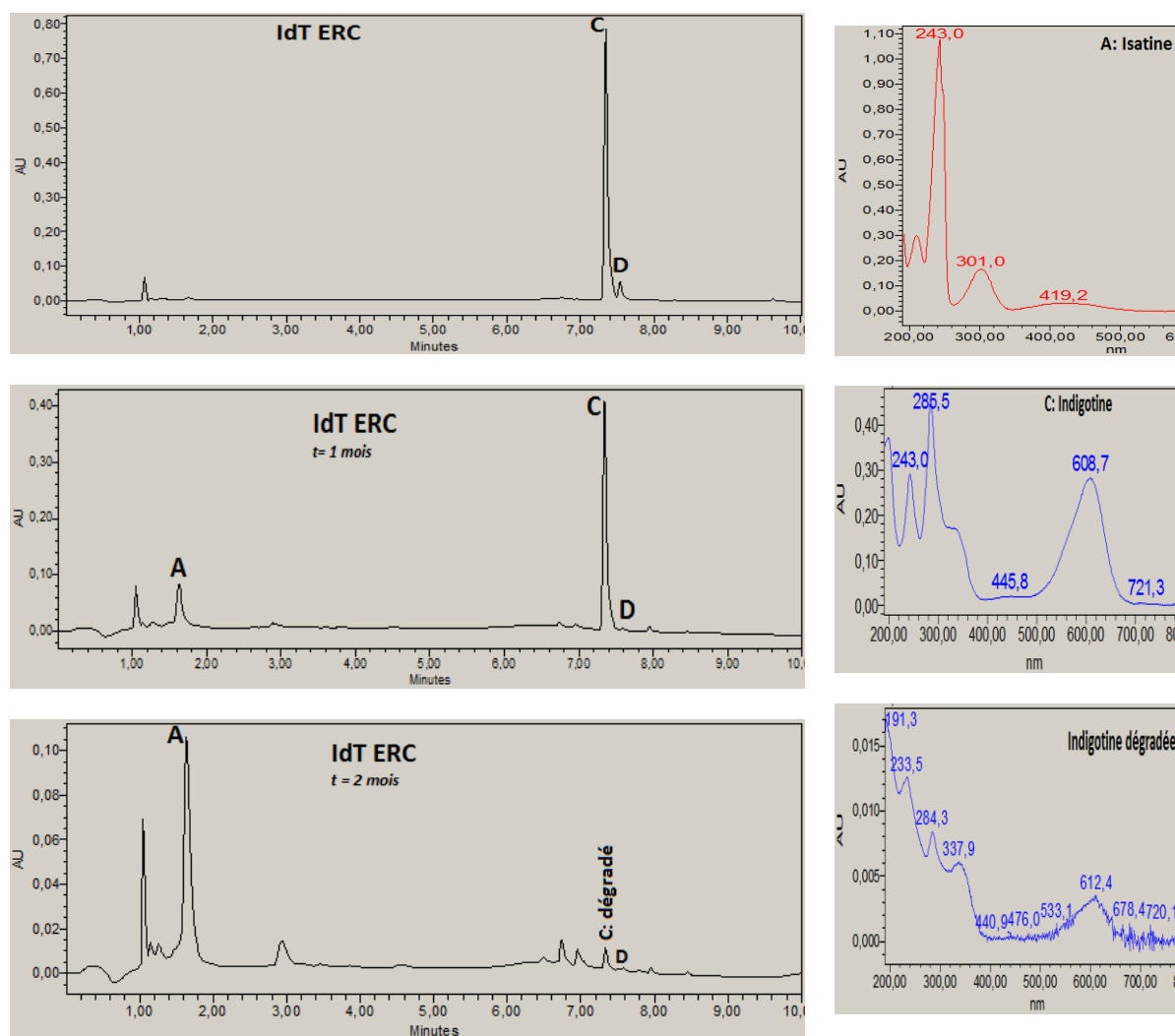


Figure II.2.31 : Chromatogrammes CLHP et spectres UV-Vis à 285 nm des solutions de IdT ERC avant et après 1 et 2 mois d'exposition à la lumière

En admettant que le solvant utilisé (DMSO), n'influence pas les résultats obtenus; on note une apparition de l'isatine au niveau de l'extrait IdT ERC au bout d'un mois d'exposition à la lumière. Ensuite sa teneur augmente au détriment de celle des indigoïdes en fonction du temps d'exposition. On remarque au bout de 2 mois une disparition totale de l'indirubine et l'indigotine subsiste sous forme de trace avec un spectre UV-Vis très particulier traduisant une dégradation de la molécule (**indigotine dégradée**). Du point de vue chimique, l'isatine est formée à partir de la rupture oxydative de la liaison éthylénique reliant les deux noyaux indoliques. Cette rupture serait également influencée par les liaisons hydrogène intramoléculaires des indigoïdes. Elle serait d'autant plus difficile que la molécule établisse des liaisons hydrogène intramoléculaires. En effet, la persistance de l'indigotine à la dégradation dans le temps serait liée à sa capacité d'établir deux liaisons hydrogène intramoléculaires. En outre, cette dégradation pourrait se poursuivre jusqu'à la formation de

l'acide anthranilique (Vautier *et al.*, 2001). Dans ce cas, ce dernier est obtenu par l'ouverture de l'hétérocycle de l'isatine (Figure II.2.32).

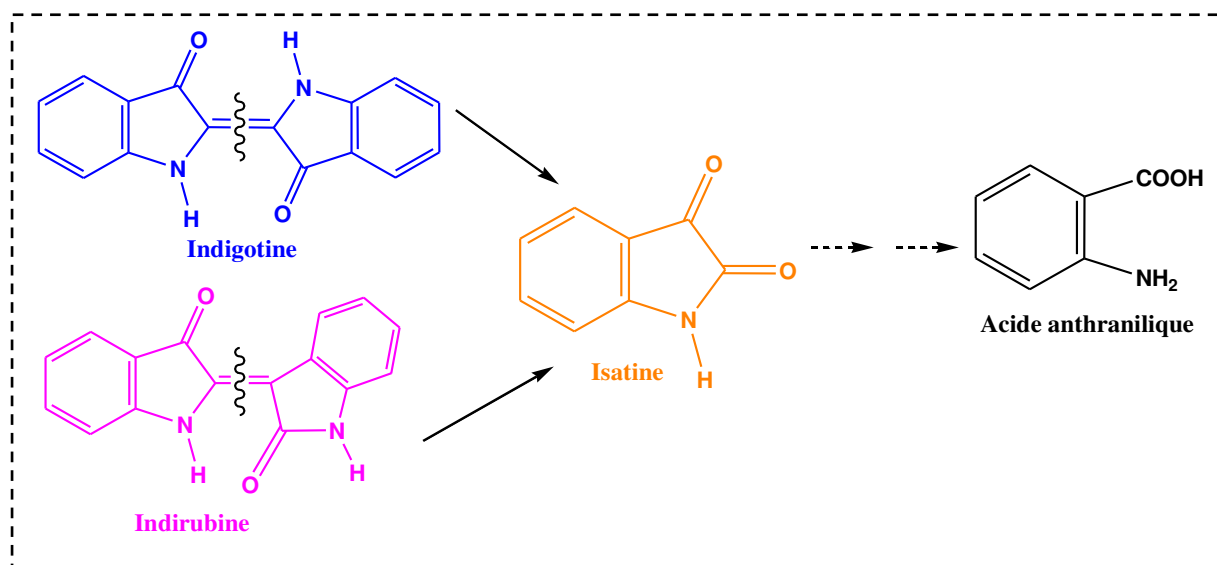


Figure II.2.32 : Dégradation photochimique de l'indigotine et de l'indirubine (Vauchier *et al.*, 2001)

2.3.2.4.2. Différenciation des deux espèces par le rapport de leur proportion relative en indigoïde

Contrairement aux dosages précédents où la teneur en indigoïdes et en isatine des différents extraits était évaluée par étalonnage des standards, les deux espèces ont fait l'objet d'une différenciation par l'établissement direct du rapport de leur proportion relative en indigoïdes. Cette analyse est réalisée dans la prévision d'établir une corrélation entre les proportions absolues et/ou relatives des indigoïdes et l'espèce végétale correspondant à certains échantillons muséaux étudiés. Pour ce faire, les valeurs moyennes des pics d'indigotine et d'indirubine obtenues à 285 nm au niveau des principaux extraits ont été relevées et le rapport aire indirubine (A_D) sur aire indigotine (A_C) a été établi dans la mesure du possible. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II.2.15.

Tableau II.2.15 : Proportions d'aire relative des indigoïdes des principaux extraits de *P. cyanescens* et *I. tinctoria*

Extraits	A ₂₈₅ (C)	%C	A ₂₈₅ (D)	%D	A _D /A _C	Classement technique
PcF DCM UAE 10min	2733492	100	-	-	0	10
IdT DCM UAE 10min	19998	22,2	70279	77,8	3,5	4
PcF Acétone RE 1h	144668	72,5	54893	27,5	0,4	5
IdT Acétone RE 1h	146210	6	2301760	94	15,7	1
PcFMeOH UAE 30min	1092932	100	-	-	0	7
IdTMeOH UAE 30min	113172	19,2	477377	80,8	4,2	2
PcF ERC	2044266	100	-	-	0	9
IdT ERC	1588394	96,2	63262	3,8	0,04	6
PcF DMF UAE 10 min	973242	100	-	-	0	7
IdT DMF UAE 10 min	20146	21,9	71498	78,1	3,6	3

A₂₈₅ (C) : Aire du pic d'indigotine mesurée à 285 nm

A₂₈₅ (D) : Aire du pic d'indirubine mesurée à 285 nm

On remarque comme précédemment, que les proportions d'aire relative des indigoïdes varient en fonction des extraits ainsi que les rapports A_D/A_C. Cependant, on note une constance du rapport A_D/A_C au niveau des extraits **IdT DCM UAE 10min** et **IdT DMF UAE 10min**. Même si les proportions en colorants dépendent non seulement des espèces mais également des procédés et des conditions d'extraction, les observations réalisées proposent une corrélation intéressante qui pourrait permettre la distinction des indigos élaborés à partir de ces deux plantes. Ainsi, à défaut d'une hiérarchisation des différents extraits en relation avec les deux espèces, une échelle technique a pu être proposée en vue d'un classement en fonction du pourcentage relatif et du rapport A_D/A_C des extraits issus des deux espèces étudiées (**Figure II.2.33**). A noter que le rapport A_D/A_C estimé, est inversement proportionnel à la proportion en indigotine présente dans les extraits.

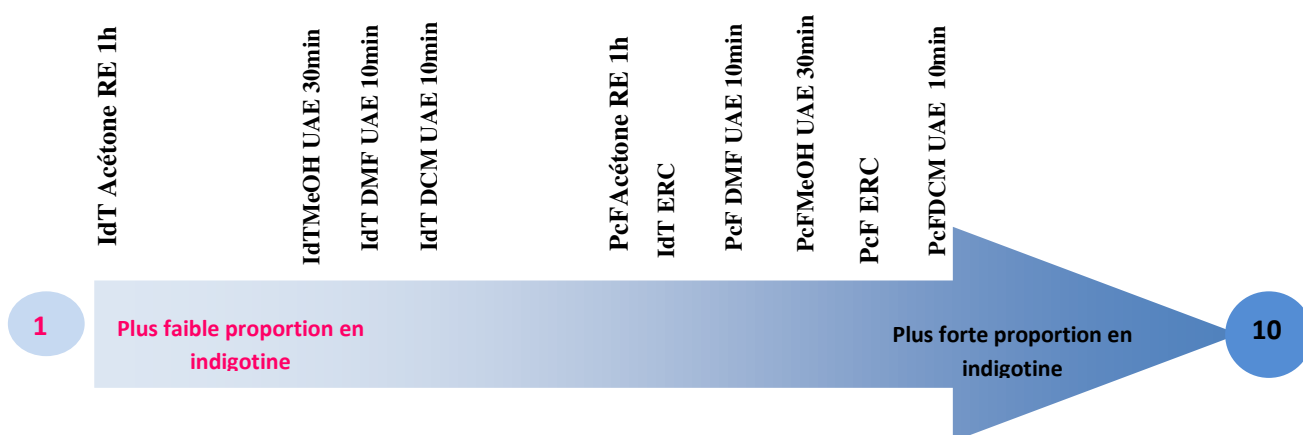


Figure II.2.33 : Echelle de classement technique des extraits en fonction de leur proportion en indigotine

2.3.2.5. Conclusion

L'investigation des paramètres de différenciation des deux espèces de plantes à indigo étudiées, a permis de disposer des empreintes de molécules issues de la photodégradation des principes colorants de ces plantes, en l'occurrence l'isatine. En effet, l'isatine constitue non seulement un marqueur chimique de dégradation de l'indigotine et de l'indirubine mais représente également un précurseur biosynthétique de l'indirubine. En outre, l'évaluation des proportions relatives des deux isomères d'indigo, réalisée au sein de chacun des extraits des deux plantes, a contribué à un classement technique de ces extraits suivant leur pourcentage relatif en indigotine. Ce classement a permis d'établir une échelle de corrélation qui pourrait favoriser la distinction des indigos élaborés à partir des plantes étudiées.

2.3.3. Analyse des extraits de *Lawsonia inermis*

A noter que le henné est l'un des plus anciens produits de beauté du monde ; beaucoup de travaux ont été réalisés sur sa composition chimique. En effet, *L. inermis* doit ses principes colorants à une naphthoquinone ; la lawsone qui est présente dans les feuilles sèches à une concentration de 0,5–2% (Aweke et Tapapul, 2005) et à certains flavonoïdes. Cette analyse se repose donc sur une compilation des procédés et des conditions d'extraction conduisant à l'identification des molécules cibles de *L. inermis* du Sud Bénin, à l'aide des standards commerciaux.

2.3.3.1. Extraction et identification des molécules cibles

Dans l'objectif d'identifier tous les composés tinctoriaux présents dans les feuilles de *Lawsonia inermis* récoltées au Sud-Bénin en vue d'une meilleure caractérisation de cette espèce, la poudre de feuilles sèches du henné a subi successivement différents procédés d'extraction. Les procédés exploités ainsi que leur rendement en colorants sont récapitulés dans le tableau II.2.16.

Tableau II.2.16: Rendements en colorants des extraits de feuilles de *L. inermis*

Extraits	Rendements (%)
Ext EtOH UAE 30 min	7,2
Ext MeOH UAE 30 min	9,83
Ext MeOHSox 2h	7,75
Ext EtOHSox 2h	6,66
Ext MeOH 80% RE 2h	10,77
Ext EtOH 80% RE 2h	9,43

A noter que *L. inermis* renferme des colorants polaires à l'instar de *T. grandis*, les solvants d'extraction adéquats sont le méthanol et l'éthanol. En effet, à l'entame de cette analyse, la technique d'extraction utilisant l'éthanol et les ultrasons a été exploitée, étant donné qu'elle avait fourni les meilleurs rendements en colorants des feuilles *T. grandis*. Cependant, l'analyse en CLHP/UV-Vis de cet extrait n'a permis d'identifier que seulement trois colorants : la lutéoline (**22** : $t_R = 19,71$ min), la diosmétine (**24** : $t_R = 21,83$ min) et l'apigénine (**25** : $t_R = 22,5$ min). Par contre, on note une augmentation du rendement en colorants lorsqu'on passe de

l'extraction à l'éthanol au méthanol en restant toujours avec les ultrasons. Cependant, les colorants identifiés dans cet extrait (Ext MeOH UAE 30 min) sont identiques au mode précédent, et la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) n'a pu être identifiée dans les deux extraits. Ainsi, les conditions d'extraction utilisant la chaleur et un mélange hydroalcoolique ont été testées. Les résultats issus de l'analyse CLHP/UV-Vis des différents extraits sont regroupés dans la figure II.2.34.

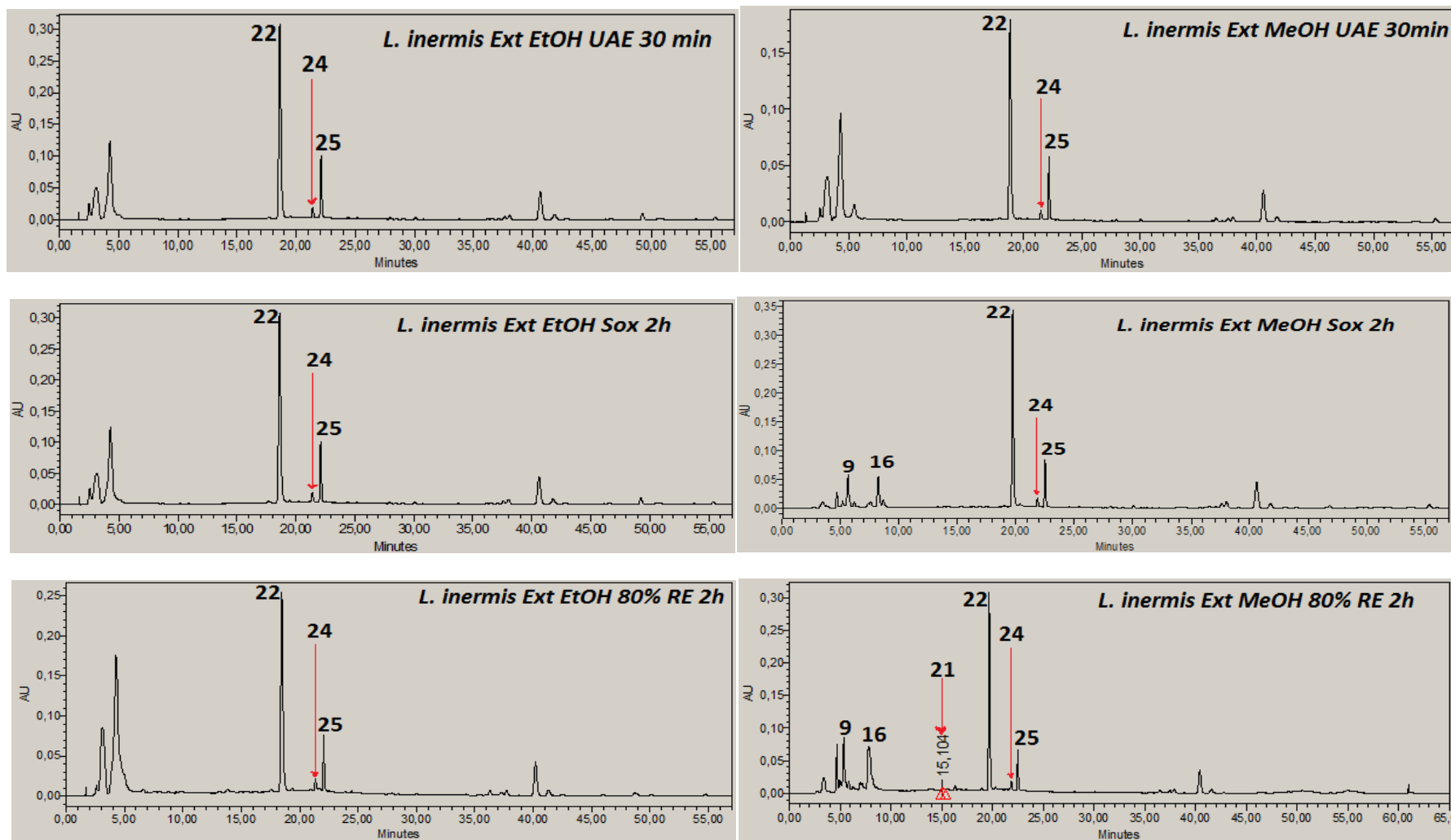


Figure II.2.34 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 350 nm des colorants issus des extraits de *L. inermis*

Il ressort des résultats présentés, que l'éthanol permet d'extraire, dans les conditions exploitées, les mêmes composés chimiques de *L. inermis* ainsi que le procédé conduit au **MeOH UAE 30min**. En effet, la lutéoline, la diosmétine et l'apigénine ont pu être identifiées. L'analyse en CLHP de l'extrait **Ext MeOH Sox 2h** a permis d'identifier deux hétérosides : la lutéoline-7-*O*-glucoside (**9** : $t_R = 5,63$ min) et l'apigénine-7-*O*-glucoside (**16** : $t_R = 8,21$ min) en plus des trois flavones précédentes. En outre, la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**21** : $t_R = 15,1$ min) a pu être identifiée dans l'extrait **Ext MeOH 80% RE 2h**. En effet, le procédé d'extraction conduit au reflux avec le MeOH 80%, a non seulement fourni le rendement le plus élevé en colorants comparé aux autres techniques, mais il a aussi favorisé l'extraction de la lawsone des feuilles du henné. L'extraction de ce colorant nécessite donc un milieu assez polaire associé à des conditions d'extraction plus dures. Il a été relevé par Ashnagar et Shiri (2011), que la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone est présente dans la plante sous forme de précurseur glycosidique qui doit être hydrolysé avant d'être isolé. Une possibilité de rompre la liaison glycosidique est de la mettre en contact de l'eau chaude pendant plusieurs heures. En outre, un traitement en milieu alcalin favorise une nette amélioration de la qualité des colorants extraits comparée à une simple extraction en milieu aqueux, selon Ali *et al.*,(2009). Par conséquent, le protocole exploité pour mieux extraire la lawsone du henné est basé sur ce principe, suivi d'un traitement acido-basique puis un fractionnement à l'éther diéthylique (Annexe 1). Le rendement en colorants de cette fraction étherée est de 1,22%. Une petite quantité de cette fraction est reprise dans le méthanol puis injectée en CLHP. Le chromatogramme issu de l'injection en CLHP de la fraction étherée est traduit par la figure II.2.35.

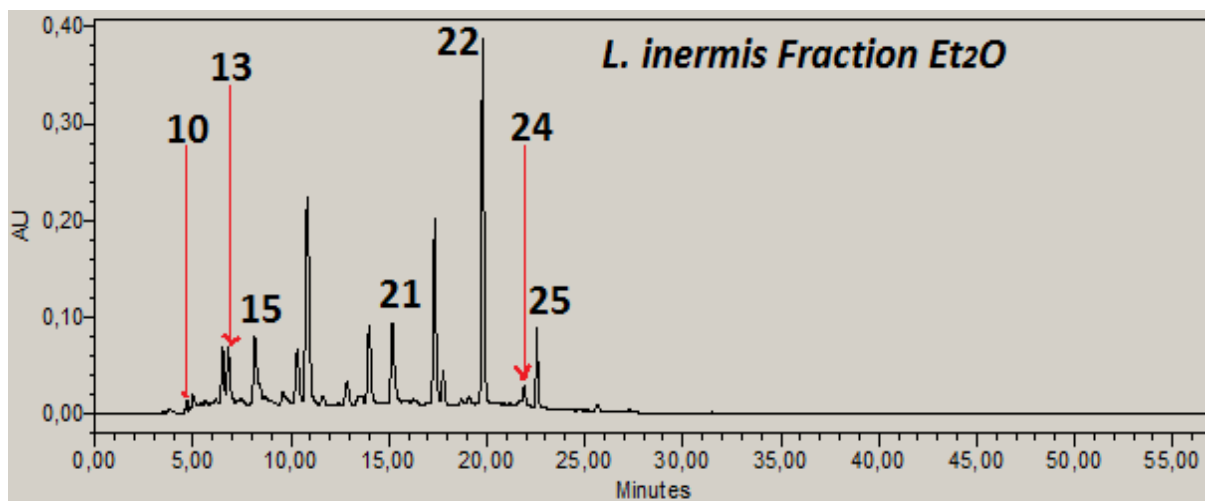


Figure II.2.35 : Chromatogramme CLHP/UV-Vis à 350 nm de la fraction étherée de *L. inermis*

Il faut noter qu'en plus de la lawsone (**21**), plusieurs autres composés ont pu être extraits par cette méthode puis identifiés par CLHP. Il s'agit de l'acide gallique (**10** : $t_R = 4,7$ min), de l'acide caféique (**13** : $t_R = 6,8$ min), de l'acide ellagique (**15** : $t_R = 8,1$ min) et des trois flavones (**22**, **24** et **25**) identifiées précédemment. Cependant, on remarque une disparition totale des hétérosides flavonoïdiques détectés précédemment dans l'extrait Ext MeOH 80% RE 2h. Cette disparition serait due à une hydrolyse totale des hétérosides présents suite aux conditions assez drastiques liées à cette extraction. Ceci pourrait également expliquer l'apparition des acides phénoliques (**10** et **15**) constitutifs des tanins gallique et ellagique.

2.3.3.2. Conclusion

La caractérisation des colorants présents dans les feuilles du henné récoltées au Sud-Bénin dans la zone d'Ifangni, a été effectuée par une analyse en CLHP des divers extraits issus de différents procédés d'extractions exploités. En effet, cette analyse a permis d'identifier dans tous ces extraits trois flavones: la lutéoline, la diosmétine et l'apigénine. Le rendement le plus élevé en colorants provient de l'extrait MeOH 80% RE 2h, dans lequel, on a pu identifier la lawsone et deux hétérosides flavonoïdiques ; la lutéoline-7-*O*-glucoside et l'apigénine-7-*O*-glucoside. En outre, les produits d'hydrolyse ont été essentiellement caractérisés dans la fraction étherée. Il s'agit en complément aux trois flavones, de la lawsone, de l'acide gallique, de l'acide caféique et de l'acide ellagique.

2.3.4. Analyse des extraits de *Khaya senegalensis*

Les données issues de la littérature sur la composition chimique des écorces de *K. senegalensis*, ont montré que ces dernières sont essentiellement riches en terpénoïdes du type limonoïde. Cependant, leur usage tinctorial est lié à leur composition en polyphénols. Ainsi cette analyse est orientée vers l'identification des composés polyphénoliques présents dans ces écorces.

2.3.4.1. Etude et discussion de la composition en colorants de *K. senegalensis*

Cette étude a été effectuée sur deux extraits d'écorce de caïlcédrat. En effet, les colorants de *K. senegalensi* sont été extraits par le procédé utilisant le méthanol et les ultrasons puis, suivant le protocole exploité par Atawodi *et al.*, (2009) (**Annexe 1**). L'analyse en CLHP de la composition chimique de ces extraits montre qu'ils renferment très peu de colorants. Néanmoins, l'identification des composés présents dans ces deux extraits a permis de caractériser deux isomères optiques à savoir la (-) - épicatechine (**5** : $t_R = 4,25$ min) et la (+) - catéchine (**7** : $t_R = 4,7$ min) (**Figure II.2.36**).

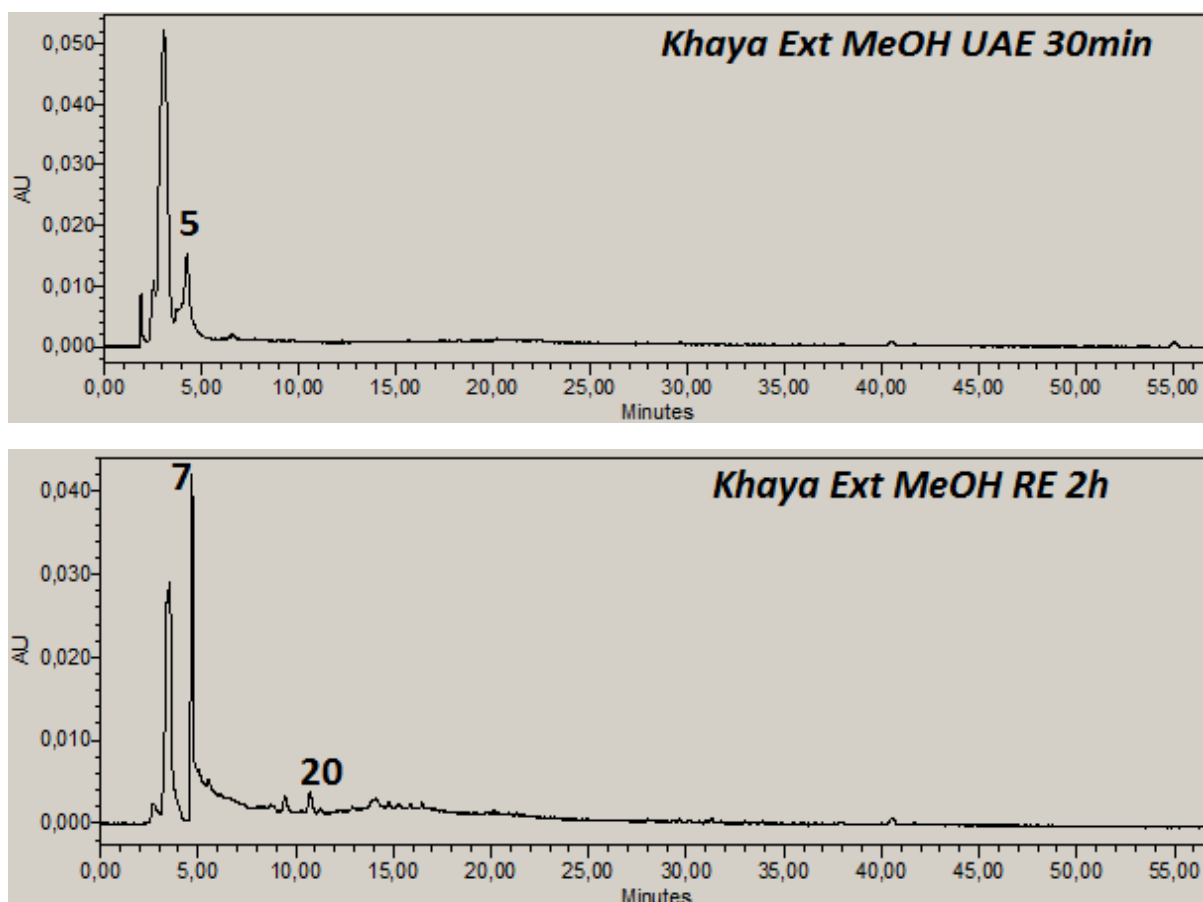


Figure II.2.36 : Chromatogrammes CLHP/UV-Vis à 350 nm des colorants extraits de l'écorce de *K. senegalensis*

Par ailleurs, hormis la (+) - catéchine, la scoparone (**20** : $t_R = 11$ min) a pu être identifiée au niveau de l'extrait **MeOH RE 2h** ayant subi un dégraissage préalable à l'hexane normal. Il est intéressant de mentionner que l'épicatéchine et la catéchine sont caractérisées par un même spectre d'absorption UV-Vis. Cependant, ce qui les différencie est leur temps de rétention ; l'épicatéchine étant éluée en première de la colonne. A noter que ces deux isomères représentent des unités monomériques constitutives des tanins condensés. Une hydrolyse en milieu acide, à chaud, a été ensuite effectuée dans le but de libérer tous les monomères anthocyaniques engagés dans le système condensé en vue de leur identification. L'empreinte chromatographique issue de l'injection de cet extrait (**Ext MeOH HCl RE1h**) est présentée dans la figure II.2.37.

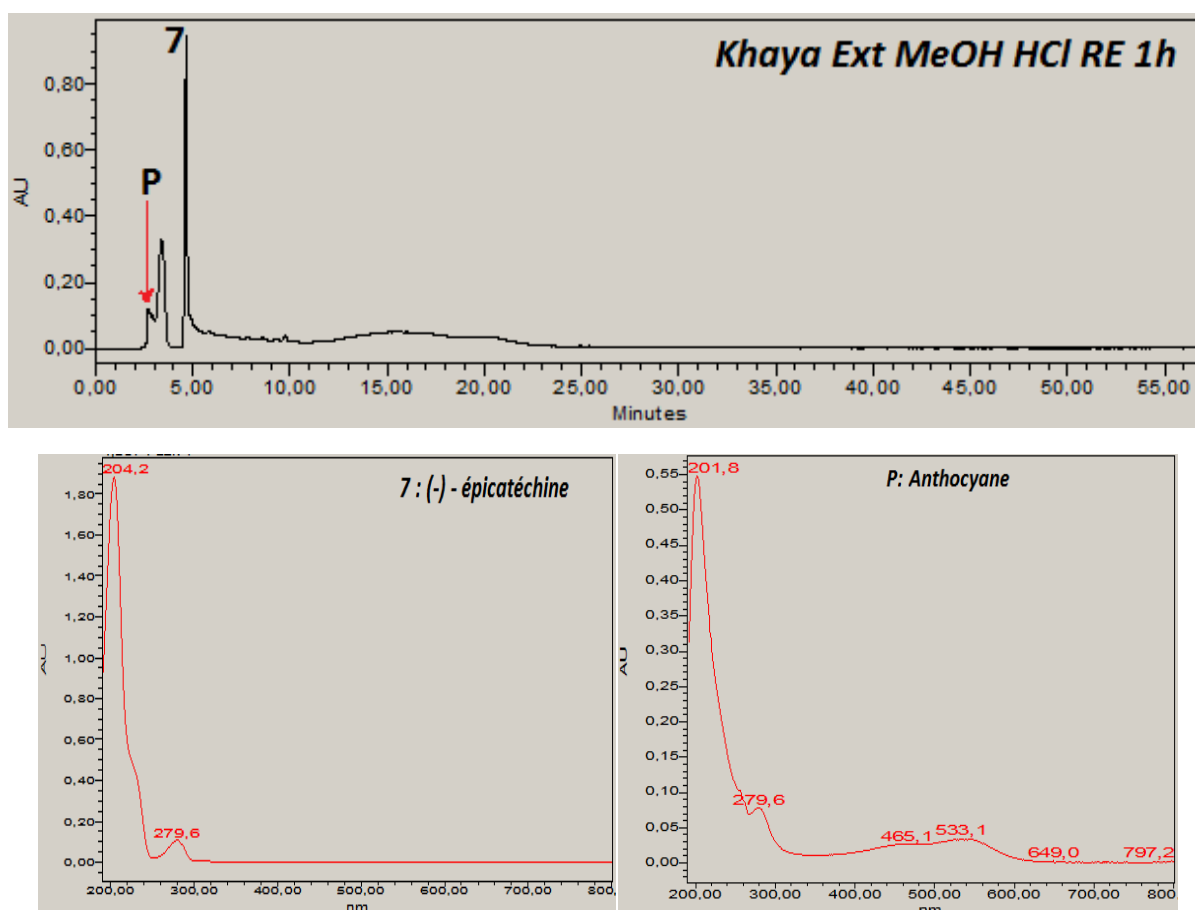


Figure II.2.37 : Empreinte chromatographique CLHP/UV-Vis à 350 nm de l'extrait issu de l'hydrolyse acide de *K. senegalensis* et spectre UV-Vis des composés **P** et **7**

L'analyse du chromatogramme obtenu, montre l'apparition d'un composé **P** ($t_R = 2,7$ min) produit de l'hydrolyse. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'un premier constat a été effectué au niveau de l'expérimentation. En effet, l'extrait d'origine vire complètement d'orange au rouge sang très remarquable sous l'action de la chaleur, en milieu acide. En outre,

en comparant les spectres UV-Vis des composés **P** et **7**, on constate l'apparition d'un maximum d'absorption à 533 nm en complément à 279 nm observé au niveau du composé **7** (épicatéchine). Ce constat pourrait se traduire par la présence dans les écorces de cette plante, des tanins condensés (oligomères ou polymères de flavanols) non hydrolysables. Ces derniers traités à chaud en milieu acide seraient dégradés en colorants rouges formés d'anthocyanidols d'où le maximum d'absorption apparu à 533 nm. Par conséquent, le colorant **P** peut être assimilé à la cyanidine, étant donné que les polymères de catéchine et d'épicatéchine, libèrent en général la cyanidine; ce qui en témoigne d'ailleurs, la coloration rouge sang observée.

