HAL
open science

Valorisation de la biodiversité et études ethnobotanique, phyto-chimique et toxicologique des plantes tinctoriales de Madagascar : applications dans le domaine des colorants naturels

Mahery Andriamanantena

To cite this version:

Mahery Andriamanantena. Valorisation de la biodiversité et études ethnobotanique, phyto-chimique et toxicologique des plantes tinctoriales de Madagascar : applications dans le domaine des colorants naturels. Génie chimique. Université de la Réunion; Université d'Antananarivo, 2020. Français. NNT : 2020LARE0015 . tel-04213458

HAL Id: tel-04213458

https://theses.hal.science/tel-04213458v1

Submitted on 21 Sep 2023

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.

UNIVERSITE DE LA REUNION

Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé

THESE DE DOCTORAT

Discipline ou spécialité : Chimie – Biologie

Présentée par :

Mahery ANDRIAMANANTENA

Valorisation de la biodiversité et études ethnobotanique, phyto-chimique et toxicologique des plantes tinctoriales de Madagascar :

Applications dans le domaine des colorants naturels

Soutenance le 07 Octobre 2020 devant le jury composé de :

Rapporteurs :	Dominique CARDON	Directeur de recherches, CNRS, Lyon
	Thierry REGNIER	Professeur, TUT, Pretoria
Examinateurs :	Elisabeth NEUHAUSER	Professeur, Université de Toulouse
	Jean-Louis LANOISELLE	Professeur, Université de Bretagne-Sud
Directeur de thèse :	Thomas PETIT	Professeur, Université de La Réunion
Co-directeur de thèse :	Yanis CARO	MCF-HDR, Université de La Réunion
Co-encadrants :	Pascal DANTHU	MCF, CIRAD Hortsys, Montpelier
	Fanjaniaina FAWBUSH	MCF, Université d'Antananarivo
	Beatrice RAONIZAFINIMANANA	Professeur, Université d'Antananarivo

"Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne - Fonds européen de développement régional (FEDER), dans le cadre du Programme Opérationnel Européen INTERREG V- 2014-2020"

UNIVERSITE DE LA REUNION

Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé

THESE DE DOCTORAT

Discipline ou spécialité : Chimie – Biologie

Présentée par :

Mahery ANDRIAMANANTENA

Valorisation de la biodiversité et études ethnobotanique, phyto-chimique et toxicologique des plantes tinctoriales de Madagascar :

Applications dans le domaine des colorants naturels

"Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne - Fonds européen de développement régional (FEDER), dans le cadre du Programme Opérationnel uropéen INTERREG V- 2014-2020"

Miorim-paka hanasoa olona…

(S'enraciner pour aider son prochain…)

Magis…

(Faire toujours plus…)

Avant-Propos

Cette thèse a été menée en cotutelle entre l'Université de La Réunion (Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé) et l'Université d'Antananarivo (Ecole Doctorale Génie des Procédés et des Systèmes Industriels, Agricoles et Alimentaires). Elle a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne (Fonds Européens de Développement Régional (FEDER), dans le cadre du Programme Opérationnel Européen INTERREG V- 2014-2020 sous la convention DIRED/20161450 - 234274/2016) sous forme d'une allocation régionale de recherche versée par la Région Réunion.

Les recherches faisant l'objet de ce manuscrit sont le fruit de travaux réalisés au sein de plusieurs entités et laboratoires de recherche universitaires dont :

- Le Laboratoire de Chimie et Biotechnologie des Produits Naturels (CHEMBIOPRO, ex- LCSNSA) de la Faculté des Sciences et Technologies (FST) de l'Université de La Réunion, qui est le laboratoire d'accueil principal à La réunion (France),
- Le Département Industries Agricoles et Alimentaires de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques (ESSA-IAA) de l'Université d'Antananarivo, qui est l'organisme d'accueil à Madagascar,
- L'unité de recherche HortSys du Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) de Montpellier,
- Le Département Biotechnologie de la Faculté des Sciences de la Tshwane University of Technology (TUT) d'Afrique du Sud, où le doctorant a réalisé deux missions de trois mois en recherche sur des tests de toxicité notamment,
- L'entreprise Terre là sarl et l'association Femmes Entrepreneurs Environnement Mahajanga (FEEM) de Madagascar, qui ont participé à la partie ethnobotanique,
- Le Centre National de Recherches Pharmacologiques de Madagascar (CNARP) qui ont participé à l'étude ethnobotanique,
- L'Institut Malgache de Recherche Appliquée – Fondation Ratsimamanga (IMRA) ayant participé aux tests de toxicité sur modèle animal (souris).

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont donné lieu à 1 publication scientifique (P) publiée dans une revue internationale à comité de lecture, 1 communication orale (C), 7 affiches (A) présentées à l'occasion de congrès internationaux et 1 action de vulgarisation (V). Nous prévoyons également de soumettre 3 autres publications (dont 1 soumise et 2 en cours de rédaction qui seront soumises prochainement).

Publications :

{P1} **M. Andriamanantena**, P. Danthu, D. Cardon, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, H. Razafintsalama, S. Rakotonandrasana, A. Ethève, T. Petit, Y. Caro (2019). Malagasy dye plant species: A promising source of novel natural colorants with potential – A Review.
Chemistry & Biodiversity, 16, e1900442, https://doi.org/10.1002/cbdv.201900442

{P2} **M. Andriamanantena**, P. Danthu, D. Cardon, A. Ethève, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, T. Petit, Y. Caro (2020). Chemical stability, coloring and antioxidant properties of five new red dyes extracted from endemic and native plant species used in Madagascar.
Article soumis pour publication (Juillet 2020) - Journal ciblé : Journal of Cleaner Production.

{P3} **M. Andriamanantena**, P. Danthu, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, Z. Razafindrakoto, T. Regnier, B. Du Plessis, T. Petit, Y. Caro (2020). Antimicrobial activities and toxicological effects of natural pigments derived from plant species of Madagascar.
Article en préparation – Journal ciblé : International Journal of Toxicology.

{P4} **M. Andriamanantena**, P. Clerc, P. Danthu, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, Z. Razafindrakoto, T. Regnier, B. Du Plessis, T. Petit, Y. Caro (2020). *Paracarphalea kirondron*: a new source of pigments rich in anthraquinone from Malagasy biodiversity and their toxicological properties.
Article en préparation – Journal ciblé : Dyes and Pigments

Communication orale :

{C1} Plantes tinctoriales de Madagascar, sources potentielles de colorants naturels pour l'agroalimentaire, *2018*, **M. Andriamanantena*,** P. Danthu, B. Raonizafinimanana, F. Fawbush, L. Dufossé, T. Petit, Y. Caro, Communication orale, 8ème Rencontre QualiREG, Comores, 21 - 26 Novembre 2018 (Présentée par moi même*)

Affiches :

{A1} Malagasy dye plant species, sources of natural colorants with antioxidant and antimicrobial activites, *2019*, **M. Andriamanantena**, P. Clerc, P. Danthu, F. Fawbush Razafimbelo, B. Raonizafinimanana, T. Reigner*, T. Petit, Y. Caro., Poster communication, The International Conference of Food Safety and Health (FSAH), Taichung, Taiwan, 26 - 28 novembre 2019 (présentée par un co-auteur*),

{A2} New sources of natural colorants for the industries from Madagascar Island dye plants, *2019*, **M. Andriamanantena***, P. Danthu, P. Clerc, T. Reigner, B. Du plessis, F. Fawbush Razafimbelo, B. Raonizafinimanana, T. Petit, Y. Caro, Poster communication, SAAFoST 23rd Biennial International Congress 2019, Johannesburg, Afrique du Sud, 1 - 4 Septembre 2019 (présentée par moi-même*),

{A3} Exploration of natural colorants from Malagasy biodiversity, sources of natural products for the industries, *2019*, **M. Andriamanantena***, P. Danthu, A. Etheve, F. Fawbush Razafimbelo, B. Raonizafinimanana, T. Petit, Y. Caro, Poster communication, Congrès international Island Biology 2019, Third International Conference on Island Ecology, Evolution & Conservation, Sainte-Clotilde, La Reunion, 8 - 13 Juillet 2019 (présentée par moi-même*)

{A4} Natural pigments from Madagascar dyeing plants: from tradition to innovation for applications as functional ingredients for foods, cosmetics and pharmaceutics, *2018*, **M. Andriamanantena**, B. Raonizafinimanana, F. Fawbush, P. Danthu, L. Dufossé*, T. Petit, Y. Caro., Poster communication, 27th SILAE Conference (Italo-latin American congress of ethnomedicine, ethnobotany, ethnopharmacology, phytochemistry, natural products and analytical chemistry, food science and microbiology), Milazzo, Sicily, Italy, 9 - 13 Septembre 2018 (présentée par un co-auteur*)

{A5} Biodiversity of dyeing plants isolated from terrestrial environment in Madagascar island, Indian ocean: new resources for natural colorants, *2018*, **M. Andriamanantena**, T. Petit, P. Danthu, F. Fawbush Razafimbelo, B. Raonizafinimanana, L. Dufosse*, Y. Caro, Poster communication, International BIOColours Conference, Breda, Netherlands, 28 – 29 mai 2018 (présentée par un co-auteur*)

{A6} Pigments from dyeing plants used as food colorants: Current situation and opportunities, *2017*, Y. Caro, T. Petit, P. Danthu, **M. Andriamanantena***, F. Fawbush, Poster communication, Symposium/Festival on natural colorants “Plants, Ecology and Colours”, Antananarivo, Madagascar, 15 - 21 mai 2017 (présentée par moi-même*)

{A7} Projet PLANTIN : Plantes tinctoriales de Madagascar et de La Réunion : Situation actuelle, potentialités et utilisations, *2017*, **M. Andriamanantena***, B. Raonizafinimanana, F. Fawbush, P. Danthu, T. Petit, Y. Caro, A. Etheve, Poster communication, Symposium/Festival on natural colorants "Plants, Ecology and Colours", Antananarivo, Madagascar, 15 - 21 mai 2017 (présentée par moi-même*)

Vulgarisation :

{V1} Concours « Ma thèse en 180 secondes », 1er prix du concours national à Madagascar et participation lors de la finale internationale 2018 à Lausanne.

Durant cette thèse de doctorat, j'ai également suivi des formations transversales à l'Université de La Réunion (Ecole doctorale Sciences Sciences, Technologies et Santé) pour un total de 233 ECTS à l'exemple des formations sur :

- L'introduction aux données de la recherche,
- L'Open Access et la bibliométrie,
- L'éthique de la recherche,
- Formation sur la conception d'affiches et supports avec le logiciel Adobe In design,
- Introduction aux statistiques, initiation au logiciel « R » et à la gestion des données,
- Des formations en entrepreneuriat dispensées au cours des doctoriales organisées par l'Université de La Reunion en 2018 et le collège doctoral en entrepreneuriat organisé par l'Agence Universitaire Francophone du Maghreb au Maroc en 2019,
- Deux mobilités Erasmus de trois mois chacune en Afrique du Sud à la TUT,

Enfin, J'ai participé activement au montage du projet PLANTIN : Plantes Tinctoriales de La Réunion qui s'est vu attribué un financement FEDER (AMI 2018). Il est prévu que je participe à la mise en œuvre de ce projet dès le démarrage prévu au mois de Novermbre 2020 en tant qu'ingénieur de recherche.

Remerciements

Je tiens à remercier l'Université de La Réunion à travers de son président, Monsieur Frédéric Miranville, le directeur de l'Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé de La Réunion, Monsieur Alain Bastide, le directeur de l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) de Saint-Pierre, Monsieur Richard Lorion et plus particulièrement le chef du département Génie Biologique, Monsieur Jean Michel Huet et la directrice du laboratoire de Chimie et Biotechnologie des Produits Naturels CHEMBIOPRO (ex LCSNSA), Madame Anne Bialecki, pour m'avoir accueilli dans leurs structures à La Réunion.

Je remercie également Monsieur le Président de l'Université d'Antananarivo, Monsieur Mamy Ravelomanana et la chef du département Industries Agricoles et Alimentaires de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques (ESSA-IAA), Madame Fanjaniaina Fawbush Razafimbelo pour m'avoir accepté dans leur établissement à Madagascar. Je remercie aussi le responsable du département Biotechnogy & Food Technology de la Tshwane University of Technology en Afrique du Sud pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser six mois de travaux de recherche au sein de ce département universitaire. Je remercie également le projet ERASMUS qui a financé ces six mois de recherche en Afrique du Sud.

Pour avoir accepté de juger ce manuscrit en qualité de rapporteurs, j'exprime mes sincères remerciements à :

- Madame Dominique Cardon, Directrice de recherche, Professeur émérite au CNRS de Lyon et Monsieur Thierry Regnier, Professeur à la TUT en Afrique du Sud,

Pour avoir accepté d'être membre du jury pour la soutenance de thèse, j'adresse également mes remerciements à :

- Madame Elisabeth Neuhauser, Professeur, Directrice du Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaires et Environnementales (LBAE, Université de Toulouse, site d'Auch),
- Monsieur Jean-Louis Lanoiselle, Professeur à l'Institut de Recherche Dupuy de Lôme (Université de Bretagne Sud).

J'exprime ma profonde gratitude à mes deux directeurs de thèse :

- Monsieur Thomas Petit, Directeur de thèse, Professeur à l'Institut Technologique Universitaire (Université de La Réunion), pour son appui, son soutien autant personnel que professionnel,
- Monsieur Yanis Caro, co-Directeur de thèse, Maître de Conférences à l'Institut Technologique Universitaire (Université de La Réunion), pour son dévouement, son enthousiasme pendant toutes nos réunions ; il a toujours été présent pour m'appuyer.

Je remercie sincèrement mes co-encadrants :

- Monsieur Pascal Danthu, Chercheur au sein de l'unité HortSys du CIRAD de Montpellier, co-endacrant de thèse, qui a toujours été disponible et m'a beaucoup aidé à améliorer ce travail par son esprit critique et son expérience,
- Madame Béatrice Raonizafinimanana, Professeur à l'Université d'Antananarivo et Madame Fanjaniaina Fawbush Razafimbelo, Directrice du Département ESSA-IAA de l'Université d'Antananarivo, pour leur soutien.

Madame Andrée Ethève, une artiste, une passionnée mais aussi une scientifique, qui m'a initié au monde de la teinture naturelle. Qu'elle en soit remerciée ainsi que son association Femmes Entrepreneurs Environnement Mahajanga (FEEM) de Madagascar et son entreprise Terre-Là SARL à Madagascar.

Je réitère également mes remerciements à Madame Dominique Cardon pour ses précieux conseils et Monsieur Thierry Regnier pour m'avoir beaucoup aidé pendant mes missions en Afrique du Sud.

Je remercie toute l'équipe de l'IUT, du laboratoire CHEMBIOPRO et de l'école d'ingénieurs ESIROI, les doctorants, les stagiaires, les collègues, dont principalement Héloïse Reiss, Ophélie Hoareau, Melissa Tan, Samuel Jannel, Pierre Eric Campos, Elsa Razafindrabenja, Tumisi Molelekoa, Laetitia Gardoque, Lynda Saminadin, et sans oublier Jean Michel Leong Pock Tsy, Carmen Leonard, Ingrid Lebreton et Gwendoline Hoareau, Nicolas Dulac, Cathie Milhau et Patricia Clerc qui ont été patients avec moi et n'ont jamais hésité à m'apporter leur aide et leur soutien.

Merci également à Bibine, Samovida, Tampons students, IUT Team, amis et amies qui m'ont permis de me décompresser, de me décontracter.

Enfin, un grand merci à ma famille qui m'a soutenu, me soutient et me soutiendra toujours dans mes décisions, dans ma vie et également merci à toutes les autres personnes qui m'ont aidé et qui ont contribué de près ou de loin à ces travaux de thèse.

Sommaire

Avant-Propos i

Remerciements v

Sommaire vii

Liste des figures ix

Liste des tableaux xii

Liste des abréviations xiv

Introduction Générale 1

Chapitre I : Les plantes tinctoriales de Madagascar : une source prometteuse de nouveaux colorants naturels avec de potentielles applications 10

1-1-Introduction 13

1-2 History and ethnobotanical survey of indigenous knowledge on dye plants used by the traditional dyers of the western region of Madagascar 15

1-3 Endemic, native and introduced dye plants traditionally used in Madagascar 18

1-4 Dye plants uses: supporting literature review and new findings 30

1-5 Chemical composition of the natural dyestuffs in relation to their biological activities 34

1-6 Conclusion and future prospects 42

References 46

Conclusions générales sur le chapitre I 54

Chapitre II : Etudes ethnobotaniques, études préliminaires et choix des espèces 56

2-1 Introduction 60

2-2 Critères de sélection des plantes tinctoriales cibles pour la suite de l'étude 61

2-3 Les plantes retenues dans notre étude 66

Conclusion 78

Chapitre III : Propriétés physico-chimiques et technologiques (couleur, stabilité, propriétés antioxydantes, etc.) de pigments rouges extraits de plantes endémiques et indigènes de Madagascar 81

3-1 Introduction 85

3-2 Materials and methods 88

3-3 Results **94**

3-4 Discussion **107**

3-5 Conclusions **111**

Appendix A. Supplementary data **112**

References **112**

Conclusions partielles sur le chapitre III **127**

Chapitre IV : Activités biologiques et propriétés toxicologiques de quelques plantes tinctoriales de Madagascar. **129**

4-1 Introduction **132**

4-2 Materials and methods **133**

4-3 Results and discussions **137**

4-4 Conclusions **143**

References **144**

Conclusions partielles sur le chapitre IV **146**

Chapitre V : *Paracarphalea kirondron :* une plante endémique de Madagascar, source potentielle de nouveaux pigments anthraquinoniques. **148**

5-1 Introduction **151**

5-2 Materials and methods **153**

5-3 Results and discussion **155**

5-4 Conclusions and prospects **160**

References **161**

Conclusions générales et perspectives **164**

VI- Partie expérimentale **173**

Tables des matières **189**

Liste des figures

Chapitre I :

Figure 1. Timeline of ethnobotanical surveys on dye plant species of Madagascar……..……17

Figure 2. Examples of Malagasy dye plant species and dye baths for dyeing textiles…….….18

Figure 3. Plant parts used for their dyeing properties……...….32

Figure 4. Range of colors obtained from dye plant species of Madagascar …….…32

Figure 5. Examples of dye plants from Madagascar…….….34

Figure 6. Classification chart of natural colorants…….35

Chapitre II :

Figure 7. Carte de localisation des zones sélectionnées pour l'étude……...62

Figure 8. Exemple de pigments naturels issus des plantes…….……...63

Figure 9. Autres usages des plantes ayant potentiellement des propriétés tinctoriales identifiées dans la biodiversité malgache…….……..…….64

Figure 10. Photographie de l'espèce *Acridocarpus excelsus*…….……..67

Figure 11. Photographie de l'espèce *Ceriops tagal*…….……69

Figure 12. Photographie de l'espèce *Harungana madagascariensis*…….……..70

Figure 13. Photographie de l'espèce *Paracarphalea kirondron*…….……71

Figure 14. Photographie de l'espèce *Rhizophora mucronata*…….……73

Figure 15. Photographie de l'espèce *Tectona grandis*…….……....74

Figure 16. Photographie de l'espèce *Woodfordia fruticose*……..…….……..…76

Figure 17. Photographie de l'espèce *Xylocarpus granatum*…….…….…….…77

Chapitre III :

Figure 18. Dye plants species……..…….....88

Figure 19. Localization map of the different areas…….…….…..90

Figure 20. Chemical formulas of the different standards used……..91

Figure 21. Extraction yields of the pigment from 5 different plant species and using different extraction methods…….…….....95

Figure 22. Color of the crude pigment extracts from the five red dyestuffs investigated in this study dissolved in aqueous ethanolic solution……..98

Figure 23. Overlay of UV-visible spectra from 280-800 nm of the crude pigment extracts from the five red dyestuffs…….……...…99

Figure 24. Polyphenol contents of the plant extracts……..100

Figure 25. Effect of pH on color characteristics and stability of crude pigment extracts expressed as lightness (L*), chroma (C*) and hue (h°) values in the CIELab system……...……..102
Figure 26. Total color variation (ΔE) of the plant extracts depending on temperature……..….105
Figure 27. Crude dry pigment extracts in powder obtained from the five endemic/native plant species used in Madagascar: *A. excelsus, C. tagal, R. mucronata, W. fruticosa,* and *X. granatum*…...……...116
Figure 28. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *W fruticosa* crude pigments extracts……..116
Figure 29. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *X. granatum* crude pigments extracts…….…….116
Figure 30. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *A. excelsus* crude pigments extracts……..…117
Figure 31. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *C. tagal* crude pigments extracts……..117
Figure 32. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *R. mucronata* crude pigments extracts……..117
Figure 33. Stability of the crude pigment extracts from some endemic/native plant species used in Madagascar depending on acid hydrolytic conditions (pH 3 or 5, at 90 °C) and alkaline hydrolytic conditions (pH 9 or 11, at 90 °C)……..……125
Figure 34. Overlay of UV-visible spectra from 280-650 nm of *W. fruticosa* crude pigment extracts according to the temperature at 155, 205 and 305 °C (dissolved in 70% aqueous ethanolic solution).
Figure 35. Glycerin soaps colored with crude extracts of *W. fruticosa* and *A. excelsus*……..126

Chapitre IV:

Figure 37. Animal models (left: albino mice, right: « zebrafish » adult)……..……..135
Figure 38. Development of zebrafish embryos during 96 hours post-fertilizations (hpf)…..…….139

Chapitre V :

Figure 39. *Paracarphalea kirondron* (Baill.) Razafimandimbison *et al*……..…….…..152
Figure 40. Anthraquinone base……..……..……153
Figure 41. Extraction yield (left) and range of hues (right)……....……156
Figure 42. HPLC/DAD chromatogram……..…….….157

Conclusions générales et perspectives

Figure 43. Sucettes composées de cristaux de sucre colorés par des extraits de plantes…….....168
Figure 44. Gélatines végétales colorées par des extraits de plantes……...168
Figure 45. Savonnettes en glycérine végétale colorées par différents extraits de plantes……169
Figure 46. Savonnettes en glycérine végétale colorées par des extraits de *P. kirondron* à différentes concentrations……..169

Partie expérimentale

Figure 47. Extraits de poudres de pigments obtenues après extraction ……175
Figure 48. Photographie de decoctions sur chauffe-ballon……176
Figure 49. Photographie d'un extracteur PLE ou extracteur liquide à pression ……177
Figure 50. Système de caractérisation de la couleur CieL*a*b*……178
Figure 51. Exemples d'échantillons colorés obtenus par dissolution à différentes concentrations d'extrait en poudre dans une solution hydroalcoholique / Photographie des cellules pour spectrophotomère……178
Figure 52. Extraits liquide de *H. madagascariensis (A)* et *R. mucronata (B)* à différents pH ……179
Figure 53. Exemples de poudres d'extrait après traitement à haute température…….....180
Figure 54. Photographie de chromatographies sur colonne ouverte……...……....182
Figure 55. Photographie d'une HPLC/DAD Ultimate 3000……..…..183
Figure 56. Exemple de méthode par réduction du DPPH ……...…….….184
Figure 57. Exemple de méthode par réduction du FRAP ……...……..….184
Figure 58. Exemple de méthode de diffusion sur disque ……...……..…..185
Figure 59. Exemple de souris albinos (OF1)…….....186
Figure 60. Dispositif d'aquarium pour zebrafish (*Danio rerio*)……...…....187
Figure 61. Développement des embryons de zebrafish……....…..188

Liste des tableaux

Chapitre I :

Table 1. Main endemic dye plant species of Madagascar and their characteristics……...19

Table 2. Main native and naturalized dye plant species of Madagascar and their characteristics…….23

Table 3. Main introduced dye plant species of Madagascar and their characteristics……...…28

Table 4. Major chemical families of dyes and pigments found in Madagascar's dye plants……...….36

Table 5. List of color additives of plant origin approved for use in Human food in the European Union (EU) and/or in the United States (US)……37

Chapitre II :

Table 6. Techniques traditionnelles de teinture naturelle utilisées à Madagascar……65

Table 7. Liste des plantes retenues pour cette étude…….66

Chapitre III:

Table 8. Botanical details and known properties of the studied plant species…….……..89

Table 9. Color expressed in terms of CIE L*, a*, C* and h° values of the crude pigment extracts depending on concentration range in hydroalcoholic solution…….…..97

Table 10. Antioxidant activities of the crude extracts (DPPH and FRAP methods)……..….106

Table 11. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *W. fruticosa* depending on pH conditions……118

Table 12. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *X. granatum* depending on pH conditions ……..……118

Table 13. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *A. excelsus* depending on pH conditions …….119

Table 14. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *C. tagal* depending on pH conditions …….…….119

Table 15. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *R. mucronata* depending on pH conditions …….120

Table 16. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the madder extract (used as control) depending on pH conditions …….…….120

Table 17. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the carmine extract (used as control) depending on pH conditions ……...……...121

Table 18. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *W. fruticosa* depending on temperature.……...122

Table 19. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *X. granatum* depending on temperature.…….……..122

Table 20. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *A. excelsus* depending on temperature.…… …… ……...……123
Table 21. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *C. tagal* depending on temperature……...123
Table 22. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *R. mucronata* depending on temperature.……. ……...…124
Table 23. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the madder extract depending on temperature.……...……...…124
Table 24. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the carmine extract depending on temperature.……..……125

Chapitre IV:

Table 25. Description of the plant species……..…… 133
Table 26. Daily mortality of albino mice……..……..…..137
Table 27. Mortality rate of "zebrafish" embryos during the 96 hpf follow-up……..….…140
Table 28. Lethal dose 50 (LC 50) and dose without observable harmful effect (NOAEL)…..……...141
Table 29. Screening of antimicrobial activities of dye plant extracts……..……142

Chapitre V:

Table 30. Chromatographic gradient program……..…….……..154
Table 31. Main compounds in *Paracarphalea kirondron* hydro alcoholic extracts……...….158
Table 32. Lethality rate from fish embryos acute tests on *Paracarphalea kirondron*……..159

Partie expérimentale

Table 33. Matériels et produits nécessaire pour la détermination des propriétés physiques……175
Table 34 : Matériels et produits nécessaire pour la détermination des propriétés chimiques…….……180

Liste des abréviations

µg :	Microgramme
ASE :	Accelerated Solvent Extraction
C :	Chroma
C. I. :	Color Index
CFR :	Code of Federal Regulations
DAD :	Diode Array Detector
DL 50 :	Dose Létale 50 %
DMSO :	Dimethyl Sulfoxyde
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EFSA :	European food safety authority
EU :	European Union
FDA :	Food and drug administration
FRAP :	Ferric reducing-antioxidant power
H :	Hues
HPLC :	High performance liquid chromatography
kg :	Kilogramme
L :	Luminance
LC 50 :	Lethal concentration 50 %
m/m :	Masse/masse
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
MS :	Mass spectrum
NOAEL :	No observable adverse effect level
OCDE:	Organisation de coopération et de développement économiques
pH :	Potentiel hydrogène
REACH :	Registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals
US :	United States
UV-Vis :	Ultraviolet/Visible
v/v :	Volume/volume

« Les hommes éprouvent une grande joie à la vue de la couleur, l'œil en a besoin comme il a besoin de lumière » (Goethe).

Introduction Générale

La couleur a toujours été un fait culturel et historique : les définitions, les conceptions, les perceptions des couleurs varient à la fois selon les cultures et au cours de l'histoire. Chaque couleur véhicule des messages, des codes, des références, des tabous, des préjugés et porte un sens caché qui influencent notre environnement, nos comportements, notre langage, notre imagination [1,2]. C'est pourquoi, la couleur est le premier contact et critère d'attirance des clients envers un produit. La composante visuelle est l'information qu'on assimile le mieux et qu'on se remémore le plus avant celles fournies par les autres sens, c'est pourquoi les spécialistes du marketing, du design, et du packaging s'y intéressent en priorité [1].

De nombreux colorants utilisés dans différentes industries ont une origine artificielle. Or, depuis quelques années, consommateurs et industriels expriment leurs réticences quant à l'utilisation de produits issus de la synthèse chimique. Les colorants de synthèse sont présents dans tous les produits de notre quotidien : denrées alimentaires, embalages, produits cosmétiques, produits pharmaceutiques, peintures, textiles, plastiques, etc. De nombreux produits chimiques, pour la plupart polluants, sont utilisés pour la synthèse organique de ces colorants artificiels ou dans le processus de coloration chimique qui nécessite généralement des fixateurs à forte toxicité. La production et l'utilisation de ces colorants artificiels créent des pollutions considérables dans l'environnement [2,3]. Par ailleurs, la controverse sur les colorants artificiels qui a émergé il y a déjà quelques décennies, concerne également les effets secondaires de ces colorants sur la santé humaine. En effet, des études toxicologiques ont révélé des effets allergisants, carcinogènes et toxiques, entre autres, de certains colorants artificiels. Leur innocuité vis-à-vis de la santé humaine est régulièrement pointée du doigt [4-5], conduisant ainsi les autorités à réévaluer la dangerosité de 41 colorants alimentaires[1] et à créer la nouvelle réglementation REACH à l'échelle européenne en 2010[1]. Cette réglementation limite l'utilisation de certaines substances chimiques d'après de nouvelles études concluant sur des effets néfastes pour la santé humaine et l'environnement. Certains colorants ont été retirés du marché, à l'instar du colorant Rouge 2G (E 128)[1], d'autres soumis à des restrictions (les doses journalières admissibles des trois colorants artificiels E 104, E 110 et E 124 ont ainsi été réduites) et les derniers colorants artificiels toujours en usage sont assez mal perçus par les consommateurs.

[1] www.efsa/org consultée en mai 2018

Les colorants représentent un marché financier considérable : le marché global des colorants et pigments était évalué à 47 milliards de dollars US en 2016 et ce marché devrait atteindre 65 milliards de dollars US en 2022, avec un taux d'accroissement annuel de 5,0% sur la période 2017-2022[2]. L'expansion du marché global des colorants est fortement influencée par les innovations dans l'usage des colorants par les industriels du textile (avec des technologies en croissance comme la teinture au CO_2 supercritique, l'industrialisation des colorants naturels ou issus du recyclage de déchets agricoles par exemple), par la demande croissante de colorants plus respectueux de l'environnement et de la santé dans l'industrie agro-alimentaire (coloration des aliments et des boissons par des colorants naturels), mais également par une demande accrue de pigments dans l'industrie de la plasturgie (coloration des matières plastiques alimentaires et autres emballages), des peintures et des revêtements (coloration des peintures écologiques et naturelles) et de la fabrication de papier. Un grand nombre d'entreprise utilise encore des colorants artificiels ou des colorants synthétiques « identiques au naturel » synthétisés par voie chimique et qui possèdent donc très exactement la même structure moléculaire que le composé qui a été bio-synthétisé par l'organisme biologique. La popularité de ces colorants synthétisés chimiquement est liée à une production facile et peu coûteuse, à un vaste spectre de couleurs et à la résistance des couleurs dans une large gamme de formulations industrielles (couleur intense, forte stabilité à la température, à l'oxygène, au pH acide des aliments…). En outre, certains colorants artificiels ont vu leur usage alimentaire se réduire très vite en Europe, et plus particulièrement en France et Allemagne, en raison de l'étude de Southampton [6] en 2007 qui suggère que six colorants azoïques (E102, E104, E110, E122, E124 et E129) pourraient, lorsqu'ils sont associés à des conservateurs du type benzoates (E210, E211…) dans des denrées alimentaires, modifier les paramètres d'attention des enfants diagnostiqués de TDAH (trouble déficitaire de l'attention / hyperactivité). Même si l'EFSA n'a pas entièrement tenu compte de cette étude, invoquant un manque de rigueur dans la recherche, l'association possible de ces colorants artificiels avec le syndrome d'hyperactivité des enfants a poussé de nombreux industriels à les retirer de leur formulation alimentaire. Ces colorants doivent par exemple être assortis en France et en Allemagne d'une mention obligatoire « Peut avoir des effets indésirables sur l'activité et l'attention chez les enfants » selon le règlement (CE) n°1333/2008, mais ils restent à ce jour autorisés.