2.3.4.2. Conclusion

L'étude de la composition en molécules tinctoriales des écorces de *Khaya senegalensis* révèle qu'elles contiennent très peu de colorants. Néanmoins, on note principalement, la présence de (-) - épicatéchine et de (+) - catéchine constitutives des proanthocyanidines. Hormis ces deux isomères, la scoparone a pu être caractérisée dans les écorces de cette plante. Par ailleurs, un traitement en milieu acide, à chaud, fournit par hydrolyse des proanthocyanidines, un colorant rouge, assimilable à la cyanidine, ce qui augmente en outre, la qualité tinctoriale de cette espèce.

PARTIE III

ETUDE DE CAS

Chapitre 1: Application à des échantillons muséaux

1. Aperçu historique

On ne peut séparer le contexte historique de l'étude chimique des matériaux anciennement utilisés par les artisans et artistes africains dans la confection des objets du patrimoine, surtout pour ce qui concerne l'identification et la provenance géographique des objets qui ont été déportés, vendus ou échangés. Ainsi, un regard rétrospectif a été brièvement porté sur l'art africain et béninois en particulier. En effet, les œuvres du continent africain étaient anciennement reléguées au second rang, en les qualifiant de grossières ou de magiques. En 1898, la Grande Encyclopédie affirmait que « Chez les Nègres qui paraissent pourtant, comme toutes les races de l'Afrique centrale et méridionale, fort arriérés pour ce qui est affaire d'Art, on trouve des idoles représentant des hommes et reproduisant avec une grotesque fidélité les caractères de la race nègre » (La Grande Encyclopédie citée par Feau et Joubert, 1996). Cette attitude, des académistes eurocentristes, s'explique pour une raison qui est double : le manque de documents écrits -pouvant permettre une étude, en est la première ; la deuxième trouve son fondement dans l'esclavage et la colonisation. Ces moments de l'histoire ont vite fait de considérer les Noirs comme des sous-hommes, au point que Laude (1988) pense qu'«une idéologie orienta l'image que se fit l'Europe des civilisations africaines : elle plongeait ses racines dans des mythes qui s'étaient élaborés au Moyen Age et qui voyaient dans le Continent Noir le Royaume des *Idolâtres*, le Royaume oublié de Dieu. L'Afrique, c'était bien, en effet, un monde à convertir...». C'est donc dire que l'histoire (l'esclavage et le colonialisme) a eu des retentissements graves sur le regard que l'Europe aura plus tard des civilisations de l'Afrique. Tout le destin, de ces civilisations et de ces arts, allait ainsi subir une terrifiante influence.

Par la suite, les européens jugeront le progrès de tout peuple suivant une voie unique et continue. En ce sens, le niveau de civilisation était déterminé par les progrès techniques du peuple auquel cette civilisation appartient. La culture européenne est la *culture par excellence*. Les civilisations n'appartenant pas à l'Europe suivent une classification dont leur niveau de technicité est le déterminant principal. En conséquence, l'infériorité technique d'un peuple impliquait son infériorité artistique. La peinture est conçue comme le premier des arts, et les Nègres qui, eux, ne se limitent le plus souvent qu'à la sculpture sont, par ricochet, des artistes inférieurs. En 1845, le muséographe Jomard cité par Laude (1988), affirmait que : «La peinture est l'art des peuples *déjà avancés en civilisation*». Ce propos, a manqué d'analyse

assez profonde, car la Grèce antique a dû son prestige à sa sculpture plutôt qu'à sa peinture qu'on ne connaît pas, a souligné Kidiba (1997), dans son mémoire portant sur la contribution du patrimoine culturel au développement du système éducatif de la République du Congo. Par contre, des voix s'élevèrent contre ce déterminisme mécanique quelques décennies plus tard ; c'est le cas de R. Andree cité par Laude (1988). Ce dernier mentionne dans son livre, qu'en 1885, Andree écrivait que : « Les peuples situés à un degré inférieur de culture peuvent avoir atteint un degré relativement élevé dans le domaine de l'art, [...] il n'apparaît pas toujours comme l'état le plus haut dans l'évolution d'un peuple ». Les objets du patrimoine béninois échantillonnés dans le cadre de cette étude seront donc ceux collectionnés autour de cette période.

A noter qu'à partir de 1840, il y a une affluence matérielle de l'Europe sur la question de l'art africain qui génère d'avantage de curiosité. Les européens vont s'intéresser à l'art des *sauvages*. Bastian déclarait : « Avant tout, achetons en masse, pour les sauver de la destruction, les produits de la civilisation des sauvages et accumulons-les dans nos Musées » (Bastian A. cité par Laude, 1988). Au même moment, certains missionnaires (SMA : Société des Missions Africaines) récoltaient ces objets qualifiés pour la plupart de fétiche qu'ils déportaient en Europe. C'est le cas au Bénin du Révérent Père Francis Aupiais. En effet, quelques années après la création des S.M.A (1856), le père Auguste Planque demande aux missionnaires résidant au Dahomey d'envoyer : *« une collection de choses de votre nouvelle patrie. Nous voulons avoir dans notre musée des armes, des outils, des ustensiles de ménage, tous vos dieux. En un mot, des objets usuels qui sont en dehors de nos mœurs. »* (Romeggio, 2007). Par ailleurs, les œuvres furent rassemblées pour faciliter leur étude, leur connaissance par tout le monde qui pouvait avoir affaire en Afrique. Ce fut le début d'une prédilection très manifeste aux descriptions et observations qui sont faites de l'art nègre.

C'est pour cette raison, qu'à partir de 1906, des peintres furent attirés par cet art. Les expressionnistes allemands (du groupe Die Brücke) et bien d'autres peintres eurent un autre regard de la sculpture africaine, et ne la considèrent plus comme primitive. Avant 1914, les œuvres nègres se côtoient avec des peintures modernes dans toutes les collections : on trouvait, dans la collection Stchoukine, quelques bronzes du Bénin. On vit une euphorie de l'art nègre : le jazz, les ballets nègres, etc., sont des événements parmi d'autres qui finissent par faire changer progressivement la conscience publique. L'art nègre a été l'objet d'admiration, de peintres, artistes et autres à travers le monde. Et Léopold Sédar Senghor de dire : « Je me rappelle encore Pablo Picasso me conduisant amicalement à la porte, comme je

prenais congé de lui, et me disant, les yeux dans les yeux : « Il nous faut rester des sauvages ». Et moi de répondre : « Il nous faut rester des nègres ». Et il éclate de rire. C'est que nous nous étions compris. En effet, les artistes de Paris l'ont reconnu, le Cubisme ou l'école de Paris s'est inspiré, avant tout, de l'art négro-africain. Ce n'est pas par hasard si cette école d'Art s'est développée à Paris en même temps que le surréalisme (Sédar Senghor, 1988).

En conséquence, de nos jours, plus des trois quarts du patrimoine africain se retrouve dans les musées européens et d'Amérique du Nord. Les objets ethniques prennent de la valeur en circulant entre collectionneurs, galeristes, maisons de vente et musées occidentaux, alors qu'en Afrique, ils continuent de disparaître petit à petit à cause des marchands africains qui les font sortir du continent par tous les moyens de vente y compris l'internet. Au cours de ce travail, nous avons eu l'occasion de pénétrer les réserves du musée du service des missions africaines (SMA) et du musée Guimet (MG) de Lyon, d'explorer la richesse et la diversité de leur collection et de réaliser des prélèvements d'échantillons sur les masques, les statuettes de jumeaux, de fétiche et sur des textiles en provenance du Dahomey mais dont on ne disposait pas d'informations quant aux colorants utilisés dans leur confection.

2. Les objets du patrimoine échantillonnés

Environ 27 objets du patrimoine, constitués d'une variété de masques Guèlèdè, de statuettes de jumeaux "Ibéji", de fétiche et tissus culturels et coutumiers, ont été échantillonnés. Compte tenu de ce nombre, on ne pourra faire une description exhaustive de chaque objet. Néanmoins une présentation de chaque groupe d'objet pourra être effectuée.

2.1. Les masques Guèlèdè

L'origine mythique du Guèlèdè reflète le passage d'une société matriarcale à un système patriarcal. Ayant dérobé le pouvoir aux femmes, les hommes décidèrent de consacrer un culte à la toute puissance de la mère ancestrale. En effet, la société guèlèdè est dirigée par un groupe de femmes dont le titre le plus élevé est Iyalashè (iya = mère et lashè = permission). Iyalashè est la femme qui détient la position-clé de la sorcellerie. Elle est le chef suprême qui ordonne la danse guèlèdè. C'est elle seule qui a le pouvoir de commander ou de décommander les actions des forces occultes. Elle supervise tous les cultes fétichistes, ses adeptes, et dirige la vie sociale de tout le village. De nos jours, Iyalashè est aidée dans ses fonctions par Babalashè (baba = père et lashè = permission). Les Nago et les Yoruba pensent que la femme a deux forces : une positive et une négative. Cette dernière est aussi appelée ajè

(sorcellerie). Si les femmes dirigent la société guèlèdè, les masques, eux, sont portés par les hommes pour implorer la bonté de ces dernières. Selon certains membres de la société guèlèdè, le Guèlèdè serait le tribut à payer aux pouvoirs mystiques des femmes dont il faut se protéger et qu'il faut apaiser, voire même changer, transformer en puissance bénéfique pour la société : "*Nous dansons pour apaiser nos mères, pour leur plaire...*" déclarent-ils. On adhère donc à la société guèlèdè pour se protéger (Puren, 2008).

Le Guèlèdè se caractérise par un élément principal qu'est le masque. Les masques sont sculptés par des artistes dans le couvant appelé "Ashè" à partir des troncs d'arbres légers (exclusivement identifiés) cylindriques et peints en polychromie. La plupart des masques ont des caractéristiques communes aux œuvres Yoruba comme les yeux en amande et les trois courtes scarifications sur les joues et/ou le front qui sont tenus en haute estime par les Yoruba/Nago.

Le masque Guèlèdè est constitué de deux parties. Une partie inférieure caractérisée par un visage de femme calme sous une forme conventionnelle simple et statique. La partie supérieure en revanche, très vivante, très complexe est liée à la créativité de l'artiste et à un événement spécifique. Elle véhicule en effet, des scènes articulées illustrant aussi bien des messages religieux que sociaux et exprime, en complément de la magie rituelle, une "magie médiatique" très populaire visant à restaurer la cohésion sociale mise en péril par les comportements néfastes de certains individus ou de certaines entités. Ces scènes doivent présenter aussi le symbole des pouvoirs intérieurs des femmes.

2.2. Les statuettes de jumeaux "Ibéji"

Dans la tradition religieuse des Yoruba-Nago, on considère que les jumeaux ont une seule âme, unie et inséparable. Pour cette raison, si un jumeau meurt, la vie du survivant est mise en danger, car son âme n'est plus en équilibre. La colère du jumeau mort peut faire courir de graves risques à toute la famille. Afin, d'éviter ces risques néfastes pour la famille, on doit rapidement trouver un moyen pour réunir à nouveau les âmes des jumeaux. La figurine d'Ibéji représente en effet, le transfert de l'âme du jumeau mort dans la figure en bois à l'issue d'une cérémonie rituelle grand public. L'Ibéji est donc le gardien de l'âme du jumeau mort. Pour cette raison il est traité avec les mêmes soins attentionnés que le jumeau vivant.

Théoriquement il n'est donc pas nécessaire de sculpter ces statuettes en bois si les deux jumeaux meurent, car l'union de leurs âmes n'est pas compromise. Mais dans la croyance Yoruba, les jumeaux morts sont dotés de pouvoirs surnaturels, plus puissants que ceux des

ancêtres, donc même si les deux bébés meurent, on fait sculpter un couple d'Ibéji, afin d'apporter aux jumeaux des offrandes ou de leur offrir des sacrifices, afin qu'ils accordent leur protection à la mère et à la famille entière.

L'Ibéji ne représente pas un enfant, comme l'on pourrait s'y attendre, mais un adulte, avec le visage et le corps nu d'un adulte. C'est le sculpteur qui décide de la forme artistique qu'il donnera à la statuette. Le seul élément qui le lie est le sexe du ou des jumeaux qui doivent être sculptés. La hauteur d'un Ibéji varie entre vingt et trente centimètres. Il est posé sur une base arrondie, ses bras pendent vers le bas, ses jambes sont courtes et sa tête est grande par rapport au corps, avec des coiffures très diverses et élaborées. Souvent les Ibéji portent des anneaux en bronze ou en fer autour des poignets et des chevilles. Mais aussi des colliers, des bracelets, des chaînes abdominales ou des boucles d'oreilles, en perles de verre, ornent les statuettes. Dans certains cas, des décorations, telles que colliers et bracelets, sont travaillées directement dans le bois par le sculpteur.

2.3. Les fétiches

Le mot fétiche désigne par excellence tout objet, qui, suite à certains actes rituels, sont investis de puissances à caractère personnel ou de forces impersonnelles. Il peut être activé par des dons sacrificiels et utilisé pour un acte magique ayant pour but de se défendre, de nuire ou d'avoir des enfants. La plupart des fétiches forme un assemblage de substances auxquelles on attribue des forces particulières. Il s'agit souvent de certaines pierres de cornes, de griffes, de dents, d'os, de cheveux, de peaux animales, etc. mais aussi de lambeaux de tissus, d'immondices, de menstrues et d'autres matières de ce type aussi impures qu'efficaces. Il joue un rôle de réceptacle et permettait de communiquer avec les esprits invisibles.

2.4. Les textiles culturels et coutumiers

Hormis les fibres filées d'écorces de plantes ou le raphia non filé, les textiles occupent une place de prestige dans la culture Yoruba, non seulement pour des raisons esthétiques, mais aussi et surtout pour des raisons culturelles et rituelles. En effet, bien que les matières de base soient identiques, leur originalité esthétique est fonction du rang social et de l'usage. Ainsi, outre les décors spéciaux réservés aux rois, aux dignitaires et aux personnages importants, les tissus exploités pour le culte Guèlèdè ou le culte Egoungoun (revenants) sont des costumes chamarrés et mirobolants, alors que les costumes de chasseurs présentent un aspect très particulier et apparaissent sous forme de gilet, de pagne ou de jupe, tapissés

d'enduit, de cauris, d'os d'animaux de toute sorte. Il en est de même pour les accoutrements rituels de Shango, Ogoun....

3. Analyse des échantillons muséaux

3.1. Principe du plan d'analyse

La technique du plan d'analyse est basée sur une succession de tests expérimentaux consistant à favoriser à chaque étape, le choix de la méthode appropriée pour la suite de l'analyse. Cette procédure va permettre de diminuer le nombre d'expériences à réaliser sur les échantillons prélevés tout en augmentant la qualité des résultats obtenus. En effet, de très petites quantités de matières tinctoriales de la taille d'une tête d'épingle, ont été prélevées sur les objets échantillonnés. Ensuite, à l'aide d'une loupe binoculaire, un tri de pigments à analyser a été réalisé suivi de leurs analyses en IR-TF. L'interprétation des résultats obtenus, et leur comparaison à des témoins directs ou à la base de données IR-TF, conditionne le choix de l'analyse suivante. Ainsi la matière colorante subit soit un test microchimique pour compléter ou confirmer les résultats dérivés de l'IR pour ce qui concerne les composés inorganiques, soit une analyse CLHP en vue de l'identification des colorants organiques. Le récapitulatif schématique du plan d'analyse des prélèvements est présenté dans la figure III.1.1

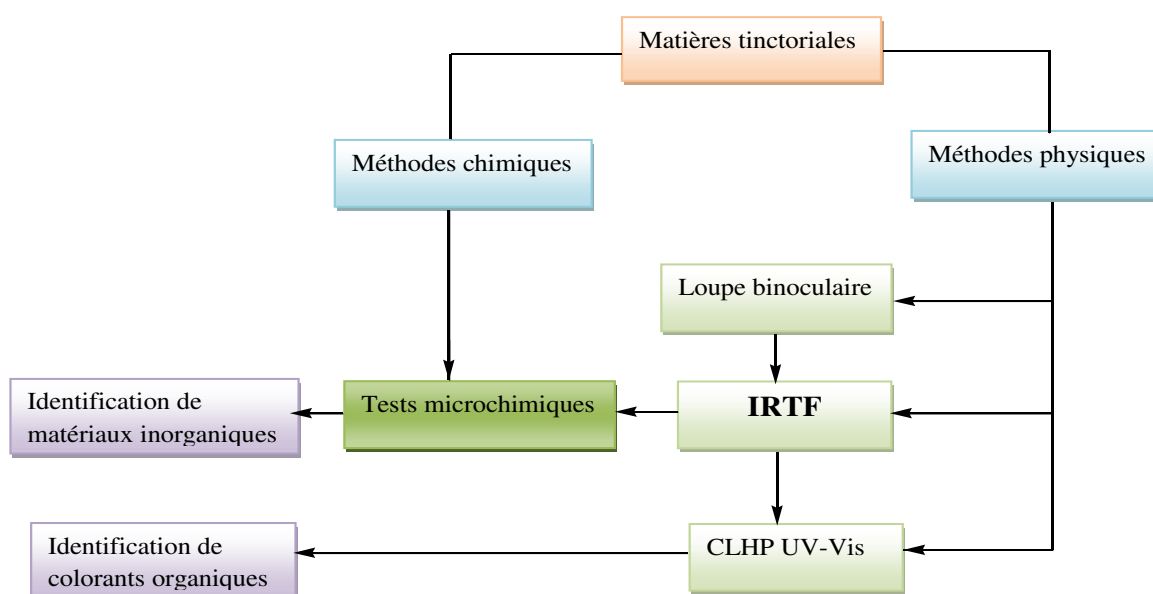


Figure III.1.1 : Plan schématique d'analyse des prélèvements muséaux

En outre, pour ce qui concerne l'analyse en CLHP des prélèvements muséaux, le protocole d'extraction exploité est celui précédemment mis au point au laboratoire (Cuoco, 2009). Ce

protocole de décomplexation non dénaturante, utilise le tampon acétique (AcOH/AcO^- ; $\text{pH}=4,3$) et les ultrasons. Cependant, ce procédé est quelque fois substitué par le mélange méthanol-HCl 6M (1:1 v/v) dans le cas où la matière colorante n'est pas dissoute et aucune coloration apparente du mélange n'est observée. Par ailleurs, l'analyse des textiles prélevés n'a nécessité aucun milieu acide. Un traitement au DMF et aux ultrasons est suffisant pour extraire les colorants des textiles.

3.2. Aperçu sur les pigments probablement utilisés dans l'artisanat au Bénin

Les pigments se définissent comme des substances généralement insolubles d'origine minérale, organique, métallique ou synthétique utilisées pour leur pouvoir colorant. Ce sont des molécules particulières capables d'absorber une partie de la lumière mais aussi de réémettre une partie du spectre qui correspondra à la couleur perçue par l'œil (Chimie et patrimoine culturel II, 2008). La liste des pigments est longue et il serait fastidieux de les passer tous en revue. C'est pourquoi une attention particulière sera portée sur ceux qui sont anciennement utilisés, qu'ils soient natifs ou importés. En effet, l'art Yoruba-Nago est connu pour la polychromie de ses objets, cela le caractérise au sein du marché de l'art africain. Ainsi, hormis les colorants d'origine végétale, des pigments minéraux comme le kaolin, la latérite (minerai de fer), les oxydes de fer, ont pu être recensés au Sud-Bénin (Romeggio, 2006). A partir de ces pigments, une multitude de teintes allant du jaune à l'orangé et au rouge peut être observée. Par ailleurs, à cette liste s'ajoutent par anticipation, les pigments caractérisés au cours de cette étude. Il s'agit du bleu de lessive, du bleu de Prusse. La présentation de ces pigments est résumée dans le tableau III.1.1.

Tableau III.1.1 : Principaux pigments d'origine naturelle/synthétique anciennement employés au Bénin

Noms (synonymes)	Nature	Formule chimique	Datation	Commentaire	Caractérisation
Kaolinite/kaolin	Naturel	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ hydroxyde d'aluminosilicates	Connu depuis les temps les plus anciens	Le kaolin est prélevé dans des dépressions qui sont assimilées au refuge des mânes des aïeux, et traduit la communication avec les ancêtres. Autour des yeux, il éloigne les fantômes	Coloration rouge de l'aluminium due à la présence de l'aluminon III en milieu tamponné
Ocre jaune	Naturel	$n\text{-FeOOH}$ (Fe_2O_3 , $n\text{H}_2\text{O}$) oxyde de fer naturel (goethite)	Depuis la préhistoire	Les ocres sont des terres dont la couleur réside dans la présence de l'ion Fe^{3+} et son environnement. Ce dernier lié aux facteurs naturel ou artificiel explique les différentes teintes des ocres. La latérite est naturellement utilisée pour le marquage des ustensiles par les femmes	Réduction en milieu acide du métal ferrique en ferrocyanure ferreux bleu
Ocre rouge	Naturel/artificiel	Fe_2O_3 (hématite)			
Latérite	Naturel	$\text{Fe}_2\text{O}_3, \text{Al}_2\text{O}_3$ hydroxydes de fer et d'aluminium			
Bleu de lessive	Synthétique	$\text{Na}_{8-10}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ sodium aluminiumsulfosilicates	1830	Pigment riche en histoire tant pour sa synthèse que pour la compréhension de l'origine de sa couleur qui n'est pas due à un métal mais plutôt au sulfure.	Les acides forts décomposent le pigment immédiatement avec décoloration et dégagement de H_2S
Bleu de Prusse / bleu cyané	Synthétique	$\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ferrocyanure ferrique	1704	Qualifié d'envahissant, il ne figure pas parmi les grands pigments bleus bien qu'il soit considéré comme le premier pigment moderne. Cependant, il a été largement utilisé /populaire	Réduction partielle par le métal du ferrocyanure ferrique en ferrocyanure ferreux blanc. Précipité de couleur rouille d'hydroxyde ferrique en présence de base

3.3. Résultats et discussion

➤ Analyse par spectrométrie IR-TF des constituants des prélèvements et tests microchimiques

Les prélèvements analysés par spectrométrie IR-TF se traduisent par l'obtention d'une diversité de profils spectraux (**Annexe 2**). En effet, ces résultats permettent de reconstituer la nature chimique et minéralogique des échantillons par identification de certaines bandes d'absorption présentes sur leur spectre, chaque bande correspondant à un mode de vibration d'une liaison chimique entre deux atomes, et si une liaison chimique est caractéristique d'un constituant, elle peut être considérée comme un traceur de celui-ci. En pratique, les interprétations vont s'appuyer essentiellement sur des bibliothèques de spectres particulièrement bien fournies incorporant des témoins d'échantillons d'origine béninoise. Ainsi, vu le nombre d'analyses et de comparaisons (superpositions) spectrales effectuées, seuls les principaux résultats pourront être présentés.

-Analyse des prélèvements jaunes, rouges et bruns de type ocre

L'analyse des prélèvements jaunes (**P19-20**) fournit particulièrement des bandes caractéristiques dans la région des empreintes digitales ($< 1600 \text{ cm}^{-1}$). En effet, les bandes d'absorption au environ de 600 cm^{-1} , caractéristiques des empreintes de la goethite ont été observées. Ces bandes, pourraient être attribuées à deux types de vibrations. Il s'agit des vibrations apparaissant respectivement à 540 cm^{-1} et 470 cm^{-1} pour le **P19** et à 630 cm^{-1} et 600 cm^{-1} pour le **P20**, caractéristiques d'une déformation au-delà du plan, du groupe O-H et d'une vibration de valence de la liaison Fe-O. Outre cela, la bande de forte intensité apparaissant sous forme double entre 3695 et 3621 cm^{-1} pourrait être attribuée à une vibration de valence du groupe O-H tandis que l'eau constitutive de la goethite, apparait sous forme d'une large bande à 3435 cm^{-1} pour le **P19**. Par contre, au niveau du **P20**, cette dernière bande apparait sous forme d'un doublet très large et intense au-dessus de 3400 cm^{-1} . Outre la bande d'absorption à 1622 cm^{-1} caractéristique d'une vibration d'élongation de la liaison O-H, on observe une autre vibration d'élongation d'intensité plus forte, correspondant à la liaison S-O des sulfates, apparait sous forme de doublet au environ de 1115 cm^{-1} . Cela suppose que ce prélèvement **P20** est constitué d'un mélange d'oxyde de fer et de sulfate hydraté ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), constituant principal du gypse. Ce résultat a été confirmé par un témoin (ocre jaune + CaSO_4) disponible au laboratoire. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les empreintes spectrales révélées par le **P19** sont également caractéristiques de certains pigments rouge et

brun. En effet, les bandes d'absorption des prélèvements rouges **P8** et **P14** sont parfaitement superposables à celles du **P19**. Néanmoins, le **P14** présente une bande assez faible à 3434 cm^{-1} , comparée à celle caractérisant la forme hydratée de l'oxyde de fer jaune. Il s'agit donc d'un pigment rouge d'oxyde de fer du type hématite. Par contre, au niveau du **P8**, cette bande apparaît avec une forte intensité caractéristique d'une vibration d'élongation de la liaison O-H (typique d'une fonction alcool associée) et on note en plus, une vibration d'élongation caractéristique de la présence de composé organique à 2920 cm^{-1} (C-H). Il en est de même pour le prélèvement rouge **P5**. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kustova *et al.*, (1992) qui ont étudié par spectroscopie IR plusieurs oxydes de fer tels que l'hématite, la lépidocrocite et la goethite ainsi qu'avec ceux de Sadik *et al.*, (2011) sur l'influence des argiles ocreuses dans la qualité des carreaux céramiques. Quant aux prélèvements bruns **P2** et **P18**, ils présentent également des bandes d'absorption caractéristiques d'oxyde de fer à 540 et 470 cm^{-1} . En outre, un examen détaillé de leur spectre met en évidence deux épaulements systématiques à 3696 et 3620 cm^{-1} correspondant à une vibration de valence du groupe O-H ainsi qu'une bande à 2923 cm^{-1} caractéristique de la présence de matière organique. Ces spectres présentent également une grande similitude avec le témoin brun Cassel exploité. En effet, ce dernier provient de l'action de décomposition des végétaux dans le sol sur les sels de fer contenus dans ce sol (ou par mélange d'un noir végétal à l'oxyde de fer rouge et une faible quantité d'ocre jaune) (Feller et Johnston-Feller, 1997). A noter que la plupart des pigments étudiés contiennent aussi des impuretés caractérisées par des bandes d'absorption obtenues entre 1075 et 1000 cm^{-1} liées aux vibrations d'élongation asymétrique des liaisons Si-O-Si ou Si-O-Al des éléments constitutifs de kaolin ou d'argile. Les empreintes spectrales de ces prélèvements sont résumées dans la figure III.1.2.

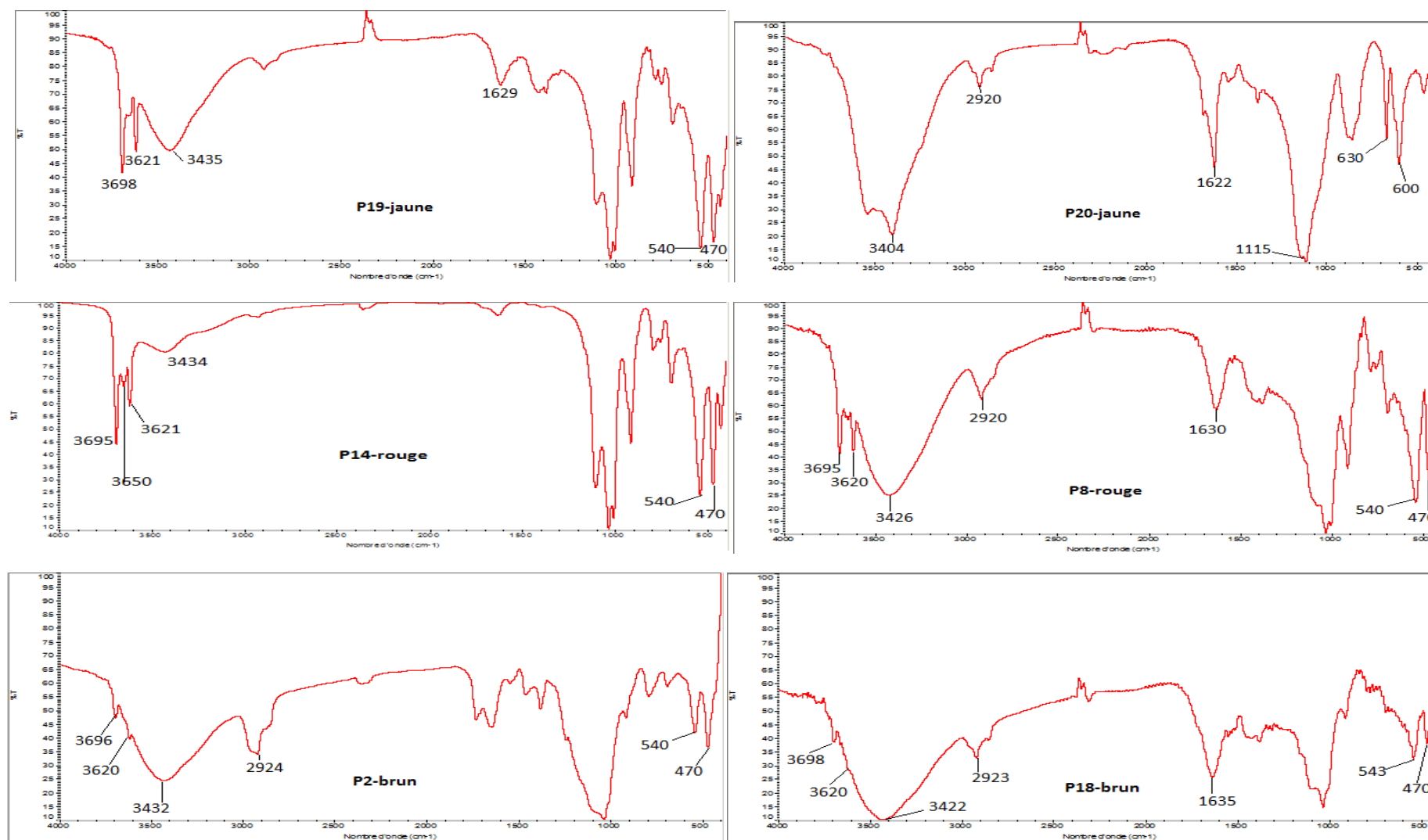


Figure III.1.2 : Empreintes IRTF des prélèvements jaunes P19-20, rouges P8, P14 et bruns P2 et P18

-Analyse des prélèvements bleus

Les empreintes spectrales issues de l'analyse par spectroscopie IR-TF des prélèvements bleus, présentent des similitudes au niveau de certains prélèvements (**P1, P3, P7** et **P9**) et (**P10, P11, P12, P13** et **P16**) alors que d'autres présentent des profils très particuliers comme le prélèvement **P6**. La caractérisation de ces prélèvements va donc se traduire par l'interprétation des trois catégories de spectres obtenus (**Figure III.1.3**).