Les problèmes environnementaux et toxicologiques liés aux produits issus de la synthèse chimique ont donc relancé le marché des solutions naturelles alternatives aux colorants artificiels. Les colorants artificiels dominent encore actuellement le marché mondial, mais le marché des colorants et pigments naturels est en très forte croissance. On constate que le marché des colorants artificiels est en baisse tandis que la demande de colorants naturels ne cesse d'augmenter. La part des colorants naturels sur le marché mondial s'est ainsi accrue : le marché mondial des colorants naturels affiche un taux de

[2] Rapport du groupe Research & Markets (report ID n°4290718, mai 2017)
https://wwwmarketsandmarketscom/

croissance annuel moyen de 5,03%, passant ainsi de 931 millions de dollars US en 2014 à 1190 millions de dollars US en 2019. Les analystes estiment que dans les prochaines années, la taille du marché des colorants naturels sera encore élargie, avec une prévision à 1 570 millions de dollars US d'ici 2024. Le marché mondial des colorants naturels est segmenté en trois catégories : à base animale, à base minérale et à base végétale. Le segment des produits d'origine végétale a dominé plus des deux tiers de la part du marché totale en 2018, affichant une croissance annuelle moyenne autour de 12%. Concernant plus particulièrement les colorants alimentaires, l'Europe représente 36% du marché mondial d'utilisation des colorants alimentaires, suivie par les États-Unis (28%), le Japon (10%), la Chine (8%) et 18% par des économies développées comme le Canada et l'Australie, et des marchés émergents comme le marché indien et le marché brésilien. On constate alors que le marché des colorants alimentaires artificiels est en baisse, tandis que celui des colorants alimentaires naturels augmentent de près de 10% par an[3]. Les colorants alimentaires naturels constituent actuellement plus de 20% du marché total des colorants alimentaires, ce qui représente plus de 650 millions de dollars US dans le Monde. Pour ce qui concerne le marché mondial des colorants textiles, il était estimé à 7,34 milliards de dollars US en 2017 selon un rapport publié récemment par Research and Markets et ce marché devrait connaitre une croissance annuelle moyenne de +6 % sur la période 2017 à 2022, pour atteindre 9,82 milliards de dollars US.

Sensibilisés aux enjeux environnementaux et aux potentiels effets toxiques sur la santé, les consommateurs sont de plus en plus attirés par des produits formulés à base d'ingrédients d'origine naturelle [7]. Ce retournement de tendance pousse les industriels à expérimenter de nouvelles sources de colorants et pigments. Certaines entreprises commencent donc à étudier la possibilité de remplacer dans leur formulation les colorants artificiels par des alternatives naturelles, mêmes si elles ne sont pas directement concernées par les limitations réglementaires. Parmi les alternatives mises en œuvre et actuellement commercialisés par des sociétés internationales (Archer Daniels Midland Company, Chr. Hansen Holding, DDW, Kalsec, Danisco, etc.) la majorité provient de colorants à base de concentrés de fruits, de légumes, de fleurs, ou alors de pigments issus du règne microbien. Ces nouvelles molécules colorantes sont très en demande sur le marché international, malgré leur faible stabilité, et les sources naturelles actuelles sont très limitées : betterave, carottes, peau de raisin, cassis, etc. pour les végétaux producteurs de pigments (caroténoïdes, betalaines, anthocyanes, proanthocyanidines, etc.) et certaines souches de bactéries, de microalgues, ou de moisissures (caroténoïdes d'origine microbienne essentiellement).

D'autre part, les teintures naturelles, supplantées de nos jours par les teintures synthétiques, étaient jusqu'à la fin du XIXème siècle les seules sources de couleurs employées pour les textiles et autres domaines de l'industrie des colorants [8, 9]. Les sources de matières premières utilisées pour ces

[3] Rapport du groupe Research & Markets (report ID n°4290718, mai 2017)
https://wwwmarketsandmarketscom/

teintures peuvent être des sources animales à l'image du pourpre ou de la cochenille, ou minérales avec l'utilisation de boue ferrugineuse, mais surtout végétales dans le cas des plantes tinctoriales. Les techniques traditionelles pour l'utilisation de ces plantes tinctoriales n'ont céssé d'évoluer à travers le monde, de la préhistoire de nos jours, et de l'artisanat à l'échelle industrielle. Dans cette perspective de rechercher d'autres alternatives plus saines et plus écologiques aux colorants de synthèse, il s'avère intéressant d'étudier ces sources végétales moins conventionnelles (provenant de graines, feuilles, racines, écorces… de plantes tinctoriales des régions tropicales par exemple). Les pigments végétaux extraits de plantes tinctoriales de Madagascar, dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien, pourraient représenter une source alternative et renouvelable de colorants naturels stables et exploitables en industries. Les applications industrielles visées sont nombreuses : coloration des denrées et emballages alimentaires, produits cosmétiques et pharmaceutiques, peintures, textiles, plastiques, etc.

En effet, Madagascar possède une grande richesse en termes de biodiversité végétale. Ce pays est classé comme étant l'un des principaux « Hotspot » de la biodiversité mondiale [10-11]. Les artisans teinturiers et la population locale utilisent plusieurs plantes tinctoriales malgaches, pour la plupart endémiques ou indigènes, pour teindre des fibres textiles naturelles comme le raphia, la soie ou le coton. Les premiers récits évoquant l'utilisation de ces plantes à Madagascar ont été énoncés par Heckel *et al*. en 1910 [12] et Decary en 1946 [13]. Par ailleurs, certains savoirs et savoir-faire traditionnels tendent même à disparaitre dans certaines régions où ces plantes tinctoriales sont délaissées au profit de l'utilisation de pigments de synthèse. Plus d'un siècle après, rares sont les plantes tinctoriales de Madagascar qui ont fait l'objet d'études approfondies, hormis celles décrites dans les travaux de Cardon [9] et Ethève [14] qui sont les seules à décrire ces savoir-faire traditionnels sur ces plantes tinctoriales. L'utilisation de ces plantes se limite au stade artisanal. Elle est effectuée par la population locale en fonction des plantes qui poussent dans leurs régions respectives et, pour autant que nous sachions, il semblerait qu'aucune autre initiative de recherche n'ait été mise en œuvre pour en adapter certains usages pour répondre à la demande en colorants naturels.

Il s'agit donc d'un travail pionnier que nous proposons dans ces travaux de thèse visant à redécouvrir la richesse de la biodiversité végétale de Madagascar et de proposer des substituants naturels à ces colorants de synthèse provenant de sources naturelles renouvelables issues des plantes tinctoriales, et contribuant ainsi à la valorisation et à la préservation de la biodiversité végétale de Madagascar. Dans un pays où les sources de revenus sont très faibles, la valorisation de ces plantes tinctoriales pourra conduire à la création ou à la relance d'une filière génératrice de revenus durables pour les populations locales, mais en étudiant la question avec le regard du biologiste et du chimiste qui a pour objet de mettre à disposition de l'industrie, des pigments ou des colorants, dont les activités biologiques et les propriétés toxicologiques sont établies.

Par ailleurs, la valorisation de la biodiversité végétale des forêts malgaches comme substitut ou comme appui à la chimie peut représenter une solution pérenne pour préserver les espèces végétales menacées : soit pour une production directe (exemple : plantes tinctoriales), soit en extrayant des molécules bioactives qui possèdent des propriétés technologiques (pouvoir colorant) et certaines propriétés biologiques démontrées (antioxydante, antimicrobienne, etc.) pour les utiliser comme colorants naturels et/ou les incorporer dans des produits à usage nutraceutique, pharmacologique ou cosmétologique. La valorisation des plantes tinctoriales de Madagascar présente donc un double enjeu écologique et économique.

La sélection de nouvelles ressources végétales productrices de pigments et colorants transposables à l'échelle industrielle, dans des formulations complexes, constitue cependant un challenge technologique. Les principaux freins à ce développement technologique résident dans la nature des molécules colorantes extraites et leur formulation, qui montrent aujourd'hui leurs limites technologiques. Les colorants et pigments naturels doivent par conséquents tout d'abord atteindre des performances proches de celles des produits synthétiques en termes de brillance, de pouvoir colorant, d'adhérence, de stabilité et de durabilité, tout en restant suffisamment compétitifs économiquement [15]. Enfin, les propriétés toxicologiques de ces extraits végétaux doivent démontrer leur innocuité vis-à-vis de la santé humaine et de l'environnement (en raison des propriétés toxicologiques intrinsèques des molécules colorantes ou du fait de la présence d'autres composés mineurs co-extraits de la plante) [16].

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont les principaux objectifs sont de :

- **Inventorier et valoriser la chimio-diversité des ressources végétales tinctoriales de Madagascar ;**
- **Proposer des pistes de valorisation d'une sélection de quelques unes de ces sources végétales de colorants pour répondre à l'évolution du besoin du marché des colorants naturels utilisés en industrie.**

Ces objectifs justifient la co-tutelle de ce travail de thèse entre le Laboratoire de Chimie et de Biotechnologie des Produits Naturels (CHEMBIOPRO, ex-LCSNSA) de l'Université de La Réunion, et le Département Industries Agricoles et Alimentaires de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques (ESSA-IAA) de l'Université d'Antananarivo, aux expertises complémentaires dans le domaine de l'analyse des substances naturelles.

Ayant fait le constat que les données scientifiques sur l'étude ethnobotanique des plantes tinctoriales malgaches, sur les procédés à mettre en œuvre pour extraire les pigments, sur la stabilité de ces composés et sur la composition chimique et la toxicité de ces extraits végétaux étaient très rares dans la littérature, trois approches complémentaires ont été mise en oeuvre dans ce travail de thèse pour compléter ces

connaissances. Une première phase du projet, l'étude ethnobotanique, a consisté à cribler et à recenser la biodiversité en plantes tinctoriales à Madagascar. Puis, dans une deuxième phase, nous nous sommes intéressés aux aspects phyto-chimiques nécessaires pour extraire les pigments par un procédé éco-responsable à l'aide de solvants non nocifs (sans utilisation de solvants chlorés) et pour caractériser les propriétés physico-chimique et technologique des extraits bruts colorés. Enfin, dans une troisième phase de la thèse, nous avons abordé les questions liées aux aspects toxicologiques à l'aide de modèles animaux pour caractériser les profils d'activité et de toxicité de ces extraits végétaux.

A partir des problématiques susmentionnées, deux grandes hypothèses de recherche ont pu être avancées pour ce travail de thèse :

Hypothèse 1 : La biodiversité végétale malgache est riche en plantes endémiques / indigènes mais aussi en plantes introduites par l'Homme. Les plantes tinctoriales utilisées traditionnelement à Madagascar sont potentiellement des sources de nouvelles molécules colorantes intéressantes. Elles représentent un fort potentiel qui permettrait de participer au développement de l'industrie des colorants à la fois pour les acteurs locaux et internationaux.

Hypothèse 2 : L'utilisation des pigments issus de ces plantes tinctoriales dans les industries autres que l'industrie du textile (telle que l'industrie agroalimentaire, cosmétique ou pharmaceutique) est envisageable, mais implique une adaptation des techniques de production et une évaluation des propriétés physico-chimiques et toxicologiques de ces extraits végétaux afin que leurs propriétés tinctoriales soient profitables pour les industries.

Pour alimenter ces hypothèses, les principales questions scientifiques que nous nous sommes posées sont les suivantes :

- **Quelle est la diversité et la disponibilité des plantes tinctoriales de Madagascar ? Sont-elles précisément identifiées d'un point de vue botanique ? Comment procéder à une meilleure conservation de ces plantes ?**
- **Parmi ces plantes, quelles sont celles déjà exploitées par les artisans locaux ? Quelles sont celles qui présentent un intérêt pour des applications dans le domaine des colorants naturels en raison des propriétés intrinsèques des molécules qu'elles renferment ?**
- **Quels procédés éco-responsables et quelles conditions choisir pour optimiser les rendements en pigments à partir des écorces ou racines adventives de ces plantes d'intérêt, tout en capitalisant les savoir-faire des artisans locaux ? Existe-t-il une variabilité de teinte en fonction des conditions d'extraction ?**
- **Quelles sont les propriétés chimiques, biologiques, physicochimiques et technologiques de ces extraits ? La coloration de l'extrait est-elle suffisamment stable aux conditions physiques (pH, température…) mises en œuvre dans les industries ? Quelle est la nature et la diversité**

chimique des pigments végétaux extraits ? Existe-t-il une relation entre les teneurs en pigments et les activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne…) ? Quels sont les profils d'activité/toxicité de ces extraits végétaux ? Est-ce compatible avec les applications visées (agroalimentaire, cosmétique…) ?

Le manuscrit de thèse, rédigé sur articles, s'organise en cinq chapitres. Le premier chapitre porte sur des données bibliographiques relatives aux plantes tinctoriales de Madagascar et présente les résultats de l'étude ethnobotanique réalisée sur le terrain durant plus de deux ans sur les plantes tinctoriales utilisées par les artisans malgaches dans la province de Mahajanga, dans l'ouest de l'île (région Boeny) et dans la province d'Antananarivo, située au centre de l'île (régions Itasy et Analamanga). Ce premier chapitre a fait l'objet d'une publication de type *Review* publiée en 2019 dans le journal *Chemistry & Biodiversity* :

M. Andriamanantena, P. Danthu, D. Cardon, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, H. Razafintsalama, S. Rakotonandrasana, A. Ethève, T. Petit, Y. Caro (2019). Malagasy Dye Plant Species: A Promising Source of Novel Natural Colorants with Potential Applications – A Review. Chemistry & Biodiversity, 16, e1900442 (doi.org/10.1002/cbdv.201900442)

Le deuxième chapitre porte sur la définition des différents critères de choix écologique, scientifique et économique à savoir, la zone d'étude, la plage de couleur, la disponibilité et la partie de la plante utilisée pour un développement durable, les usages traditionnels des espèces de plantes tinctoriales et enfin les limites d'adaptation des pratiques locales pour d'autres usages. Ces critères vont permettre de sélectionner huit plantes qui seront caractérisés dans ce chapitre par des études ethnobotaniques et études préliminaires sur leurs origines, leurs écologies et répartitions géographiques, leurs aspects botaniques, leurs propriétés tinctoriales et autres propriétés biologiques ainsi que de quelques perspectives d'exploitation.

Le troisième chapitre de la thèse présente les propriétés physico-chimiques et technologiques de pigments rouges extraits de cinq plantes endémiques et indigènes de Madagascar. Différents techniques d'extraction dont une decoction conventionnelle et une extraction éco-responsable sont mises en œuvre afin d'obtenir des pigments rouges à partir des racines et/ou écorces de ces plantes. Ainsi, les rendements et la composition des extraits végétaux obtenus (teneurs en pigments de type polyphénols, etc.) sont discutés. Les performances des extraits sont ensuite caractérisées en termes de pouvoir colorant et de stabilité de la coloration aux conditions physiques (pH, température) ainsi qu'en termes de pouvoir antioxydant. Les performances des nouveaux extraits sont comparées à celles de colorants rouges naturels déjà commercialisés dans l'industrie (rouge de garance ou *madder color*, carmin de cochenille). Ce chapitre fait l'objet d'un article qui a été recemment soumis (juillet 2020) :

M. Andriamanantena, P. Danthu, D. Cardon, A. Ethève, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, T. Petit, Y. Caro, 2020, Chemical stability, coloring and antioxidant properties of five new red dyes extracted from endemic and native plant species used in Madagascar, Journal of Cleaner Production (under review). »

Dans le quatrième chapitre, les propriétés antimicrobiennes et toxicologiques des plantes tinctoriales retenues dans cette étude sont présentées afin d'évaluer leur potentiel à des fins d'utilisation comme colorants naturels bioactifs dans les industries (textile, agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique). L'étude de la toxicité aigüe des extraits inclut deux méthodologies distinctes et complémentaires, l'une sur le modèle souris albinos et l'autre sur les embryons de zebrafish (*Danio rerio*), permettant d'évaluer leur potentiel à des fins d'utilisation comme colorants naturels dans les industries. Ce chapitre fait l'objet d'un article en cours de rédaction qui devrait pouvoir être soumis prochainement :

M. Andriamanantena, P. Danthu, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, Z. Razafindrakoto, T. Regnier, B. Du Plessis, T. Petit, Y. Caro, Antimicrobial activities and toxicological effects of natural pigments derived from plant species of Madagascar. International Journal of Toxicology.

Le dernier chapitre est consacré à la caractérisation physico-chimique et biologique des pigments jaune-orangé extraits d'un arbuste endémique de Madagascar, l'espèce *Paracarphalea kirondron* (de la famille des Rubiaceae). A Madagascar, le bain de teinture fabriqué à partir des racines adventives de cette plante permet aux artisans teinturiers de teindre des fibres textiles sans devoir utiliser des mordants ou fixateurs, ce qui est relativement remarquable. La caractérisation chimique comprend les analyses par HPLC-DAD-CAD-MS (*reversed phase High Performance Liquid Chromatography method coupled with a Diode Array Detector, Charged Aerosol Detector and Mass Spectrometer*) analytique et semi-préparative des pigments préalablement fractionnés par chromatographie sur colonne ouverte. L'étude de la toxicité aigüe de l'extrait inclut les deux méthodologies susmentionnées.

Ce chapitre fait également l'objet d'un projet d'article qui devrait également pouvoir être soumis prochainement :

M. Andriamanantena, P. Clerc, P. Danthu, F.R. Fawbush, B. Raonizafinimanana, Z. Razafindrakoto, T. Regnier, B. Du Plessis, T. Petit, Y. Caro, Paracarphalea kirondron: a new source of pigments rich in anthraquinone from Malagasy biodiversity and their toxicological properties. Dyes and Pigments.

Références bibliographiques :

[1] Causse J-G. L'étonnant pouvoir des couleurs. Edition J'ai lu. 2016, 224p.

[2] Pastoureau M. Figures et couleurs : études sur la symbolique et la sensibilité médiévales. Paris, le Léopard d'Or. 1986.

[3] de Oliveira GAR, de Lapuente J, Teixidó E, Porredón C, Borràs M, de Oliveira DP. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages: Developmental toxicity of textile dyes to zebrafish. Environmental Toxicology and Chemistry 2016; 35:429–34.

[4] Markandeya, Shukla SP, Mohan D. Toxicity of Disperse Dyes and its Removal from Wastewater Using Various Adsorbents: A Review. Research Journal of Environmental Toxicology 2017; 11:72–89.
[5] Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2015; 73:914–22.
[6] McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, *et al.* Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. The Lancet 2007;370:1560–7.
[7] Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, Mapari SA, Sutthiwong N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. Current Opinion in Biotechnology 2014 ;26 :56–61.
[8] Senthilkumar RP, Bhuvaneshwari V, Sathiyavimal S, Amsaveni R, Kalaiselvi M, Malayaman V. Natural Colours from Dyeing Plants for Textiles. International Journal of Biosciences and Nanosciences 2015 ; 2 :160–74.
[9] Cardon D. Le monde des teintures naturelles. Ed. Belin. 2014. 500p.
[10] Goodman SM, Benstead JP. Updated estimates of biotic diversity and endemism for Madagascar. Oryx 2005; 39 :73–7.
[11] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 2000 ;403 :853–8.
[12] Heckel E, Henri J, Perrier dela Bâthie H. Les Plantes utiles de Madagascar. vol. 8. Annales du Musée colonial de Marseille. Annales du Musée colonial de Marseille ; 1910.
[13] Decary R. Plantes utiles de la Flore Malgache. Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale 1946 ;26 :383–9.
[14] Etheve A-M. Manuel de teinture naturelle : Exemple de Madagascar. Cite; 2005, 52p.
[15] Voith M. Coloring food, naturally: The effort to eliminate synthetics gives chemists the blues. Chemical & Engineering News 2008 ;86 :18–9.
[16] Bourrier T. Intolérances et allergies aux colorants et additifs. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 2006 ;46 :68–79.

Chapitre I :

Les plantes tinctoriales de Madagascar : une source prometteuse de nouveaux colorants naturels avec de potentielles applications

Présentation générale du chapitre :

Les problèmes environnementaux et toxicologiques liés aux colorants issus de la synthèse chimique ont ravivé le besoin de trouver des solutions naturelles alternatives aux colorants artificiels. Dans une optique de remplacement des colorants artificiels par des colorants naturels issus de ressources renouvelables, la production de pigments végétaux et/ou microbiens devrait voir sa croissance augmenter de manière significative dans les prochaines années. Dans le règne végétal, parmi les nombreuses plantes productrices de pigments, les plantes tinctoriales de Madagascar peuvent constituer de précieuses matières premières naturelles pour l'industrie des colorants naturels. De plus, le savoir-faire artisanal pour l'utilisation de ces plantes tinctoriales pour des teintures végétales est ancestral et ces connaissances seront particulièrement utiles pour sélectionner les plantes de notre étude.

Quelles sont les plantes tinctoriales utilisées par les artisans locaux pour la teinture des textiles ? Quelle est l'étendue de la biodiversité des plantes tinctoriales à Madagascar ? Est-il possible de valoriser ces plantes comme sources de colorants naturels pour d'autres applications industrielles ? Quels sont les pigments responsables des propriétés tinctoriales ? Possèdent-ils d'autres propriétés biologiques ?

Ce chapitre de thèse vise à apporter des réponses à ces questions à travers une synthèse que nous avons réalisée à partir des travaux scientifiques publiés depuis les années 1900 et d'une étude ethnobotanique réalisée sur le terrain entre janvier 2017 et décembre 2018 sur les plantes tinctoriales utilisées par les artisans malgaches dans la province de Mahajanga, dans l'ouest de l'île (région Boeny) et dans la province d'Antananarivo, située au centre de l'île (régions Itasy et Analamanga). Une description botanique, les caractéristiques chimiques ainsi que les propriétés fonctionnelles et biologiques de plus d'une centaine de plantes tinctoriales malgaches sont détaillées dans ce chapitre. Il met en lumière la grande biodiversité végétale malgache comme une source prometteuse de nouveaux colorants naturels avec de potentielles applications dans les industries.

Malagasy dye plant species: a promising source of novel natural colorants with potential applications – A review

(Cette partie de la thèse a été publiée dans le Journal Chemistry & Biodiversity en 2019, https://doi.org/10.1002/cbdv.201900442)

Mahery Andriamanantena, [a, b] Pascal Danthu, [c, d] Dominique Cardon, [e] Fanjaniaina R. Fawbush, [b] Béatrice Raonizafinimanana, [b] Vahinalahaja Eliane Razafintsalama, [f] Stéphan R. Rakotonandrasana, [f] Andrée Ethève, [g] Thomas Petit, [a, h] and Yanis Caro*[a, h]

[a] Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, Université de La Réunion, FR-97490 Sainte-Clotilde, Réunion, e-mail: yanis.caro@univ-reunion.fr

[b] Département Industries Agricoles et Alimentaires (IAA-ESSA), Université d'Antananarivo, MG-101 Antananarivo, Madagascar

[c] Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité HortSys, FR-34000 Montpellier, France

[d] Université de Montpellier, FR-34000 Montpellier, France

[e] CIHAM/UMR 5648, CNRS, FR-69000 Lyon, France

[f] Centre National d'Application de Recherche Pharmaceutique (CNARP), MG-101 Antananarivo, Madagascar

[g] Association Femmes Entrepreneurs Environnement Mahajanga (FEEM), MG-401 Mahajanga, Madagascar

[h] Département Hygiène Sécurité Environnement (HSE), IUT de La Réunion, Université de La Réunion, 40 Avenue de Soweto, FR-97410 Saint-Pierre, Réunion

Highlights

- This review is the first to show a specific list about dye plants from Madagascar terrestrial environment.
- This review contains a list of 128 interesting dye plants including 34 endemic species with their characteristics
- It describes the main techniques used by local population in the west of Madagascar for natural dyeing
- Many classes of colorants (chemical families) exist in naturally-occurring, wild or cultivated plants in Madagascar and are described in this study.
- This richness of the dye plants biodiversity of Madagascar is a promising future for the sector of natural dyestuffs and the development of local population

Abstract

Due to the potentially harmful effects of some synthetic dyes, there is an increasing demand for natural colorants. Recent literature has emphasized the necessity of investigating new sources of dyes. This review discusses the biological sources of dyes derived from the rich plant diversity of Madagascar. As one of the first contributions on the use of these dyestuffs for dyeing textiles, it provides an overview of 128 dye plant species with other potential applications for coloring materials in industry. A detailed description of the botanical and chemical properties of these dyestuffs is given. We believe that the Madagascar plant diversity may be a promising source of novel colorants not yet investigated. We considered worthwhile to carry out a thorough scientific study of a set of Malagasy plants carefully selected for their coloring properties together with their potential use and valorization in specialized industries where use of natural colorants would be a particular interest.

Keywords: Biodiversity; dye plant, natural pigment, natural dye, food colorant

1-1-Introduction

Over the last twenty years, the development of what has been labelled green chemistry, that respects human health and the environment, applied from "the cradle to the grave" has been increasingly demanded by manufacturers, consumers, politicians and civil society generally. The industry of synthetic colorants is directly concerned by this evolution since the adverse effects of some aspects of the production and some their products on human health and environment have been evidenced in textile, [1,2] and food applications [3]. Synthetic colorants currently dominate the market for a number of reasons. They are readily available at low cost and most of them have a fair lightfastness, good stability in harsh environmental conditions and provide long-lasting bright coloration.

However, there are darker sides to consider: some of them have been suspected to cause allergic reactions, neurological disorders and potential carcinogenicity on human health [2,3]. Growing urbanization in most parts of the world goes together with an increasing demand for innovative and appealing colors and formats in packaged products which will considerably stimulate the global colorants market in coming years. The uses in textile or food and beverage productions are not only ones concerned, but also the paints and coatings, the packaging and plastic industries. In the current context of increasing environmental awareness among consumers, natural colorants are predicted to gain increasing importance in this market as an alternative to potentially hazardous synthetic colorants [4,5]. Natural colorants can provide renewable and sustainable bioresource products with minimal environmental impact. It is considered by some researchers that the needs of an expanding market for colorants could not be only met by the production of well-known plants that have historically been used as natural sources of colorants, like indigo (*Indigofera tinctoria*) to produce fast textile dyes [6] or

turmeric (*Curcuma longa*) to produce non-toxic food-grade colorants [7]. Recent literature has emphasized the necessity of investigating unconventional, or underutilized dyestuffs of plant origin to meet the increasing global demand for natural colorants [6,8–10]. For instance, the successful marketing of novel natural colorants extracted from plant resources, e.g., the tomato lycopene extract or concentrate, the red and orange dyes bixin and norbixin (carotenoids) from the seeds of *Bixa orellana* (family Bixaceae) [11] the yellow dyes lutein and zeaxanthin (carotenoids) from *Tagetes erecta* (Asteraceae) meal and extract [12], the betanin from beetroot (*Beta vulgaris*) red powder, and the apocarotenoids crocin and crocetin from fruit of *Gardenia jasminoides* [13] (Rubiaceae), illustrates the existence and importance of niche markets in which consumers are willing to pay a higher price for 'natural healthy ingredients'[10]. These novel unconventional natural colorants are often harvested from wild plants, and moreover, each unconventional colorant presents particular challenges for large-scale production: these may range from the preservation of biodiversity in the local ecosystem, to the necessity of optimizing the extraction yield of the main coloring compounds, or of eliminating minor toxic compounds during extraction, etc. These eco-friendly, presumably mostly non-toxic natural colorants, should have possible applications in other industrial sectors [14,15] like cosmetics [16] or, furthermore, in pharmacological industries [5]. Indeed, recent research studies have already shown that some natural colorants have health-promoting properties in human diet, like naturally-occurring carotenoids [17] and anthraquinones [9,18] from plants. This is because natural dyes can not only enhance the appeal of commercial products, but also provide beneficial biological effects such as antioxidant and anticancer properties.

Madagascar is one of the eight 'hottest' biodiversity hotspots based on the exceptional richness and concentrations of its indigenous flora (c. 12,000 spp. of vascular plants, >90 per cent endemic) [19]. Madagascar also stands out by the high rate of its flora endemism at higher taxonomic levels (genera and families) [20]. Goodman and Benstead estimated that 83% of the plant species growing in Madagascar are endemic to the island [20,21]. They represent 3.2% of the flora of the world [20] This exceptional richness of plants has always been used by local people as a source of traditional medicines [15] foods, or materials for the handcrafted weaving and coloration of textiles, as described already about a century ago [22–24]. Nevertheless, it is important and timely to undertake new studies of the dyeing traditions in Madagascar because traditional knowledge and expertise are fast disappearing [25]. Only a few craftspersons and weavers are still using natural dyes extracted from plants in Madagascar to dye textile materials, and only on a small scale [25]. In other sectors such as cosmetic or food industries, the use of natural colorants from plants is almost non-existent in Madagascar. Furthermore, the chemical properties of many of the colorants extracted from the traditional Malagasy dye plants have never been fully investigated and are still not completely understood. Lastly, beyond the historical and scientific importance of such research, natural colorants today are of great interest to many local weavers who are increasingly seeking to tap into the European and North American markets of consumers who

prefer natural colors and ecologically sound products. The emerging body of literature on the environmental and economic issues of natural textile dyeing demonstrates that, as the environmental impact is reduced throughout the whole life cycle [4] the use of natural colorants is expected to contribute more significantly to sustainable development in the near future [5].

We have previously performed and published research studies on some dyes extracted from Malagasy plants, and related extraction and application techniques [6,25]. The present review builds on our previous studies in order to offer an inventory of all the dye plant species – some currently threatened with extinction – used by local practitioners in Madagascar. It discusses the biological sources of natural dyestuffs, particularly those originating from the richness and endemism of the Malagasy flora. In a first part, this work provides an overview of 128 Malagasy dye plant species – of which 34 are endemic – with potential applications as one of the first descriptions of the use of these dyestuffs by local practitioners in Madagascar for dyeing textile materials. We believe that the plant diversity of Madagascar may be a promising source of novel natural colorants, not yet investigated, with several potential applications. Furthermore, a detailed description of the botanical, coloring and chemical properties of these natural dyestuffs is given, with appropriate design criteria. This part indicates the range of colors obtained depending on the plant parts used, the chemical composition of the main coloring compounds isolated from the plant materials, their biological activities, and the current state of their uses in natural dyeing.

1-2 History and ethnobotanical survey of indigenous knowledge on dye plants used by the traditional dyers of the western region of Madagascar

The range of colors provided by natural dyes has attracted human interest for enhancing the appearance of various artefacts from ancient times until the end of the nineteenth century AD. Their traditional uses started to decline after the invention of the synthetic mauveine dye by Sir William Henry Perkin in 1856, along with progresses made in the development, manufacture, and applications of synthetic dyes. However, more recently, consumer awareness of the potentially adverse effects of some synthetic dyes on human health and environment [2,3] has stimulated renewed interest in natural sources of colorants. Therefore, the search for alternative sources of natural dyes, particularly from traditional and/or underutilized dyestuffs of plant origin from all over the world. Madagascar and other regions of the world had their own natural dyeing traditions utilizing their natural resources. Indigenous knowledge of using dyestuffs from plants for production of natural colorants to dye fabrics is presently in danger of becoming extinct, because this knowledge is passed on orally from generation to generation and because many traditional dyers do not keep written records [6]. It has now become more important than ever to record and preserve the traditional knowledge on dye plants from Madagascar, in order to inspire the discovery of new natural colorants and possibly to find improved applications [6]. In addition, developing knowledge through scientific research into natural dyes from plants and documenting the

research results about traditional dyeing techniques is an integral part of the preservation of an indigenous people's cultural heritage for future generations. Ethnobotanical studies are today recognized as an effective method of identifying new plant species or refocusing on those plants reported in earlier studies for the possible extraction of beneficial bioactive compounds, which is the case for natural colorants. The need for continued ethnobotanical research cannot be overemphasized: it has a key role to play in the discovery and documentation of important dye plants from Madagascar.