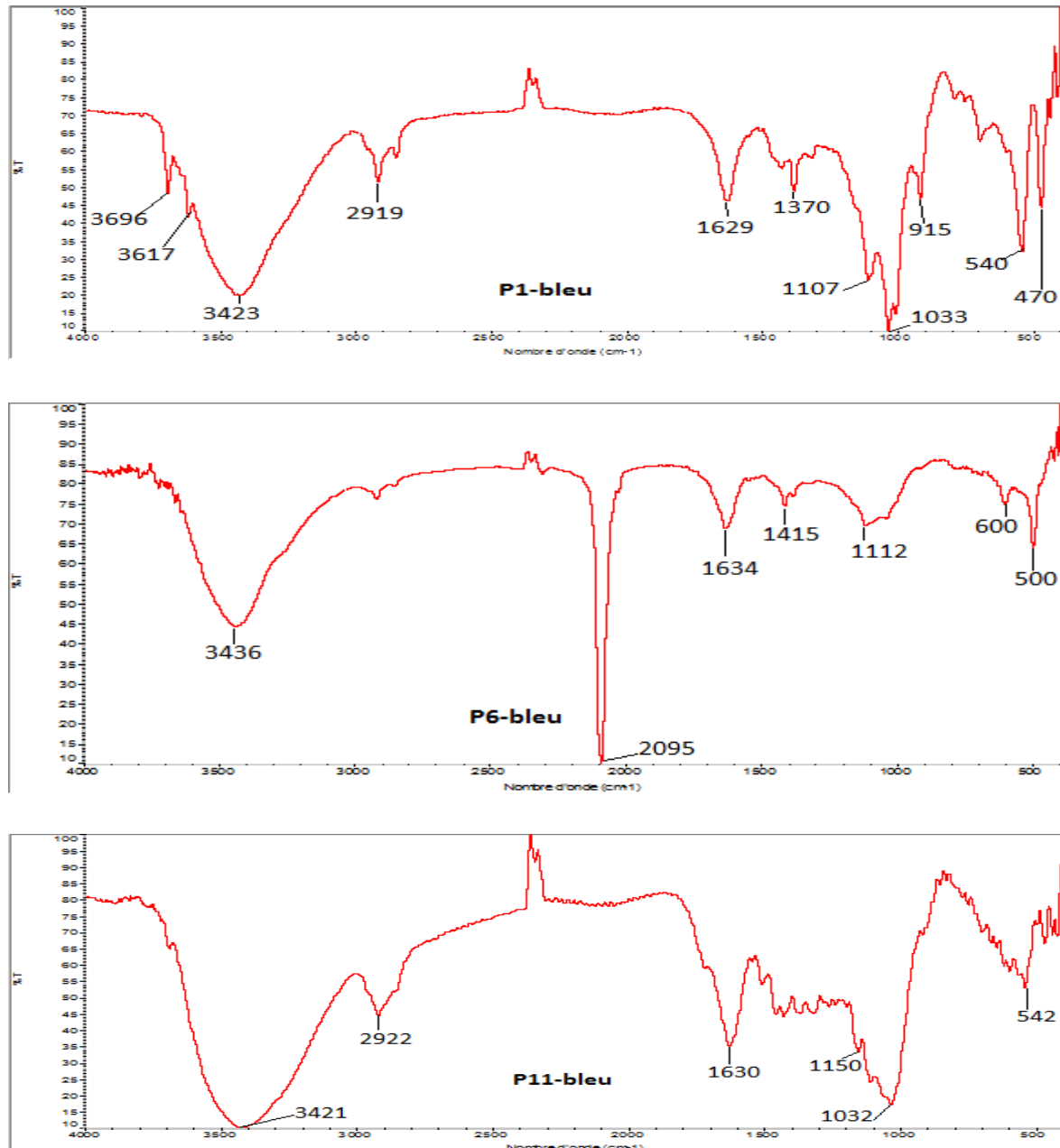


Figure III.1.3 : Empreintes IR-TF des prélèvements bleus P1, P6 et P11

Le spectre IR-TF du prélèvement **P1** est marqué par une bande large et intense apparaissant entre 1110 et 1000 cm^{-1} caractéristique des vibrations d'élongation des liaisons Si-O-Si et Si-O-Al, précédée d'une bande faible à 1629 cm^{-1} et d'une bande très large à 3423 cm^{-1} caractérisant respectivement des vibrations de déformation et d'élongation des liaisons O-H. Ces caractéristiques sont spécifiques des empreintes du bleu outremer synthétique (bleu de lessive) et du lapis lazuli de Sibérie et de Chili. Cependant, seul le bleu outremer naturel en provenance d'Afghanistan/Badakhshan présente en plus, une faible bande à 2340 cm^{-1} caractéristique d'élongation des ions sulfures (Michele *et al.*, 1999). Par ailleurs, ce spectre fait apparaître des bandes d'absorption caractéristiques d'oxyde de fer à 540 et 470 cm^{-1} précédées de deux épaulements observés à 3917 et 3968 cm^{-1} . Ceci serait lié à la compacité des pigments entraînant avec eux une couche inférieure. Par contre, le prélèvement **P6**, présente un profil spectral typique d'un bleu cyané équivalent au bleu de Prusse. Il est caractérisé par une vibration d'élongation systématique de la triple liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ à 2095 cm^{-1} qui apparaît en une bande très intense (Feller et Johnston-Feller, 1997). On note également de faibles bandes d'absorption caractéristiques des vibrations d'élongation de liaison Fe-N à 600 cm^{-1} et des liaisons Fe-C et C-Fe-C ou Fe-CN à 500 cm^{-1} , ainsi que des bandes caractéristiques de l'eau, qui apparaissent à 3423 et 1650 cm^{-1} correspondant respectivement à des vibrations d'élongation et de déformation du groupe O-H.

Il ressort du spectre IR-TF du prélèvement bleu **P11**, trois groupements essentiels : le groupement O-H avec une bande large et intense à 3421 cm^{-1} similaire à un O-H engagé dans une liaison intermoléculaire (comme celui de certains alcools), et le groupement C-H avec une bande faible à 2922 cm^{-1} caractérisant les vibrations d'élongation ainsi que le groupement C=O à 1630 cm^{-1} correspondant également à une vibration d'élongation. Les bandes d'absorption observées à 1150 cm^{-1} et 1033 cm^{-1} pourraient être attribuées à des liaisons C-O et C-N. Ceci montre que ce pigment bleu est constitué de matière organique. Par ailleurs, les prélèvements de textiles (**P21-27**) analysés en mode ATR, ont révélé en majorité des bandes d'absorption caractéristiques de la matière textile employée et non du colorant exploité (Annexe 2). En effet, ces tissus sont faits pour la plupart de coton. C'est du moins ce qu'a montré la superposition des spectres obtenus par rapport aux témoins (coton, laine, jute, soie). Il est intéressant de noter que, de façon générale, les bandes d'absorption spécifiques observées aux environs de 1000 cm^{-1} sont fortement concurrencées par les vibrations d'élongation asymétrique caractéristiques des liaisons Si-O et Si-O-Al du kaolin.

-Analyse microchimique des prélèvements

Le tableau III.1.2 résume les résultats issus des tests microchimiques réalisés sur chaque échantillon, précédés des bandes d'absorption IR-TF caractéristiques des particules constitutives des matériaux prélevés. A noter qu'aucun prélèvement n'a répondu positivement au test de détection du cuivre (Cu^{2+}).

Tableau III.1.2 : Bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des composants des prélèvements et résultats des tests microchimiques.

Prélèvements	Analyse IRTF			Tests microchimiques			Constituants
	Bandes caractéristiques (cm ⁻¹)	Liaisons inter-atomes	Formes des bandes	Fe ³⁺ /Fe ²⁺	Al ³⁺	S ²⁻	
P1-bleu	3423 1629 1110-1033	ν O-H δ O-H ν Si-O-Si et Si-O-Al	faible faible large et intense	+	+	+	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ Na ₈₋₁₀ Al ₆ Si ₆ O ₂₄ S ₂₋₄
P2-brun	3695-3621 2923 540 470	ν O-H ν C-H γ O-H δ Fe-O	épaulement faible fine moyenne fine moyenne	+	-	-	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ et matière organique
P3-bleu	3423 1629 1110-1033	ν O-H δ O-H ν Si-O-Si et Si-O-Al	faible faible large et intense	+	+	+	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ Na ₈₋₁₀ Al ₆ Si ₆ O ₂₄ S ₂₋₄
P4-rouge	3425 2925 1736 1632 1243	ν O-H ν C-H ν C=O ν C=C ν C-O	large intense faible fine moyenne moyenne fine moyenne	-	-	-	matière organique
P5-rouge	3695 2920 540 470	ν O-H ν C-H γ O-H δ Fe-O	épaulement faible faible faible	+	-	-	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ matière organique
P6-bleu	2095 600 500	ν CN ν Fe-N ν C-Fe-C ou Fe-CN	fine intense faible faible	+	-	-	H ₂ O(hydratation) Fe ₄ [Fe(CN) ₆] ₃
P7-bleu	3423 1629 1110-1033	ν O-H δ O-H ν Si-O-Si et Si-O-Al	faible faible large et intense	+	+	+	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ Na ₈₋₁₀ Al ₆ Si ₆ O ₂₄ S ₂₋
P8-rouge	3695-3621 2920 540 470	ν O-H ν C-H γ O-H δ Fe-O	fine moyenne faible fine moyenne fine moyenne	+	-	-	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ matière organique

P9-bleu	3423 1629 1110-1033	ν O-H δ O-H ν Si-O-Si et Si-O-Al	faible faible large et intense	+	+	+	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ Na ₈₋₁₀ Al ₆ Si ₆ O ₂₄ S ₂
P10-bleu	3421 2922 1150	ν O-H ν C-H ν C-O	large intense faible moyenne	-	-	-	matière organique
P11-bleu	3421 2922 1150	ν O-H ν C-H ν C-O	large intense faible moyenne	-	-	-	matière organique
P12-bleu	3421 2922 1150	ν O-H ν C-H ν C-O	large intense faible moyenne	-	-	-	matière organique
P13-bleu	3421 2922 1150	ν O-H ν C-H ν C-O	large intense faible moyenne	-	-	-	matière organique
P14-rouge	3695-3621 540 470	ν O-H γ O-H δ Fe-O	fine intense fine moyenne fine moyenne	+	-	+	Fe ₂ O ₃ HgS
P15-mauve				-	-	-	résine
P16-bleu	3421 2922 1150	ν O-H ν C-H ν C-O	large intense faible moyenne	-	-	-	matière organique
P17-rouge	2427 2920 1307	ν O-H ν C-H ν C-O	large intense faible moyenne	-	-	-	matière organique
P18-rouge brun	3695-3621 2923 540 470	ν O-H ν C-H γ O-H δ Fe-O	épaulements faible fine moyenne fine moyenne	+	-	-	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ matière organique
P19-jaune	3695-3621 540 470	ν O-H γ O-H δ Fe-O	fine moyenne fine moyenne fine moyenne	+	-	-	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃
P20-jaune	3435 1115 630	ν O-H ν S-O γ O-H	doublet large intense moyenne	+	-	+	H ₂ O(hydratation) Fe ₂ O ₃ CaSO ₄

+ : Présence de l'ion;

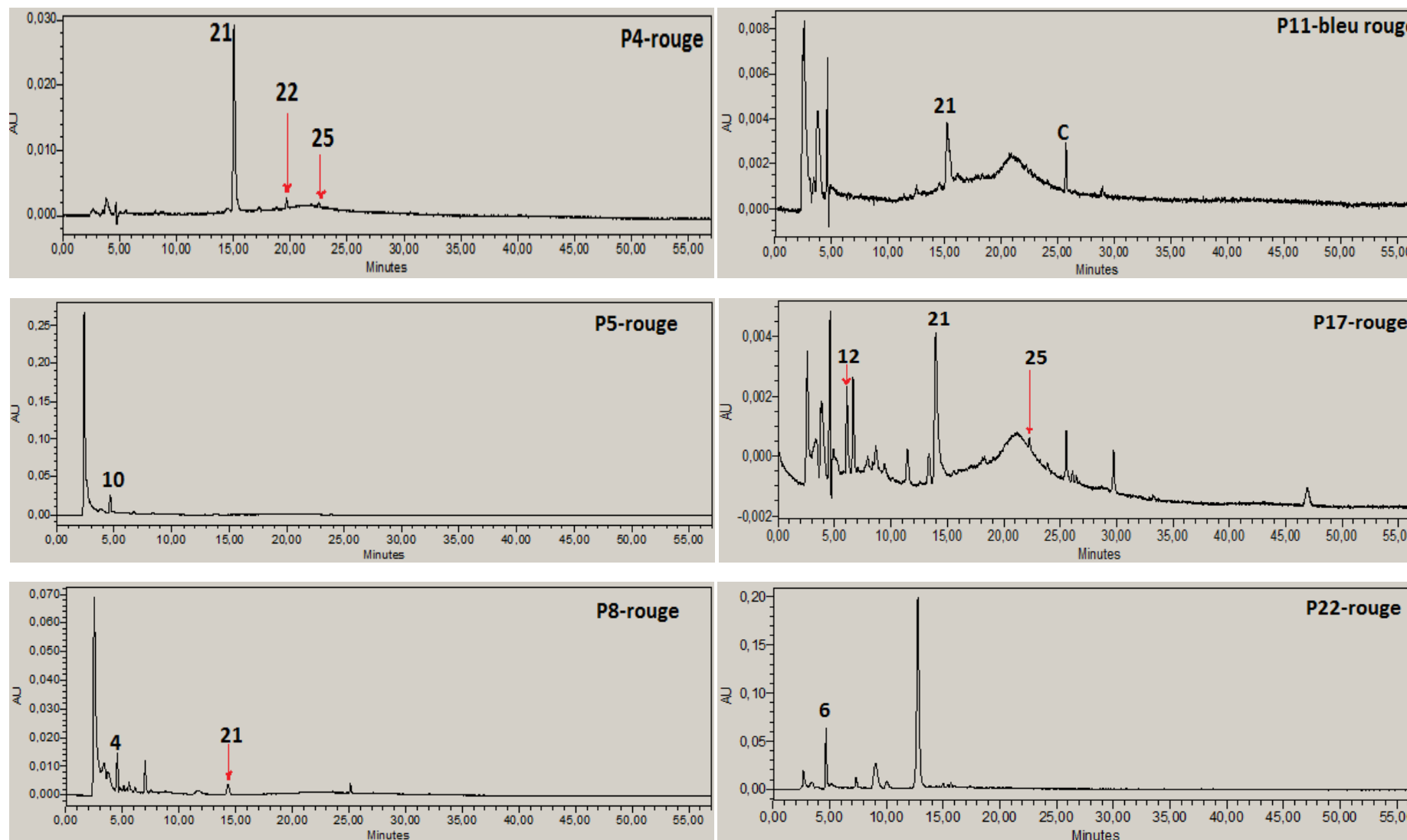
- : Absence de l'ion

Les tests microchimiques effectués sont très sélectifs et concernent la mise en évidence des éléments constitutifs des pigments compatibles révélés par l'analyse IR des prélèvements. Cependant, le test de la platine chauffante réalisé sur le prélèvement **P15** a montré que ce dernier est constitué de résine mais cette résine n'a pu être caractérisée. Par ailleurs, ces tests ont permis de détecter la présence d'ions ferriques et ferreux constitutifs d'oxyde de fer au niveau des prélèvements jaunes et bruns ainsi qu'au niveau de certains prélèvements rouges (**P8**, **P14** et **P5**). En outre, la présence de fer composant le ferrocyanure ferrique caractéristique du bleu cyané a pu être confirmée par ce test. Il en est de même pour les ions Al^{3+} et S^{2-} détectés au niveau des pigments bleus dont les spectres IR-TF caractérisent les vibrations des liaisons Si-O-Si et Si-O-Al associées au bleu outremer synthétique ou bleu de lessive. Par ailleurs, l'analyse microchimique du **P14** a révélée en plus du fer, la présence de sulfures S^{2-} . Il se peut que ce pigment soit issu d'une terre riche en pyrite (FeS_2) et en oxyde de fer ou qu'il résulte d'un mélange d'oxyde de fer avec un minéral du type vermillon (HgS). Il faut également mentionner que les prélèvements de textiles qui n'ont pas subi de test microchimique n'ont pas été présentés. Par contre, ils ont tous fait l'objet d'étude par CLHP/UV-Vis.

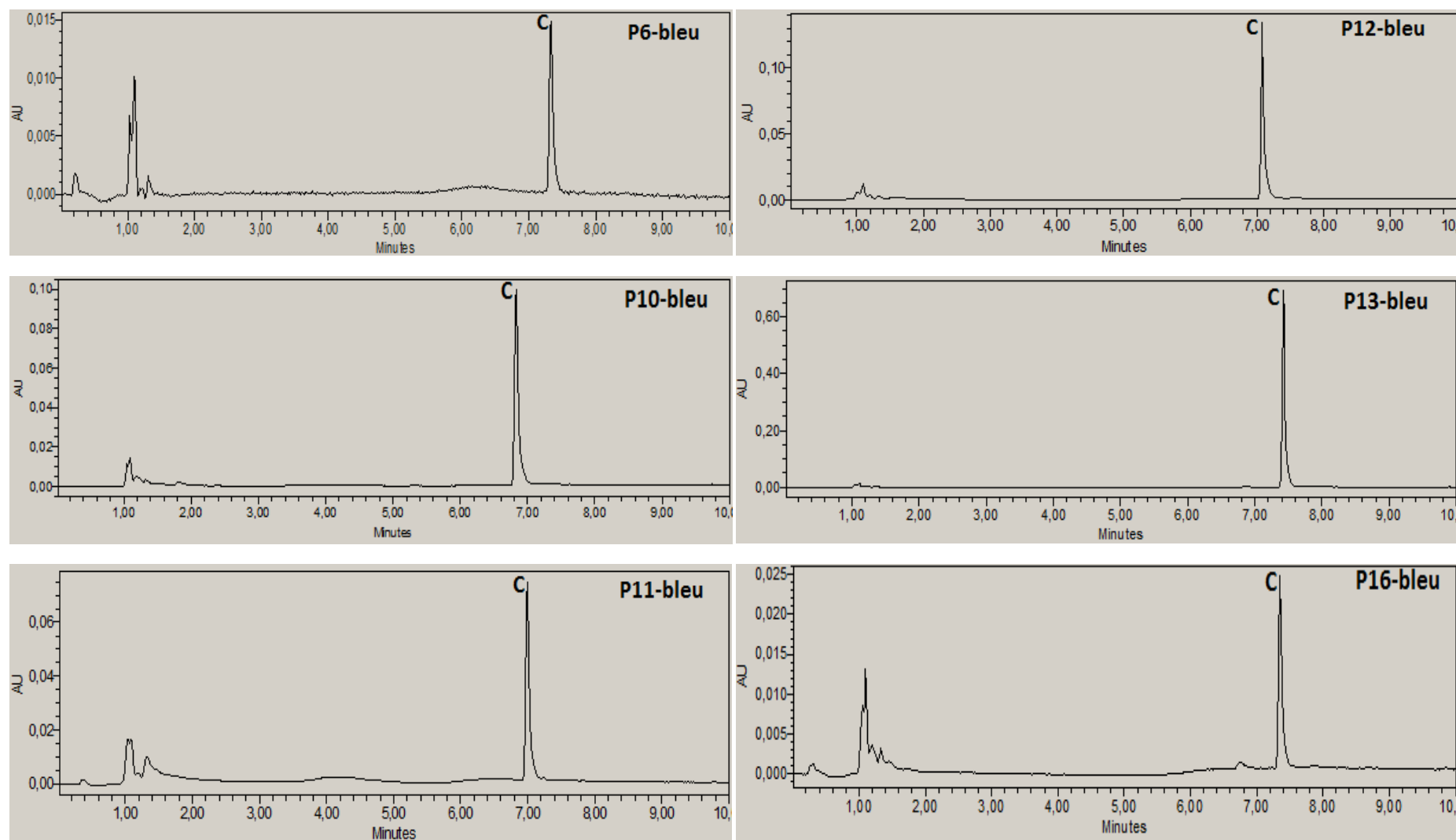
-Analyse des prélèvements par CLHP

Les colorants employés en peinture et en teinture sont souvent associés à une charge métallique afin de donner une solidité à la couleur en profitant notamment de leur propriété d'insolubilité dans tout solvant. Mais cela pose un problème lors de leur analyse en chromatographie liquide, qui reste la technique de choix pour l'identification de ces substances (Szostek *et al.* 2003; Novotná *et al.*, 1999). Afin d'étudier ces échantillons par chromatographie liquide, il faut effectuer un prétraitement de l'échantillon (laque ou textile) en extrayant le(s) colorant(s) emprisonné(s) dans le complexe de coordination. Cette étape permet de "casser" la liaison colorant-charge métallique. C'est pourquoi la méthode d'extraction utilisant le tampon acétique mise au point au laboratoire (Cuoco, 2009) a été employée en première position dans le but d'éviter l'hydrolyse des hétérosides voire la dénaturation des aglycones, que pourrait engendrer une extraction en milieu plus acide notamment au niveau des flavonoïdes (Zhang et Laursen, 2005). Cependant quelques échantillons ont fait l'objet de traitement dans des conditions plus ou moins dures (MeOH-HCl 6M 1:1 v/v) afin de pouvoir extraire leurs colorants (Annexe 1). En effet, il a été démontré que l'action du tampon acétique dans la décomplexation n'est pas due à l'apport de proton dans le milieu, comme peut le faire l'acide chlorhydrique dans une décomplexation

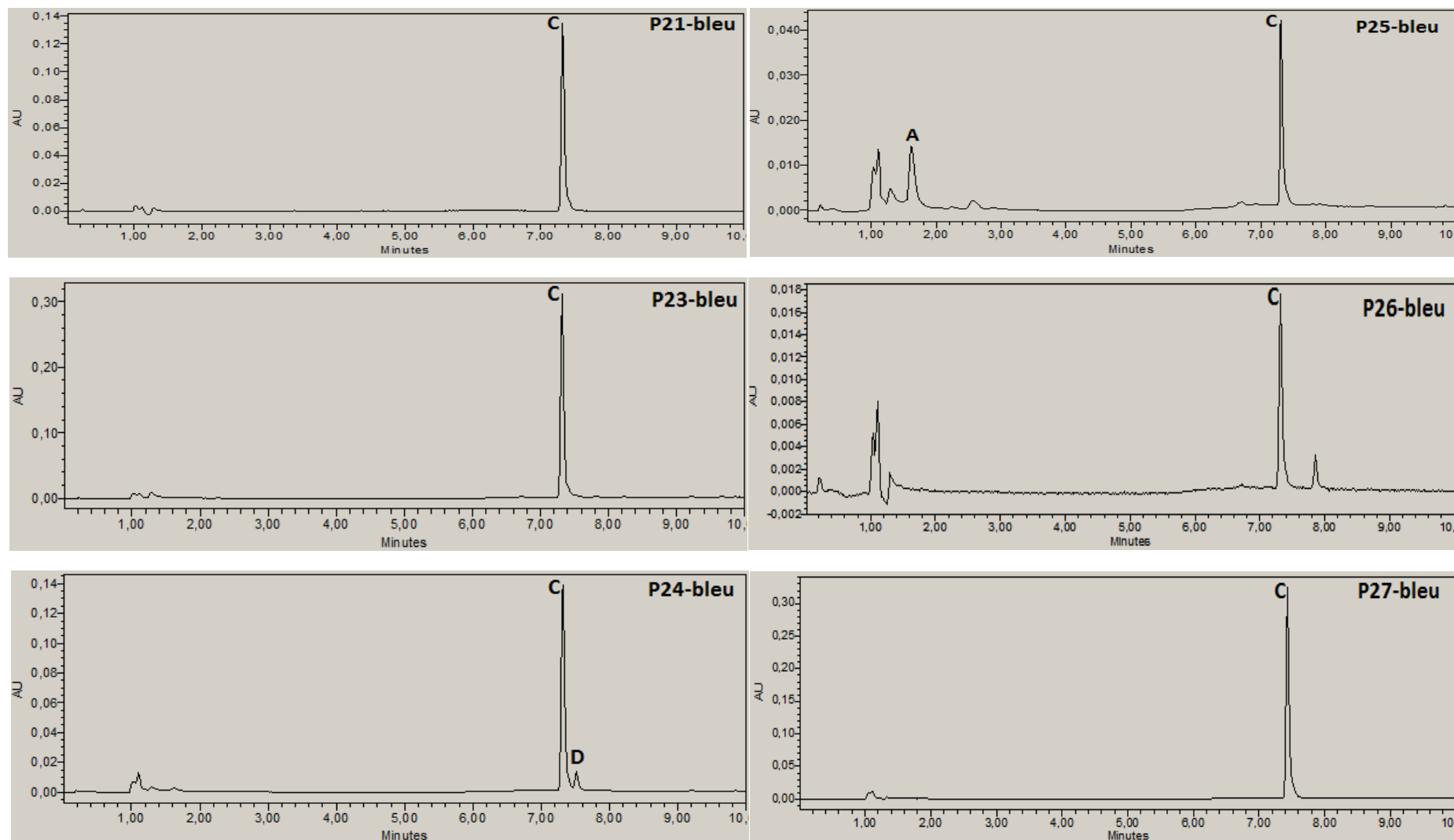
“dure”. Le tampon acétique intervient en tant qu’agent complexant et peut entrer en compétition avec les molécules colorantes (Persson *et al.*, 1998). Dans cette compétition, l’ion acétate a une activité de coordinant qui passe par la formation de complexes du type $[\text{Al}(\text{OAc})]^{2+}$ et $[\text{Al}(\text{OAc})_2]^+$ et avec des valeurs de pH proches de 4, on pourrait extraire le colorant sans le dénaturer, ni dénaturer la colonne analytique (Bourhis *et al.*, 2011). La figure III.1.4 regroupe les empreintes chromatographiques issues de l’analyse par CLHP des prélèvements, suivant leur couleur.



A) Chromatogrammes CLHP à 350 nm des colorants extraits à partir des prélèvements rouges (gradient n°1)



B) Chromatogrammes CLHP à 285 nm des colorants extraits à partir des prélèvements bleus (gradient n°2)












C) Chromatogrammes CLHP à 285 nm des colorants extraits à partir des prélèvements de textiles bleus (gradient n°2)

Figure III.1.4 : Empreintes CLHP des colorants extraits des différents échantillons muséaux















L'analyse des prélèvements rouges **P4** et **P17** a permis d'identifier la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (21) et des aglycones flavones : la lutéoline (22) et l'apigénine (25) caractéristiques de l'espèce *Lawsonia inermis*. Comme il a été vu précédemment, la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) n'est présente que dans cette espèce. Ainsi, même en l'absence des composés très sensibles aux facteurs environnementaux à l'instar des flavonoïdes, la présence de cette espèce est révélée par son marqueur de coloration ; la lawsone. Par conséquent, la caractérisation de la lawsone dans les prélèvements **P8** et **P11**, dénote de la contribution de *L. inermis* dans la confection de ce pigment. Outre la lawsone, la (-)- épicatechine (4) a été identifiée dans le **P4** tandis que le **P11** renferme en plus de l'indigotine. Par ailleurs, l'acide gallique (10) et la (+)- catéchine (6) ont été respectivement identifiés dans les prélèvements **P10** et **P22**. Ces composés caractérisent fortement les fruits et les écorces de certaines plantes dites riches en tanins à l'instar de l'épicatechine et la catéchine identifiées préalablement dans les écorces de *Khaya senegalensis*.

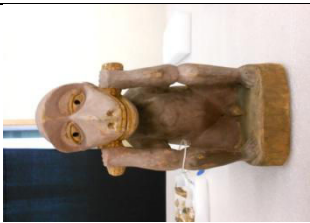











Dans les prélèvements bleus **P6**, **P10**, **P11**, **P12**, **P13** et **P16** ainsi qu'au niveau des textiles bleus analysés **P21**, **P23**, **P24**, **P25**, **P26** et **P27**, il a été identifié l'indigotine (C). Outre l'indigotine, le **P24** renferme l'indirubine (D) tandis que l'isatine (A) est identifiée dans le **P25**. En effet, l'indigotine et l'indirubine caractérisent naturellement les espèces de plantes à indigo, ce qui ne permet pas d'établir précisément l'espèce botanique utilisée, parmi les deux espèces *P. cyanescens* et *I. tinctoria* employées au Bénin. Néanmoins l'échelle de différenciation préétablie entre les deux espèces et qui repose sur le rapport de leur proportion relative en indigoïdes, contribue à leur distinction. En effet, l'application de ce paramètre révèle que, le **P24** dont le rapport $A_D/A_C = 0,6$; se situe dans la zone de l'espèce *I. tinctoria*, tandis que les autres prélèvements bleus analysés sont dans la zone de *P. cyanescens* ($A_D/A_C = 0$). A noter que les conditions d'extraction et d'analyse par CLHP, appliquées dans la réalisation de cette caractérisation sont identiques à celles qui ont été établies précédemment. Par conséquent, on pourrait conclure que l'espèce *I. tinctoria* a été employée dans la coloration du tissu **P24** tandis que la couleur des autres prélèvements bleus est due à l'usage de *P. cyanescens*. Ceci corrobore les résultats de l'enquête ethnobotanique effectuée dans le cadre de cette étude montrant que la fréquence d'utilisation de *P. cyanescens* est deux fois supérieure à celle d'*I. tinctoria*. Par ailleurs, la détection de marqueur de dégradation (isatine) dans le **P25** pourrait être liée aux conditions de conservation de ce tissu. Le tableau III.1.3 présente les objets muséaux échantillonnés puis récapitule les résultats des différentes analyses effectuées.

Tableau III.2.3 : Fiche identitaire des prélèvements muséaux et récapitulatif des résultats de leur caractérisation

N° ordre	Nature de l'objet et identifiant	Structure de l'objet	Endroit de prélèvement	Texture des couleurs prélevées	Description	Matériaux (ions ou molécules) identifiés	Conclusion: (origine du matériau)
P1	Masque Guèlèdè 401.940.039 Réserves SMA		Œil droit 	bleu 	Homogène bleu avec quelques impuretés jaunes d'ocre	Al^{3+} , S^{2-} , Fe^{3+} , Fe^{2+}	Mélange Bleu outremer et de contaminant d'oxyde de fer (ocre jaune)
P2	Masque Guèlèdè 401.940.039 Réserves SMA		Serpent arrière (partie supérieure) 	brun 	Hétérogène brun sur support jaune	Fe^{3+} , Fe^{2+}	Présence d'Oxyde de fer, pigment identique au brun Cassel
P3	Masque Guèlèdè 401.940.033 Réserves SMA		Côté gauche lézard (patte-tête) 	bleu via noir 	Hétérogène bleu noir sur support ciment jaune	Al^{3+} , S^{2-} , Fe^{3+} , Fe^{2+}	Mélange Bleu outremer et de contaminant d'oxyde de fer (ocre jaune)

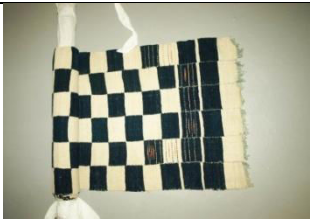
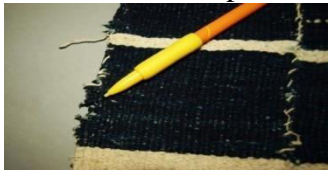

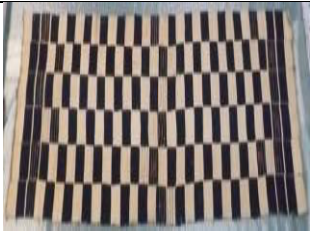





P4	Masque Guèlèdè 2013.7.1 Réserves SMA		Intérieur tête 	Rouge 	Homogène rouge collé au bois	2-hydroxy-1,4- naphthoquinon e (lawsone) Lutéoline Apigénine	<i>Lawsonia inermis</i> (Henné)
P5	Masque Guèlèdè 401.940.006 Réserves SMA		intérieur tête (côté gauche) 	Rouge 	Homogène rouge avec quelques impuretés de cristaux brun-noir	Acide gallique et Fe^{3+} , Fe^{2+}	Plante à tanins et oxyde de fer (ocre rouge)
P6	Jumeaux Ibéji 501.931.002 Réserves SMA		nuque droite (femelle) 	Bleu 	Hétérogène bleu collé au bois	Fe^{3+} , Fe^{2+} et indigotine	Mélange bleu Cyané (minéral) et bleu organique issu de <i>Phenoptera cyanescens</i> (liane indigo)
P7	Masque Guèlèdè 401.940.040 Vitrine SMA		arrière socle (bord) 	Bleu 	Homogène bleu avec quelques impuretés de bois	Al^{3+} , S^{2-} , Fe^{3+} , Fe^{2+}	Bleu outremer synthétique ou bleu de lessive
P8	Masque Guèlèdè 401.940.023 Vitrine SMA		bas côté gauche 	Brun 	Hétérogène rouge mêlé aux cristaux jaune	Lawsonie épicatechine Fe^{3+} , Fe^{2+}	Henné + autre plante à tanin probablement le <i>Khaya senegalensis</i> + oxyde de fer

P9	Masque Guèlèdè 401.940.023 Vitrine SMA		bord draper arrière 	Bleu 	Hétérogène bleu mêlé de bois	Al^{3+} , S^{2-} , Fe^{3+} , Fe^{2+}	Bleu outremer et oxyde de fer
P10	Fétiche 60003627 Réserves MG		sur le socle 	Bleu 	Hétérogène bleu collé au bois	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)
P11	Fétiche 60003627 Réserves MG		haut du dos 	Bleu 	Hétérogène deux couches bleu supporté par le rouge	Lawsonet Indigotine	Couche supérieure faite de liane indigo et couche inférieure faite de Henné
P12	Fétiche proche d'Ibéji 60003628 Réserves MG		nuque arrière gauche 	Bleu 	Homogène avec quelques impuretés de bois	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)
P13	Jumeaux Ibéji 60004141 Réserves MG		oreille droite 	Bleu 	Homogène écaille bleue	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)

P14	Singe 60004085 Réserves MG		socle arrière gauche 	Rouge 	Hétérogène brun rouge orangé	Fe^{3+}, Fe^{2+}, S^{2-}	Mélange d'oxyde de fer et de terre riche en pyrite FeS_2 ou en HgS
P15	Masque Guèlèdè 60004102 Réserves MG		bande côté gauche 	résine mauve, liant 	Hétérogène Cristaux brillants bleu brun		Résine
P16	Masque Guèlèdè D979-3-0792 Réserves MG		nuque arrière gauche 	bleu noir 	Coupeau recouvert de bleu	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)
P17	Masque Guèlèdè D979-3-0792 Réserves MG		narine intérieure droite 	Rouge 	Homogène rouge avec quelques morceaux de bois	Acide vanillique Lawsonie Apigénine	<i>Lawsonia inermis</i> (Henné)

P18	Masque Guèlèdè 60003937 Réserves MG		socle côté gauche (grattage bois) 	rouge brun résineux 	Hétérogène brun avec quelques impuretés de cristaux bleus	Fe^{3+}, Fe^{2+}	Présence d'oxyde de fer, pigment identique au brun Cassel
P19	Masque Guèlèdè 60003937 Réserves MG		arrière oreille droite 	Jaune 	Hétérogène écaille jaune reposant sur une mince couche de bleu de lessive	Fe^{3+}, Fe^{2+}	Oxyde de fer du type ocre jaune
P20	Masque Guèlèdè 60004102 Réserves MG		arrière ruban côté gauche 	Jaune 	Hétérogène jaune mêlé au bois avec quelques cristaux de bleu de lessive	$Fe^{3+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}$	Mélange oxyde de fer et de $CaSO_4$
P21	Costume gilet chasseur (70 x 70 cm) 2013.0.152 Ré serves SMA		trou, partie inférieure du textile 	Bleu jaune orangé 	Hétérogène fibre bleue entrelacée de jaune orangé	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)

P22	Accessoire de tenue de Sakpata (Divinité) 2013.0.192.2 Réserve SMA		cordelette de fibres effilochées 	Rouge 	Homogène fibre "sisal" rouge	(-)-épicatechine	<i>Khaya senegalensis</i> ou autre plante à tanins
P23	Tenue de vodounsi Sakpata (Tissu blanc bleu motifs gris et rouge) 2013.0.192.5 Réserve SMA		bas de la jupe 	Bleu et orangé 	Hétérogène fibre bleue entrelacée d'orangé	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)
P24	Couverture en laine peul dite Kassa (162 x 69 cm) 2013.0.173 Réserve SMA		fibres bleues extrémité inférieure 	Bleu 	Homogène fibre bleu foncée via noire	Indigotine et Indirubine	<i>Indigofera tinctoria</i> (Indigotier)

P25	Tissu Baoulé du Burkina Faso 2013.0.174 Réserve SMA		fibres extrémité supérieure 	Bleu foncé 	Homogène fibre bleue foncée	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)
P26	Tissu Baoulé du Burkina Faso 2013.0.174 Réserve SMA		fibres extrémité inférieure 	Bleu clair 	Homogène fibre bleue claire	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)
P27	Tissu Côte d'Ivoire bande bleue 101.633.001 Réserve SMA		fibres bleues extrémité inférieure 	Bleu 	Homogène fibre bleue	Indigotine	<i>P. cyanescens</i> (liane indigo)

SMA : Service des missions africaines (musée africain de Lyon)

MG : Musée Guimet (ou Musée de Confluence de Lyon)

Ces résultats montrent que parmi les 27 échantillons caractérisés, plus de la moitié est faite purement de colorants organiques dont les textiles en majorité, tandis qu'environ 6 sont constitués spécifiquement de matières minérales. En outre ces matières sont utilisées sous forme de formulation en mélange ou en couche solide et tenace, ce qui transparait parfois dans le spectre IRTF de certains prélèvements sous forme de contamination (impuretés). En dépit de cela, la provenance botanique et minérale des échantillons caractérisés a pu être élucidée grâce aux investigations menées par des tests microchimiques et par CLHP/UV-Vis. Cependant, l'origine botanique des prélèvements rouges **P5** et **P22** renfermant les tanins, n'a pu être véritablement élucidée. Il est intéressant de noter que l'identification des pigments synthétiques comme le bleu cyané et le bleu de lessive dans certains prélèvements (**P1**, **P3**, **P6**, **P7** et **P9**) montre que la préparation de ces derniers est probablement postérieure à 1700. En effet, il a été rapporté que vers la fin du siècle passé, 150 commerciaux sillonnent la planète pour vendre les différents bleus Guimet. On peut alors le retrouver en Tunisie, au Maroc, au Gabon, au Togo, en Côte d'Ivoire, au Bénin et au Nigeria (Romeggio, 2007). Il en serait de même pour le bleu cyané.