This work focuses on the dye plants – some currently threatened with extinction – used by local practitioners in the western region of Madagascar for the dyeing of fabrics. Figure 1 summarizes all the inventory works that have been made on dye plants from Madagascar. The dye plants of Madagascar were first observed by Etienne de Flacourt, the French governor of Madagascar, during his stay on the island between 1648 and 1655 [26]. He reported the fineness of Malagasy weaving, fabrics and use of natural colorants. He particularly described the production of a red dye probably obtained from one or several different species of *Tambourissa*, and of a yellow color from a *Danais sp*. At the beginning of the 20th century, the French botanists Henri Perrier De La Bâthie [24] Edouard Heckel and their colleagues [23] established a list of wild and cultivated plants including some information about their uses. They mentioned fifteen plants in their studies, among which three were used by local people for dyeing natural fabrics, e.g. Harungana madagascariensis, *Weinmannia bojeriana* and *Sideroxylon rubrocostatum*. They further indicated that indigo (from *Indigofera tinctoria*) and turmeric (from *Curcuma longa*) were the two most popular natural colorants in Madagascar. In 1946, the naturalist and Administrator Raymond Decary [22,27] added more information by publishing a more complete list of dye plants. Based on a first ethnobotanical study of dye plants present in Madagascar, Ethève in 2005 has mentioned over one hundred species of plants which have the potential to dye fabrics [25]. Cardon has undertaken research on several specific natural dye sources, and suggested additional compelling reasons for undertaking new studies of traditional dyeing, notably in Madagascar [6]. These first inventories of dye plants of Madagascar were completed by the archive documents [28,29] analyzed by Allorge-Boiteau & Allorge, [28] and Fee *et al.* [29] at least, as shown in Figure 1.

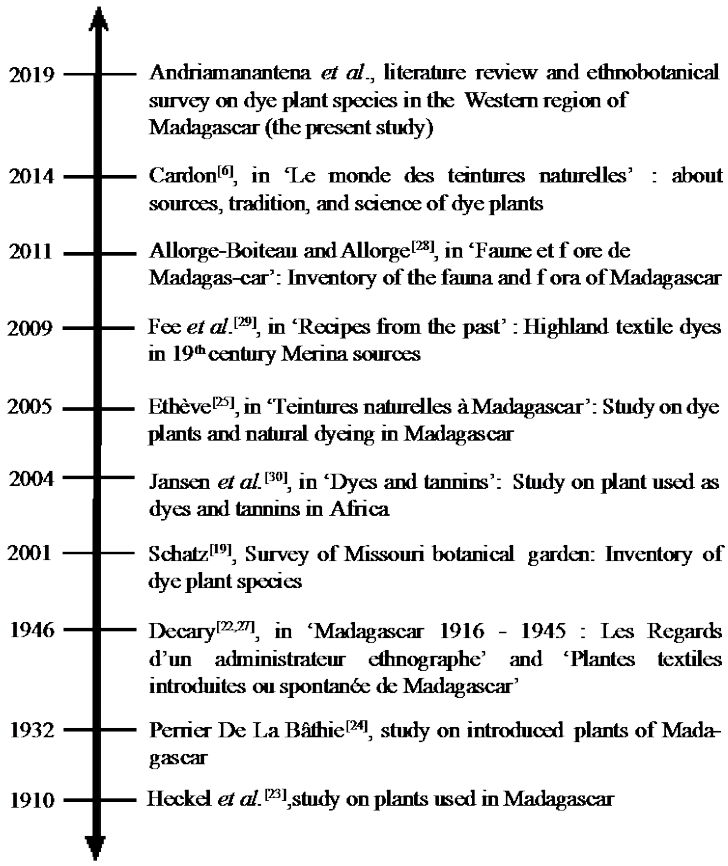


Figure 1. Timeline of ethnobotanical surveys on dye plant species of Madagascar [6,19,22–25,27–30]

In the present contribution, all the information obtained from the reviewed literature has been combined and supplemented by information obtained during a two-year ethnobotanical survey on dye plants conducted in two western regions of Madagascar (Boeny and Itasy), from January 2017 to December 2018. The western region of Madagascar was chosen because the traditional dyers practicing their craft in that area still adhere to their people's age-old traditional beliefs and customs, and, as such, they constitute an authentic source of data for the scientific documentation of some dye plants still in use. During the discussions with each prospective respondent, we emphasized the immense value which each traditional dyer's contribution could make to the compilation of a record of traditional knowledge on dye plants from Madagascar. The main goal of this ethnobotanical survey is to provide baseline data for future phytochemical and pharmacological studies of these dye plants species, in order to propose improved applications of natural colorants from plants in the textile industry, as well as in the food industry and in other industrial sectors.

1-3 Endemic, native and introduced dye plants traditionally used in Madagascar

The plant species have been classified in three categories according to their origin,[30]: (i) endemic species of Madagascar are species specific to this region of the world and growing naturally only in Madagascar; (ii) native species exist naturally in Madagascar without the intervention of man and can also exist naturally in other regions of the world; (iii) and introduced species include those that did not previously exist in Madagascar but whose appearance comes from human activities, by introducing seedlings or seeds from other countries in a voluntary or involuntary way. The study revealed 128 plant species from 61 families (representing 109 genera) – of which 34 species are endemic – that are used for dyeing purposes by traditional dyers in Madagascar, the Rubiaceae and Fabaceae being the dominant botanical families, with 11% and 9%, respectively, of the total dye plant species inventoried in this study.

Figure 2. Examples of Malagasy dye plant species and dye baths for dyeing textiles ((a) a bark extract of *Rhizophora mucronata*, (b) a bark extract of *Harungana madagascariensis*, and (c) leaf extract of *Indigofera arrecta* from Madagascar.)

1-3-1 Endemic dye plant species

Thirty-four dye plant species inventoried in this work are endemic to Madagascar (Table 1) (i.e., about 26% of the total dye plant species inventoried). Outstanding examples of endemic dyestuffs mostly used in Madagascar for dyeing fabrics, in Table 1, are the bark of *Acridocarpus excelsus* (Malpighiaceae) [22,30] the bark and root of *Paracarphalea kirondron* (Rubiaceae) [25,30] the bark of *Labourdonnaisia madagascariensis* (Sapotaceae) [29] the bark of *Commiphora aprevalii* (Burseraceae), [25] and the bark and timber of *Terminalia mantaly* (Combretaceae) [30]. To date, to the best of our

knowledge, very little or no information about the dyeing molecules contained in most of these endemic plant species of Madagascar can be found in the literature.

Most species of *Acridocarpus* are also used as an antidiarrheal by the local people [30]. The bark of *A. excelsus* produces a reddish color (Figure 2a). *A. excelsus* is a tree that grows naturally in arid parts of western Madagascar. This species is also known for its utilization as firewood; it is widespread in this region of Madagascar. The stem bark of this tree is rich in tannins and has astringent properties [30]. Two other endemic species, *Danais ligustrifolia* [6] and *Pentanisia veronicoides* [6] (Table 1), both from the Rubiaceae have roots that are traditionally used in the central region of Madagascar to dye silk red, but both species have become difficult to find in the region. *Faucherea ambrensis* (Sapotaceae) [25] *Rothmannia reniformis* (Rubiaceae) and *Aloe macroclada* (Asphodelaceae) [31] (Table 1), are three more endemic species rather commonly used by Malagasy craftspersons to dye silk and rafia textiles. *Psiadia altissima* (Asteraceae), a widespread shrub, can give a green color on silk with a single hot dye bath; this endemic plant is mostly used however in Madagascar for its medicinal properties, in the treatment of abdominal pain, and liver disorders [32]. Other endemic plant species of Madagascar are mentioned in the literature as having interesting dyeing properties, but they are not well-known to local craftspersons in Madagascar (they are also listed in Table 1 with the mention 'research stage'). Since current scientific understanding of these endemic dye plant species of Madagascar is limited, further phytochemical and pharmacological studies will be necessary to discover and propose improved applications of these natural dyes.

Table 1. Main endemic dye plant species of Madagascar and their characteristics [15,21,24,25,31–39]

Family	Plant species: *Scientific name* (*Malagasy* vernacular name)	Colour	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Anacardiaceae	***Baronia taratana* Baker** (*tarentana*, *tarantana*)	Red, Pink, black	Leaves, seeds	Abdominal pains, colds, fevers, bronchitis, asthma, arthritis, liver disorders	Research stage (+)	(this study)
Asphodelaceae	***Aloe macroclada* Baker** (*vahona*, *vahoniolona*)	Green light, red purplish	Roots, leaves	Antioxidant, antimicrobial	**Craft dyeing (++)**	[12,13]
Asteraceae	***Psiadia altissima* (DC.) Drake** (*dingadingana*)	green	Leaves	unknown	**Craft dyeing (++)**	[13–15]
Balsaminaceae	***Impatiens baronii* Baker** (*kivolobola*, *kivolavola*, *silamolidrano*)	Yellow	Flowers	unknown	Research stage (+)	(this study)
Burseraceae	***Commiphora aprevalii* (Bail.) Guillaumin** (*guillaumin*, *daro)*	red	Bark	unknown	**Craft dyeing (+++)**	(this study)
Combretaceae	***Terminalia mantaly* H. Perrier** (*mantaly)*	Beige, red	Bark, timber	unknown	**Craft dyeing (+++)**	[13]
Compositae	***Gymnanthemum appendiculatum* (Less.) H. Rob.** (*ambiaty*)	Green	Leaves	Febrifuge	Research stage (+)	[13,17]
Cunoniaceae	***Weinmannia bojeriana* Tul.** (*sokia*, *lalona*, *vondrozo*)	Red, black	Bark, wood chips, leaves	unknown	Research stage (+)	[10,18]
Cyperaceae	***Cyperus papyrus subsp. madagascariensis* (Willd.) Kük.**	Black, light brown	Leaves	unknown	Research stage (+)	(this study)
Euphorbiaceae	***Dalechampia subternata* Müll. Arg.** (*teloravina*, *vahindrongony*)	Black	Whole plants	unknown	Research stage (+)	(this study)
Fabacaeae	***Dalbergia purpurascens* Baill.** (*hitsika*)	Brown	Bark, timber	unknown	Research stage (+)	(this study)
Fabacaeae	***Dalbergia tricolor* Drake** (*tsiandalana)*	Red	Bark, timber	unknown	Research stage (+)	(this study)
Fabacaeae	***Piptadenia chrysostachys* (Benth.) Benth.** (*fano*)	Red, beige dark	Bark, stems	unknown	Research stage (+)	(this study)
Hypericaceae	***Psorospermum amplifolium Tul.* ex H. Perrier** (*harungampanihy*)	Yellow	Bark	unknown	Research stage (+)	(this study)
Lauraceae	***Cryptocarya agathophylla* van der Werff** (*hazomanga*, *pisopiso*)	Reddish	Bark	Febrifuge, strengthening,	Research stage (+)	[19]
Malpighiaceae	***Acridocarpus excelsus* A. Juss.** (*mavoravo*, *kirajy*, *sariheza*)	Red dark	Bark	Antidiarrheal	**Craft dyeing (+++)**	[22,30]

Family	Plant species: *Scientific name* (*Malagasy* vernacular name)	Colour	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Menispermaceae	***Burasaia madagascariensis* DC** (*amborasaha*, *oditohina*)	Yellow, black	Roots	Antimalarial	Research stage (+)	[13,22]
Monimiaceae	***Tambourissa perrieri* Drake** (*amboara*)	Red	Fruits	unknown	Research stage (+)	[13]
Orobanchaceae	***Radamaea montana* Benth.** (*tambarasaha*)	Purple	Fruits	unknown	Research stage (+)	[23]
Phyllanthaceae	***Phyllanthus bojerianus* (Baill.) Müll. Arg.** (*repika, marofolena)*	Red, black	Leaves	unknown	Research stage (+)	[13]
Rubiaceae	***Danais ligustrifolia* Baker** (*bongo)*	Yellow	Bark	unknown	**Craft dyeing (++)**	(this study)
Rubiaceae	***Paracarphalea kirondron* (Baill.) Razafim., Ferm, B. Bremer & Kårehed** (*hazomenavony, menavony)*	Red, orange	Bark, roots	unknown	**Craft dyeing (+++)**	[13]
Rubiaceae	***Paracarphalea pervilleana* (Baill.) Razafim., Ferm, B. Bermer & Kårehed** (*toehatra, toebahatra)*	Red	Roots		Research stage (+)	[30]
Rubiaceae	***Pentanisia veronicoides* (Baker) K. Schum.** (*bongotany, volobotany, lokotany)*	Bright red	Roots, fruits	unknown	**Craft dyeing (++)**	[13,24]
Rubiaceae	***Psychotria subcapitata* Bremek.** (*voamasondreo)*	Red	Fruits	unknown	Research stage (+)	(this study)
Rubiaceae	***Rothmannia reniformis* R. Cap** (*sofikombo)*	Brown, pink	Leaves	unknown	**Craft dyeing (++)**	(this study)
Rutaceae	***Cedrelopsis grevei* Baill.** (*katrafay, hafatraina)*	Black, yellow	Bark	Anticancer, anti-inflammatory, antioxidant,	Research stage (+)	[25]
Sapotaceae	***Faucherea ambrensis* Capuron ex Aubrév.** (*nanto, hafotra)*	Red	Bark	unknown	**Craft dyeing (++)**	(this study)
Sapotaceae	***Labourdonnaisia madagascariensis* Pierre ex Baill.** (*nato)*	Red, brown	Bark	unknown	**Craft dyeing (+++)**	[25,30]
Sapotaceae	***Labramia bojeri* A. DC.** (*felambarika)*	Black, Red	Bark, flowers and leaves	Antimicrobial, antifungal	Research stage (+)	[13,26]
Sapotaceae	***Sideroxylon saxorum* Lecomte** (*vongo)*	Red	Bark	unknown	Research stage (+)	(this study)
Sarcolaenaceae	***Leptolaena bojeriana* (Baill.) Cavaco** (*hatsikana)*	Yellow-green, Black	Leaves, stem and roots	Antimicrobial	Research stage (+)	[13]
Urticaceae	***Laportea oligoloba* (Baker) Friis** (*amiana)*	Red purple	Bark	unknown	Research stage (+)	[13,27]

[a] Development status on dyeing: Research stage (+), Moderately used by craftspersons in Madagascar for dyeing textile (++), or frequently used by craftspersons, or local population in Madagascar for dyeing textile (+++).

1-3-2 Native dye plants species

Fourty-three dye plant species inventoried in this work are native to Madagascar (Table 2) (i.e., about 33% of the total dye plant species inventoried). Eight of these native dye plant species are frequently used by craftspersons or local population in Madagascar for their dyeing properties on fabrics as shown in Table 2; this is the case of *Harungana madagascariensis* (Hypericaceae) [25] Xylocarpus granatum (Meliaceae) [30] *Haematoxylum campechianum* [30] and Indigofera longiracemosa (Fabaceae) [6] *Ceriops tagal* [30] and *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) [30] Terminalia catappa (Combretaceae), and *Woodfordia fruticosa* (Lythraceae).

Harungana madagascariensis is one of the plant species most commonly used by dyers from the west of Madagascar and some other regions to produce a yellow color on all types of fabrics (Table 2). The bark of *H. madagascariensis* contains anthraquinonoids, flavonoids, anthocyanins and tannin derivatives which are of considerable interest for dyeing [40]. From the dye bath a bright yellow color is obtained on raffia fabrics (Figure 2b). This tree is widely spread in African regions and grows in many regions of Madagascar, but because it is not much used, it is not cultivated anymore. A study of the bark of *H. madagascariensis* collected in Cameroun and Nigeria also revealed the presence of phenols, alkaloids, sterols and saponins. All of these compounds also confer some medicinal properties to the plant [40,41]. A methanol extract of the stem bark of H. madagascariensis showed its antifungal activity [41] and the presence of α-glucosidase enzyme inhibitors, which can be used to help diabetic patients. New anthraquinones and anthrones have been identified for the first time in hexane extract of the stem bark [42].

Xylocarpus granatum is another example of one of the most-used native dye plants in Madagascar (Table 2). Its bark is used for its dyeing properties and the plant is also extensively used as firewood or timber in Madagascar. In other regions of the world, this species is used for its medicinal properties: antidiarrheal, antiulcer and antibacterial [34]. The plant *X. granatum* is a mangrove species which gives red and reddish-brown tones on different textile fibers as do two other mangrove plants of the Rhizophoraceae: *Rhizophora mucronata* and *Ceriops tagal*. The aqueous extract of *X. granatum* is rich in tannins (containing up to 74%) and its medicinal properties are mostly due to limonoids contained in all parts of the plant [43]. Flavonols and tannins are also present as main compounds, which can be explain the dyeing properties of the plant [30]. New flavanols with antioxidant properties have also been isolated from this plant, one derivative, catechin-(4β→8)-catechin, having shown the highest α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity [44].

Table 2. Main native and naturalized dye plant species of Madagascar and their characteristics [6,24,25,30–35,40,45–62]

Botanical family	Plant species: Scientific name (Malagasy vernacular name)	Color	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Botanical family	**Plant species: *Scientific name*** *(Malagasy vernacular name)*	**Color**	**Parts used**	**Biological activity**	**Development status on dyeing[a]**	**References**
Anacardiaceae	***Sclerocarya birrea* A. Rich.** (*sakoa)*	Light brown, red dark	Bark, fruits, seeds	Antioxidant, acetylcholinesterase inhibitory, antibacterial	**Craft dyeing (++)**	[13,28,29]
Aphloiaceae	***Aphloia theiformis* (Vahl) Benn.** (*ravimboafotsy)*	Yellow	Bark, stems and leaves	Effects on key enzymes related to diabetes, immunomodulatory, anti-inflammatory, antimalarial	Research stage (+)	[13]
Arecaceae	***Phoenix reclinata* Jacq.** (*daro)*	Red brown	Bark	Antimicrobial	**Craft dyeing (++)**	[30]
Asphodelaceae	***Aloe zebrina* Baker** (*vahona)*	Yellow gold	Roots	Unknown	**Craft dyeing (++)**	(this study)
Cannabaceae	***Trema orientalis* (L.) Blume** (*andrarezina, vakoka*)	Red, pink, purple	Bark, leaves	Unknown	Research stage (+)	(this study)
Combretaceae	***Terminalia catappa* L.** (*atafana)*	Black, yellow, green	Bark, fruits, leaves	Antioxidant, antimicrobial; Hepatoprotective effect	**Craft dyeing (++)**	[13]
Cunoniaceae	***Weinmannia eriocarpa* Tul.** (*hazomanga, pisopiso)*	Reddish	Bark, leaves or flowers	Unknown	Research stage (+)	(this study)
Cyperaceae	***Cyperus latifolius* Poir.** (*herana)*	Black	Stems	Antibacterial	Research stage (+)	[13,31]
Dennstaedtiaceae	***Pteridium aquilinum* (L.) Khun** (*ampanga)*	Black	Leaves, fruits	Antioxidant, antibacterial	Research stage (+)	[13]
Phyllanthaceae	***Phyllanthus emblica* L.**	Brown	Leaves	Unknown	Research stage (+)	[13]
Fabaceae	***Vachelia nilotica* (L.) P.J.H.Hurter & Mabb.,**	Black and kaki	Bark	Antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial	Research stage (+)	[32,48,49]
Fabaceae	***Crotalaria incana* L.** (*aika beravina)*	Blue, green, black	Leaves	Unknown	**Craft dyeing (++)**	[13]
Fabaceae	***Haematoxylum campechianum* L.**	Red dark	Bark and wood	Antibacterial, anti-inflammatory, Protein Tyrosine Kinase Inhibitors	**Craft dyeing (+++)**	[32,50,51]
Fabaceae	***Indigofera longiracemosa* Boivin ex Baill.** (*netsy, aika)*	Blue, grey	Leaves	Antimicrobial (other genus)	**Craft dyeing (+++)**	[30]
Hypericaceae	***Harungana madagascariensis* Lam. *ex* Poir.** (*harongana)*	Yellow, Golden yellow	Bark and timber, latex, roots,	Antifungal, antibacterial, antimicrobial, cardio protective effect	**Craft dyeing (+++)**	[24,40,52]

Botanical family	Plant species: Scientific name (Malagasy vernacular name)	Color	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Lauraceae	***Cassytha filiformis* L.** (*tsyhitafototra, maroampototra)*	Orange yellow	Liana	Vasorelaxing	Research stage (+)	[13]
Lecythidaceae	***Barringtonia racemosa* (L.) Spreng.**	Green	Bark	Antibacterial, antifungal, antioxidant	Research stage (+)	[21,37]
Lythraceae	***Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz** (*ambohenjana, arify)*	Red, pink, black	Leaves, flowers, roots	Antimicrobial	**Craft dyeing (++)**	[13,22]
Malvaceae	***Hibiscus lasiococcus* Baill.** (*hafotra)*	Mauve, red purplish	Flowers	Unknown	**Craft dyeing (++)**	(this study)
Malvaceae	***Sparrmannia ricinocarpa* (Eckl. & Zeyh.) Kuntze** (*hafotra)*	Green	Leaves	Unknown	Research stage (+)	(this study)
Malvaceae	***Thespesia populnea* (L.) Sol. ex Corrêa** (*andranomena)*	red pink	Bark	Anti-inflammatory, antibacterial	Research stage (+)	[13]
Meliaceae	***Xylocarpus granatum* J. Koenig** (*tavela)*	Light brown, red	Bark	Antibacterial	**Craft dyeing (+++)**	[17,38]
Moraceae	***Ficus lutea* Vahl** (*amontana, hafotra, mandresy)*	Red, brown	Bark; leaves	Unknown	**Craft dyeing (++)**	[13,39]
Moraceae	***Ficus sycomorus* L.** (*adabo, adabonaomby*)	Black	Bark	Dehydration	Research stage (+)	[13,40]
Nymphaeaceae	***Nymphaea nouchali* Burm. f.** (*tatamo, voahirana)*	Black, grey	Bark	Aphrodisiac, antifungal, antioxidant	Research stage (+)	[13]
Orobanchaceae	***Buchnera hispida* Buch.- Ham. ex D. Don** (*tamborintsintsina, tamborokijoa)*	Blue, black	Plant	Antispasmodic, antispasmolytic	Research stage (+)	[41]
Orobanchaceae	***Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke** (*arema*)	Blue, black	Flowers	Unknown	Research stage (+)	(this study)
Passifloraceae	***Passiflora stipulata Aubl.*** (*garanadrelina)*	Green	Leaves	Unknown	**Craft dyeing (++)**	(this study)
Rhizophoraceae	***Bruguiera gymnorhiza* (L.) Savigny** (*afiafy)*	Orange to brown red, kaki, black	Bark	Antioxidant, antimicrobial	Research stage (+)	[25,30]
Rhizophoraceae	***Ceriops boiviniana* Tul.** (*tanga)*	Golden yellow, orange	Bark	Antimicrobial	Research stage (+)	[13,42]
Rhizophoraceae	***Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob.** (*honkolahy)*	Grey to light brown red	Bark	Antiviral	**Craft dyeing (+++)**	[30]
Rhizophoraceae	***Rhizophora mucronata* Lam.** (*honkovavy, tanga)*	Black, re	Bark	Antimicrobial, antiradical,	**Craft dyeing (+++)**	[13,21,43]
Rubiaceae	***Breonadia salicina* (Vahl) Hepper & J.R.I. Wood** (*sohihy)*	Red	Fruits and seeds	Antioxidant, antifungal	Research stage (+)	[13,28,44]
Rubiaceae	***Cremaspora triflora (Thonn.)* K. Schum.**	Red	Fruits and seeds	Antibacterial	Research stage (+)	[21,28]

Botanical family	Plant species: Scientific name (Malagasy vernacular name)	Color	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Rubiaceae	***Danais fragrans* (Comm. ex Lam.) Pers.** (*bongonomby)*	Orange red, golden yellow	Bark of fresh or dried roots	Antibacterial, antifungal	**Craft dyeing (++)**	[6,61]
Rubiaceae	***Melanoxerus suavissimus* (Homolle ex Cavaco) Kainul. & B. Bremer** (*tangena*)	Black	Flowers, fruits and fibres	Unknown	Research stage (+)	(this study)
Rubiaceae	***Morinda citrifolia L.*** (*noni)*	Red	Roots, barks	Nutritional	**Craft dyeing (++)**	[24]
Rubiaceae	***Mussaenda arcuata* Lam. ex Poir.** (*vahilengo)*	Red	Roots	Unknown	Research stage (+)	(this study)
Rubiaceae	***Paederia grevei* Drake** (*vahimantsy, laingomaimbo)*	Red, Black	Bark	Ailments of liver and stomach	Research stage (+)	[13]
Solanaceae	***Solanum anguivi* Lam.** (*voampoana)*	Green	Leaves	Unknown	Research stage (+)	(this study)
Urticaceae	***Obetia radula* (Baker) Baker ex B.D. Jacks.** (*miabe)*	Red	Bark	Aphrodisiac	Research stage (+)	[13]

[a] Development status on dyeing: Research stage (+), Moderately used by craftspersons, in Madagascar for dyeing textile (++), or frequently used by craftspersons, or local population in Madagascar for dyeing textile (+++).

1-3-3 Introduced dye plants

Less than 40% (fifty-one species) of the inventoried dye plants were introduced into Madagascar (Table 3). Craftspersons have used these introduced dye plants, learning from the experience of people from other countries. Examples of introduced dye plants used by local dyers are *Curcuma longa* (Zingiberaceae) and *Allium cepa* (Amaryllidaceae) that give yellow colors on fabrics [25] or henna, *Lawsonia inermis* (Lythraceae) widely used all over the world for hair dyeing [63] *Agave sisalana* (Amaryllidaceae) [25], *Punica granatum* (Punicaceae) [25], or *Bixa orellana* (Bixaceae) [24], all used for textile dyeing in Madagascar. The leaf extract of the well-known source of indigo dye *Indigofera tinctoria* (Fabaceae) (Figure 2c) also contains bioactive compounds such as quinoids, flavonoids, saponins, tannins, and steroidal terpenes phenol [64]. Another relevant species is the tree *Tectona grandis* (Verbenaceae), commonly known as teak in English, which has been introduced in the west of Madagascar in the 1970s. Its leaves are used by local people to dye fibers red in a hot dye bath. Methanolic and chloroformic extracts of *T. grandis* leaves are rich in carotenoids, condensed tannins, quinonoids and flavonoids. Flavonoids and quinones, present in the form of naphthoquinones and anthraquinones, are major secondary metabolites in *T. grandis* [65]. They explain the dyeing and medicinal properties of teak leaves [66,67]. Astringent tannins from teak leaves are used for treating intestinal disorders such as diarrhea and dysentery and the methanol extract inhibits bacterial growth; teak leaves are also useful in skin diseases, leprosy, inflammations, ulcers and also have hemostatic properties; they can be applied on a cut to stop bleeding [45,46].

Table 3. Main introduced dye plant species of Madagascar and their characteristics [24,25,30–35,48,49,56,68–94]

Botanical family	Plant species: *Scientific name* (Malagasy vernacular name)	Color	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Amaryllidaceae	***Agave sisalana* Perrine** (*tarandra, manasibe)*	Red, green	Roots	Antimicrobial, antiseptic	**Craft dyeing (+++)**	[13]
Amaryllidaceae	***Allium cepa* L.** (*tongolo)*	Yellow	Fruits	Antimicrobial,	**Craft dyeing (+++)**	[13]
Anacardiaeae	***Anacardium occidentale* L.** (*mahabibo, korosy)*	Brown, dark		-	Research stage (+)	(this study)
Anacardiaceae	***Mangifera indica* L.** (*manga)*	Black, red	Bark, seed, leaves	Antioxidant, free radical scavenging, antibacterial	**Craft dyeing (++)**	[13,48,49]
Arecaceae	***Cocos nucifera* L.** (*kijavo, voanio)*	Red brown		-	**Craft dyeing (++)**	(this study)
Asteraceae	***Cosmos sulphureus* Cav.**	Yellow, orange or red	Flowers	-	Research stage (+)	(this study)
Asteraceae	***Tagetes erecta* L.** (*mavoadala)*	Yellow, red orange	Leaves, stems, flowers	Antibacterial, analgesic, antioxidant	**Craft dyeing (++)**	[32,70,71]
Bixaceae	***Bixa orellana* L.** (*andriba)*	Orange to red	Seeds	Hypoglycaemic, antibacterial, antifungal	**Craft dyeing (++)**	[21,52,53]
Caesalpiniaceae	***Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd.**	Yellow, orange, red	Fruits, timber	Antibacterial	Research stage (+)	[21,22]
Caesalpiniaceae	***Caesalpinia decapetala* Alston** (*tsivakinombalahy)*	Red	Leaves	Analgesic, anti-inflammatory, antioxidant	Research stage (+)	[13]
Caesalpiniaceae	***Caesalpinia sappan* L.**	Yellow	Fruits, timber	Antimicrobial, antiviral, immunostimulant	**Craft dyeing (++)**	[21,54]
Casuarinaceae	***Casuarina equisetifolia* L.** (*filao, filaotra)*	Black, red	Bark, roots	Antibacterial	Research stage (+)	[13]
Chenopodiaceae	***Beta vulgaris* L.** (*betiravy)*			Antimicrobial	**Craft dyeing (++)**	[13]
Cyperaceae	***Schoenoplectus corymbosus* (Roth ex Roem. & Schult.) J. Raynal** (*ravindahatra, hazondrano)*	Red yellow	Bark	Toothache	Research stage (+)	[13]
Cyperaceae	***Scirpus corymbosus* L.** (*ravindahatra)*	Yellow, red	Bark	-	Research stage (+)	(this study)
Euphorbiaceae	***Acalypha emirnensis* Baill.** (*tsimbilaotra)*	Black	Leaves	-	Research stage (+)	(this study)
Euphorbiaceae	***Manihot utilissima* Pohl** (*mangahazo)*	Green	Leaves	-	Research stage (+)	(this study)