4. Conclusion

Les différentes investigations menées par IR-TF, tests microchimiques et CLHP/UV-Vis, ont permis de déterminer grâce à la présence de particules minérales ou de biomarqueurs spécifiques, l'origine minérale ou botanique des prélèvements muséaux échantillonnés. En effet, les espèces tinctoriales les plus employées et identifiées dans les prélèvements bleus sont *Philenoptera cyanescens* et *Indigofera tinctoria* tandis que *Lawsonia inermis* caractérise la plupart des prélèvements rouges. Cependant l'attribution de *Khaya senegalensis* dans la préparation des pigments **P8** et **P22** est quelque peu hypothétique étant donné que le composé identifié caractérise également d'autres plantes riches en tanins. En outre, les pigments minéraux caractérisés, sont essentiellement des oxydes de fer du type ocre jaune et rouge ainsi que des pigments synthétiques comme le bleu cyané et le bleu de lessive. En effet, l'identification de ces pigments synthétiques fournit des informations complémentaires concernant la période probable de la fabrication de l'objet. Par ailleurs, des empreintes de minéraux utilisés sous forme de charge comme le kaolin et la pyrite ont été caractérisées dans certains prélèvements.

Chapitre 2: Applications pharmacologiques *via* des tests chimiques *in-vitro***1. Activité anticancer : Test de cytotoxicité sur des cellules MCF-7 et IGROV**

Une substance cytotoxique se définit comme une molécule qui est toxique pour la cellule à divers degrés, du simple trouble métabolique à l'apoptose. Dans le domaine cosmétique, il est indispensable de déterminer la dose à partir de laquelle un extrait ou une fraction d'extrait de plante est cytotoxique avant tout autre test, dans le but d'éviter de commercialiser des produits toxiques pour la santé humaine. Alors que dans le domaine pharmaceutique, les molécules cytotoxiques sont fortement recherchées, dans l'espoir de trouver un traitement efficace contre les cancers et autres tumeurs qui sont liés à une prolifération anormale de cellules. En effet, première cause de mortalité chez l'être humain, le cancer, sous toutes ses formes, est à lui seul à l'origine de près de 8 millions de morts chaque année à travers le monde (OMS, 2006). Supérieure à celles du sida, de la tuberculose et du paludisme réunis, la mortalité liée au cancer augmente de façon constante depuis près de quarante ans, à mesure que la population augmente et vieillit (OMS, 2006 ; Beaulieu, 2013). Le cancer du sein est le plus fréquent et le deuxième plus meurtrier chez les femmes, après le cancer du poumon qui demeure la principale cause de décès imputable à cette maladie. C'est pour cette raison, que l'application pharmacologique des extraits bruts et fractions plus ou moins purifiées des plantes étudiées a porté sur la maladie la plus meurtrière du monde, en complément aux tests chimiques: activités antioxydantes et toxicité larvaire, réalisés précédemment sur les plantes tinctoriales sélectionnées. En effet, la lignée de cellules mammaires cancéreuses humaines (MCF-7) ainsi que la lignée cellulaire du cancer de l'ovaire IGROV ont été testées.

A noter que ces tests de cytotoxicité ont été effectués au "Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR CNRS 5623" de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse sous la direction du professeur Jalloul Bouajila.

1.1. Principe

L'activité cytotoxique des extraits et fractions de plantes étudiées sur les lignées cellulaires cancéreuses, a été évaluée en utilisant le sel de tétrazolium ; le bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Ce sel est réduit par des mécanismes moléculaires complexes au sein des cellules vivantes faisant intervenir des déshydrogénases mitochondriales, notamment la succinate déshydrogénase puis il est transformé en un produit

coloré appelé formazanin soluble dans l'eau (Berridge *et al.*, 1996 ; Daycem *et al.*, 2013) (**Figure III.2.1**). Ainsi, il est possible de déterminer la viabilité cellulaire par simple lecture d'absorbance au spectrophotomètre UV-Vis à 540 nm après solubilisation du formazan dans un solvant organique. Plus l'absorbance diminue plus la viabilité cellulaire diminue. En effet, après incubation des deux lignées (MCF-7 ; IGROV) dans des plaques de 96 puits, le nombre des cellules vivantes est directement proportionnel à l'intensité de la coloration violette mesurée après 72 h en présence ou non des produits testés. Chaque analyse est répétée trois fois et les effets cytotoxiques des extraits ont été évalués en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire suivant l'expression : [% **Inhibition** = (Abs_{témoin} - Abs_{extrait}) / Abs_{témoin} × 100; Abs=absorbance à 540 nm] ; Abs_{témoin} étant l'absorbance lue au niveau des puits de cellules sans extrait.

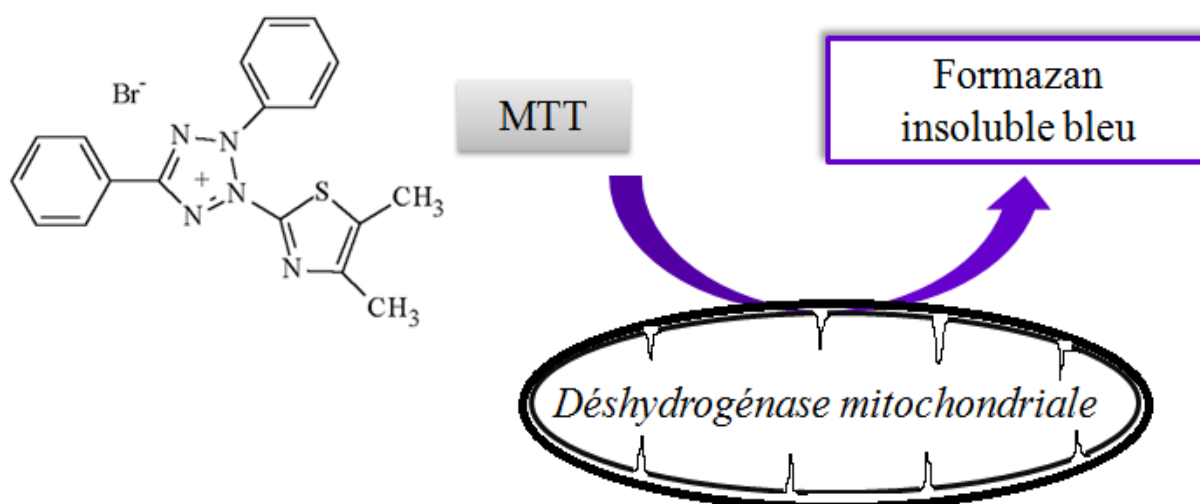


Figure III.2.1 : Structure et schéma réactionnel impliquant le sel de tétrazolium (MTT) dans les cellules vivantes

1.2. Résultats

Le tableau III.2.1 présente le pourcentage moyen d'inhibition de la croissance des lignées de cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV mises en contact avec les extraits ou leurs fractions. Après 72 h d'incubation et à une concentration de 50 mg/L, les résultats indiquent une variation du pourcentage d'inhibition en fonction des espèces et des extraits testés. Hormis les extraits issus de *P. cyanescens* et l'extrait IdT MeOH UAE tous les échantillons appliqués possèdent une toxicité non négligeable sur l'une ou l'autre des lignées cellulaires testées.

Tableau III.2.1 : Pourcentage d'inhibition illustrant la cytotoxicité des extraits ou leurs fractions sur la croissance des cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV

Espèces	Extraits et fractions testés	MCF-7	IGROV
		% inhibition	% inhibition
<i>Tectona grandis</i>	<i>T. grandis</i> Ext MeOH UAE	95,1 ± 4,3	51,8 ± 7,3
	<i>T. grandis</i> F5	92,6 ± 5,2	83,6 ± 5,3
<i>Indigofera tinctoria</i>	<i>IdT</i> Ext MeOH UAE	nd	13,4 ± 2,1
	<i>IdT</i> F5	71,0 ± 4,9	29,4 ± 6,6
<i>Philenoptera cyanescens</i>	<i>PcF</i> Ext DCM RE	47,2 ± 1,4	nd
	<i>PcF</i> ERC	25,9 ± 4,7	nd
<i>Lawsonia inermis</i>	<i>L. inermis</i> Ext MeOH 80% RE	48,5 ± 3,9	47,5 ± 9,3
	<i>L. inermis</i> Fraction Et ₂ O	71,2 ± 3,4	46,0 ± 2,1
<i>Khaya senegalensis</i>	<i>Khaya</i> Ext MeOH UAE	27,0 ± 6,7	54,4 ± 0,2
	<i>Khaya</i> Ext MeOH RE	35,7 ± 1,1	48,1 ± 1,9

Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est issu de l'espèce *T. grandis*. En effet, son extrait brut méthanolique UAE induit une inhibition de 95,1 ± 4,3% sur la lignée cellulaire MCF-7 et une inhibition moyenne (51,8 ± 7,3%) sur la croissance de la lignée IGROV. Ce dernier résultat avoisine celui de l'extrait hexanique des feuilles de teck (54%), sur les cellules embryonnaires du fibroblaste (CEF), trouvé par Mahesh et Jayakumaran (2010) alors que l'extrait chloroformique des écorces, testé sur les cellules embryonnaires du rein humain (HEK 293) a fourni un résultat (95,3%) similaire à celui de l'extrait MeOH UAE, bien que les organes exploités de la plante soient différents. Par ailleurs, l'application de la fraction F5 de *T. grandis* a révélé une activité cytotoxique très élevée aussi bien sur les cellules MCF-7 (92,6 ± 5,2%) que sur la lignée cellulaire IGROV (83,6 ± 5,3%). Que ce soit l'extrait chloroformique ou l'extrait méthanolique ou encore la fraction F5 de *T. grandis*, les composés quinoniques extraits seraient à l'origine de l'activité cytotoxique observée. En effet, la toxicité de la fraction F5 sur les deux lignées de cellules testées, serait liée aux effets cytotoxiques des trois anthraquinones **Ta**, **Tb** et **Tc** caractérisées au sein de cette fraction. Ces résultats complètent et corroborent ceux de Mahesh et Jayakumaran (2011) en ce qui concerne la

diversité des lignées cancéreuses sur lesquelles les anthraquinones du teck ont révélé un effet cytotoxique évident.

Après *T. grandis*, les fractions IdT F5 et Et₂O issues respectivement des espèces *I. tinctoria* et *L. inermis* exercent un effet inhibiteur assez important, évalué à 71% environ, sur la croissance des cellules cancéreuses MCF-7. Par contre le pourcentage d'inhibition enregistré au niveau de la lignée IGROV est assez faible, pour la fraction IdT F5 ($29,4 \pm 6,6\%$) et moyen pour la fraction Et₂O ($46,0 \pm 2,1\%$). En outre, on relève un pourcentage d'inhibition sensiblement identique (48%) de l'extrait MeOH 80% RE de *L. inermis* sur les deux lignées cellulaires testées. En effet, cet extrait est essentiellement caractérisé par des flavones : lutéoline, diosmétine, apigénine et leurs hétérosides (7-*O*-glucoside). En plus, la lawsone a été détectée dans cette fraction. Par ailleurs, l'augmentation de la toxicité observée au niveau de la fraction Et₂O, serait due à l'augmentation de la concentration en lawsone spécifiquement extraite par fractionnement, ainsi qu'aux acides phénoliques (acides gallique, caféique et ellagique) identifiés dans la fraction. Il a été démontré que la molécule responsable de l'activité cytotoxique de *L. inermis* sur les cellules cancéreuses des seins (MCF-7), du colon (Caco-2) et du foie (HepG2) est un dérivé de la lawsone appelé isoplumbagin (8-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphthoquinone) isolé des écorces de tige de l'espèce (Ali et Grever, 1998 ; Endrini *et al.*, 2007). De la même manière, la cytotoxicité de la fraction IdT F5 serait due à l'indirubine. L'écart important du pourcentage d'inhibition relevé entre les lignées de cellules cancéreuses (MCF-7 et IGROV) serait non seulement lié à la sensibilité différentielle des deux lignées mais surtout aux propriétés intrinsèques de l'indirubine et à la durée du traitement. En effet, Paitoon *et al* (2007), ont montré que l'application d'une forte concentration d'indirubine (30 µM) pendant 72 h provoque sa cristallisation et sa dégradation réduisant ainsi son effet inhibiteur sur les cellules MCF-7. En raison de ces limites, plusieurs analogues d'indirubine comme la 5-chloro-indirubine, la 3'-monoxime-indirubine ont été synthétisées, et ont donné des propriétés pharmacologiques très intéressantes contre les cellules cancéreuses (Damiens *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'extrait PcF ERC constitué spécifiquement d'indigotine a révélé un effet cytotoxique assez faible sur les cellules MCF-7 ainsi que les tanins catéchiques caractéristiques des deux extraits de *Khaya senegalensis* testés. Par contre, on note un pourcentage d'inhibition moyen de ces derniers extraits sur la lignée IGROV. Il ressort tout de même, que la structure des composés présents dans les extraits joue un rôle primordial quant à leur réactivité sur les cellules cancéreuses. C'est du moins, ce qui justifie l'écart de

cytotoxicité observé entre l'indirubine et l'indigotine caractéristiques des extraits IdT F5 et PcF ERC.

En résumé, les résultats des tests de cytotoxicité des colorants extraits des plantes étudiées, sur les cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV, sont très probants car il a été enregistré de forte mortalité cellulaire allant jusqu'à 95% pour de petites concentrations d'extraits testées notamment au niveau des espèces *T. grandis*, *L. inermis* et *I. tinctoria*. Cette étude est encourageante car elle donne de fortes probabilités de purification et d'isolement de molécules actives contre les cancers. A noter que la figure III.2.2 récapitule sous forme d'histogramme l'ensemble des résultats obtenus avec une visibilité assez nette de l'inhibition comparée des extraits, sur la croissance des lignées cellulaires MCF-7 et IGROV.

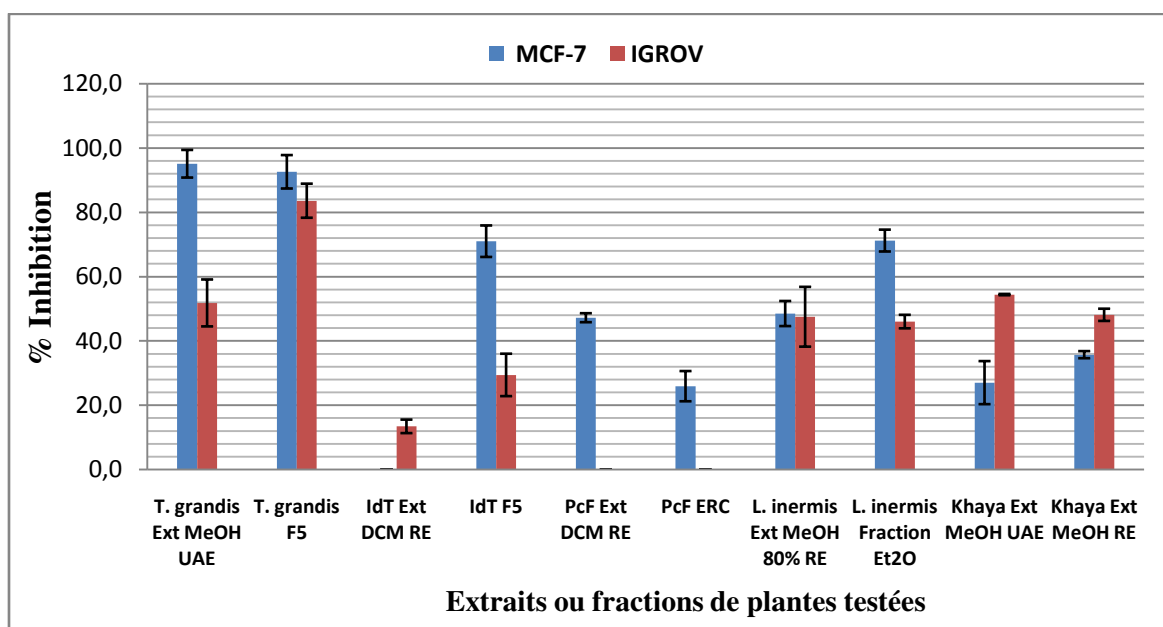


Figure III.2.2 : Histogramme illustrant le pourcentage d'inhibition des extraits ou fraction de plantes testées sur les lignées cellulaires MCF-7 et IGROV

2. Discussion générale sur la caractérisation et les propriétés pharmacologiques des plantes étudiées.

L'identification par CLHP/UV-Vis a permis de caractériser une diversité de colorants allant du jaune flavonoïdique au bleu indigoïque en passant par le rouge quinonique et les acides phénoliques et cinnamiques contenue dans les plantes étudiées. Par ailleurs, l'évaluation de la teneur en phénols, en flavonoïdes et en tannins totaux présents dans ces plantes ainsi que les tests chimiques réalisés *in vitro* notamment l'activité antioxydante, la toxicité larvaire et la cytotoxicité, ont permis de déterminer les composés ou groupes chimiques responsables des propriétés pharmacologiques de ces plantes. Parmi ces composés,

la catéchine et l'épicatéchine constitutives des tanins condensés ainsi que les acides gallique, ellagique (constituants des tanins hydrolysables) et caféique sont des composés phénoliques polyhydroxylés caractérisés dans les espèces *Khaya senegalensis* et *Lawsonia inermis*. En outre, ces espèces présentent les plus fortes teneurs en tanins totaux accompagnées d'une forte activité antioxydante *via* les tests au DPPH et FRAP. En effet, de nombreux travaux ont démontré que les polyphénols ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation (Teissedre *et al.*, 1996 ; Bohm *et al.*, 1998 ; Debra *et al.*, 2001). Les composés contenant une structure *ortho*-trihydroxylée, comme les gallotanins et les proanthocyanidines galloylées montrent une forte activité contre les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) (Plumb *et al.*, 1998 ; Ursini *et al.*, 2001). Il a aussi été démontré que les gallocatéchines ont la propriété de neutraliser les radicaux OH^{\cdot} et HOO^{\cdot} grâce à leur potentiel redox bas (Plumb *et al.*, 1998). On leur attribue également, des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers (Vinson *et al.*, 1995 ; Bohm *et al.*, 1998) ou encore des activités antitumorales et chimio-préventives (Lacaille-Dubois et Wagner, 1996). La taille des proanthocyanidines polymériques joue aussi un rôle important. Les dimères et trimères ont une activité antioxydante plus forte que les oligomères de taille supérieure (Plumb *et al.*, 1998 ; Ursini *et al.*, 2001). Ceci expliquerait, dans une certaine mesure, le fait que *L. inermis* présente un pouvoir antiradicalaire inférieur à celui de *K. senegalensis* bien que cette espèce ait fourni la plus forte teneur en tanins. Tout ceci confirme la corrélation assez forte enregistrée précédemment entre la teneur en tanins totaux et l'activité antioxydante des plantes étudiées. Par ailleurs, hormis, les acides phénoliques et les tanins, d'autres travaux ont montré que l'activité antioxydante de *L. inermis* est due aux flavones isolées de cette espèce. Botros *et al.* (2004) ont prouvé que l'activité antioxydante de l'apiin (apigénine-7-apiosyl-glycoside) est largement supérieure à celle de la vitamine C alors que l'apigénine et la lutéoline ont révélé une activité proche de celle de la vitamine C. A noter que le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de *L. inermis* est pratiquement identique à celui de *T. grandis*, la teneur en flavonoïdes totaux la plus élevée est issue de *T. grandis*. Ainsi, son activité antioxydante serait principalement liée aux colorants jaunes flavonoïdiques qu'il renferme. En effet, trois flavones : lutéoline, diosmétine et apigénine et quatre flavonols : rutine, quercétine, isorhamnétine et rhamnétine ont été caractérisés dans cette espèce. D'après Rice-Evans *et al.* (1996), pour obtenir une activité antioxydante maximale les flavonoïdes doivent comporter:

- une structure *ortho*-diphénolique (noyau catéchol) sur le noyau B,
- une double liaison entre le C2 et le C3, qui est en conjugaison avec la cétone du C4,

- des groupements hydroxyles en position 3 et 5.

Par ailleurs, les méthylations et glycosylations des flavonoïdes réduisent leur activité par rapport à leur aglycone correspondant. En considérant ces critères structuraux, la quercétine est le flavonol type qui doit posséder une forte capacité antioxydante, ce qui a d'ailleurs été confirmé dans plusieurs études (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Pietta, 2000). Par ailleurs, la plupart des flavonoïdes ne sont pas toxiques pour la santé humaine, mais il a été démontré qu'ils inhibaient la prolifération cellulaire de diverses lignées de cellules cancéreuses. Ainsi les flavonols, telle que la quercétine, ont été proposés comme agent chimiopréventif capable d'inhiber *in vitro* l'angiogénèse et la prolifération de tumeurs (Benavente-Garcia et Castillo, 2008). Dans cette étude, il a pu être démontré que l'extrait brut méthanolique de *T. grandis* riche en composés polaires notamment en flavonoïdes ainsi que la fraction F5 constituée d'antraquinones, présentaient une cytotoxicité à 50 mg/L sur les cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV. En effet, il a été relevé une augmentation du pourcentage d'inhibition de l'extrait brut mère de 3% par rapport à celui de la fraction F5, principalement sur la lignée MCF-7. Cet écart pourrait être assimilé au pourcentage d'inhibition des flavonoïdes, étant donné que cet extrait brut renferme également les anthraquinones Ta, Tb et Tc caractéristiques de la fraction F5 qui en plus, a été très active sur la lignée IGROV contrairement à l'extrait brut. Par conséquent, l'activité cytotoxique de *T. grandis* pourrait être attribuée aux anthraquinones et ses dérivés et non aux flavonoïdes, ce qui serait en accord avec les connaissances actuelles sur la toxicité des flavonoïdes en tant que composés ubiquitaires moins toxiques des végétaux.

Par ailleurs, cet extrait s'avère non toxique à l'issue de son évaluation toxicologique sur les larves d'*Artemia salina* mais il pourrait être à la limite bioactif par référence à la définition de Meyer *et al.*, (1982). En effet, cette bioactivité attribuée aux anthraquinones, a été prouvée sur les cellules cancéreuses testées. Néanmoins, du point de vue chimique, des travaux antérieurs ont rapporté que le lapachol et ses dérivés notamment le 5-hydroxylapachol constituent les principaux composés cytotoxiques isolés de *T. grandis* (Khan et Mlungwana, 1999 ; Guerra *et al.*, 2001). Toutefois, ces composés n'ont pas été identifiés dans les feuilles de teck étudiées. De la même manière, il a été remarqué que la lawsone testée sur les larves d'*Artémia salina* apparaît non toxique comparée à l'extrait brut méthanolique de *L. inermis*. *A contrario*, le pourcentage d'inhibition de cet extrait sur la croissance des cellules cancéreuses est très faible comparé à celui de la fraction Et₂O plus concentrée en lawsone. Ces résultats semblent quelque peu mitigés et ne permettent pas d'établir une relation directe entre la toxicité larvaire et la bioactivité des extraits et fractions testés, notamment en ce qui concerne l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses. A noter que ces extraits et fractions sont composés de

plusieurs molécules, ce qui pourrait induire des effets antagonistes ou synergiques sur les activités testées. Ainsi deux ou plusieurs molécules différentes peuvent soit agir sur la même cible et la compétition qui en résulte a un effet néfaste sur l'activité, soit elles agissent sur des cibles différentes et l'action combinée des effets induit une diminution de l'activité. En plus de la lawsone, les acides gallique, ellagique et caféique ainsi que trois flavones (lutéoline, diosmétine et apigénine) ont été caractérisés dans cette fraction. En effet, de nombreux travaux ont associé les propriétés pharmacologiques du henné à la lawsone (Rani *et al.*, 2007) et ses dérivés notamment l'isoplumbagin responsable de son activité cytotoxique (Ali et Grever, 1998 ; Endrini *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il a été relevé précédemment que les plus faibles activités antioxydantes proviennent des plantes à indigo. En effet, outre l'isatine, l'indigotine et l'indirubine caractérisées dans les deux plantes, la quercétine, le kaempférol et l'isorhamnétine ont été identifiés dans l'espèce *P. cyanescens*. Les critères de Rice-Evans permettent également d'expliquer l'activité antioxydante assez élevée au niveau de *P. cyanescens* qui contient de la quercétine et de l'isorhamnétine comparativement à *I. tinctoria*. Par contre, de nombreuses études ont prouvé une forte activité antioxydante des extraits éthanolique, méthanolique et acétate d'éthyle de *I. tinctoria* et ont associé cette activité aux flavonoïdes présents au sein de cette espèce (Saraswathi *et al.*, 2012 ; Nagarajan et Sellamuthu, 2013). En effet, Tadigoppula *et al.*, (2006) ont pu caractériser trois furano-flavonoïdes : la pseudosemiglabrine, la semiglabrine et la glabretéphrine ainsi que le kaempférol-4',7-dirhamnoside, des feuilles de *I. tinctoria*. En outre, des activités antibactériennes et cytotoxiques, notamment la cytotoxicité sur les cellules cancéreuses du poumon (NCI-H69) ont été attribuées à une action synergique de ces composés (Renukadevi et Suhan, 2011). Par ailleurs, l'indirubine purifiée de la fraction F5 de cette espèce, a révélé un effet cytotoxique sur la croissance des cellules cancéreuses MCF-7, ce qui corrobore les travaux de Paitoon *et al.*, (2007). Par contre, son isomère indigotine s'est révélé moins toxique aussi bien sur les larves d'*Artemia salina* que sur les cellules cancéreuses testées. De ces résultats, il ressort que l'activité cytotoxique n'est pas nécessairement liée à des composés polaires présents dans les extraits de plantes étudiées. La structure des composés jouerait un rôle primordial quant à leur réactivité sur les cellules cancéreuses testées.

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était de contribuer à l'étude chimique des colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du Bénin dans le domaine artisanal, en mettant en œuvre des méthodes d'extraction, de fractionnement et d'identification de composés tinctoriaux, plus rapide, plus efficace, tout en réduisant les quantités de solvant, d'énergie et d'échantillon consommées. Par ailleurs, il a été également question d'aborder quelques propriétés pharmacologiques de ces plantes à travers des tests chimiques réalisés *in-vitro*.

La première partie du travail a donc permis de répertorier à travers une enquête ethnobotanique réalisée dans le Sud-Bénin, les 26 plantes tinctoriales les plus employées par les artisans. Les plantes dont la fréquence d'utilisation est supérieure à 20%, ont fait l'objet d'un criblage phytochimique, ce qui a permis de caractériser les groupes de composés comme les alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, terpènes, stéroïdes, saponosides, dérivés quinoniques, composés réducteurs, dérivés cyanogéniques, coumarines, mucilages et cardénolides et de montrer que les diverses couleurs révélées par ces plantes résultent d'une synergie entre les groupes chimiques identifiés dans la plante. Par ailleurs, parmi la vingtaine de plantes ayant subi le screening phytochimique, sept ont été sélectionnées en raison de leur fréquence d'utilisation, de leur abondance, de leur répartition et de leur usage médicinal à l'échelle nationale : il s'agit de *Tectona grandis*, *Philenoptera cyanescens*, *Indigofera tinctoria*, *Khaya senegalensis*, *Jatropha curcas*, *Parkia biglobosa* et *Lawsonia inermis*. Pour aller plus loin dans ce criblage, les plantes sélectionnées ont subi une évaluation quantitative de leur teneur en polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes et tannins totaux), de leur activité antioxydante et toxicologique sur les larves d'*Artemia salina*. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de ces plantes est liée à la teneur en phénols totaux notamment en tanins, qu'elles renferment et que les espèces testées peuvent être désignées comme les plus intéressantes en termes de capacité antioxydante, suivant l'ordre:

K. senegalensis>*P. biglobosa*>*T. grandis* ≥ *L. inermis*>*J. curcas*>*P. cyanescens*>*I. tinctoria*.

En outre, seul *J. curcas* s'est révélé toxique *vis-à-vis* des larves d'*Artemia salina*.

La seconde partie de cette étude s'est concentrée sur l'extraction des colorants jaunes et rouges ainsi que celle des colorants bleus et leur caractérisation par CLHP/UV-Vis. Un protocole utilisant les ultrasons a donc été établi avec succès pour l'extraction des différentes molécules responsables de la couleur jaune et rouge de *T. grandis*. En effet, ce travail dont

l'intérêt est d'élaborer et d'utiliser un procédé d'extraction simple, rapide et efficace pouvant être employé à des fins analytique et industrielle, a été effectué en concomitance avec une analyse d'impact des solvants utilisés sur l'environnement, la santé et le coût du procédé. Les résultats obtenus ont montré que toutes les techniques d'extraction employées permettent d'extraire les mêmes composés chimiques pour un même type de solvant utilisé et que la méthode utilisant les ultrasons permet un gain au niveau du temps et du rendement tout en opérant à faible température, comparativement au chauffage par reflux ou au Soxhlet pouvant initier une dénaturation thermique des colorants. Les études théoriques conjointement menées sur les principaux standards exploités au cours de ces travaux de recherche ont contribué à une meilleure compréhension des relations entre la structure et le comportement spectroscopique et/ou chromatographique de plusieurs colorants organiques naturels.

Une étude chromatographique par CLHP/UV-Vis a permis d'identifier en utilisant les mêmes conditions analytiques, les composés présents dans les espèces *T. grandis*, *L. inermis* et *Khaya senegalensis*. Il a pu être déterminé que *T. grandis* et *L. inermis* contiennent trois flavones : lutéoline, diosmétine et apigénine. De plus, l'espèce *T. grandis* présente des flavonols, des anthraquinones dont la tectoquinone et trois autres anthraquinones **Ta**, **Tb** et **Tc** dont les structures n'ont pas été élucidées mais caractérisent fortement cette espèce ; alors que *L. inermis* présente en plus, la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone et des acides phénoliques et cinnamiques extraits dans des conditions acido-basiques catalysées. A noter que les trois flavones : lutéoline, diosmétine et apigénine ainsi que des flavonols dont la rhamnétine et l'isorhamnétine, jamais citées dans la littérature de *T. grandis*, ont été identifiées dans cette espèce. Quant à l'espèce *K. senegalensis*, elle est spécifiquement caractérisée par la catéchine, l'épicatéchine ainsi que par la scoparone.

Les deux autres espèces étudiées par CLHP/UV-Vis sont des plantes à indigo : *P. cyanescens* et *I. tinctoria*. Dans un premier temps, il a été mis au point un procédé d'extraction spécifique de l'indigotine, en employant un puissant réducteur chimique; l'hydrosulfite de sodium. Cette méthode a été comparée à celle utilisant les solvants organiques usuels et dans un second temps la caractérisation des colorants ainsi que l'évaluation de la teneur en indigoïdes et en isatine présents dans les des deux espèces d'indigo ont été effectuées par CLHP/UV-Vis.

Cette étude a permis de montrer que l'extraction par réduction chimique est plus adaptée pour extraire l'indigotine de *P. cyanescens* et peut, dans une certaine mesure, se substituer à la méthode traditionnelle utilisée jusque-là par les artisans locaux. L'originalité de ce procédé repose sur le fait que l'extraction se fait en un temps réduit avec un rendement et une qualité en indigotine assez important. Cependant, bien que l'indigotine extraite par cette méthode soit

d'une pureté incontestable, sa teneur inférieure à celle issue de l'extraction avec le DCM ainsi que l'emploi d'alcali chimique, nécessite d'optimiser ce protocole par l'utilisation de bases organiques provenant des végétaux. De la même manière, l'acétone a favorisé l'extraction de l'indirubine de *I. tinctoria*, ce qui a permis de purifier l'indirubine utilisée comme standard à partir de cette espèce. Quant à l'analyse par CLHP/UV-Vis, elle a permis d'identifier des colorants tels que l'isatine, l'indigotine et l'indirubine communs aux deux espèces. En outre, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol ont été identifiées dans l'espèce *P. cyanescens* ce qui permet de distinguer *à priori* et sans ambiguïté les deux espèces.

Enfin, dans la troisième partie de ces travaux de doctorat, l'ensemble des résultats expérimentaux a pu être transposé avec succès à l'étude des colorants extraits à partir d'échantillons muséaux. Les analyses IR-TF accompagnées des tests microchimiques ainsi que les différentes investigations menées par CLHP/UV-Vis ont permis de déterminer grâce aux témoins spécifiques et à la présence de biomarqueurs caractéristiques, l'origine minérale et botanique des prélèvements muséaux analysés ainsi que leur état de conservation pour ce qui est des colorants bleus organiques ; ceci conforte l'efficacité des protocoles préalablement établis. Ainsi, 27 pigments ont pu être analysés et caractérisés. On peut noter que les artisans utilisaient de nombreuses couleurs, qui pour la majorité, étaient issues des plantes tinctoriales locales. De plus, ils avaient développé certains savoir-faires pour la préparation de ces pigments. En effet, les espèces tinctoriales les plus employées et identifiées dans les prélèvements bleus sont *Philenoptera cyanescens* et *Indigofera tinctoria* tandis que *Lawsonia inermis* caractérise la plupart des prélèvements rouges. Cependant l'association de *Khaya senegalensis* à certains prélèvements rouges est quelque peu hypothétique étant donné que les composés caractérisés dans cette espèce peuvent être identifiés dans d'autres plantes riches en tanins. En outre, les pigments minéraux caractérisés, sont essentiellement des oxydes de fer du type ocre jaune et rouge ainsi que des pigments synthétiques comme du bleu cyané et le bleu de lessive. Ce qui dénote la nature importée de certains colorants minéraux bleus venant compléter ou même supplanter l'indigo béninois au cours de l'époque concernée.

Par ailleurs, l'évaluation *in-vitro* des propriétés pharmacologiques en particulier l'activité cytotoxique des fractions plus ou moins enrichies en molécules colorantes issues des plantes étudiées, sur les cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV, a révélé une activité cytotoxique très importante, car il a été enregistré de forte mortalité cellulaire allant jusqu'à 95% pour de petites concentrations d'extraits testées notamment au niveau des espèces *T. grandis*, *L. inermis* et *I. tinctoria*. Ces résultats sont très encourageants car les molécules testées semblent très actives pour lutter contre les cancers, véritables fléaux les plus meurtriers au monde.

La poursuite de ces travaux va donc s'attacher à l'isolement et à la caractérisation structurale des anthraquinones **Ta**, **Tb** et **Tc** présentes dans *T. grandis* compte tenu de leur importance pharmacologique et tinctoriale.

De plus, il est envisagé la poursuite de l'analyse par chromatographie en phase liquide des autres plantes tinctoriales recensées, de même que l'étude approfondie par CPG/SM de résines qui n'ont pas pu être réalisées dans le cadre de ce travail. Enfin les protocoles d'extraction seront optimisés dans l'objectif de fabriquer des laques en employant divers sels minéraux comme agent complexant suivie de la réalisation d'une étude de vieillissement par photodégradation *via* l'utilisation d'une suntest.

Références bibliographiques

- Abiodun Falodun and Osahon Obasuyi** (2009). Phytochemical screening and evaluation of stem bark extract of *Khaya senegalensis* (Meliaceae) on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences*; 3(3): 925-928.
- Achyuthan K.E.** (2004). Fluorescent assays to quantitate enzymatic activities yielding as end product an aqueous-insoluble indigo-blue dye. *Langmuir*, 20: 2424-2428.
- Ademola IO, Fagbemi BO and Idowu SO** (2004). Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 122: 151-164.
- Ademola IO, Fagbemi BO and Idowu SO** (2009). Bioseparation and activity of *Khaya senegalensis* fractions against infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 165: 170-174.
- Adesida GA, Adesogan EK, Okorie DA, Taylor DAH and Styles BT** (1971). The limonoid chemistry of the genus *Khaya* (Meliaceae). *Phytochemistry* 10: 1845-1853.
- Adewuyi A., Oderinde R.A., Rao B.V.S.K. and Prasad R.B.N.** (2012). “Chemical Composition and Molecular Speciation of the Triacylglycerol of the Oils of *Lonchocarpus sericeus* and *Lonchocarpus cyanescens*,”. *Natural Product Research*, 26 (20): 1954-1956.
- Adjanohoun E, Adjakidjè V, Ahyi MRA, Ake Assi L, Akoegninou A, D’Almeida J, Apovo F, Boukef K, Chadare F, Cusset G, Dramane K, Eyme J, Gassita J-N, Gbaguidi N, Goudote E, Guinko S, Houngnon P, Issa L, Keita A, Kiniffo HV, Kone Bamba D, Musampa Nseyya A, Saadou N, Sdogandji T, De Souza S, Tchabi A, Zinsou Dossa C, Zohoun T.** (1989) *Contribution aux Etudes Ethnobotaniques et Floristiques en République Populaire du Bénin* (2^{ème} édition), Agence de Coopération Culturelle et Technique (ACCT), Paris, p.895.
- Adjanohoun E. J. et Aké Assi L.** (1979). *Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte-d’Ivoire*. Université d’Abidjan, Centre National de Floristique (C.N.F.), p.358 .
- Afzal M., Al-oriquat G., Al-Hassan JM and Muhammad N.** (1980). Flavone glycosides from *Lawsonia inermis*. *Heterocycles*, 14:1973-1976

- Afzal M., Al-oriquat G., Al-Hassan JM and Muhammad N.** (1984). Isolation of 1,2-Dihydroxy-4 glucosyloxynaphthalene from *Lawsonia inermis*. *Heterocycles* 22(4): 813.
- Agarwal S.C., Sarngadharan M.G. and Seshadri T.R.** (1965). Colouring matter of teak leaves: isolation and constitution of tectoleafquinone. *Tetrahedron Letters*, 6 (30): 2623-2626
- Aguinaldo, A.M., Ocampo O.P.M., Bowden B.F., Gray A.I. and Waterman P.G.** (1993). tectograndone, an anthraquinone- naphthoquinone pigment from leaves of *Tectona grandis*, *Phytochemistry*, 33 (4): 933-935
- Ahyi R. G., Nondeke D., Chadare M., Zinsou C., Ahyi A.M.** (1988) Habitat, Santé et Médecine Traditionnelle où la palissade de haie-vive, *Pharmacie domaine traditionnel*.
- Ainane Tarik** (2011). *Valorisation de la biomasse algale du Maroc: Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes Cystoseira tamariscifolia et Bifurcaria bifurcata*. Thèse de doctorat Université Hassan II -Casablanca, p.201.
- Akinpelu David A.** (2001) Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia* 72: 286-287.
- Akoègninou A., Vander Burg W.J.and Vander Maesen L.J.G.** (2006). *Flore Analytique du Bénin*, Backhuys Publishers, Leiden. Netherlands, p 1034
- Ali BH, Bashir AK, and Tanira MO** (1995). Antiinflammatory, antipyretic, and analgesic effects of *Lawsonia inermis* L. (henna) in rats. *Pharmacology* 51(6): 356-363.
- Ali M. and Grever M.R.** (1998). A cytotoxic naphthoquinone from *Lawsonia inermis*. *Fitoterapia*. 69(2):181-183.
- Almeida E. R.** (1990). Antyinflamatory action of lapachol. *J. Ethnopharmacol.*, 29: 239-241
- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddamc P., Barl B., et Weil J.A.** (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84: 551–562.
- Amarnath VB., Saralaya MG** (2011). Anti Hyperglycemic activity of ethanol extract and chloroform extract of *Indigofera tinctoria* leaves in streptozotocin induced diabetic mice. *Res J Pharm Biol Chem Sci*; 2(1): 445-455.

- Amonkou Y. E.** (1998). *Influence de la forte densité du peuplement et du nombre de rejets par cépée de Teck (Tectona grandis L.f.) sur la croissance et la qualité des tiges régénérées. Cas des Teckérais de Bamoro (Bouaké-C.I.)*. Mémoire de DEA, UFR BIOSCIENCES, Université de Cocody, p.36 .
- Androulakis XM, Muga SJ, Chen F., Koita Y., Toure B. and Wargovich MJ** (2006). Chemopreventive effects of *Khaya senegalensis* bark extract on human colorectal cancer. *Anticancer Res* 26: 2397-2406.
- Anis Ben Hsouna , Mohamed Trigui , Gérald Culioli , Yves Blache and Samir Jaoua.** (2011). Antioxidant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. *Food Chemistry* 125:193-200.
- Anusuya Nagarajan and Manian Sellamuthu** (2013). Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of *Indigofera tinctoria* L. leaves. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5 (1): 142-147.
- Aradhana R., Rao K.N.V., Banji D. and Chaithanya R.K.** (2010). A Review on *Tectona grandis* Linn: Chemistry and Medicinal uses (family: Verbenaceae). *Herbal Tech Industry* 1: 6-9.
- Arbonnier Michel** (2002). *Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest*. Editions Quae. p.573.
- Armenta S., Garrigues S. and de la Guardia, M.** (2008). Green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6): 497-511.
- Aruoma O.L.** (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1617-1625.
- Ashnagar A. and Shiri A.** (2011). Isolation and characterization of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) from the powdered leaves of henna plant marketed in Ahwaz city of Iran *International Journal of ChemTech Research* 3(4): 1941-1944
- Assogba Gabriel** (2008). *Structuration spatiale et impacts des institutions de micro finance sur le développement local dans la commune d'Ifangni (Sud est du Benin)*. Mémoire de maîtrise en géographie. Université d'Abomey Calavi.

- Asuntha G., Prasannaraju Y. and Prasad KVSRRG.** (2010). “Effect of Ethanol Extract of *Indigofera tinctoria* Linn (Fabaceae) on lithium / Pilocarpine-Induced *Status Epilepticus* and Oxidative Stress in Wistar Rats”. *Tropical Journal of pharmaceutical Research*. 29 (2):149-156.
- Atawodi SE, Ameh DA, Ibrahim S., Andrew JN, Nzelibe HC, Onyike EO, et collaborateurs.** (2002). Indigenous knowledge system for treatment of trypanosomiasis in Kaduna state of Nigeria. *J Ethnopharmacol*; 79(2): 279-282.
- Atawodi S.E., Atawodi J.C., Pala Y. and Idakwo P.** (2009). Assessment of the Polyphenol Profile and Antioxidant Properties of Leaves, Stem and Root Barks Of *Khaya senegalensis* (Desv.) A. *Electronic Journal of Biology*, 5(4): 80-84.
- Aubaile-Sallenave F.** (1982). Les voyages du henné. *Journal d'Agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée* 29(2) : 123-178.
- Aweke Getachew and Tapapul Lekoyiet Suzanne** (2005). *Lawsonia inermis* L. In: Jansen, P.C.M. & Cardon, D. (Editeurs). PROTA 3: Dyes and tannins/Colorants et tanins. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Pays Bas.
- Babu PD and Subhasree RS.** (2009). Antimicrobial Activities of *Lawsonia inermis* - A Review. *Acad J Plant Sci* ; 2 (4): 231-232.
- Badreddine Belhassen** (1976). Le tatouage maghrébin au henné In: Communication et langages. 31: 56-67
- Baladier G.** (1963) *Sociologie actuelle de l'Afrique Noire*, Paris, PUF, 2^{ème} édition, p.532 .
- Barahona MV and Sanchez-Fortun S.** (1999) Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Env Pollut*, 104: 469-476.
- Barbour J. and Simmonds D.** (1971). *Adire cloth in Nigeria*. *Institute of African Studies*, University of Ibadan, Nigeria. p.104
- Barka Noureddine** (2008). *L'Elimination des colorants de synthèse par adsorption sur un phosphate naturel et par dégradation photocatalytique sur TiO2 supporté*. Thèse de doctorat de l'Université IBNZOHR-AGADIR, 177p
- Bate-Smith, E.** (1973). Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* 12: 1809 -1812.

- Beaulieu André** (2013). *Fiche d'information et de faits: Statistiques canadiennes sur le cancer 2013*. Société canadienne du cancer 5.p.
- Bedaux R.M.A et Bolland Rita.** (1980). Tellem, reconnaissance archéologique d'une culture de l'Ouest africain au Moyen-Age: Les Textiles. *Journal des africanistes*. 50 (1): 9-23
- Behaghel I.** (1999). Etat des plantations de Teck dans le monde. *Bois et forêts des tropiques* 262: 13-18.
- Bechtold T., Turcanu A., Geissler S. and Ganglberger E.** (2002). Process balance and product quality in the production of natural indigo from *Polygonum tinctorium* Ait. applying low-technology methods. *Bioresource Technology*, 81: 171-177.
- Bellamy L.J.** (1954). *The infra-red spectra of complex molecules*. Editions John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Benavente-Garcia O. and Castillo J.** (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6185-6205.
- Bensegueni-Tounsi Lynda** (2001). *Etude in vitro de l'effet antibactérien et antifongique de Inula viscosa, Lawsonia inermis, Asphodelus microcarpus, Aloe vera, Juniperus oxycedrus*. Thèse de Magister, Faculté des sciences, Département vétérinaire, Université de Constantine, p.110.
- Benzie I.F.F.et Strain J.J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70– 76.
- Bergström B.** (2000). *Aspects on heartwood formation in scots pine*. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Genetics and Plant Physiology. Umeå
- Bernède J.C., Ben Nasrallah T.; Jamali M., Mevellec J.Y., Rabiller C. and Proutiere A.** (1995). Is a hydrogen bond responsible for the optical properties of some dihydroxyanthraquinones: quinizarin and anthraflavic? *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 56: 1239-1251.
- Berridge M.V., Tan A.S., McCoy K.D. and Wang R.** (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4.

- Besse, P. and Baccini, A.** (2011). Analyse des données ou statistique exploratoire multidimensionnelle. *Techniques de l'ingénieur*, AF 620, 1-16.
- Bhardwaj DK, Murari R., Sheshadri TR and Singh R.**(1976). Lacoumarin from *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry* 15(11):1789
- Bhardwaj DK, Sheshadri TR and Singh R.** (1977). Xanthonés from *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry* 16(10):1616-1617.
- Bhardwaj DK, Jain RK, Jain BC and Mehta CK.** (1978). 1-hydroxy-3,7-dimethoxy-6-acetoxy xanthone a new xanthone from *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry* :17(8):1440-1441.
- Bhargava S., Jain S., Suri A. and Singh P.** (1991). Further studies on anthraquinone derivatives from *Tectona grandis*. *J. Ind. Chem. Soc.* 68: 631-632.
- Bhuyan Ranjana and Saikia C.N.** (2005). Isolation of colour components from native dye-bearing plants in northeastern India, *Bioresource Technology* 96: 363-372
- Bleton J., Rivallain J., Sansoulet J.** (1995) Caractérisation et fonctions d'enduits placés sur les masques Ejumba de Basse Casamance, sud du Sénégal, *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée XXXVII (2) : 25-35.*
- Bleton J., Sansoulet. J., Rivallain J.** (1996). Analyse d'objets africains par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, *Analisis* 24 (7) : 28-31.
- Blois M.S.** (1958). Antioxydant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Bloom H., Briggs L.H. and Cleverley B.** (1959). Physical properties of anthraquinone and its derivatives. Part I. Infrared spectra. *Journal of the Chemical Society* 33: 178-185.
- Bohm H., Boeing H. and Hempel J.** (1998). Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 37(2): 147-63.
- Boser-Sarivaxévanis Renée.** (1975). *Recherche sur l'histoire des textiles traditionnels tissés et teints de l'Afrique occidentale.* Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel 86, 1-2: 301-341.

- Bosseaux Maurice** (1965). *Plantes cultivées et spontanées du Dahomey* N°25 Journal d'Agriculture et de botanique appliquée (CBRST) Museum, National d'Histoire Naturelle.
- Botros R., Mikhaeil Farid A., Badria Galal T. Maatooq and Mohamed M. A. Amer** (2004). Antioxidant and Immunomodulatory Constituents of Henna Leave, *Z. Naturforsch.* 59c: 468-476.
- Bourhis K., Blanc S., Mathe C., Dupin J-C. and Vieillescazes C.** (2011). Spectroscopic and chromatographic analysis of yellow lakes. *Applied clay science*, 53: 598-607.
- Brode W.R., Pearson E.G. and Wyman G.M.** (1954). The relation between the absorption spectra and the chemical constitution of dyes XXVII. *Cis-trans* isomerism and hydrogen bonding in indigo dyes. *Journal of the American Chemical Society* 76: 1034-1036.
- Brouillard R.** (1993). *The Flavonoids, Advances in research since 1986*. C. a. Hall. London, éd. J. B. Harborne: 525-538.
- Bruneton J.** Tanins. (1999). In *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales*, 3rd ed.; Tec et Doc: Paris, France; 369- 404. (p.1120).
- Buisson** (1854). Extrait du rapport de Mr. Buisson, chirurgien-major de l'Orénoque, sur l'emploi du Caïlcédra comme fébrifuge ". *Annales maritimes et coloniales*, 13 (2): 239-251
- Cahin Françoise** (1995). Cezanne : A Special Issue of Connaissance des Arts. *Connaissance des Arts* p.100.
- Calow P.** (1993). *Handbook of ecotoxicology*. Oxford: Blackwell Science.
- Camps-Fabrer Henriette et Souville Georges.** (1974). Le Docteur E.G. Gobert (29 novembre 1879- 1^{er} août 1973). In: *Revue de l'Occident musulman et de la Méditerranée*, 17: 7-17
- Capon M., Courilleu V. et Valette C.** (1999). *Chimie des couleurs et des odeurs, Nantes, Culture et technique*.
- Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Pérez P and Garcia-Grávalos MD.** (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2:17-21.

- Cardarelli C.R., Benassi M.T. et Mercadante A.Z.** (2008). Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT – Food Science and Technology* 41: 1689-1693.
- Cardon D., du Chatenet G.** (1990). *Guide des teintures naturelles*. Neuchâtel, Delachaux et Niestlé, p.400.
- Cardon D.** (2000). *Le monde des teintures naturelles*, Paris, Gallimard Découvertes, p.586
- Cardon D.** (2003). *Le monde des teintures naturelles*. Ed Belin, Paris, France. p.581
- Cardon D. et Jansen P.C.M.** (2005). *Philenoptera cyanescens* (Schumach. & Thonn.) Roberty. [Internet] Fiche de PROTA4U. Jansen, P.C.M. & Cardon, D. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l’Afrique tropicale), Wageningen, Pays.
- Caventou E.** (1849). *Recherche chimique sur l’écorce du Cail-cédra (Swetania senegalensis)*, 18 août 1849, Thèse de pharmacie. L’arbre a d’abord été nommé *Swietania senegalensis* Desrouss. In *Lamark*. dans la Flore de Guillemin *et al*, 1833.
- Centre Technique Forestier Tropical (CTFT).** (1988). *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. *Bois et Forêts des Tropiques*, 218 : 43-55.
- Chakraborty T., Podder G. and Deshmukh SK** (1977). Triterpenoids and other constituents of *Lawsonia inermis*. *Indian Journal of Chemistry Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*; 15: 96-97.
- Chanayath N., Lhieochaiphant S. and Phutrakul S.** (2002). Pigment Extraction Techniques from the Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and Chemical Structure Analysis of Their Major Components, *CMU Journal* 1(2) : 149-160.
- Chaudhary Gagandeep, Goyal Sandeep and Poonia Priyanka.** (2010). *Lawsonia inermis* Linnaeus: A Phytopharmacological Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2(2): 91-98.
- Chauhan MG and Pillai APG.** (2007). Microscopic profile of powdered drug used in Indian system of medicine, *Jamnagar, Gujarat*. 84-85

- Chemat Farid, Zill-e-Huma and Kamran Khan Muhammed** (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18: 813-835.
- Chengping Xie, Kaifu Li, Jinling Lin and Jianbing Li** (2011). GC-MS Analysis on Heartwood Extractive Chemical Components of Different Provenances Teak (*Tectona grandis* L.f.). *Advanced Materials Research*, 236-238: 1049-1053.
- Chimie et patrimoine culturel II** (2008). Matières picturales, pigments, colorants et substances organiques, numéro spécial de *L'Actualité Chimique*, avril 2008.
- Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F. and Chou S.T.** (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2454–2458.
- Cossi Ganglo Jean, Lejoly Jean et Pipar Thierry** (1999). Le teck au Bénin Gestion et Perspectives. *Bois et Forêts des Tropiques* 261: 17-27
- Cuoco Guillaume, Mathe Carole , Archier Paul, Chemat Farid and Vieillescazes Cathy.** (2009). A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 75-82.
- Cuoco Guillaume** (2009). *Etude chimique et caractérisation de principes colorants historiquement employés dans l'impression des indiennes en Provence*. Thèse de doctorat Académie d'Aix-Marseille UAPV. p.292.
- Cuong NX, Nhiem NX, Thao NP, Nama NH, Dat NT, Anh HLT, Huong LM, Kiem PV, Minh CV, Wonc J, Chung W and Kim YH.** (2010). Inhibitors of osteoclastogenesis from *Lawsonia inermis* leaves. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20(16):4782-4784.
- Cuvillier A.** (1964). *Introduction à la sociologie*. Armand Colin, Collection U. Sorbonne Paris.
- Damiens E., Baratte B., Marie D., Eisenbrand G. and Meijer L.** (2001). Anti-mitotic properties of indirubin-3'-oxime ; a CDK/GSK-3 inhibitor : induction of endoreplication following prophase arrest, *Oncogene*, 20: 3786-3797.

-
- Dangles Olivier (2012).** Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance *Current Organic Chemistry, 16*: 692-714.
- Davodoun Comlan Cyr (2011).** *L'apprentissage traditionnel dans l'artisanat au Bénin. Les Editions ruisseaux d'Afrique* : Bureau d'appui aux artisans, p.161.
- Daycem Khlifi, Rabiaa Manel Sghaier, Sameh Amouri, Dhafer Laouini, Mokhtar Hamdi and Jalloul Bouajila (2013).** Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology* In Press FCT 7080: 1-7.
- Daysson G. (1967).** *Organisation et classification des plantes vasculaires. 2^{ème} partie, systématique, SEDES, Paris. 434 p.*
- Debra A., Pearson H. H. S., Lazarus S. A., and Keen C. L. (2001).** Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. *Methods in Enzymology* 335: 350-360.
- De Pooter H.L. et Schamp N. (1986).** Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In : *Progress in essential oil research*. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. 139-150.
- Diedhiou Ibrahima (1998).** Réponses à la contrainte hydrique de *Indigofera oblongifolia* Forssk et *Indigofera tinctoria* L. deux suffrutescentes de la zone sahélienne au Sénégal. Rapport de travail du programme STDIII, « *Réhabilitation des terres dégradées au nord et au sud du Sahara. Utilisation des légumineuses pérennes et des microorganismes associés pour le rétablissement des formations pluristrates.* Université Cheikh Anta Diop, p.134.
- Dinesh Babu P. and Subhasree R.S. (2009).** Antimicrobial Activities of *Lawsonia inermis*, *Academic Journal of Plant Sciences* 2 (4): 231-232.
- Dixit SN, Srivastava HS and Tripathi RD (1980).** Lawsone, the antifungal antibiotic from the leaves of *Lawsonia inermis* and some aspects of its mode of action. *Indian Phytopathological* 31: 131-133.
- Dolan J.W., Snyder L.R., Blanc T. and Van Heukelem L. (2000).** Selectivity differences for C₁₈ and C₈ reversed-phase columns as a function of temperature and gradient steepness I. Optimizing selectivity and resolution. *Journal of Chromatography A* 897: 37-50.

- Donoff E** (2008). Celebrating Craftmanship. *Architectural Lighting, Eugene* 22 (5): 11
- Dumonceaud. O.** (2001). Petits bois naturellement durables dans des usages extérieurs en vue de limiter l'emploi des traitements par les pesticides : problèmes posés par l'utilisation du châtaignier (*Castanea sativa* Mill.) et intérêts d'un traitement de type friture à basse température. Thèse. Univ Montpellier 2, France, p.214.
- Dupuy B.** (1991). Les plantations à vocation de bois d'œuvre en Afrique intertropicale humide. *Etude FAO 98*, Rome, p.201.
- Dweck Anthony** (2002) Natural ingredients for coloring and styling, *International Journal of Cosmetic Science*, 24 : 287-302
- El-Hag AG, Al-Jabri AA and Habbal OA** (2007). Antimicrobial properties of *Lawsonia inermis* (henna): a review. *Australian J Medical Herbalism* ; 19(3): 114-125.
- El-Tahir A., Ibrahim AM, Satti GMH, Theander TG, Kharazmi A. and Khalid SA** (1998). The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytother Res* 12: 576-579.
- Encarta** (2009). Microsoft Encarta® 1993-2008. Microsoft Corporation. Tous droits réservés
- Endrini S., Rahmat A., Ismail P., Hin TYY** (2002). Anticarcinogenic properties and Antioxidant Activity of Henna (*Lawsonia inermis*). *J Med Sci*; 2(4): 194-197.
- Endrini S., Rahmat A., Ismail P and Taufiq-Yap YH** (2007). Comparing of the cytotoxicity properties and mechanism of *Lawsonia inermis* and *Strobilanthes crispus* extract against several cancer cell lines. *J Med Sci*. 7(7):1098-1102.
- Epstein E., Nabors M.W. and Stowe B.B.** (1967). Origin of indigo of woad. *Nature*, 216: 547-549.
- Escribano-Bailon M. T., Dangles O., & Brouillard R.** (1996). Coupling reactions between flavylum ions and catechin, *Phytochemistry*, 41: 1583–1592.
- Extraits de CIRAD-Forêt** (1997). " Fiche technique :Teck " Bois et Forêts des Tropiques, . 224: 39-47.

-**Fagbohoun Louis** (2009). Identification et évaluation de l'activité inhibitrice des polyphénols des folioles de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq) du site de Pobè sur le développement des larves de *Coelaenomenodera lameensis* Berti contaminant ces palmiers. Mémoire de DEA en Chimie Université d'Abomey-Calavi, p.80.

-**Fagbohoun Louis, Gbaguidi A. Fernand, Ayedoun A. Abel, Mathe Carole Moudachirou Mansourou et Vieillescazes Cathy** (2014). Etudes ethnobotanique et phytochimique des plantes tinctoriales sources de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du Bénin dans le domaine artisanal (Ifangni/Bénin) *SFE* in Press.

-**FAO**, (2001). Forest resources assessment Internet <http://www.wikipedia.org/wiki/Teck3>

-**Favilla M., Macchia L., Gallo A. and Altomare C.** (2006). Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1922-1931.

-**Feller Robert L. and Johnston-Feller Ruth. M.** (1997). *Vandyke Brown, Cologne and Kassel earth*. In Artists' Pigments, A Handbook of Their History and Characteristics, vol. 3., ed. Elisabeth West FitzHugh. Washington, D.C.: National Gallery of Art 366p

-**Fletcher Joann** (2002). Ancient Egyptian Hair and Wigs. *The Ostrakon: The Journal of the Egyptian Study Society*. 13 (2): 2-8.

-**Frankel E.N. and Meyer A.S.** (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13): 1925-1941.

-**Fritch H, Griesbach H.** (1975). Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry*, 14: 2437-42.

-**Gandonou Basile Marius et Guidibi Emmanuel** (2006). *Monographie communale d'Ifangni*. Compilation des PDC, SDAC et Monographie de première génération, Association Nationale des Communes du Bénin.

-**Garcia M.** (2005). *"Couleurs végétales, teintures, pigments et encres"*. Éditions Edisud Nature, Aix-en-Provence.

- Gast M.** (2000). « Henné » Encyclopédie berbère in *Hadrumetum-Hidjaba*, Aix en Provence, *Edisud* 22: 3437-3440.
- Gilbert K.G., Hill D.J., Crespo C., Mas A., Lewis M., Rudolph B. and Cooke D.T.** (2000). Quantitative analysis of indigo precursors from woad by HPLC and HPLC/MS. *Phytochemical Analysis*, 11: 18-20.
- Gobert E.G** (1961-1962). "Tunis et les parfums" *Revue africaine*, 105: 295-322; 106: 75-118.
- Gonzalez M., Gallego M. and Valcarcel M.** (2003). Determination of natural and synthetic colorants in prescreened dairy samples using liquid chromatography-diode array detection. *Analytical Chemistry* 75: 685-693.
- Gosh A., Das BK, Roy A., Mandal B. and Chandra G.** (2008). Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J Nat Med*; 62(2): 259-62.
- Guerra M. de O., Mazoni A. S. B., Brandao M. A. F. and Peters V. M.** (2001). Toxicology of lapachol in rats: Embryoletality, *Rev. Brasil. Biol.*, 61(1): 171-174.
- Gupta A., Saifi AQ, Modi NT and Mishra N.** (1986). Anti-inflammatory activity of some active principles of *Lawsonia inermis* leaves. *Indian Journal of Pharmacology*; 18(2): 113-114.
- Gupta S., Ali M., Alam MS, Niwa M. and Sakai T.** (1992). 24 β -ethylcholest-4-en-3- β -ol from the Roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry* 31(7) : 2558-2560.
- Hagerman A. E. et Butler L. G.** (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 809-812.
- Hagerman A. E.** (2002). Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae).
- Harborne JB** (1989). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.*, 25 (7): 85-109.
- Hariri El Bachir, Sallé G. and Andary C.** (1991). Involvement of flavonoids in the reistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album L*). *Protoplasma*. 162: 20-26.
- Hartl M. and Humpf H.U.** (2000). Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 1097-1102.

- Harwig J., Scott P.** (1971). Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a Screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol*, 21: 1011-1016.
- Haslam E.** (2007). Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68 (22-24): 2713-2721.
- Hnawia E., Lebouvier N. and Nour M.** (2010). *Etude des substances naturelles d'intérêt tinctorial des plantes des forêts sclérophylles de Nouvelle-Calédonie*. Rapport de Recherche, Nouméa, p.33.
- Hooper L. and Cassidy A.** (2006) A review of the health care potential of bioactive compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 1805-1813.
- Hosein HKM and Zinab D.** (2007). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Henna Leaves Extracts (*Lawsonia inermis*). *World J Dairy & Food Sci* ; 2(1): 38-41.
- Houghton P.J. and Raman A.** (1998). *Laboratry Handbook for the Fractionation of Naturals Extracts*, Editions Chapman and Hall first collection, New York.
- Hovaneissian Michael**, (2005). *Différenciation de substances naturelles par diverses techniques analytiques: spectroscopie IRTF, CLHP/Uv-visible/Fluorimétrie et CPG/SM. Application à l'étude d'échantillons officinaux et archéologiques*. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, p.290.
- Huaping Zhang, Junjie Tan, Don VanDerveer, Xi Wang, Michael J. Wargovich, Feng Chen** (2009). Khayanolides from African mahogany *Khaya senegalensis* (Meliaceae): A revision. *Phytochemistry* 70: 294-299
- Hutchinson G.E. and Wollack A.** (1944). Biological accumulation of aluminium. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 35: 75-127.
- Igbiosa O.O., Igbiosa E.O. and Aiyegoro O.A.** (2009). Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn), *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3(2): 058-062.
- INSAE** (2003). *Troisième recensement général de la population et de l'habitation : Synthèse des résultats*, Cotonou, Direction des études démographiques.

- Iwu M. M. and Anyanwu B. N.** (1982). Phytotherapeutic Profile of Nigerian Herbs, 1: Anti Inflammatory and Anti-Arthritic Agents, *Journal of Ethnopharmacology*, 6 (3): 263-274.
- Iwu M. M.** (2006). Comparative Estimation of Glycyrrhetic Acid Content of *L. cyanescens* and *glycyrrhiza* Roots, *Journal of Pharmaceutical Science*, 71(12): 1412-1413.
- Jaki B., Orjala J., Bürji HR and Sticher O.** (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharm Biol*, 37: 138-143.
- Jansen P.C.M. et Cardon D.** (2005). *Colorants et tanins Ressources végétales de l'Afrique tropicale*, PROTA 3. p.238.
- Jansen P.C.M.** (2005). *Pterocarpus soyauxii* Taub, PROTA Network Office Europe, Wageningen University, P.O. Box 341, 6700 AH Wageningen, Netherlands.
- Jaussaud P.** (1993). Histoire des colorants naturels (2^{ème} partie: Indigo). *Actualités Pharmaceutiques*, 313: 65-66.
- Jean-Blain C.** (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev. Méd. Vét.* 149: 911-920.
- Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., and Lee S.C.** (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 3389–3393.
- Kamal R. and Mangla M.** (1993). *In vivo* and *in vitro* investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis*. *J Biosci.*; 18: 93-101.
- Karapanagiotis I., Daniilia S., Van der Heijden R. and Verpoorte R.** (2005). Identification of red natural dyes in post-byzantine icoms by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 28: 739-749.
- Kerharo J. et Adam G.** (1974). *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques*. Ed Vigot frères Paris ISBN 2 - 7114 – 0646 - 6.

- Khalid S.A., Friedrichsen G.M., Kharazmi A., Theander T.G., Olsen C.E. and Christensen S.B.** (1998). Limonoids from *Khaya senegalensis*. *Phytochemistry* 49 (6): 1769-1772.
- Khan Rafiullah M. and Mlungwana Suleiman M.** (1999). 5-Hydroxylapachol : a cytotoxic agent from *Tectona grandis*. *Phytochemistry* 50: 439-442.
- Kidiba Samuel** (1997). *Contribution du Patrimoine Culturel au Développement du Système Educatif de la République du Congo : Enseignement des Arts et de l'Artisanat au Musée*. Mémoire d'Etudes Professionnelles Approfondies. Université internationale de Langue Française au Service du Développement Africain à Alexandrie d'Egypte.
- Kilahama F.B.** (1998). Connaissances écologiques des populations autochtones : outil essentiel des stratégies de vulgarisation rurale. *Echos Du Cota*, 78: 14-19.
- Kilani A. M.** (2006). Antibacterial assessment of whole stem bark of *Vitex doniana* against some enterobactriaceae, *African Journal of Biotechnology* 5 (10): 958-959.
- Kinjo J., Uemura H., Nohara T.** (1995). Novel Yellow Pigment from *Pterocarpus santalinus*: Biogenetic Hypothesis for Santalin Analogs, *Tetrahedron Letters* 36 (31): 5599-5602.
- Kluger N., Raison-Peyron N. et Guillot B.** (2008). Tatouages temporaires au henné: des effets indésirables parfois graves. *Presse Med* 37:1138-1142.
- Kok A.N., Ertekin M.V., Ertekin V. and Avcı B.** (2004). Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) induced haemolytic anaemia in siblings. *Int. J. Clin. Pract.* 58: 530-532.
- Kokutse Adzo Dzifa.** (2002). *Analyse de la qualité du bois de teck (Tectona grandis L.f) en plantation au Togo : formation du bois de cœur, propriétés mécaniques et durabilité*. Thèse de doctorat Université Bordeaux I, p.163.
- Kone K.** (2006). *Contribution à la préservation des plantations de Teck (Tectona grandis L.f., Verbenaceae) par la lutte chimique contre les adventices, dans les jeunes parcelles de reboisement de la SANGOUE, dans la région d'Oumé, en Côte d'Ivoire*. Mémoire de DEA, UFR Biosciences, Université de Cocody Abidjan, p61.