Botanical family	Plant species: *Scientific name* (Malagasy vernacular name)	Color	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Euphorbiaceae	***Ricinus communis* L.** (*kimanga, tseroka)*	Red	Whole plants	Anti-inflammatory, antiradical scavenging, antimicrobial	Research stage (+)	[13,55]
Fabaceae	***Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex Delile**	Black and kaki	Bark	Antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial	Research stage (+)	[32,48,49]
Fabaceae	***Albizia lebbeck* L.** (*bonaramena, kafe bonara)*	Red light brown	Timber	Asthma	**Craft dyeing (++)**	[13]
Fabaceae	***Sesbania sesban* (L.) Merr.** (*kintskintsana)*	Yellow	Whole plants	Antibacterial, antifungal, antiviral	Research stage (+)	[56,57]
Fabaceae	***Tamarindus indica* L.** (*madiro, lily, madilo)*	Ochre	Bark, flowers	Hypotension, inflammations, dysentery	Research stage (+)	[13,40]
Fagaceae	***Quercus nigra* L.**	Fruit	Purple	-	Research stage (+)	(this study)
Lythraceae	***Lawsonia inermis* L.** *(moina)*	Red au pink	Leaves, seeds	Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial,	**Craft dyeing (+++)**	[21,58]
Malpighiaceae	***Achyranthes aspera* L.** (*vatofosa)*	Bleu	Inflorescences and roots	Anti-allergic, antibacterial	Research stage (+)	[59]
Malvaceae	***Gossypium indicum* Lam.** (*landy hazo)*	Bright orange	Flowers	-	Research stage (+)	(this study)
Mimosaceae	***Acacia dealbata* Link** (*mimoza)*	Red	Bark	Antioxidant	**Craft dyeing (++)**	[13]
Mimosaceae	***Acacia mearnsii* De Wild.**	Red	Bark	-	Research stage (+)	(this study)
Moraceae	***Artocarpus heterophyllus* Lam.** (*finesy)*	Bright yellow	Leaves, heart wood	Antibacterial, anti-inflammatory, scavenger, antioxidant	**Craft dyeing (++)**	[13,22,24]
Moraceae	***Morus indica* L.** (*voaroy hazo)*	Grey, green	Fruits, leaves	Antioxidant, hypoglycemic	Research stage (+)	[60]
Musaceae	***Musa paradisiaca* L.** (*akondro)*	Blue, pink,	Leaves, fruits, roots	-		
Myrtaceae	***Eucalyptus globulus* Labill.** (*kininina)*	Orange, light brown, black	Leaves	Analgesic, anti-inflammatory	**Craft dyeing (++)**	[61]
Myrtaceae	***Eugenia jambolana* Lam.** (*rotra)*	Pink, black, red and light brown	Bark	Antioxidant	**Craft dyeing (++)**	[62]
Myrtaceae	***Psidium guajava* L.** (*goavy)*	Black, green	Leaves	Hypoglycemic, antibacterial, antimalarial	**Craft dyeing (++)**	[13]
Onagraceae	***Jussiaea repens* L.** (*volondrano, boribotry)*	Brown, green	Roots and leaves	Antioxidant, cytotoxic activity	Research stage (+)	[24,83,84]

Botanical family	Plant species: *Scientific name* (Malagasy vernacular name)	Color	Parts used	Biological activity	Development status on dyeing[a]	References
Onagraceae	***Ludwigia leptocarpa* (Nutt.) H. Hara** (*volovdrano, kiatondra, koronoka)*	Light yellow , brown grey	Leaves, stems and roots	Antioxidant, Antibacterial *(Ludwigia peploid*	Research stage (+)	[65,66]
Oxalidaceae	***Oxalis corniculata* L.** (*kodiaramborona, kisirasira)*	Green	Stems, leaves	-	Research stage (+)	[13]
Papilionaceae	***Indigofera arrecta* A. Rich.** (*netsy fotsy)*	Blue, grey	Leaves	Antiviral, antihyperglycemic	**Craft dyeing (+++)**	[21]
Papilionaceae	***Indigofera suffruticosa* Mill.** (*n*etsy)	Blue, grey	Leaves	Antimicrobial	**Craft dyeing (++)**	[21]
Papilionaceae	***Indigofera tinctoria* L.** (*netsy mena)*	Blue ,green, purple	Leaves	Antibacterial, antioxidant,	**Craft dyeing (+++)**	[33]
Passifloraceae	***Passiflora edulis* Sims** (*garana dia)*	Green, yellow citrus	Leaves, fruits	-	**Craft dyeing (++)**	[13]
Pinaceae	***Pinus spp.*** (*k*esika*)*	Reddish yellow darkish brown	Bark	-	Research stage (+)	(this study)
Poaceae	***Sorghum bicolor* (L.) Moench** (*ampemba)*	Red	Leaves, seeds, stems	-	Research stage (+)	(this study)
Poaceae	***Oryza sativa L.*** (*vary)*	Green	Straw	-	Research stage (+)	(this study)
Primulaceae	***Maesa*** *lanceolata* L. (*voarafy, rafy, radoka)*	Reds	Leaves	Antifungal, ovicidal and larvicidal activity	Research stage (+)	[67,68]
Punicaceae	***Punica granatum* Forssk.** (*ampongabe)*	Black, Green	Leaves, fruits	Antibacterial, antifungal, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory	**Craft dyeing (+++)**	[13]
Rosaceae	***Malus domestica* Borkh.** (*paoma)*	Red	Leaves, barks and timber	-	Research stage (+)	(this study)
Rutaceae	***Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle** (*tsoahamatsiko)*	Green	Fruits	Antimicrobial, antioxidant	Research stage (+)	[69,70]
Sapindaceae	***Cardiospermum halicacabum* L.** (*pok pok)*	Green	Leaves, seeds	Antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory	Research stage (+)	[71,72]
Solanaceae	***Solanum americanum* Mill.** (*anamamy)*	Green	Leaves	Antibacterial	Research stage (+)	[73]
Verbenaceae	***Tectona grandis* L.F.** (*k*esika*)*	Light brown yellow	Bark, roots, leaves	Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity	**Craft dyeing (+++)**	[74]
Zingiberaceae	***Curcuma longa* L.** (*tamotamo, vongotany)*	Yellow	Roots	Antimicrobial, anti-inflammatory, antibiotic, antioxidant	**Craft dyeing (+++)**	[21]

[a] Development status on dyeing: Research stage (+), Moderately used by craftspersons, in Madagascar for dyeing textile (++), or frequently used by craftspersons, or local population in Madagascar for dyeing textile (+++)

1-4 Dye plants uses: supporting literature review and new findings

Traditional dyers usually collect wild plants in their natural environment, dry and crush them, before storing the plant material at room temperature. Different parts of the plants like root, bark or trunk, wood (or heart of the trunk or stem), leaves, seeds, flowers or fruit can be used to dye fabrics. Bark (30%) and leaves (24%) are the plant parts most commonly used for dyeing purposes in Madagascar, followed by the fruit (12%), the root (11%), the flowers (8%), the seeds (8%), the whole plant (5%) and the wood (4%) (Figure 3). The bark and leaves (aerial parts of the plants) are favored because of their availability throughout the year. Bark is generally used because it is rich in tannins called proanthocyanidins. The bark of mangrove plants is also traditionally used for leather tanning. [95,96] It can also be rich in flavonoids, as in the case of *Harungana madagascariensis* [97]. These parts of the trees give generally red to brick red colors in the case of *Rhizophora spp*. or *Labourdonnaisia spp.* growing in the highlands of Madagascar. Leaves, for example those of *Mangifera sp.* or of *Tectona grandis*, are the best parts to use because they can be renewed easily and quickly. For *T. grandis* leaves, it is necessary to chop and grind the leaves with a drop hammer to extract all the sap before the decoction to optimize the extraction of the pigment [94]. Concerning the roots used as dyestuffs, such as those from *Morinda citrifolia* [98] or *Danais spp.*[99,100] and *Pentanisia spp*.[101] they have been commonly used in Madagascar to dye wild silk into orangey reds[6]. However, the last two endemic plants are becoming increasingly rare and are not used anymore by the local people. The roots of *Paracarphalea kirondron*, which give a yellow to yellow-orange color, are mainly used to dye raffia fibers in the western region of Madagascar; only the adventitious roots of *P. kirondron* can be collected to prevent the death of the plant. Fresh roots are cut into small pieces and put directly into a cooking pot on a wood fire. Once the boiling point is reached, textile fibers are immersed in the bath which is kept boiling for a few hours until the required color is obtained. Interestingly, experiments made by traditional dyers show that leaving the roots to dry in the sun or in the shade will reduce the dyeing power of this species. In Madagascar, some plant rhizomes, underground stems, can also be rich in dyeing molecules: for example, curcumin in *Curcuma longa* [7].

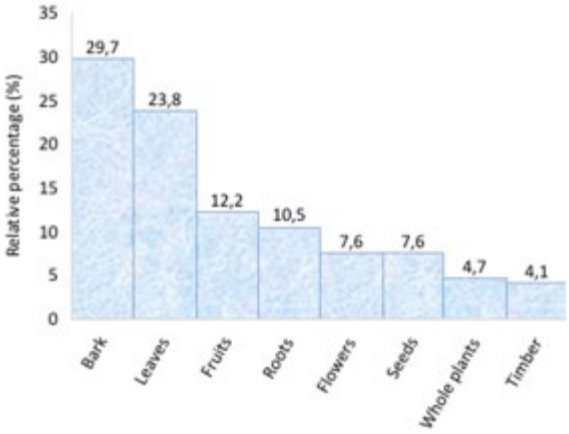


Figure 3. Plant parts used for their dyeing properties (%* of the 128 dye plants species inventoried)

Most traditional dyers prepare their natural dye baths by a maceration or decoction of the dye plants in water [102]. However, several different traditional techniques can be used to extract and fix the natural colorants onto the fabrics in Madagascar: (i) cold maceration in the juice of the plants or in the pre-extracted dye; (ii) dyeing with warm water; (iii) hot dyeing (simmering water or boiling water depending on the properties of the plant); (iv) dyeing with fermentation processes like the techniques used with Musa sp. ; (v) and dyeing by oxidation, a method used for example with Indigofera arrecta to turn from light blue to dark blue and purple colors. Mordanting, which consists in using various substances, either mineral (sludge, metal oxides...) or organic (animal fats, plant decoctions...) to facilitate color fixation and to vary the shades of color obtained [6] is also a technique traditionally used by local dyers to dye fabrics. According to the techniques implemented by the local dyers, different shades can be obtained from the dye plants inventoried in this study. Red (34%) and yellow (20%) are the most commonly obtained shades, followed by black (19%), green (11%), brown (9%) and blue (6%) shades (Figure 4).

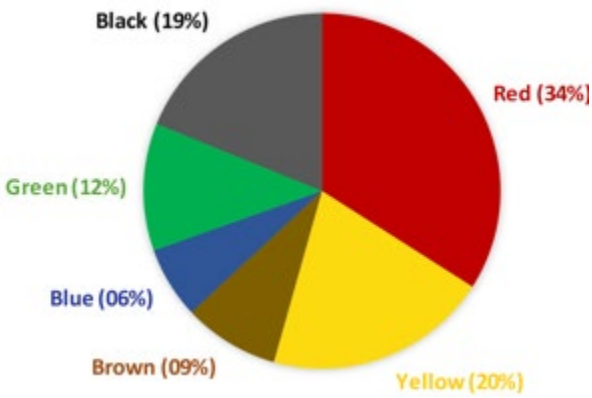


Figure 4. Range of colors obtained from dye plant species of Madagascar (%* of the 128 dye plant species inventoried in Madagascar)

Ranges of reds are often obtained from several species of Rubiaceae which contain red hydroxyanthraquinones [9] or from 'tannin trees' such as species of Rhizophoraceae from mangroves. [30] However, it is difficult to produce a stable and specific color because the traditional extraction and dyeing processes do not always follow well-defined parameters. As an example, the red color obtained with the bark of *Acridocarpus excelsus* [30] on fibers depends on the duration of the dye bath and the quantity and nature of the ash used as a mordant to turn the color from a brick red to a dark red color. Furthermore, some of the most interesting dyestuffs become often scarcer as in the cases of *Danais spp.* and *Pentanisia veronicoides* [6]. The yellow and orange tones come from many dye plants rich in flavonoids and carotenoids [103]. Even though most plants, especially leaves, have a green color (due to the presence of chlorophyll), this color is the most difficult to achieve naturally on fabrics because chlorophyll do not stand high temperature processing. However, a species of *Psiadia* has been found to give a stable green with a hot dye bath and is widely used in the Arivonimamo region of Madagascar. In nature, few sources of blues are available. The blues colors obtained by local dyers are not true blues but tend towards other nuances, for example, the dark bluish color obtained from banana roots [25]. The main dye plants giving a true blue color are *Indigofera* species, such as *I. tinctoria* [6] and *I. arrecta* [64] as well as *Cremaspora trifloral* [30] a species used generally for coloring one's face and body.

The color of the dye baths can also vary according to several factors: the chemical nature of the pigments contained in the plants, the substrates to be colored, the pH of the solution (acid, neutral or basic), and the quantity of raw materials or extracts used. By varying the mordanting process, heating time or the sequence of the dye baths, different colors can be obtained from a single plant or a combination of different dye plants. Let us give some examples of three possibilities: (i) firstly, a dye bath made with bark of *Terminalia mantaly* gives a black color after treating the fabrics with ferruginous mud. This coloration is explained by the reaction between the tannins contained in the bark and the ferrous elements of the mud, (ii) secondly, the dyeing bath made with the leaves of Indigofera tinctoria turns from light blue to dark blue to purple depending on heating time, (iii) and thirdly, a consecutive bath of raffia fiber in *Indigofera arrecta* (blue color bath) then in a bath of *Allium cepa* (yellow bath) gives green colors on the fabrics. Many different colors, primary and secondary colors of the chromatic circle, and many more nuances from various combinations of plants and processes can be obtained from this Malagasy plant biodiversity (Figure 5).

Interestingly, more than 80% of the dye plants inventoried in this study have active substances that give them both dyeing and medicinal properties. Such is the case of *Psiadia altissima* [32,104] and *Harungana madagascariensis* [97] which are used in the western region of Madagascar as antibacterial agents [105–107]. Hence, it is interesting from an economic point of view because if one or several of these dye plants were grown on a large scale, it might bring more added value since each plant has more than one use.

Figure 5. Examples of dye plants from Madagascar, color produced according to primary and secondary color of the color circle

For instance, *Paracarphalea kirondron* is widely used as ornamental because of the bright red color of its flowers that embellish the gardens and the dyeing properties come from the adventitious roots. Cultivation of *P. kirondron* as ornamental plants can therefore be associated with a production of adventitious roots for its dyeing properties. In the case of *Bruguiera gymnorhiza* and *Eucalyptus spp.*, the bark is used for their dyeing properties and the wood is also used as a lumber or firewood [108].

These dyeing plants have many interesting properties not only as a source of pigments but also in other fields. Consequently, socio-economic studies should be carried out before any extension of their exploitation as dyestuffs. With the aim of using these dye plants as new sources of coloring molecules, the parts of the plant species used for their dyeing properties are very important to avoid excessive deforestation. It will be necessary to establish good harvesting and cultural practices that will allow the sustainable use of these wild resources and protect the environment in which those plants are growing in Madagascar.

1-5 Chemical composition of the natural dyestuffs in relation to their biological activities

Natural dyes and pigments are those that are found in biological systems (plants, animals, and microorganisms) or that which can be obtained from inorganic sources such as minerals. A classification chart of natural colorants is proposed in the Figure 6 on the basis of natural sources, chemical structures, technique employed for their application, and dye application in industries. Unlike synthetic colorants, natural colorants from plants are usually not a single molecule but a mixture of closely related chemical compounds. However, a particular colorant may be extracted and purified from the mixture to be used alone. Many classes of colorants are present in wild or cultivated plants in Madagascar, with indigoids, [64,109] anthracenes (quinones) [10,110,111], flavonoids [112], carotenoids [113], and condensed tannins [114] being relevant examples as shown in Table 4. The presence of these molecules that absorb light in the visible region (380 — 700 nm) provides a spectrum of colors ranging from yellow to black.