- Kone W.M., Atindehou K.K., Terreaux C., Hostettmann K., Traore D. et Dosso M.** (2004). Traditionnal medicine in north Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93: 43-49.
- König Claire** (2009). La couleur bleue sous tous les angles. *Futura Sciences*. 1-32. <http://www.futura-sciences.com/magazine/terre/infos/>
- Kouamé J., Gnoula C., Palé E., Bassolé H., Guissou I. P., Simporé J. et Nikiéma J. B.** (2009). Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae) *Science et technique, Sciences de la santé*, 32 (1-2): 9-23.
- Kumaran, A. et Karunakaran, R.J.** (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 40: 344-352.
- Kustova G.N., Burgina E.B., Sadykov V.A., and Poryvaev S.G.** (1992). Vibrational Spectroscopic Investigation of the Goethite Thermal Decomposition Products, *Phys Chem Minerals* 18:379-382.
- La Grande Encyclopédie** cité par Feau E. et Joubert H. (1996). *L'art africain*, Editions Scala, Paris, p.8
- Lacaille-Dubois M.A. and Wagner, H.** (1996). Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica* 143(6):555-562.
- Lacret Rodney, Varela M. Rosa, Molinillo M.G. José, Nogueiras Clara and Macias A. Francisco.** (2012). Tectonoelins, a new norlignans from a bioactive extract of *Tectona grandis*. *Phytochemistry Letters* 5: 382-386.
- Lagarto-Parra A., Yhebra R.S., Sardinias I.G. and Buela L.I.** (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8: 395-400
- Laine A.**, (2003). Médecins africains et français à la Côte d'Afrique : les raisons d'une non-rencontre (1815-1874) . *Revue française d'histoire d'Outre-Mer*, 338-339: 199-224.

- Lamchahab F.Z., Guerrouj B., Benomar S., Ait Ourhroui M., Senouci K., Hassam B. et Benzekri L.** (2011). Du henné d'un tatouage symbolique à une vraie dermatose. *Archives de Pédiatrie-Elsevier Masson SAS*, 18:653-656.
- Laude Jean** (1988). *Les arts de l'Afrique noire*, Sté Nle des Editions du Chêne, p381.
- Laughlin J.L.M., Rogers L.L. and Anderson J.E.** (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*; 32: 513-524.
- Lee Jungmin, Durst Robert W., Wrolstad Ronald E. et collaborateurs** (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.
- Le Gal Y. et Gros F.** (1988). "Biochimie marine", Edition Masson, Paris, France, p.285.
- Lemordant D. et Forestier J.P.** (1983). Usages médicaux traditionnels et propriétés pharmacologiques de *Lawsonia inermis* L., Lythracées. *Journal d'Agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée* 30: 69-89.
- Lewis J.A., Lommen D.C., Raddatz W.D, Dolan J.W. and Snyder LR.** (1992). Computer simulation for the prediction of separation as a function of pH for reversed-phase high-performance liquid chromatography I. Accuracy of a theory-based model. *Journal of Chromatography A* 592: 183-195.
- Li H-B. , Wong C-C., et Cheng K-W., Feng C.** (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*. 41(3): 385-390.
- Liu Jie** (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives, *Journal of Ethnopharmacology*. 100 : 92–94.
- Louppe D.** (2005). *Tectona grandis* L.f. [Internet] Record from PROTA4U. Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. <<http://www.prota4u.org/search.asp>>.
- Luque de Castro M. D. and Garcia-Ayuso L. E.** (1998). "Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future." *Analytica Chimica*

Acta 369: 1-10.

-**Luque de Castro M.D. and Priego-Capote F.** (2007). Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization), *Ultrason. Sonochem* 14: 717-724.

-**Mabry T.J., Markham K.R. and Thomas M.B.** (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag Eds., Berlin-Heidelberg-New York.

-**Macheix Jean-Jacques, Fleuriet Annie et Jay-Allemand Christian** (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Collection Biologie. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes* Vol1. p.185.

-**Macias A. Francisco, Lacret Rodney, Varela M. Rosa, Nogueiras Clara, Molinillo M.G. José** (2008). Bioactive apocarotenoids from *Tectona grandis*. *Phytochemistry* 69: 2708–2715.

-**Mahesh S. K. and Jayakumaran N.A.** (2010). Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potential of Different Extracts from Leaf, Bark and Wood of *Tectona grandis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2(2): 155-158.

-**Mahesh S. K. et Jayakumaran N. A.** (2011). Anthraquinones from leaves of *Tectona grandis* : A detailed study on its antibacterial activity and other biological properties, *International Journal of Phytomedicine* 3: 50-58.

-**Majhenic L., Kerget M.S., and Knez Z.** (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104: 1258–1268.

-**Makhija Inder K., Dhananjaya D.R., Kumar Vijay S., Raviraj Devkar, Devang Khamar, Nishant Manglani and Sandeep Chandrakar** (2011). *Lawsonia inermis* - From Traditional Use to Scientific Assessment. *The African Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacy* 2 (1): 145-165.

-**Makkar H.P., Blummel M. and Becker K.** (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques, *Br. J. Nutr.* 73 (6): 897-913.

-**Malekzadeh F** (1968). Antimicrobial Activity of *Lawsonia inermis* L. *American Society for Microbiology* .16(4): 663-634.

-
- Margot C., Kalem A., Le Boisselier R., Guincestre J.Y., Debruyne D et Leroyer R.** (2008). Le syndrome de la poche à urine violette : à propos d'un cas avec identification des substances colorantes, *J. Pharm. Clin*, 27(2) : 80-84.
- Mark P.** (1998). Ritual and masking traditions in Jola men's initiation, *African Arts* XXX, I, 36-47.
- Martinez M., Del ramo J., Torreblanca A., Diaz-Mayans J.** (1998) Effect of cadmium exposure on Zinc levels in the brine shrimp *Artemia Partenogenetica*. *Aquaculture* 172: 315-325.
- Martinez-Herrera J., Siddhuraju P., Francis G., Davila-Ortiz G., Becker K.** (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry* 96: 80-89.
- Mason T.J.** (1990). *Chemistry with ultrasound*. Elsevier Science Publishers Ltd, Angleterre.
- Maspero G.** (1886). Procès verbal de l'ouverture des momies de Ramsès II et Ramsès III: *Comptes rendus des séances de l'Académie des Inscriptions et Belles Lettres* 30 (2): 294-301.
- Mathe Carole** (2003). *Etude de résines naturelles. Caractérisation par CLHP et CPG couplées à divers modes de détection: UV-Visible, fluorimétrie et spectrométrie de masse*. Thèse de doctorat en Chimie, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Maugard T., Enaud E., De La Sayette A., Choisy P. and Legoy M.D.** (2002). β -Glucosidase-catalyzed hydrolysis of indican from leaves of *Polygonum tinctorium*. *Biotechnology Progress*, 18: 1104-1108.
- Maurin Garcia M.** (1992). *Le henné, plante du Paradis*, Edito Georges Naef SA, Genève.
- McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL** (1991). Bench top "bioassay for the discovery of bioactive naturel products: an update. In: *Studies in Naturel Products Chemistry* (Edited by: AU Rahman) Elsevier, 383-409.
- McLaughlin J. L., Chang C. J., and Smith D. L.** (1993). Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumour compounds. In: *Human Medicinal Agents from Plants*. Kinghorn, A. D. and Balandrin, M. F. (Eds.), *ACS Symposium 534*, American Chemical Society, Washington, D. C.: 112-137.

- Meyer, B.N., Ferrign, R.N., Putnam, J.E., Jacobson, L.B., Nicholas, D.E. & McLaughlin, J.L.** (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45: 31-34.
- Michele R. Derrick, Dusan Stulik and James M. Landry** (1999). *Infrared Spectroscopy in Conservation Science*. Scientific Tools. The Getty Conservation Institute, p.252.
- Molyneux P.** (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn. J. Sci. Technol* 26 (2): 211-219.
- Moronkola Dorcas Olufunke and Oladosu Ibrahim Adebayo** (2013). Chemical Compositions of *Lonchocarpus cyanescens* Benth., (Fabaceae)-Case Study of Its Volatile Oils, and Two Triterpenoids. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 1653-1659.
- Moshi, M.J., Cosam, J.C., Mbwambo, Z.H., Kapingu, M. & Nkunya, M.H.H.** (2004). Testing Beyond Ethnomedical Claims: brine shrimp lethality of some Tanzanian plants. *Pharmaceutical Biology* 42,547–551.
- Moumouni A. M.** (1980). *Les travaux des recherches forestières et les essais d'éclaircies dans les plantations de teck de Djigbé, d'Agrimey et de Toffo*. Mémoire de fin d'études Cpu/Unb, Abomey-Calavi, Bénin, p.99 .
- Mousseux M** (1995). *Test de toxicité sur larves d'Artemia salina : entretien d'un élevage de balanes.*; Nouméa, Centre Universitaire de Nouvelle Calédonie. 20 p.
- Mpiana P. T., Tshibangu D.S.T., Shetonde O.M. and Ngbolua K.N.** (2007). In vitro antitrepanocytary activity (anti-sickle cell anemia) of some congolese plants, *Phytomedicine* 14 :192–195.
- Mueller-Harvey I. and Mc Allan A.B.** (1992). Tannins: their biochemistry and nutritional properties, *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* 1: 151-217.
- Mueller-Harvey I.** (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 3-20.
- Mueller-Harvey, I.** (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86 (13): 2010-2037.

- Muhammad HS and Muhammad S.** (2005). The use of *Lawsonia inermis* linn. (Henna) in the management of burn wound infection, *Afr. J. Biotechnol* 4 (9):934-937.
- Mulholland DA, Parel B., and Coombes PH** (2000). The chemistry of Meliaceae and Ptaeroxylaceae of southern and eastern Africa and Madagascar. *Curr Org Chem* 4: 1011-1054.
- Muthulingam M., Mohandoss P., Indra N. and Sethupathy S.** (2010). Antihepatotoxic efficacy of *Indigofera tinctoria* (Linn.) on paracetamol induced liver damage in rats. *IJPBR*, 1(1):13-18.
- Nacro Mouhoussine et Millogo-Rasolodimbi Jeanne** (1994) *Plantes tinctoriales et Plantes à tanins de Burkina-Faso*, Amiens, Ed. ScientifikA. p.152, 128 illustrations.
- Nagarajan Anusuya and Sellamuthu Manian** (2013). Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of *Indigofera tinctoria* L. leaves *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(1): 142-147.
- Naira Nayeem and Karvekar MD** (2010). Isolation of phenolic compounds from the methanolic extract of *Tectona grandis*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 1(2): 221-225.
- Newmann D. and Cragg G.M.** (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70: 461-477.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G. N., Traoré D. et Aké-Assi L.** (2009) Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire) *Sciences & Nature* 6 (1) : 1-15.
- Niamké F.B., Amusant N., Stien D., Chaix G., Lozano Y., Kadio A.A., Lemenager N., Goh D., Adima A.A., Kati-Coulibaly S., Jay-Allemand C.** (2012). 4',5'-Dihydroxy-epiisocatalponol, a new naphthoquinone from *Tectona grandis* L.f. heartwood, and fungicidal activity. *International Biodeterioration & Biodegradation* 74: 93-98.
- Nikiema A. and Pasternak D.** (2008). *Khaya senegalensis* (Desr.) A.Juss. [Internet] Fiche de PROTA4U. Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. <<http://www.prota4u.org/search.asp>

- Novotná P., Pacáková V., Bosáková Z., Stulik K. (1999)**. High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. *Journal of Chromatography A* 863: 235-241.
- Oladele AT and Adewunmi CO. (2008)**. Medicinal plants used in the management of malaria among the traditional medicine practitioners (TMP'S) in south western Nigeria. *Afr J Infect Dis*; 2(1): 51-59.
- Olivier Marc and Sanou Louis (2001)**. *Pratiques culturelles, la sauvegarde et la conservation de la biodiversité en Afrique de l'Ouest et du Centre : Rôle des femmes et des tradipraticiens dans la conservation et la valorisation de la biodiversité dans le sud-ouest du Burkina Faso*. Chapitre 4. Acte du séminaire-atelier de Ouagadougou du 18 au 21 juin.
- OMS (2006)**. *Le cancer. Aide-mémoire*. W. H. Organisation, World Health Organisation. 297: 1-4.
- Ouattara D. (2006)**. *Contribution à l'inventaire des plantes médicinales significatives utilisées dans la région de Divo (sud forestier de la Côte-d'Ivoire) et à la diagnose du poivrier de Guinée : Xylopiia aethiopica (Dunal) A. Rich. (Annonaceae)*. Thèse de Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan (Côte-d'Ivoire), UFR Biosciences, Laboratoire de Botanique, p.184.
- Ouinsavi C. (2000)**. Conservation *in situ* de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss : importance socio-économique, structure et dynamique des peuplements naturels et productivité des plantations d'essai du Bénin. Thèse d'ingénieur agronome, Fsa/Unb, Abomey-Calavi, Bénin, p.120.
- Oyaizu M. (1986)**. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44 : 307-315.
- Pahup S., Sunita J. and Sangeeta B. (1989)**. A 1, 4-Anthraquinone derivat from *Tectona grandis*. *Phytochemistry*. 28, 1258-1259.
- Paitoon Aobchey, Supachok Sinchaikul, Suree Phutrakul and Shui-Tein Chen (2007)**. Simple Purification of Indirubin from *Indigofera tinctoria* Linn. and Inhibitory Effect on MCF-7 Human Breast Cancer Cells, *Chiang Mai J. Sci* 34 (3): 329-337.

- Pearlman A.** (2004). *Craft Matters*, Afterimage, *Rochester* 32 (1): 6–7.
- Pelka M., Danzl C., Distler W. and Petschelt A.** (2000). A new screening test toxicity testing of dental materials. *J Dent* 28: 341-345.
- Perkin F.M.** (1900). The present condition of the indigo industry. *Nature* 63: 7-9
- Persson P., Karlsson M. and Öhman L.O.** (1998). Coordination of acetate to Al(III) in aqueous solution and at the water-aluminum hydroxide interface: a potentiometric and attenuated total reflectance FTIR study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62: 3657-3668.
- Pétrier C., Gondrexon N. et Boldo P.** (2008). Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*, AF6310, 1-14.
- Pietta P.G.** (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7): 1035-1042.
- Plumb G. W., De Pascual-Teresa S. and Santos-Buelga C.** (1998). Antioxidant properties of catechins and procyanidins: effect of polymerization gallylation and glycosylation. *Free Radical Research* 29: 351-358.
- Pratibha G and Korwar GR.** (1999). Estimation of lawsone in henna (*Lawsonia inermis*). *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 21: 658-660.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302.
- Promsattha R., Taylor R.B., Tempesta M.S. and Iwu M.M.** (1987). Chemical Studies on the Nigerian Plant *L. cyanescens* Benth. Application of Autocorrelated 2D-DQC Spectroscopy to Structure and C-13 Assignments of the Triterpenoid Lupeol, *International Journal of Crude Drug Research*, 25: 221-224.
- Prusty A.K., Das Trupti, Nayak A. and Das N.B.** (2010). Colourimetric analysis and antimicrobial study of natural dyes and dyed silk. *Journal of Cleaner Production* 18: 1750-1756.
- Puren Odile** (2008). Le masque dans la société béninoise. *Revue Teheran* N°33.

- Purushotham K. G., Arun P., J Johnsy Jayarani J., Vasanthakumari R., Sankar L., Bijjam Raviprakash Reddy** (2010). *In vitro* antibacterial activity of *Tectona grandis* leaves with tetracycline, *International Journal of Pharm Tech Research* 2 (1) : 519-523.
- Quye A. and Wouters J.** (1991). An application of HPLC to the identification of natural dyes. *Dyes in History and Archaeology* 10: 48-54.
- Rajaei A., Barzegar M., Hamidi Z. and Sahari M. A.** (2010). Optimization of Extraction Conditions of Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistachia vera*) Green Hull through Response Surface Method. *J. Agr. Sci. Tech* 12: 605-615.
- Rajib Ahsan, Monirul Islam, Israt Jahan Bulbul, Ashik Musaddik, and Ekramul Haque** (2009). Hepatoprotective Activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *European Journal of Scientific Research* 37 (2): 302-310.
- Ramade. F.** (1979). "Ecotoxicologie", Masson, 2ème édition Paris, France, p 228.
- Ramesh B.N. and Mahalakshmi AM.** (2014). Teak (*Tectona grandis* Linn.): A Renowned timber plant with potential medicinal values. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (1): 48-54.
- Rani Sauriasari, Da-Hong Wang , Yoko Takemura, Ken Tsutsui, Noriyoshi Masuokac, Kuniaki Sano, Masako Horita, Bing-Ling Wang and Keiki Ogino** (2007). Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli* *Toxicology* 235: 103–111.
- Ranjana Bhuyan et Saikia C.N.** (2005). Isolation of colour components from native dye-bearing plants in northeastern India, *Bioresource Technology* 96 : 363–372.
- Rao K.V.; McBride T.J. and Oleson J.J.** (1968). Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. *Cancer Res.* 28: 1952–1954.
- Rao K. V.** (1974). Quinone natural products: Streptonigrin (NSC-45383) and Lapachol (NSC-11905) structure-activity relationships. *Cancer Chemother Rep.* 2, 4(4): 11-17.
- Razali, N., Razab, R., Mat Junit, S. and Abdul Aziz, A.** (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry* 111: 38-44.

- Reichling VJ, Harkenthal M., Brandt H. and Bayerl C.** (1999). Temporare Henna Taottoos. *Deutsche Apotheker Zeitung* 139 (33):35-41.
- Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O. and Regerat F.** (1996). Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* 32 (1):17-27.
- Renukadevi KP and Suhani Sultana S.** (2011). Determination of Anti bacterial, Antioxidant and Cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on Lung cancer cell line NCI-h69. *International journal of pharmacology.* 7(3): 356-362.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G.** (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933-956.
- Richardson K.E. and Hamilton P.B.** (1990). Comparative toxicity of scirpentriol and its acetylated derivatives. *Poultry Science*; 9: 397-402.
- Rivallain Josette et Iroko A. Félix.** (2000) *Yoruba, masques et rituels africains*, Paris, éd. Hazan, p.150., ill., carte, bibliographie.
- Rohman A., Riyanto S., Yuniarti N., Saputra W. R. and Utami R. and Mulatsih W.** (2010). Antioxidant activity, total phenolic, and total flavaonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). *International Food Research Journal* 17: 97-106.
- Romeggio Camille** (2006) *Liste et fiches techniques des matériaux naturels utilisés dans l'artisanat à Porto-Novo et aux alentours*. Ecole du Patrimoine Africain de Porto-Novo, Rapport de stage, p.145.
- Romeggio Camille** (2007). *Sièges rituels yoruba. Questions de conservation-restauration, entre contexte africain et recontextualisations occidentales*. Mémoire de Master en conservation-restauration d'œuvres peintes. Ecole Supérieure d'Art d'Avignon p.139.
- Rouessac Francis et Annick.** (1998). *Analyse Chimique, Méthodes et Techniques instrumentales modernes 5^e*- édition DUNOD., Paris.
- Russell Joanna Elizabeth** (2010). *A Study of the Materials and Techniques of Francis Bacon (1909-1992)*. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of the University of Northumbria at Newcastle for the degree of Doctor of Philosophy p.548.

- Sadik C., El Amrani E.H. et Albizane A.** (2011). *Influence de la nature chimico-minéralogique des argiles et du processus de fabrication sur la qualité des carreaux céramiques*. Séminaire International, Innovation & Valorisation en Génie Civil & Matériaux de Construction INVACO2, 1P-317: 1-6
- Sam, T. W.** (1993). Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In: Colegate, S. M. and Molyneux, R. J. (Eds.), *Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination*. CRC Press, Boca Raton, FL: 442-456.
- Samir A. M. Abdelgaleil, Hiroaki Okamura, Tetsuo Iwagawa, Atsuko Sato, Ikuko Miyahara, Matsumi Doe and Munehiro Nakatani.** (2001). Khayanolides, rearranged phragmalin limonoid antifeedants from *Khaya senegalensis*. *Tetrahedron* 57: 119-126.
- Sanchez C., Gupta M. and Vasquez M.** (1993). Bioassay with brine shrimp *Artemia* to predict antibacterial and pharmacologic activity. *Revista Medica de Panama*, 18: 62-69
- Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A., Saura-Calixto F.** (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76(2): 270-276.
- Sanni S., Thilza IB, Ahmed MT, Sanni FS, Talle M. and Okwor GO.** (2010). The effect of aqueous leaves extract of henna (*Lawsonia inermis*) in carbon tetrachloride induced hepato-toxicity in swiss albino mice. *Academia arena*; 2(6): 87-89.
- Santos-Buelga C. et Scalbert A.** (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1094-1117.
- Saraswathi Motamarri N., Karthikeyan M., Rajasekar S. and Gopal V.** (2012). *Indigofera tinctoria* Linn - A Phytopharmacological Review, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 3 (1): 164-169.
- Sarni-Manchado P, Cheynier V.** (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*, Ed. Lavoisier (Tec & Doc). Paris, 2006, 300-398.
- Scarone F.** (1939). Le henné dans le monde Musulman. *L'Agronomie Coloniale* 28: 97-107, 129-140.

- Scherer R. and Godoy H. T.** (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112: 654-658.
- Schofield P., Mbugua, D.M. and Pell A.N.** (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21-40.
- Seaver C. and Sadek P.** (1994). Solvent selection part I: UV absorption characteristics. *LC-GC Magazine* 12: 742-746.
- Sédar Senghor L.** (1988). *Ce que je crois*, Editions Grasset, Paris, p.222.
- Service des eaux, forêts et chasse** (1959). Rapport annuel d'activités. Cotonou, Bénin.
- Shukla N., Kumar M., Akanksha G.A., Rahuja N., Singh A.B., Srivastava A.K., Rajendran S.M. and Maurya R.** (2010). Tectone, a new antihyperglycemic anthraquinone from *Tectona grandis* leaves. *Nat Prod Commun*, 5 (3): 427-430.
- Simatupang H. M. and Yamamoto K.** (1999). Properties of teakwood (*Tectona grandis* L. F.) as influenced by wood extractives and its importance for tree breeding. Regional seminar on site technology and productivity of teak plantations. Thailand Southern Forest Experiment Station. Institute of Tropical Forestry, p.12.
- Singh N., Shukla N., Singh P., Sharma R., Rajendran S.M., Maurya R. and Gautam P.** (2010). Verbascoside isolated from *Tectona grandis* mediates gastric protection in rats via inhibiting proton pump activity. *Fitoterapia* 81: 755–761.
- Singleton V.L. and Rossi J.A. Jr.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Amer. J. Enol. Viticult* 16: 144-158.
- Smith Marc J.** (2009). Traversing eternity: texts for the after life from Ptolemaic and Roman Egypt.
- Société de pharmacie de Paris** (1839). *Rapport du concours de 1839 sur l'extraction de l'indigo du polygonum, sur la pectine et l'acide pectique sur la digitale pourprée*. Imprimerie de Fain et Thunot 149p. <http://books.google.com>.
- Sogbossi Marie-Josée** (2004). *Contribution à l'aménagement participatif des forêts classées du Bénin : Analyse des relations entre les systèmes socio-économique et physique des terroirs*

riverains et forêts classées des Monts Kouffé et de Wari-Marô. Thèse d'Ingénieur agricole FSA-UAC. p.124.

-**Sokpon N. et Ouinsavi C.** (2002). Utilisations du *Khaya senegalensis* en médecine traditionnelle au Bénin. *Revue de Médecine et Pharmacopée Africaine*, 16 : 9-19.

-**Sokpon Nestor et Ouinsavi Christine** (2004). Gestion des plantations de *Khaya senegalensis* au Bénin. *Bois et forêts des tropiques*; 279 (1): 37-46.

-**Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP and Phillipson JD** (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med*, 59: 250-252.

-**Sore Harouna, Hilou Adama, Sombie Pierre Alexandre Eric Djifaby, Compaore Moussa, Millogo Jeanne and Nacoulma Odile Germaine** (2012). Dyeing and Medicinal Plants Used in the Area of Mouhoun in Burkina Faso *Universal Journal of Environmental Research and Technology* 2 (3): 110-118.

-**Souyah Nadia** (Mai 2002). Heartwear réveille l'indigo: Une association parisienne s'est mobilisée pour la sauvegarde d'une technique béninoise en voie d'extinction: la teinture à l'indigo. *Terre sauvage (Levallois-Perret)*. 172: 90-93.

-**Steer Laure et Goudet Mathieu.** (2004). *Les plantes aromatiques, médicinales et tinctoriales, un atout pour le développement rural de la région de Tata* -Etudes thématiques en vue du développement des oasis de la région de Tata (Maroc). CNEARC-Montpellier 46p.

-**Stoker K.G., Cooke D.T. and Hill D.J.** (1998). An improved method for the large-scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo. *Journal of Agricultural Engineering Research* 71: 315-320.

-**Surowiec I., Nowik W. and Trojanowicz M.** (2004). Identification of “insoluble” red dyewoods by high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) finger printing, *Journal of Separation Science* 27: 209-216.

-**Swengley N.** (2008). *Contemporary – with antique quality Top designers are being brought together with master craftsmen to produce a new line of furniture that blends modern creativity and ancient techniques*, Financial Times, London, march 29, 18p.

-**Szostek B., Orska-Gawrys J., Surowiec I., Trojanowicz M.** (2003). “Investigation of natural dyes occurring in historical Coptic textiles by high-performance liquid

chromatography with UV-Vis and mass spectrometric detection". *Journal of Chromatography A* 1012: 179-192.

-**Tadigoppula Narender, Tanvir Khaliq, Anju Puri and Ramesh Chander** (2006). Antidyslipidemic activity of furano-flavonoïds isolated from *Indigofera tinctoria*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 3411-3414.

-**Takawira-Nyanya R. et Cardon D.** (2005). *Indigofera tinctoria* L. In: Jansen, P.C.M. & Cardon, D. (Editors). PROTA 3: Dyes and tannins/Colorants et tanins. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands.

-**Takeda Y and Fatope MO** (1988). New phenolic glucosides from *Lawsonia inermis*. *J. Nat. Prod.* 51(4):725-729.

-**Tatsch E. and Schrader B.** (1995). Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of indigoids. *Journal of Raman Spectroscopy* 26: 467-473.

-**Tauzin A.** (1998). *Le henné, art des femmes de Mauritanie*, Paris, Ibis Press

-**Taylor G.W.** (2002). Botanical alternatives to alum. *Dyes in History and Archaeology*, 18: 37-40.

-**Teissedre T. L., Frankel E. N., and Waterhouse A. L.** (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70: 55-61.

-**Tewari D.** (1992). *A Monograph on teak (Tectona grandis L. f., Verbenaceae)*. International book Distributors, Dehra Dun, p.235.

-**Thiruvanmiyoor Ravichandran K. and Ravichandran Ramanibai** (2008). The Anti proliferate activity of Flavonoidal Fraction of *Indigofera tinctoria* is through Cell Cycle Arrest and Apoptotic Path way in A-549 Cells. *Journal of Biological Sciences*;1-7.

-**The Plant List** (2010). Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 11 november 2013).

-**Tohozin A.Y.** (1986). *Dynamique de l'espace frontalier bénino-nigérian : secteur Ifangni Pobè*. Mémoire de maîtrise, Université Nationale du Bénin, FLASH, DGAT, p.174.

- Tramil 4** (1989). Vers une pharmacopée aux Caraïbes. *Recherche Scientifique et Usage Populaire des Plantes Médicinales dans le Caraïbe*. Robineau L (éd) : 234-267.
- Tyagi KP** (2010). Preliminary phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of leaves of *Indigofera tinctoria*. *Int J Res Phytochem Pharmacol*; 3(1): 47-50.
- Ursini F., Rapuzzi I., Toniolo R., Tubaro F. and Bontempelli G.** (2001). Characterization of antioxidant effect of procyanidins. *Methods in Enzymology*, 335: 338-350.
- Uygur-Bayramicli O., Dabak R. and Sargin M.** (2005). Acute chemical colitis resulting from oral intake of henna. *J. Clin. Gastroenterol.* 39: 920-921.
- Vanhaecke P., Persoone G., Claus C., and Sorgeloos P.** (1981). Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5: 382-387.
- Varichon Anne** (2005). *Couleurs pigments et teintures dans les mains des peuples*, Editions du Seuil, p.288.
- Vautier M., Guillard C. and Herrmann J.M.** (2001). Photocatalytic degradation of dyes in water. Case study of indigo and indigo carmine. *Journal of Catalysis* 201: 46-59.
- Verma SM., Suresh KB and Verma Amit** (2010). Antidiabetic Activity of Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn (Fabaceae). *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*.1(2): 42-43.
- Vinson J. A., Dabbagh Y. A., and Serry M. M.** (1995). Plant flavonoïds, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2800-2802.
- Voss G.** (2000). The analysis of indigoid dyes as leuco forms by NMR spectroscopy. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 116: 80-90.
- Wang L., and Weller C.L.** (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6) : 300-312.
- Weng W.C. and Sheu S.J.** (2000). Separation of anthraquinones by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* 23: 143-148.

- Wilson A.** (1987). Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol.*, 13 (3): 473-493.
- Wong KC and Teng YE** (1995). Volatile Components of *Lawsonia inermis* L. Flowers. *J. Essent. Oil Res.* 7(4):425-428.
- www.spindigo.net.**
- Xia Z. and Zenk M.H.** (1992). Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31: 2695-2697
- Yedmel M.** (2004). *Contribution à l'amélioration de la culture du Teck (Tectona grandis L. f., Verbenaceae) en Côte d'Ivoire par l'évaluation d'un essai de descendance et par reproduction de clones.* Mémoire de DEA, UFR Biosciences, Université de Cocody Côte d'Ivoire, 50 p.
- Yizhong Cai, Qiong Luo, Mei Sun and Harold Corke** (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sciences* 74: 2157–2184.
- Zhang X., Laursen R.A.** (2005). Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-Diode Array Detector-MS. *Analytical Chemistry* 77: 2022-2025.

ANNEXE 1

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Généralité

Au cours de ces travaux, divers solvants et réactifs ainsi que différentes techniques analytiques ont été employés. Pour chacun de ces éléments, cette annexe propose en complément, un récapitulatif des réactifs et solvants, une description du matériel ou de la technique exploitée, le mode de préparation des échantillons et les conditions optimales de séparation. En outre, plusieurs autres manipulations de chimie organique exploitant des protocoles expérimentaux dont les buts sont divers seront évoqués dans cette annexe: séparation des fractions acide et neutre; cétonique et non, en vue d'en simplifier l'étude chromatographique ainsi que des tests microchimiques sur les échantillons muséaux.

1.1. Principaux solvants, réactifs et standards commerciaux utilisés

Le méthanol absolu 99,9% (VWR, Frontenay-Sous-Bois, France), l'éthanol absolu 99,9% (VWR), sont employés pour extraire principalement les colorants rouge et jaune. L'extraction des colorants bleus a été réalisée avec du dichlorométhane 99,9%, le diméthylsulfoxyde 99,9% (VWR), le N,N-diméthylformamide $\geq 99,8\%$ (Sigma Aldrich) et l'acétone 99% (Fisher Scientific). Le cyclohexane 99,5% (Aldrich); le chloroforme 99,8% (AcrosOrganics); l'acétate d'éthyle 99,8% (Aldrich) et le butanol normal 99% (AcrosOrganics) ont été utilisés lors des fractionnements. L'acétonitrile de grade analytique (Fisher Scientific) a servi d'éluant pour l'analyse chromatographique. Ces solvants peuvent également constituer des systèmes d'éluants en CCM. Les principaux réactifs et standards commerciaux utilisés sont respectivement décrits dans les tableaux A.1 et A.2

Tableau A1.1: Principaux réactifs utilisés

Réactifs	Numéro Cas	Provenance
Kit réactif de Folin-Ciocalteu	-	Isitec Labo
2-aminoéthylidiphénylborate	[524-98-8]	Sigma-Aldrich
Acétate de sodium	[127-09-3]	Carlo Erba
Acide trifluoroacétique (TFA)	[76-05-1]	AcrosOrganics
Acide chlorhydrique	[7647-01-0]	AcrosOrganics
Acide acétique glacial	[64-19-17]	VWR
Bovine Serum Albumine (BSA \geq 96%)	9048-46-8]	Sigma-Aldrich
Sodium DodecylSulphate (SDS \geq 99%)	[151-21-3]	Aldrich
Triéthanolamine (TEA 98%)	[102-71-6]	Alfa Aesar
1,1-diphényl 2- picrylhydrazile(DPPH 90%)	[1898-66-4]	Sigma-Aldrich
Chlorure ferrique FeCl ₃	[7758-94-3]	Aldrich
Bromure de potassium KBr \geq 99%	[7758-02-3]	Aldrich
Réactif de T. Girard 99%	[123-46-6]	AcrosOrganics

Tableau A.1.2: Principaux standards commerciaux utilisés

Standards commerciaux	Numéro Cas	Fournisseur
Trolox 97%	[53188-07-1]	AcrosOrganics
Acide gallique 99%	[149-91-7]	Alfa Aesar
Quercétine \geq 95%	[117-39-5]	Aldrich
Cyanidine-3-glucoside \geq 98%	[7084-24-4]	Aldrich
Acide tannique \geq 90%	[1401-55-4]	Extrasynthèse
Chlorure de malvidine 95%	[7228-78-6]	Extrasynthèse
Acide ellagique 97%	[476-66-4]	Aldrich
Acide ferulique 99%	[537-98-4]	Alfa Aesar
Acide caféique 99%	[331-39-5]	Aldrich
Rutine \geq 94%	[207671-50-9]	Aldrich
Acide para-coumarique \geq 98%	[501-98-4]	Aldrich
Acide méta-coumarique	[14755-02-3]	Fluka
Acide ortho-coumarique	[614-60-8]	Fluka
Acide chlorogénique \geq 97%	[327-97-9]	Fluka
Acide sinapinic \geq 99%	[530-59-6]	Aldrich
(-)- épicatechine \geq 99%	[490-46-0]	Extrasynthèse
(+)-catéchine \geq 99%	[154-23-4]	Aldrich
Acide anthranilique $>$ 98%	[118-92-3]	AcrosOrganics
Acdeursolique	[77-52-1]	Extrasynthèse
Acide vanillique \geq 97%	[121-34-6]	Fluka
Rhamnétine	[90-19-7]	Extrasynthèse
Isorhamnétine	[480-19-3]	Extrasynthèse
Diosmétine	[520-34-3]	Extrasynthèse
Lutéoline	[491-70-3]	Extrasynthèse
Apigénine \geq 95%	[520-36-5]	Aldrich

Kaempférol $\geq 90\%$	[520-18-3]	Aldrich
Lutéoline-7-O-Glucoside $\geq 98\%$	[5373-11-5]	Extrasynthèse
Quercétine-3-O-Glucoside-pyranoside		Fluka
Kaempférol-3-O-Glucoside	[480-10-4]	Extrasynthèse
Isorhamnétine-3-O-Rutinoside		Extrasynthèse
Isorhamnétine-rhamnétine-3-O-Glucoside		Extrasynthèse
Scopolétine $\geq 99\%$	[92-61-5]	Aldrich
Scoparone	[120-08-1]	Aldrich
Tectoquinone $\geq 95\%$	[84-54-8]	Aldrich
2-(hydroxyméthyl)anthraquinone 97%	[17241-59-7]	Aldrich
Lapachol 98%	[84-79-7]	Aldrich
Lawsonie 97%	[83-72-7]	Aldrich
Isatine 98%	[91-56-5]	AcrosOrganics
Indigo	[482-89-3]	AcrosOrganics
Quinizarine $\geq 98\%$	[81-64-1]	Fluka
Purpurine	[81-54-9]	AcrosOrganics
Emodine	[518-82-1]	Extrasynthèse
Aloe-Emodine	[481-72-1]	Extrasynthèse
Alizarine	[72-48-0]	Extrasynthèse
1,8-dihydroxyanthraquinone 96%	[117-10-2]	Extrasynthèse
2,6-dihydroxyanthraquinone	[84-60-6]	Extrasynthèse

1.2. Systèmes et préparations d'échantillons afférentes

1.2.1. Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF)

-Matériel

- Spectromètre Avatar 360 (Thermo-Nicolet, Madison, Wisconsin, USA)
- Acquisition : 64 balayages
- Résolution : 4 cm^{-1} en format % de transmission
- Domaine d'étude : moyen IR ($4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$)
- Détecteur DTGS KBr
- Logiciel de traitement : EZ OMNIC version 6.0

-Préparation des échantillons

Environ 1% d'échantillon solide (standard, extrait, matrice végétale...) est broyé de manière homogène à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate dans du bromure de potassium KBr anhydre. La poudre ainsi obtenue est ensuite comprimée sous une pression de 10 t.cm^{-2} , avec une presse manuelle, afin d'obtenir une pastille fine et translucide. La pastille est ensuite

analysée, l'air étant pris comme référence. Par ailleurs, l'analyse des textiles muséaux a été directement effectuée en mode ATR (Réflexion Totale Atténuée).

1.2.3. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

-Matériel

- Pompe à gradient quaternaire Waters 600
- Injecteur ou passeur automatique Waters 717 : 10 μ L sont injectés automatiquement à chaque analyse
- Colonne C18-e (Symmetry Shield RP-18, Waters 5 μ m; 4,6 \times 250 mm) ou colonne C18 (nouvelle génération Kinetex Core-Shell RP-18, Phenomenex 2,6 μ m ;100 mm \times 4,60 mm)
- Détecteur à barrette de photodiodes Waters 2996
- Logiciel d'acquisition : Empower 1154 (Waters).

-Préparation des échantillons

Une quantité de 10 mg d'extrait brut ou d'un 1mg de standard est solubilisée dans 2 mL de méthanol de grade analytique. La solution est ensuite homogénéisée pendant 5 min dans un bain à ultrasons puis centrifugée et/ou filtrée sur membre PTFE avant d'être injectée dans le système CLHP. Par ailleurs, les standards commerciaux sont injectés à une concentration de 0,5 mg/mL.

2. Etude d'extraction des colorants de *T. grandis*

2.1. Matériel et Procédure pour l'extraction assistée par les ultrasons (UAE)

Les échantillons ont été soumis aux ultrasons, à l'aide du prototype SOLEX 180 (25 kHz, 120 W) commercialisé par la société R.E.U.S. (Contes, France). Il est composé d'un réservoir inoxydable avec une capacité maximum de 0,8 L, d'un serpentín pour réguler la température (**Figure A1.1**). C'est une cuve dont le diamètre de la sonde ultrasonique est de 13 cm. L'intensité acoustique électrique dissipée par cette sonde est de 0,905 W.cm⁻² calculée par la formule $I = P/\pi r^2$ où r est le rayon de la sonde, et P est sa puissance d'entrée.

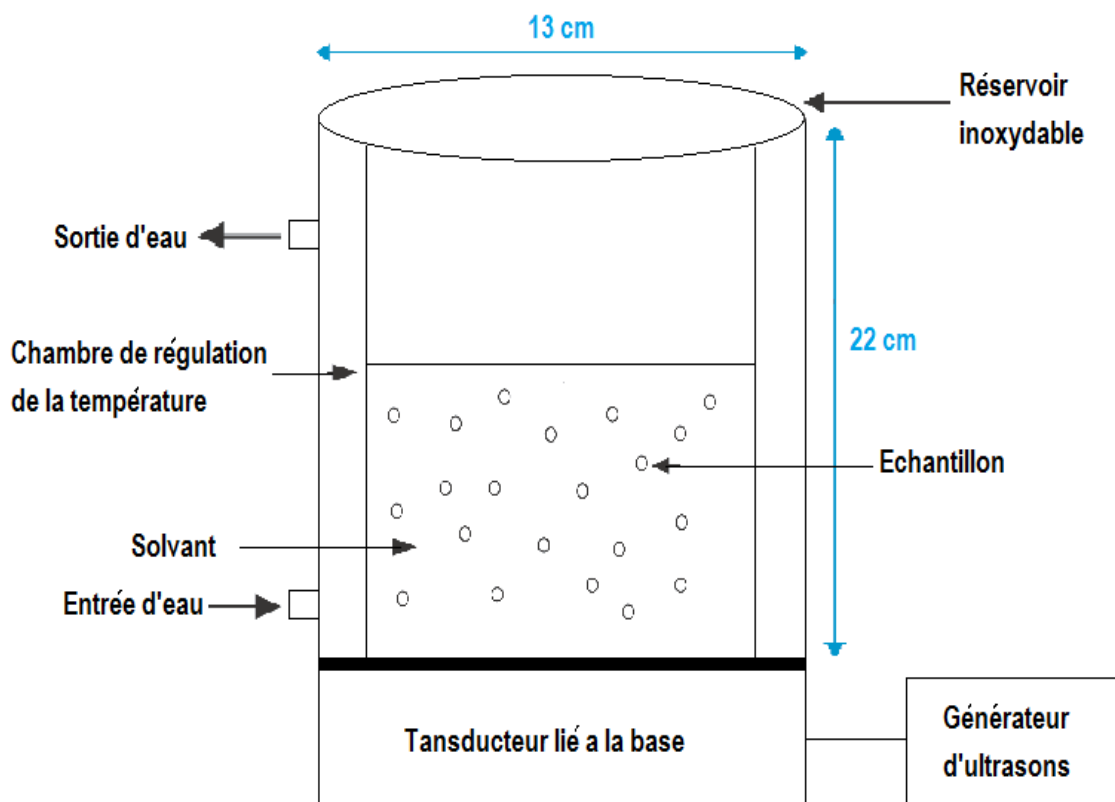


Figure A1.1 : Schéma du prototype SOLEX

Pour ce qui concerne l'étude du ratio volume solvant/masse échantillon (v/m), on pèse à chaque fois 6 g d'échantillon auxquels on ajoute respectivement 60, 120, 150, 300 et 450 mL d'éthanol absolu. Chaque solution est ensuite soumise pendant 30 min aux ultrasons. L'extrait obtenu est filtré (sur papier Watmann ou deux fois sur du coton hydrophile) puis évaporé à sec pour déterminer le rendement massique.

Après le choix du ratio, 6 g de poudre de feuilles sèches de *T. grandis* ont été extraites dans 150 mL de solvant (MeOH, EtOH, MeOH 70% et EtOH70%) à température ambiante et à des durées variables (10min, 20min, 30min et 60min). Après filtration, chaque extrait a été évaporé sous vide puis l'extrait sec obtenu est pesé. Chaque expérience est répétée trois fois.

2.2. Procédure pour les extractions par Soxhlet, macération et reflux

Pour chacune de ces extractions réalisées au cours du processus d'optimisation des colorants de *T. grandis*, 6 g d'échantillon ont été extraites dans 150 mL de solvant ; la seule variable est la durée d'extraction au niveau de chaque technique dont les conditions expérimentales sont les suivantes:

-Soxhlet à 65°C suite à l'épuisement total du colorant de la matrice végétale (2 h environ).

-Macération à température ambiante sous agitation douce et continue à des durées variables (1h, 24h, 48h et 72h).

-Reflux à 65°C pendant 1h, 2h, 4h et 5h.

Comme précédemment, après filtration, chaque extrait a été évaporé à sec pour déterminer le rendement massique.

Par ailleurs, pour ce qui concerne l'analyse de ces extraits bruts par CLHP/UV-Vis, 10 mg de chaque extrait ont été solubilisés dans du méthanol de grade analytique puis homogénéisés pendant 5 min dans un bain aux ultrasons. La solution est ensuite centrifugée et/ou filtrée sur membrane PTFE puis directement injectée en CLHP.

2.3. Fractionnement et purification d'extraits bruts de *Tectona grandis*

➤ Protocole d'obtention des fractions acide et neutre

4,5 g de poudre sèche de *T. grandis* sont dissouts dans 5 mL d'éther diéthylique et 33 mL de méthanol. La partie insoluble de la solution est éliminée par filtration et la solution résultante est évaporée à sec sous vide.

Le liquide visqueux obtenu est à nouveau dissout dans le mélange méthanol-éther 33:5 v/v puis re-concentré par évaporation. Cette opération est renouvelée deux fois. Le produit résultant de la dernière évaporation est solubilisé dans 38 mL d'éther et extrait 3 fois avec 10 mL d'une solution à 5% de carbonate de sodium. La phase étherée est collectée puis extraite trois fois avec 7 mL d'une solution à 0,5 M d'hydroxyde de sodium. La phase organique restante contient les molécules neutres, c'est-à-dire ne possédant pas de fonction acide carboxylique. Elle sera séchée (MgSO₄ anhydre) puis évaporée à sec.

Quant aux extraits aqueux, ils sont rassemblés puis acidifiés avec de l'acide chlorhydrique, suivi de trois extractions à l'éther. L'ensemble de ces phases est alors séché, puis évaporé à sec donnant ainsi la fraction acide de la matrice végétale. La procédure schématisée est présentée dans la **figure A1.2** suivante.

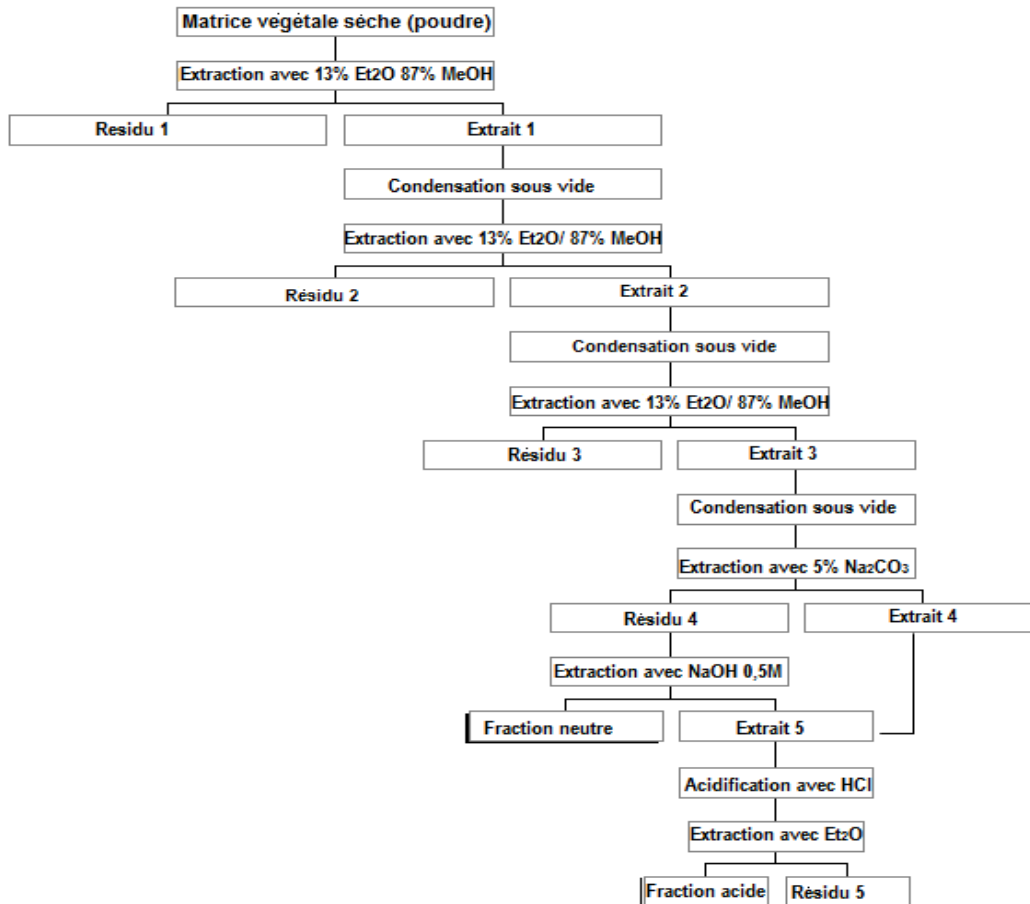
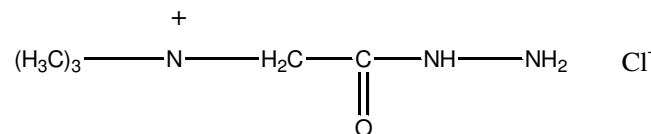


Figure A1.2 : Schéma d'extraction des fractions acides et neutres (Mathe, 2003)

➤ **Protocole d'obtention des fractions cétonique et non cétonique**

7 g de réactif T de Girard, de formule :



sont mélangés à 90 mL d'éthanol et à 24 mL d'acide acétique. On ajoute ensuite 1 g de poudre sèche de *T. grandis*. Le mélange est laissé 1 heure à 80°C (bain-marie thermostaté). Après refroidissement, le mélange est versé sur de l'eau saturée par 60 g de NaHCO₃. La solution obtenue subit trois extractions successives à l'aide d'éther diéthylique. La phase organique résultante est lavée ensuite quatre fois à l'eau (MilliQ, Millipore). Dans la fraction étherée ainsi obtenue se trouvent les produits non cétoniques. Elle sera séchée puis évaporée à sec.

La phase aqueuse est acidifiée par de l'acide chlorhydrique concentré, puis extraite trois fois à l'éther. Les produits cétoniques libérés par l'acidification sont ainsi séparés.

➤ **Fractionnement au Combiflash® Rf TELEDYNE ISCO**

-Matériel

L'appareil utilisé est un automate du type Teledyne Combiflash Isco, muni d'une cellule de détection UV permettant d'avoir une visualisation de l'absorption du composé séparé à 254 nm (**Figure A1.3**).

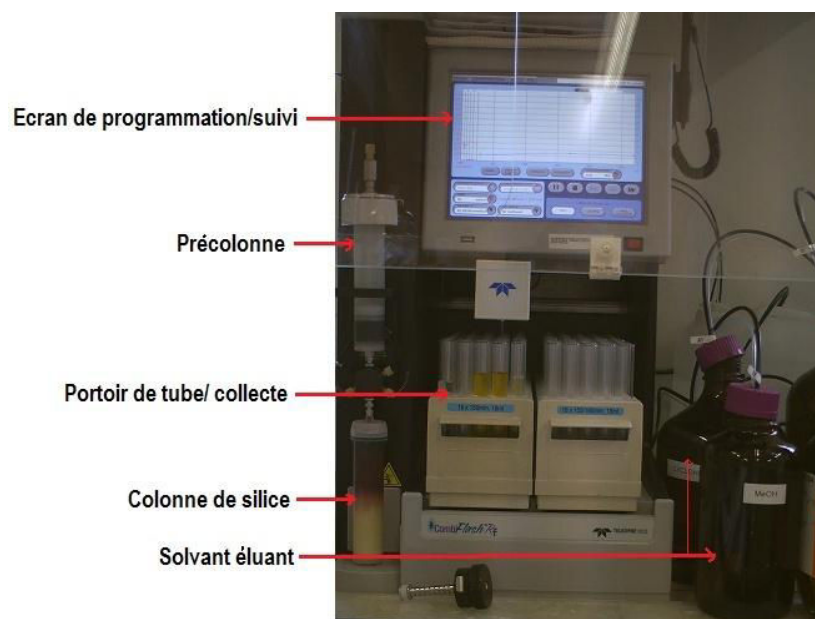


Figure A1.3 : Appareil de chromatographie flash piloté du Teledyne Isco

-Procédure du fractionnement

1g d'extrait sec a été solubilisé dans un minimum d'éluant constitué de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (cHex-ACE) auquel on a ajouté une spatulée de silice. Ce mélange a été évaporé sous vide puis séché sous azote liquide. Le solide obtenu a servi à réaliser la précolonne. En effet, elle est constituée d'un corps de seringue en polypropylène transparent, ouverte sur l'extrémité supérieure dans laquelle on introduit un filtre capuchon sur laquelle, on dépose le solide à purifier. On introduit ensuite un second filtre et à l'aide d'un piston, on compresse l'ensemble constituant ainsi la précolonne. La phase stationnaire utilisée est une colonne RediSepSilica 40g du type Fast-Connect. Elle est également constituée d'un corps de seringue contenant de la silice qui est refermé par un bouchon avec une sortie femelle ne nécessitant aucun piston ni holder supplémentaire. Elle est placée en dessous de la précolonne. Le débit de l'élution de la phase mobile est de 40 mL/min et le gradient utilisé est constitué de deux séries d'élution de 37 CV (44,4 min) à raison de 5 CV (6 min) par montée intercalés de 2CV (2,4 min) par palier avec les solvants cHex-ACE en premier et ACE-MeOH

ensuite. Le seuil de détection des composés élués est de 0,2 AU. Les fractions sont recueillies en zig-zag de façon automatique dans des tubes à essai (16 mm×150 mm) de 18 mL. Ensuite chaque fraction subie une migration sur plaque CCM (TLC Silica gel 60 F₂₅₄Merck®). A noter que les composés sont élués suivant leur polarité croissante, les plaques sont développées par un système d'éluant constitué de cHex-ACE 8:2 v/v pour les 75 premières fractions et cHex-ACE 5:5 v/v pour la suite.

➤ **Purification de molécules ciblées de *T. grandis***

La purification de molécules ciblées contenues dans la fraction F₅ (64,8 mg) a été effectuée par dépôt de la fraction sur une plaque de Chromatographie sur Couche Mince (CCM) préparative et développée avec le mélange cHex-ACE (8:2, v/v), comme phase mobile. Les plages de colorants obtenues ont été raclées, puis percolatées par filtrage à l'aide du solvant éluant. L'extrait recueilli au niveau de chaque colorant est évaporé à sec puis repris dans 2 mL de méthanol.

Les composés ont été purifiés par extraction en phase solide (SPE) dans le but d'éliminer toute impureté résiduelle. La cartouche SPE Strata C18-E (200 mg, 3 mL, Phenomenex, CA, USA) a été conditionnée successivement avec 1,2 mL de méthanol et 1,2 mL d'eau bidistillée. Ensuite, l'extrait a été chargé dans la cartouche SPE, elle a été lavée avec 1,8 mL d'un mélange méthanol-eau (7:3, v/v). Enfin, l'antraquinone a été éluée avec 0,9 mL de méthanol, puis concentrée par évaporation du solvant.

3. Etude chimique des plantes à indigo

3.1. Méthode d'extraction des colorants de *P. cyanescens* et *I. tinctoria*

La procédure d'extraction utilisée est similaire à celle de *T. grandis*. En effet, 6 g de poudre de feuilles sèches de *P. cyanescens* ou de tiges feuillées de *I. tinctoria* ont été extraites dans 150 mL de solvant (MeOH, DCM, Acétone, DMF et DMSO) par diverses techniques (UAE, reflux et Soxhlet). Les extraits secs (10 mg) obtenus après évaporation ont été repris dans le DMSO (2 mL) avant d'être injectés en CLHP.

3.2. Protocole d'extraction par réduction chimique (ERC)

10 g de feuilles séchées de plantes sont introduites dans 250 mL d'eau distillée portée à ébullition dans un bécher de 500 mL. On mélange le contenu pour bien imprégner les feuilles. Le bécher est recouvert de papier aluminium puis la solution est remise à bouillir sur la plaque

chauffante pendant 10 minutes. Le mélange est filtré à chaud sur Büchner puis rincé abondamment à l'eau chaude 70-80°C (4 à 6 litres) jusqu'à ce que le substrat soit quasiment incolore afin de débarrasser au mieux l'indigo recherché des composés secondaires. Les feuilles bouillies, lavées et essorées sont recueillies dans le bécher de 500 mL auquel on ajoute 150 mL d'une solution mixte de dithionite de sodium et de soude préparée à partir de 2,5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ et 2,5 g de NaOH dissous dans 150 mL d'eau chaude ou tiédie (50°C). Le mélange est porté à ébullition douce pendant 20 mn, le bécher étant toujours recouvert de papier aluminium. On filtre une seconde fois à chaud sur Büchner, on laisse le filtrat refroidir, on crée une agitation dans le bain de teinture basique afin de favoriser la pénétration de dioxygène (oxydation de leuco-dérivés en indigo) puis on ajoute par petite quantité goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur de l'acide chlorhydrique 3N pour ramener le pH à environ 7 ; pendant ce temps l'indigo précipite mais le précipité étant trop fin, on peut laisser décanter puis on élimine le surnageant jaune brun. On sèche ensuite à l'étude à 40°C avant de recueillir la matière sèche bleu foncée recherchée.

3.3. Purification et caractérisation des molécules colorantes ciblées dans les espèces étudiées

➤ Criblage des éluants via la CCM des extraits

Les principaux extraits obtenus ont subi une analyse par CCM dans l'objectif de trouver un éluant efficace à la séparation des colorants, lors du fractionnement au combiflash. Un dépôt de témoin indigo synthétique (**Indigo synth**), suivi respectivement des extraits **IdT ERC** ; **PcF ERC** ; **IdT Acétone RE 1h** ; **PcF DCM RE 1h** et **PcF Acétone RE 1h** a été effectué sur la plaque. Trois systèmes d'éluant ont été exploités pour la migration des composés : DCM-MeOH-AcOH (97:2:1, v/v/v) ; HCCl_3 -Hex-MeOH (7:4:1, v/v/v) et DCM-MeOH (97:3, v/v). Les spots ont été directement appréciés en lumière visible.

➤ Fractionnement au combiflash

Il a été réalisé en deux étapes. Dans un premier temps à partir de 1 g d'extrait brut **IdT Acétone RE1h** dans les mêmes conditions analytiques que celui réalisé avec *T. grandis*, à la seule différence que, dans ce cas, l'élution est réalisée en mode isocratique durant 37 CV (44,4 min) avec le mélange de solvant DCM-MeOH (97:3, v/v). Les fractions collectées (107) ont été regroupées en cinq avant d'être évaporées à sec. Un second fractionnement a été effectué à partir du groupe de fraction contenant l'indigotine et l'indirubine. En effet, **302,98 mg** d'extrait sec obtenu, ont été solubilisés dans un minimum de dichlorométhane puis traités de la même

façon que précédemment afin de réaliser la précolonne. La phase stationnaire utilisée est une colonne RediSepSilica 12 g et la phase mobile est constituée du dichlorométhane et d'hexane. Le gradient appliqué est de 0-6-24-36-60 min/ 60-60-100-100-100% DCM avec un débit d'élution de 27 mL/min. Au total 45 fractions colorantes ont été recueillies puis séparées en fraction bleue **F₄** contenant l'indigotine et rouge **F₅** contenant l'indirubine, avant d'être évaporées à sec.

➤ **Purification de l'indirubine**

La purification de l'indirubine a été effectuée par dépôt de la fraction **F₅ (168 mg)** sur une plaque de chromatographie sur couche mince préparative (CCM préparative) et développée avec le système d'éluant DCM-MeOH-AcOH (97:2:1, v/v/v). Le colorant raclé est en outre soumis à une purification par SPE pour éliminer d'éventuelle impureté résiduelle. La cartouche SPE Strata C18-E (200 mg, 3 mL, Phenomenex, CA, USA) a été conditionnée successivement avec 1,2 mL ACN et 1,2 mL MeOH. Ensuite le colorant (2mL) a été chargé dans la cartouche SPE, elle a été lavée avec 1,8 mL d'un mélange ACN-MeOH (85:15, v/v). Enfin, l'indirubine a été éluée avec 1,2 mL d'acétone, puis concentrée par évaporation du solvant.

➤ **Caractérisation de l'indirubine par RMN**

Une analyse de confirmation structurale du composé purifié a été réalisée à l'aide d'un spectromètre RMN 400MHz/BRUKER AC-400. Cette analyse concerne de façon spécifique, la résonance magnétique nucléaire monodimensionnelle (¹H) et bidimensionnelle (COSY ¹H-¹H). Le colorant a été solubilisé dans 60 µL de deutérochloroforme CDCl₃(¹H: 7,19 ppm) puis introduit à l'aide d'une pipette pasteur dans le tube d'analyse RMN de diamètre 1,7 mm. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au pic de solvant résiduel comme référence dans un couplage homonucléaire ¹H. Les abréviations utilisées pour les modèles de signal sont: s:singulet; d: doublet; dd: doublet de doublet; t: triplet; q: quatuor ; m: multiplet.

3.4. Quantification des indigoïdes et de l'isatine des extraits de *P. cyanescens* et *I. tinctoria*

Le dosage de l'indigotine a été réalisé à partir des solutions d'indigo synthétique de concentrations massiques comprises entre 1 et 120 mg.L⁻¹. Celui d'indirubine est effectué par l'indirubine purifiée au laboratoire à partir d'*Indigofera tinctoria*. Une gamme de solutions étalon de concentrations comprises entre 8 et 40 mg.mL⁻¹ a été préparée. Pour ce qui concerne

l'isatine utilisée pour cette opération, des solutions de concentrations variant entre 5 et 150 mg.L⁻¹ ont été injectées. A noter que chaque solution mère est préparée à partir du DMSO 100%, homogénéisée pendant 10 min dans le bain aux ultrasons, filtrées à l'aide d'une seringue munie d'un filtre PTFE avant d'être diluée puis injectée dans le système CLHP. Les solutions ont été analysées 6 fois réparties en 2 fois 3 injections successives sur 2 jours différents. Les courbes d'étalonnage ont été construites en traçant l'aire moyenne des pics en fonction de la concentration massique de chaque composé. La limite de détection (**LD**) et la limite de quantification (**LQ**) ont été déterminées par le rapport signal/bruit de fond multiplié respectivement par 3 et par 10.

Pour la détermination des teneurs en indigoïdes et en isatine au sein de chaque espèce, une solution de 0,5 mg/mL de chaque extrait a été préparée à partir du DMSO dans les mêmes conditions que les solutions mères des standards, puis injectée en CLHP. Pour chaque échantillon, trois analyses ont été réalisées. L'évaluation de la teneur en indigoïdes et en Isatine de chaque échantillon a été effectuée à partir de l'équation issue de la courbe d'étalonnage de chaque standard. Les données sont traitées par le logiciel Microsoft office Excel 2007.

4. Analyse et extraction de *Lawsonia inermis*

4. 1. Extraction et identification des molécules cibles de *Lawsonia inermis*

6 g de poudre de feuilles sèches de *Lawsonia inermis* ont été extraites dans 150 mL de solvant (MeOH, EtOH, MeOH80% et EtOH80%) par diverses techniques (UAE, reflux et Soxhlet). Les extraits secs (10 mg) obtenus après évaporation ont été repris dans le MeOH de grade analytique (2 mL) avant d'être injectés dans le système CLHP auquel, on applique les mêmes conditions analytiques que celles utilisées pour *T. grandis*.

4.2. Extraction de la lawsone par fractionnement

Le protocole d'extraction exploité par Ashnagar et Shiri (2011) a été utilisé avec quelques modifications. En effet, à 15 g de poudre de feuilles sèches du henné contenus dans un ballon, on ajoute 300 mL d'eau distillée et le mélange est porté au reflux à 75°C pendant deux heures. On additionne 5 g de bicarbonate de sodium (NaHCO₃), puis on porte à nouveau le mélange à chaud à 50°C durant quatre heures. Ensuite la solution est filtrée sur du coton hydrophile et on ajuste le pH du filtrat à 3 par addition du HCl 2N. On passe ensuite à un fractionnement liquide-liquide où le filtrat est extrait 4×120 mL à l'éther diéthylique. La

fraction étherée est lavée 2×100 mL à l'eau distillée puis séchée à travers du MgSO₄ anhydre et ensuite concentrée à sec.

5. Analyse des extraits de *Khaya senegalensis*

5.1. Extraction des polyphénols de *K. senegalensis*

Hormis les procédés utilisant les ultrasons et le méthanol utilisés dans les mêmes conditions que précédemment, l'extraction des composés présents dans les écorces de *Khaya senegalensis* a été effectuée suivant la méthode décrite par Atawodi *et al.*, (2009). Pour ce faire, 15 g de matière végétale ont été dégraissés par extraction au Soxhlet dans 300 mL d'hexane normal pendant 3 heures. La matière végétale est ensuite séchée sous hôte durant 24 heures puis reprise dans 300 mL de méthanol. Le mélange est porté au reflux pendant 2 heures puis filtré. L'extrait évaporé à sec et repris dans le méthanol, est ensuite injecté en CLHP puis analysé dans les mêmes conditions que *T. grandis*.

5.2. Extraction par hydrolyse acide des composés présents dans les écorces de *K. senegalensis*

1 g de poudre d'écorce de caïlcédrat, a été dissout dans 25 mL du mélange MeOH-HCl 6 M (4:1, v/v). La solution est portée au reflux (75°C) pendant 1 heure, filtrée puis évaporée à sec. L'extrait obtenu (5 mg/ mL) est repris dans le méthanol puis injecté en CLHP.

6. Application aux prélèvements d'échantillons muséaux

De petits échantillons de matières colorées ont été prélevés sur les objets étudiés, avec un microscalpel et à l'aide d'une lunette d'approche réglable. Ces prélèvements ont été réalisés dans des zones préalablement choisies de l'objet où il était plus facile de prélever des écailles et de préférence dans des endroits altérés (méthode de la National Gallery ; Philippon, 1986). L'analyse de chaque prélèvement a commencé par une observation de la stratigraphie de la matière sous loupe binoculaire, suivie d'un tri afin d'écartier les impuretés et de récupérer seules les substances à analyser. La matière colorée a ensuite subi une analyse en IR-TF en mode KBr dans les conditions décrites précédemment. En effet, les profils spectraux issus de cette analyse permettent de caractériser la nature organique et/ou inorganique des matériaux analysés. Les prélèvements de nature minérale ont subi des tests microchimiques complémentaires en vue de conforter les composants inorganiques quant aux prélèvements organiques, une analyse par CLHP a été réalisée en vue de caractériser les colorants.

6.1. Tests microchimiques

Les tests microchimiques sont basés sur l'analyse qualitative par voie humide des ions constitutifs d'un pigment, par des réactions spécifiques permettant de caractériser en l'absence de tout un groupe d'éléments, ce pigment *via* des expérimentations rapides, faciles de mise en œuvre et très peu onéreuses. En effet, presque toutes les caractérisations s'effectuent dans une goutte de solution (réactions dite « à la goutte ») et les différentes parties de l'analyse sont indépendantes. En outre, ces tests sont d'autant sélectifs qu'ils sont réalisés dans le but de compléter et confirmer les résultats issus de l'analyse en IR-TF. Par conséquent, seuls quelques principaux tests seront présentés au nombre de ceux appliqués. Toutes les analyses exploitées sont issues des protocoles développés dans les ouvrages de Charlot (1980) et Philippon (1986). Ils sont réalisés, pour la plupart, dans les alvéoles de plaques à godets avec un suivi sous loupe binoculaire équipée de caméra reliée à tablette numérique.

-Test de détection du kaolin

A noter que le kaolin est très utilisé aussi pur ou comme charge additionnelle dans les pigments. Il s'agit d'argiles blanches principalement composées de kaolinite $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ soit de silicates d'aluminium. On attaque le prélèvement avec HCl concentré (37%) à chaud jusqu'à évaporation, puis on reprend, le résidu dans de l'acide dilué (HCl 3N). On recherche alors l'aluminium au niveau du prélèvement (cf test décrit ci-après).

-Recherche de Al^{3+}

On ajoute au prélèvement, deux gouttes de tampon acétique (10 g de AcONa + 20 mL de AcOH glacial + 75 mL d'eau) puis une goutte d'aluminon III (acide aurine en solution à 0,1% dans l'eau). La présence d'aluminium est confirmée après quelques minutes par une coloration rose foncée ou rouge.

-Test de détection des ocre (oxydes de fer)

On recherche la présence des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} . Au prélèvement est ajouté une goutte de HCl concentré (37%) puis une goutte de solution de ferrocyanure de potassium (100 g/L dans l'eau) donnant une coloration bleue en présence d'ions Fe^{2+} , tandis que l'ajout d'une solution de thiocyanate de potassium (160 g/L dans l'eau) caractérise les ions Fe^{3+} *via* une coloration rouge sang.

-Test de détection du bleu de Prusse ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ avec $x=14-16$)

Il s'agit du ferrocyanure de fer. On recherche donc la présence du fer ferrique (**cf test décrit ci-dessus**). En outre, sous l'action du NaOH 4N, ce pigment est totalement décoloré et on observe toujours sous loupe, la formation d'un précipité brun orangé d'hydroxyde de fer $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

-Test de détection du bleu outremer ou bleu de lessive $\text{Al}_6\text{Na}_7\text{O}_{24}\text{S}_3\text{Si}_6$

Naturel ou artificiel, il s'agit d'un complexe de silicates d'aluminium et de sodium et de sulfure de sodium en provenance d'un minéral bleu *Lapis-lazuli*. La reconnaissance de ce pigment conduit donc à la caractérisation des sulfures, du sodium ou d'aluminium.

-Recherche des sulfures S^{2-}

On ajoute au pigment, une goutte de HCl dilué (3N) puis rapidement une goutte du réactif iode-sodium azide (solution constituée par 1 goutte d'azide de sodium + 1 goutte d'iodure de potassium + 3 mL d'eau + un petit cristal d'iode). Il se produit alors un dégagement gazeux de H_2S en présence de sulfure suivi d'une décoloration de la solution.

-Recherche de sodium Na^+

On dépose une goutte de solution acide (acide acétique 30%) du prélèvement sur du papier filtre. Après séchage, on recouvre avec une goutte du réactif d'uranyle acétate de zinc préparé à partir de 10 g d'acétate d'uranyle + 10 g d'acétate de zinc + 15 mL d'acide acétique et 80 mL d'eau distillée. On dépose une goutte du réactif à côté puis on observe sous lumière UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). La présence de sodium se traduit par l'apparition d'une tache plus fluorescente.

-Test de détection du carbonate de calcium (CaCO_3)

On recherche le calcium en plaçant l'échantillon dans un tube à essai et on additionne 1 goutte d'EDTA en solution aqueuse (100 g/L) + 1 goutte de nitrate d'aluminium (100 g/L dans l'eau) + 4 gouttes de tampon acétique + 2 gouttes d'oxalate de potassium (200 g dans 1L d'eau) puis on laisse pendant 2 min au bain marie. On observe un précipité blanc d'oxalate de calcium (CaC_2O_4). Par ailleurs, la mise en évidence du carbonate se traduit par une vive effervescence dégageant du CO_2 suite à l'ajout d'une goutte de HCl (3N) sur le prélèvement.

6.2. Extraction et analyse des prélèvements par CLHP UV-Vis

6.2.1. Conditions “douces”

0,5-1,5 mg de matière tinctoriale a été placé dans un tube à hémolyse avec 500 μ L d'une solution de tampon acétique $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$. La solution de tampon acétique (pH = 4,3) a été préparée avec 10 g d'acétate de sodium CH_3COONa , 75 mL d'eau distillée et 20 mL d'acide acétique glacial CH_3COOH . L'échantillon est soumis aux ultrasons pendant 10 min en utilisant le prototype SOLEX 180. La solution est ensuite filtrée sur membrane PTFE, puis l'extrait, évaporé à sec est repris dans 250 μ L de méthanol avant d'être injecté dans le système CLHP.

6.2.2. Conditions “moyennement dures”

0,5-1,5 mg de matière prélevée est dissous dans 500 μ L du mélange : MeOH-HCl 6 M (50:50 v/v) puis porté à chaud entre 90-95°C pendant 5 min (Sanz *et al.*, 2012). Ensuite, le mélange est filtré, évaporé et repris dans le méthanol puis injecté comme précédemment en CLHP.

6.2.3. Extraction des colorants bleus

Les prélèvements bleus en général sont extraits avec du diméthylformamide (DMF). Quelques millimètres carrés de fibres ont été placés avec 500 μ L de DMF dans un tube à hémolyse jusqu'à immersion totale de l'échantillon. L'ensemble est soumis aux ultrasons pendant 10 min, filtré puis analysé par CLHP.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'analyse par CLHP des couleurs rouges et jaunes, le gradient d'élution employé est celui utilisé pour l'étude de *T. grandis*, *L. inermis* et *K. senegalensis*. Les bleus sont analysés en utilisant le gradient d'élution des plantes à indigo.

7. Méthodes de dosage spectrophotométrique

7.1. Dosage des phénols totaux

On prépare séparément dans des tubes à hémolyse des solutions constituées de blanc réactif, d'étalon (acide gallique) et d'échantillon à doser.

-A 20 μ L d'eau distillée, on ajoute 2 mL du chromogène constitué du réactif de Folin-Ciocalteu : c'est le blanc réactif.

-A 20 μ L d'étalon (acide gallique 3 g/L), on ajoute 2mL de chromogène : c'est la solution étalon.

-A 20 μ L d'échantillon (extrait végétal méthanolique à 0,005g/mL), on ajoute 2 mL du chromogène : c'est l'échantillon.

Chaque solution est agitée à l'aide d'un vortex puis après 1 minute de repos, on complète à chaque solution avec 1 mL du tampon carbonate de sodium et on agite une seconde fois au vortex.

Après 30min environ d'incubation à température ambiante, l'absorbance des solutions d'échantillon et celle de l'étalon sont mesurées à 620 nm par rapport à la solution d'eau distillée représentant le blanc réactif.

Chaque expérience est répétée trois fois au niveau des échantillons.

7.2. Dosage des flavonoïdes totaux

On dispose pour ce dosage d'une solution mère d'étalon (quercétine 0,1 mg/mL) à partir de laquelle on réalise des dilutions successives (0,001 à 0,03 mg/mL) et d'une solution de l'échantillon à doser, préparées à partir du MeOH 80%.

A 2 mL de la solution d'extrait ou d'échantillon, on ajoute 100 μ L du réactif de NEU 1% (2-aminoethyl diphenyl borate). Après agitation au vortex, l'absorbance est mesurée à 404 nm au colorimètre par rapport au blanc MeOH 80% (2,10 mL). Chaque expérience est répétée trois fois.

L'étalonnage est réalisé à partir de quercétine utilisée comme standard.

7.3. Dosage des anthocyanes totaux

On prépare pour ce dosage des solutions tampon KCl (pH=1,0), tampon acétate de sodium (pH=4,5), d'étalon (cyanidine-3-glucoside) et des solutions d'échantillon à doser.

- Tampon chlorure de potassium, pH 1,0 (0,025 M). A 1,86 g de KCl dans un bécher, on ajoute de l'eau distillée à environ 980 mL. On mesure le pH à l'aide d'un pH-mètre puis on l'ajuste 1,0 (\pm 0,05) avec HCl (6,3 mL). La solution est ensuite transvasée dans une fiole jaugée de 1 L, et on complète le volume avec de l'eau distillée.

- Tampon acétate de sodium, pH 4,5 (0,4 M). A 54,43 g de CH₃CO₂Na. 3H₂O dans un bécher on ajoute de l'eau distillée à environ 960 ml. On suit le pH à l'aide d'un pH-mètre et on l'ajuste à 4,5 (\pm 0,05) avec du HCl (environ 20 mL). La solution est transvasée dans une fiole jaugée de 1 L, et on complète le volume avec de l'eau distillée.

Dans un tube à hémolyse contenant 100 μ L de la solution d'étalon ou d'échantillon à doser, on ajoute 2mL du tampon KCl pH1 et dans un autre contenant 100 μ L de la même solution on ajoute 2mL du tampon $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ pH = 4,5. Après agitation, chaque tube est laissé à température ambiante pendant 20 min environ et l'absorbance de chaque dilution est lue à 520 et 700 nm respectivement par rapport à un blanc constitué d'eau distillée (2,10 mL). Chaque expérience est répétée trois fois.

7.4. Dosage des tanins totaux

La méthode basée sur la formation du complexe protéine-tanins décrite par Hagerman et Butler (1978), a été utilisée avec quelques modifications. On prépare préalablement une solution tampon A en dissolvant 9,8 g de NaCl dans 800 mL d'eau distillée, on ajoute 11,5 mL d'acide acétique glacial et on ajuste le pH à 4,9 avec une solution de NaOH jusqu'à 1 L; et une solution tampon B constituée d'une solution mixte [1% Sodium DodecylSulphate (SDS) et 5% de triéthanolamine (TEA) v/v] à pH 9,4 ajusté avec du HCl.

1mL d'extrait a été ajouté à 2 mL de solution de BSA (Bovine Sérum Albumine 1mg/mL préparée à partir de la solution tampon A). Le mélange est homogénéisé puis incubé pendant 24 h à 4 ° C dans le réfrigérateur. Il est ensuite centrifugé à 1500 RPM pendant 15 min et le surnageant décante. Le précipité est dissous dans 5 mL de la solution tampon B; 1 mL de FeCl_3 acide (10nM de FeCl_3 préparé à partir de HCl 0,01N) a été ajouté puis le mélange est immédiatement homogénéisé au vortex et laissé au repos à température ambiante pendant 10 min.

L'absorbance due aux tanins présents dans le précipité a été mesurée par spectrophotométrie à 510 nm contre un blanc où l'extrait a été remplacé par le méthanol. La quantité de tanins dans l'extrait est calculée en utilisant la courbe d'étalonnage issue du contrôle positif mené dans les mêmes conditions opératoires par une solution méthanolique d'acide tannique à différentes concentrations (0,025 à 0,5 mg/mL).

7.5. Test au DPPH

Le dépistage préliminaire du potentiel réducteur des extraits testés a été mis en évidence selon le protocole décrit par Takao et *al.* (1994).

5 μ L de chaque extrait à la concentration de 10 mg/mL (M/V) ont été déposés sur une plaque de silicagel 60F254 (Merck). La plaque a été placée dans une cuve à chromatographie contenant le système de solvant (BAW) : n-butanol-acide acétique-eau (65 : 25 : 15). Après

migration, et séchage, les chromatogrammes ont été révélés à l'aide d'une solution méthanolique de 1,1-diphényl 2-picrylhydrazile (DPPH) à concentration de 2 mg/mL.

Par suite, la mesure de l'activité antiradicalaire a été testée selon la méthode de Blois (1958) telle qu'elle a été décrite par Kavita *et al.*, (2012). On dispose pour ce test des solutions mères de DPPH, d'étalon (Trolox) et de l'échantillon (extrait à tester) à partir desquelles on réalise des dilutions à utiliser.

Dans des tubes à hémolyse, on introduit 50 µL de la solution à tester, on ajoute 2 mL de solution du DPPH 6.10^{-5} M. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 min. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par rapport à un témoin d'antioxydant commercial, le trolox, traité dans les mêmes conditions que les extraits testés.

On réalise un blanc constitué de 2,05 mL de méthanol. Le contrôle test est constitué de 2 mL de la solution de DPPH additionnée de 50µL de méthanol.

En cas de pigmentation, pour limiter les erreurs dues à la coloration, l'échantillon a été suffisamment dilué ou ajusté au spectrophotomètre avec un blanc constitué de l'échantillon coloré à différente concentration, qui sert à enlever la partie de l'absorbance due à la pigmentation.

7.6. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

1 mL de l'extrait méthanolique à différentes concentrations (0,5; 1,0 et 2,0 mg/mL) est mélangé avec 1,25 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1,25 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est homogénéisé au vortex puis incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min; ensuite, 1,25 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction et les tubes sont centrifugés au 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (1,0 mL) du surnageant est combiné avec 1,0 mL d'eau distillée et 200 µL d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1%. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 700 nm au spectrophotomètre contre un blanc semblablement préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol absolu qui permet de calibrer l'appareil. Le trolox est l'antioxydant standard utilisé pour le contrôle positif et son absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

8. Test de toxicité "Brine Shrimp"

Les œufs d'*Artemia salina* sont mis à éclore pendant 48 heures sous agitation très douce, dans l'eau de mer provenant de l'océan Atlantique. On prépare une série de solutions d'extrait à tester à des concentrations (mg/mL) variables et progressives (12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,098; 0,049, 0,024 mg/mL). Au total, 16 larves sont introduites dans chaque solution. Toutes les solutions ainsi que des solutions témoins ne contenant pas de substance active sont laissées sous agitation douce continue à température ambiante et la lecture des résultats se fait après 24 heures par comptage sous une loupe binoculaire. Au cas où le témoin contient des larves mortes, le pourcentage de mortalité est corrigé en utilisant la formule de Abbott : $\% \text{ décès} = [(Test - Témoin) / Témoin] \times 100$. La dose létale ou concentration létale LC50 est déterminée à partir de la courbe de régression qui exprime le pourcentage des larves tuées en fonction de la dose (concentration) appliquée. Les témoins de colorants commerciaux à savoir le lapachol, la lawsone et de l'indigo purifié ont été traités dans les mêmes conditions que les extraits de plantes. Tous les échantillons testés sont mis en solution dans 2% de DMSO, exceptionnellement 5% pour l'indigo, avant les dilutions successives réalisées.

9. Test de cytotoxicité sur les cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV

Le test de cytotoxicité a été effectuée sur la lignée de cellules mammaires cancéreuses humaines (MCF-7) et la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire IGROV, selon la méthode décrite par Daycem *et al.*, (2013). Ce test se traduit par l'évaluation des effets des extraits et fractions de plantes étudiées sur la croissance cellulaire. Les cellules sont dénombrées dans des flasques de culture puisensemencées dans une plaque de 96 puits à raison de $25 \cdot 10^3$ cellules par puits. Les plaques sont mises dans l'incubateur durant 24 h à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le 2^{ème} jour, les extraits sont ajoutés au milieu, à concentration de 50 mg/L, puis les plaques sont mises à incuber pendant 72 heures. Ensuite, les cellules sont traitées avec 100 µL d'une solution de MTT (0,2 mg/mL dans le PBS) à 37°C pendant 2 h. Le produit de réduction du MTT obtenu, est solubilisé dans 50 µL d'isopropanol afin de favoriser la lecture au spectrophotomètre de la densité optique de formazan. Les expériences ont été répétées trois fois contre un blanc sans extrait, analysé dans les mêmes conditions.

ANNEXE 2

Spectres RMN de l'indirubine et des prélèvements muséaux

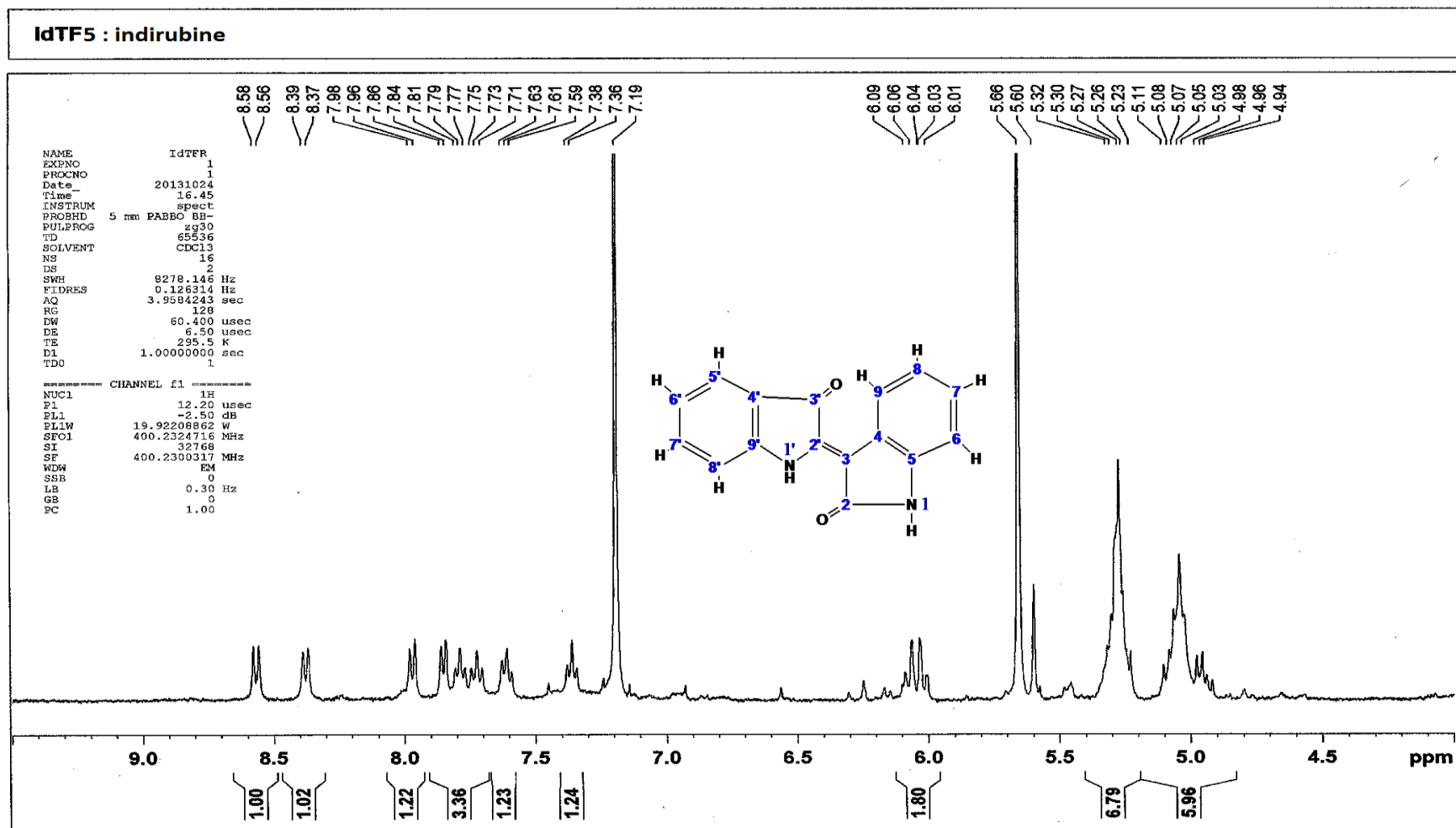


Figure A2.1: Spectre RMN ^1H de l'indirubine purifiée

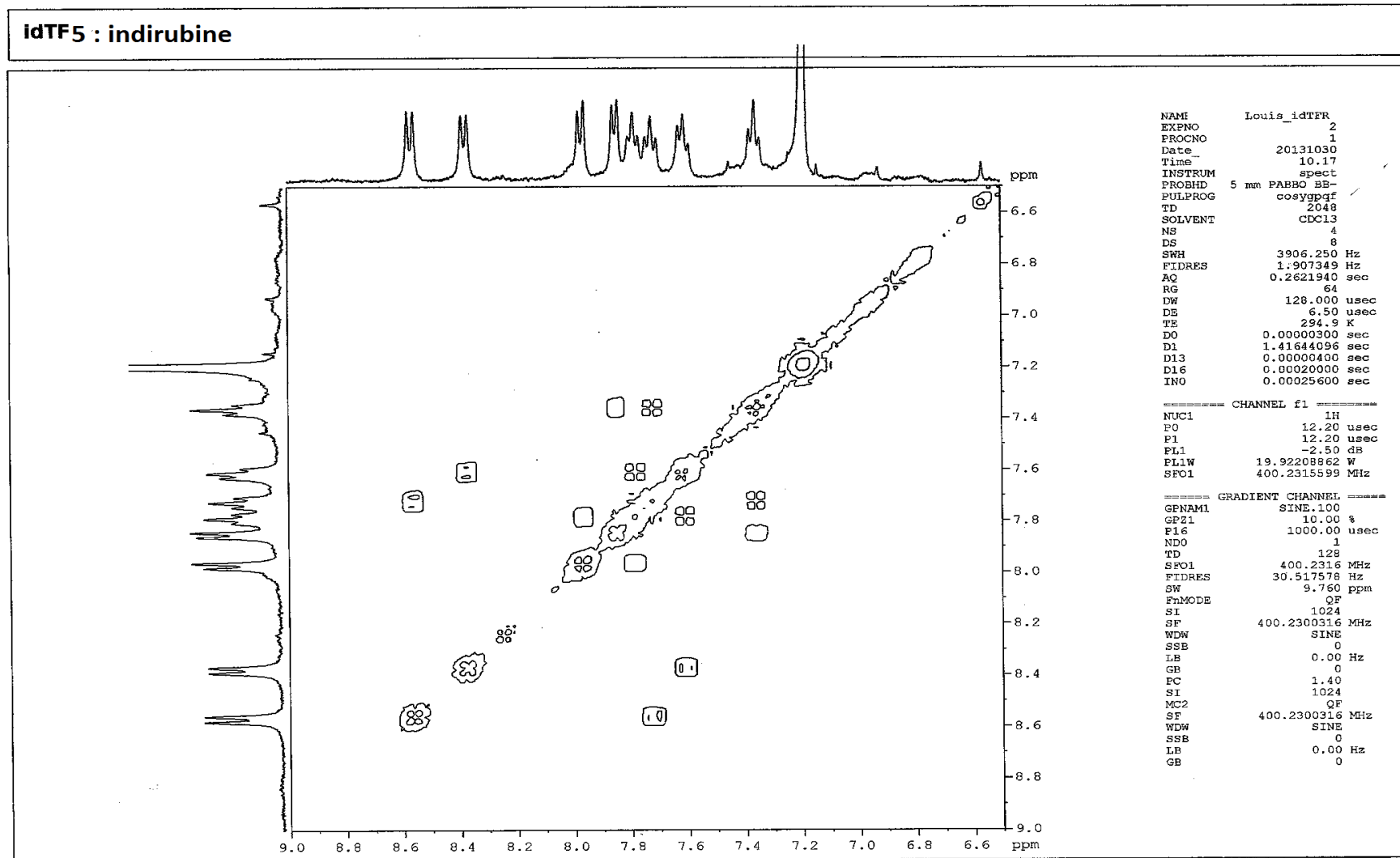


Figure A2.2 : Spectre RMN COSY de l'indirubine purifiée

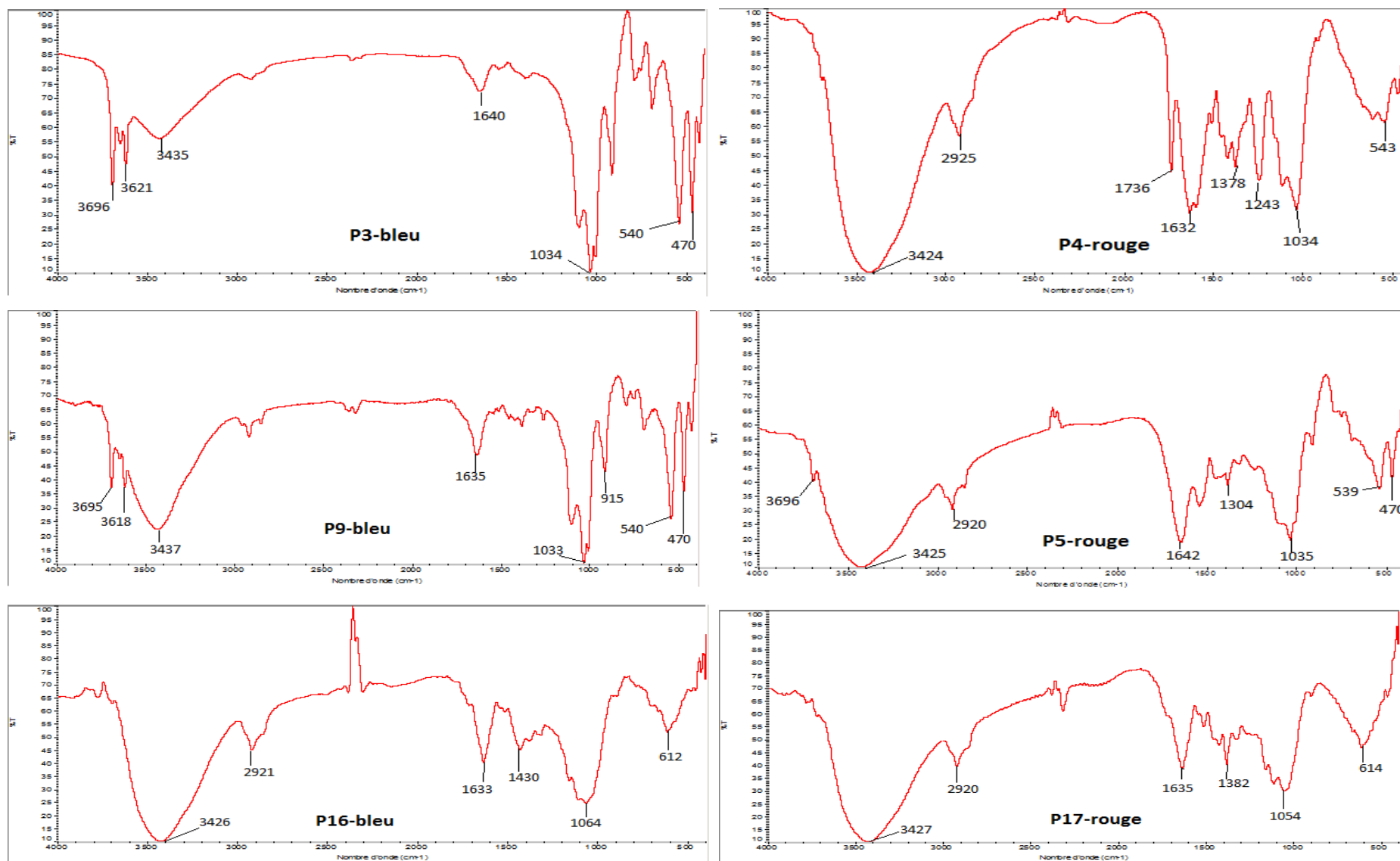


Figure A2.3 : Spectres IR-TF des prélèvements bleus (P3, P9 et P16) et rouges (P4, P5 et P17) (suite)

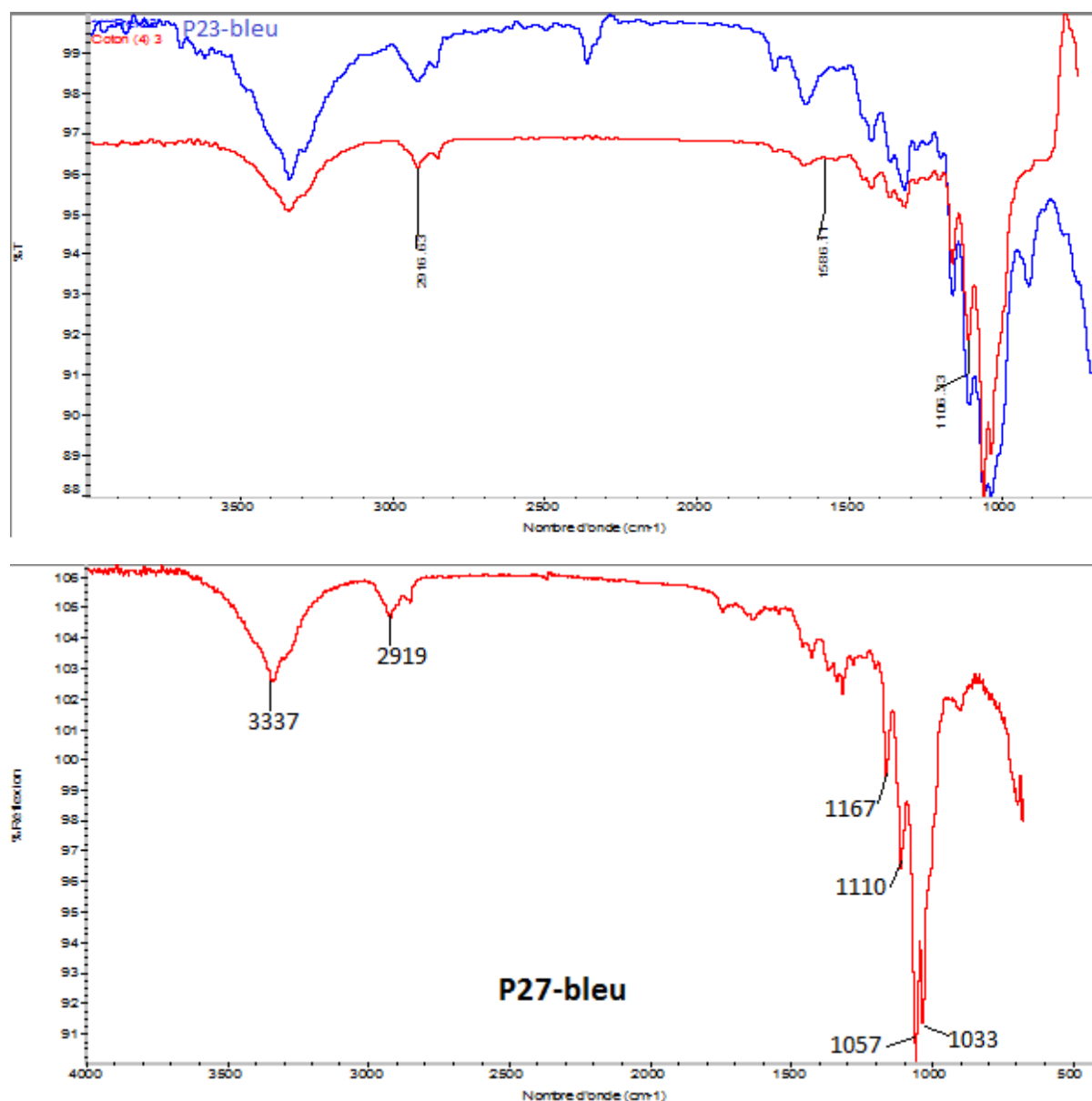


Figure A2.4 : Spectre IR-TF en mode ATR de deux prélèvements textiles (P23 et P27) colorés en bleu : empreintes caractéristiques du coton

Résumé

La richesse moléculaire des végétaux constitue une source importante de molécules tinctoriales et bioactives d'origine naturelle, utilisées depuis toujours par les artisans et tradipraticiens dans le domaine artisanal et thérapeutique.

Ces travaux contribuent principalement à l'étude chimique de cinq plantes tinctoriales : *T. grandis*, *L. inermis*, *K. senegalensis*, *I. tinctoria* et *P. cyanescens*, lesquelles représentent les plus employées par les artisans à l'issue d'une enquête ethnobotanique réalisée au Sud-Est du Bénin.

Un essai d'optimisation des conditions d'extraction des colorants de *T. grandis* assistée par ultrasons a été effectué et comparée à trois autres techniques utilisées conventionnellement. Ce procédé a été établi comme le plus simple, rapide, efficace et donnant le rendement le plus important en colorants jaunes et rouges extraits des plantes étudiées, en comparaison aux extractions classiques. De la même manière, il a été mis au point un procédé d'extraction de l'indigotine par usage du dithionite de sodium. Il a pu être démontré que ce procédé permet d'extraire rapidement et efficacement cette molécule à partir de *P. cyanescens* comparativement à l'emploi de solvants organiques usuels.

Une étude fondamentale sur l'identification des colorants extraits à partir des plantes étudiées a été effectuée. Une approche chromatographique utilisant la CLHP/UV-Vis a permis d'identifier la catéchine et l'épicatéchine ainsi que des acides phénoliques, constitutifs des tanins quantitativement caractéristiques des espèces *K. senegalensis* et *L. inermis*. En outre, la lawsone et des flavones ont été identifiées dans *L. inermis*. Il a été caractérisé en plus de la tectoquinone, trois autres anthraquinones **Ta**, **Tb** et **Tc** dont les structures n'ont pas été élucidées, à ce jour, ainsi que des flavonoïdes dont cinq n'ont jamais été décrits dans littérature de *T. grandis*. Quant aux plantes à indigo, elles se différencient non seulement par la teneur en indigoïdes issue de leurs divers extraits mais aussi par trois flavonoïdes identifiés spécifiquement dans *P. cyanescens*. L'ensemble de ces résultats expérimentaux a pu être appliqué avec succès à l'étude de colorants extraits à partir d'échantillons prélevés sur des objets du patrimoine notamment des masques, statuettes et textiles provenant de collections muséales, ce qui a contribué à la détermination de leur origine minérale et botanique. Par ailleurs, des tests chimiques sur des fractions plus ou moins enrichies en molécules colorantes issues des plantes étudiées ont permis l'évaluation des propriétés pharmacologiques réalisés *in-vitro* révélant une activité antioxydante et cytotoxique sur les cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV.

Mots clés : Colorants, enquête ethnobotanique, extraction, ultrasons, plantes tinctoriales, flavonoïdes, anthraquinones, indigoïdes, CLHP/UV-Vis, échantillons muséaux, propriétés pharmacologiques

Abstract

Molecular plant wealth is an important source of dyes and naturally occurring bioactive molecules, have always been used by artisans and crafts and traditional healers in the therapeutic field.

This work contributes mainly to the chemical study of five dye plants: *T. grandis*, *L. inermis*, *K. senegalensis*, *I. tinctoria* and *P. cyanescens*, which represent the most used by the artisans at from a ethnobotanical study conducted in southeastern Benin.

An optimization of the extraction conditions dyes from *T. grandis* assisted ultrasonic tests was carried out and compared with three other techniques conventionally used. This process has been established as the simplest, quick, efficient and providing the most important yield in yellow and red dyes extracted from plants studied, in comparison to conventional extractions. Similarly, a method of indigotine extraction using sodium dithionite has been developed. It could be shown that this method can extract quickly and efficiently indigotine from *P. cyanescens* compared to the use of conventional organic solvents.

A fundamental study of the identification of dyes extracted from plants studied was performed. Chromatographic approach using HPLC / UV-Vis permits to identify catechin and epicatechin and phenolic acids, tannins constituent species characteristics quantitatively and *K. senegalensis* and *L. inermis*. Furthermore, lawsone and flavones have been identified in *L. inermis*. It was further characterized by the tectoquinone, three other anthraquinones Ta, Tb and Tc whose structures have not been elucidated and flavonoids which five were never been described in literature of *T. grandis*. As for indigo plants, they differ not only by the content of their various end indigoid extracts but also specifically identified by three flavonoids in *P. cyanescens*. All these experimental results have been successfully applied to the study of dyes extracted from samples of objects including heritage masks, statuettes and textiles from museum collections, which contributed to the determination of their mineral and botanical origin. Furthermore, evaluation of the pharmacological properties, by chemical tests in vitro and antioxidant showed cytotoxic activity on cancer cells MCF-7, IGROV and very important fraction of more or less enriched in the dye molecules from plants tested.

Keywords : Dyes, ethnobotanical survey, extraction, ultrasounds, dye plants, flavonoids, anthraquinones, indigo, HPLC / UV-Vis, museum samples , pharmacological properties