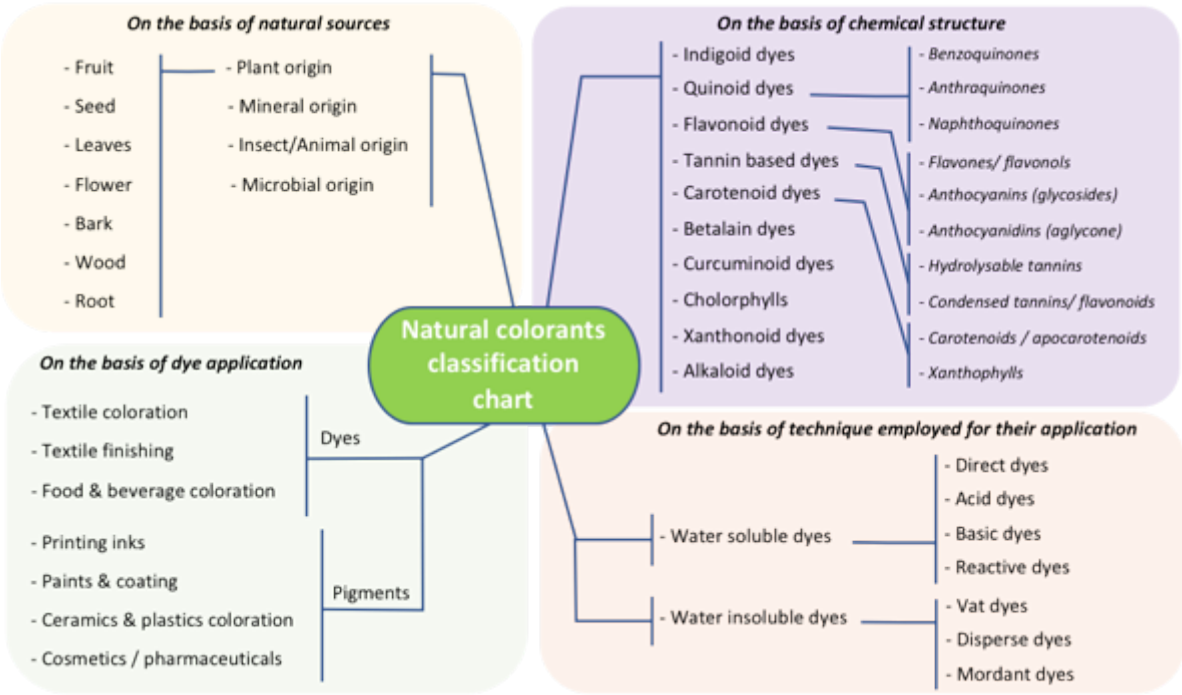
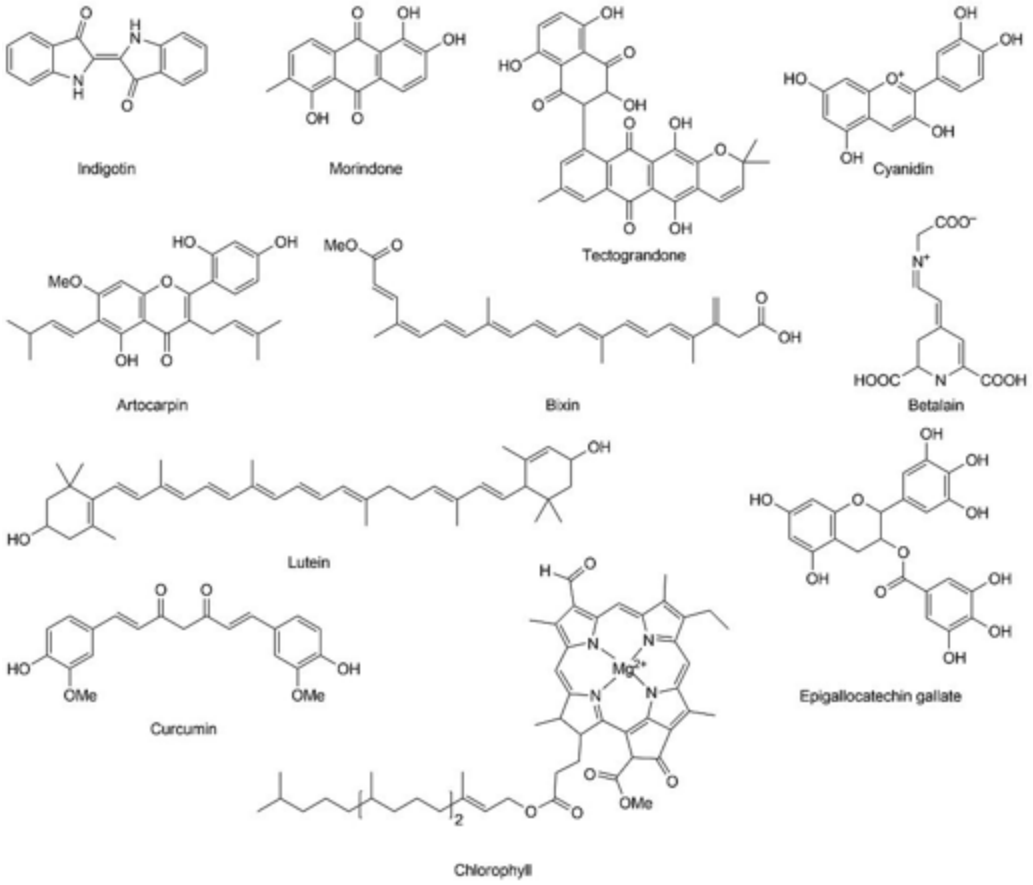


Figure 6. Classification chart of natural colorants.

Table 4. Major chemical families of dyes and pigments found in Madagascar's dye plants.



Chemical families	Dye or pigment	Plant origin	Dye color	Example of applications
Indigoids	Indigotine	Indigo (*Indigofera tinctoria*)	Blue – Purple	Textile dyeing (CI Natural Blue 1, C.I. 75780)
Quinones (Anthraquinones)	Morindone	Noni (*Morinda citrifolia*)	Golden yellow	Textile dyeing
Quinones (Naphtoquinones)	Tectograndone	Teak (*Tectona grandis*)	Red	Textile dyeing
Flavonoïds (Anthocyanin)	Cyanidin	Hibiscus (*Hibiscus sp.*)	Redder in low acid pH	Textile dyeing
Flavonoïds (Flavone)	Artocarpin	Jackfruit (*Artocarpus integer*)	Yellow	Textile dyeing
Carotenoïds (Apocarotenoid)	Bixin	Annato or roccou *(Bixa orellana*)	Reddish orange	Food coloring (E-160b, US.CFR n°73.30)
Carotenoïds	Lutein	Aztec marigold (*Tagetes erecta*)	Golden yellow	Food coloring (E-161b, US.CFR n°73.295
Tannins	Epigallocathecin gallate	Mangrove wood (*Rhizophora sp.)*	Red	Textile dyeing

Curcuminoids	Curcumin	Turmeric (*Curcuma longa*)	Yellow orange	Food coloring (E-100, US.CFR n°73.600)
Pyrrole derivatives	Chlorophyll A	Green leaves	Green	Food coloring (E 140, not allowed in the US)
Betalains (Betacyanins)	Betalain	Prickly pear (*Opuntia ficus-indica*)	Red	Wool dyeing

In vivo they are often associated with antioxidant effects or the transmission of signals or energy in cells. Some novel naturally occurring colorants of plant origin are already approved for use in Human food either in the European Union (EU) or United States (US). Relevant examples include tomato lycopene extract and tomato lycopene concentrate, annatto extract (red dye from seeds of *Bixa orellana*), lutein (from Aztec marigold (*Tagetes erecta*) meal and extract), anthocyanins from grapes (*Vitis vinifera*) and blackcurrant (*Ribes nigrum*), betanin from beetroot (*Beta vulgaris*) red powder, etc. All the color additives of plant origin approved for use in Human food in the EU and/or the US are listed in the Table 5.

Table 5. List of color additives of plant origin approved for use in Human food in the European Union (EU) and/or in the United States (US)

(according to regulations from the European Commission, and US Food and Drug Administration).

EU name	E-number	US name	US.CFR	Plant origin	Main pigments	Colors
Color additives [a]:						
Curcumin	E 100	Turmeric	73.600	*Curcuma longa*	Curcuminoids	yellow
		Turmeric oleoresin	73.615			
Chlorophyll(in)s	E 140	Not allowed in the US	-	Green leaves	Pyrroles derivatives	green
β-Carotenes	E 160a(ii)	Carrot oil	73.300	*Daucus carota*	Carotenoids	yellow
Annatto	E 160b	Annatto extract,	73.30	*Bixa orellana*	Carotenoids	orange-reddish
Annatto/Bixin	E 160b(i)				Carotenoids	orange-reddish
Annatto/Norbixin	E 160b(ii)				Carotenoids	orange-reddish
Paprika extract	E 160c	Paprika	73.340	*Capsicum annuum*	Carotenoids,	red-orange
Paprika oleoresin	E 160c(i)	Paprika oleoresin	73.345		Xanthophylls	
Lycopene	E 160d(ii)	Tomato lycopene extract	73.585	*Solanum lycopersicum*	Carotenoids	yellow to red
		Tomato lycopene concentrate	73.585			
β-apo-8′-carotenal	E 160e	β-apo-8′-carotenal	73.90	*Spinacia sp., Citrus sp.*	Carotenoids	orange
Lutein	E 161b	Tagetes (Aztec marigold) meal	73.295	*Tagetes erecta*	Xanthophylls	golden yellow
Zéaxanthine	E 161h(ii)	-	-	*Tagetes erecta*	Xanthophylls	orange
Beetroot red	E 162	Dehydrated beets (beet powder)	73.40	*Beta vulgaris*	Betalains	red
Anthocyanins	E 163	Grape color extract	73.169	*Vitis vinifera*	Anthocyanins	red
Anthocyanins	E 163(ii)	Grape skin extract	73.170	*Vitis vinifera*	Anthocyanins	red

EU name	E-number	US name	US.CFR	Plant origin	Main pigments	Colors
Anthocyanins	E 163(iii)	Blackcurrant juice color	73.250	*Ribes nigrum*	Anthocyanins	dark purple
Saffron	(no E-numbe	Saffron	73.500	*Crocus sativus*	Carotenoids	yellow-orange
Not allowed in the EU	-	Toasted partially defatted cooked cottonseed flour	73.140	*Gossypium sp.*	Flavonoids	brown
Coloring foods in the EU or fruit/ vegetable juice allowed as color additives in the US [b]:						
Grape	-	Fruit (Grape) juice	73.250	*Vitis vinifera*	Anthocyanins	dark purple
Black currant	-	Fruit (Blackcurrant) juice	73.250	*Ribes nigrum*	Anthocyanins	dark purple
Blueberry	-	Fruit (Blueberry) juice	73.250	*Vaccinium corymbosum*	Anthocyanins	purple
Chokeberry	-	Fruit (Chokeberry) juice	73.250	*Aronia spp.*	Anthocyanins	red, purple
Cherry	-	Fruit (Cherry) juice	73.250	*Prunus avium*	Anthocyanins	red, purple
Elderberry	-	Fruit (Elderberry) juice	73.250	*Sambucus spp.*	Anthocyanins	red, purple
Purple potato	-	Vegetable (Purple potato) juice	73.260	*Solanum tuberosum*	Anthocyanins	purple
Red radish	-	Vegetable (Red radish) juice	73.260	*Raphanus sativus*	Anthocyanins	red
Pumpkin	-	Vegetable (Pumpkin) juice	73.260	*Cucurbita spp.*	Carotenoids	orange
Carrot	-	Vegetable (Carrot) juice	73.260	*Daucus carota*	Carotenoids	orange
Black/purple carrot	-	Vegetable (Black carro juice	73.260	*Daucus carota*	Anthocyanins,	black/purple
Not allowed in EU	E 163(iv)	Vegetable (Purple corn) juice	73.260	*Zea mays*	Anthocyanins	dark purple
Not allowed in EU	E 163(v)	Vegetable (Red cabbage) juice	73.260	*Brassica oleracea*	Anthocyanins	red
Other color extracts not allowed neither in the EU or in the US [c]:						
Gardenia yellow pigmer	E164 (permitted in Japan/ China)			*Gardenia jasminoides*	Carotenoids	red, yellow
Onion	-	-		*Allium cepa*	Flavonoids	brown
Safflower	-	-		*Carthamus tinctorius*	Quinochalcone, C-glycoside	red, yellow

[a] Color additives approved for use in Human food: substances not normally consumed as a food or a characteristic ingredient of food that c be used to add or restore color to Human food, allowed as food additives in the EU, or as color additives exempt from certification in the US for the coloring of Human foods; [b] Foods with coloring properties (so-called 'Coloring Foods') used in food processes due to their coloring properties (not a food additive) in the EU, or fruit juice or vegetable juice allowed as color additives exempt from certification in the US for the coloring of Human foods.

1-5-1 Indigoid dyes

Some species of the Indigofera genus occurring naturally in Madagascar, such as *I. tinctoria*, *I. arrecta* (locally called “netsy mena”) and *I. longiracemosa* (native to Madagascar) [30,64,115] can produce the blue dye indigotin (C.I. Natural Blue 1, C.I. 75780) obtained after conversion of the glycoside indican (indoxyl-beta-D-glucoside) naturally presents in the leaves of the Indigofera plants. The glycoside indican is hydrolysed by enzymatic reactions to indoxyl and then oxidized to form the indigo blue called indigotin [64]. Indigotin is not soluble in water and has to be reduced to its water-soluble leuco form through a reduction process; it is in this water-soluble form that indigo can be used for dyeing textiles [116]. When the textile fiber has been impregnated with the leuco form of indigo, it is oxidized by atmospheric air to its original blue indigotin structure. The leaves of different

Indigofera spp. are used in different regions of Madagascar to dye natural fibers either in a direct bath dyeing or in different vat processes using the extracted pigment [24]. The traditional process used to extract natural indigo consists of first letting the leaves and branches steep in water; then, the liquor thus obtained is separated from the plant material and oxidized by prolonged heating to precipitate the blue indigo pigment. Natural indigo has excellent colorfastness properties [6]. Natural indigotin is similar in structure to synthetic indigotin (C. I. Vat Blue1, C.I. 73000) but natural indigo usually also varying proportions of the purplish indirubin colorant formed during the extraction process, which may impart rich reddish to purple tones to some textiles dyed with natural indigo [116]. Different *Indigofera spp.* are also used as medicinal plants used by Indian people for the treatment of asthma or for the promotion of hair growth. Some studies of methanol extracts have shown they had an antibacterial and strong antioxidant properties observed, which were rated as higher than the ascorbic acid standard [117].

1-5-2 Quinonoid dyes

They are related to compounds with a quinoid skeleton. The quinoid structure is widespread in higher plants and the quinones presently include over 1200 naturally occurring compounds [109]. Quinones have important biochemical and physiological functions in biological systems. They contribute to electron transport between respiratory complexes, exert antioxidant activity that inhibits lipid peroxidation of membranes, and can also regulate gene expression and signal transduction within cells. These biomolecules which are derived from isoprenoids, represent a diverse class of phenolic compounds [17]. The three main groups of naturally occurring quinones are benzoquinones, naphthoquinone [118] and anthraquinones [9]. These natural dyes produce yellow, orange, red, or reddish-brown to purple colours. In contact with salts, they also produce purple, blue, and green colors.

The most famous anthraquinone plant colorant used for textile dyeing is the yellowish-red morindone [8] present in the roots of *Morinda citrifolia*. Several red to orange hydroxyanthraquinone derivatives from plants play an important role in textile dyeing, printing, and cosmetics in other parts of the world. However, they are not used as food colorants in Europe nor in the US. But they seem to have or have had some uses in Japan in confectionery, or to color boiled fish and soft drinks [9]. The chemical diversity of this class of colorants and the health-promoting benefits (antimicrobial, antioxidant, anticancer, immunomodulatory, cytotoxic or carcinogenic activities) that have attributed to some naturally-occurring hydroxyanthraquinones (e.g. purpurin, emodin, rhein, physcion, damnacanthal…) have recently drawn the attention of industries in such fields as textile dyeing, food coloring and pharmaceuticals [9]. Recent studies clearly indicate that several hydroxyanthraquinone dyes of plant origin, might be considered as potent sources of novel anticancer drugs and, at least, promising anti-leukemic agents, anti-invasive agents for human pancreatic and gastric cancers chemotherapy, and antitumor agents for hepatocellular carcinoma, bladder cancer, and others (the activity mechanism being based on caspase cascade and induction of apoptosis) [111].

Naphthoquinones are also secondary metabolites widespread in plants comprising a wide variety of chemical structures based on the naphthalene skeleton. The leaves of the tree *Tectona grandis*, introduced into Madagascar, are traditionally used for textile dyeing. They contain the red naphthoquinonic colorant tectograndone traditionally used for textile dyeing [119]. Several plant species producing red to purple naphthoquinone dyes (e.g. alkannin, angelylalkannin, shikonin…) are of great interest for the natural red dye market. This is the case of several species of the *Alkanna, Onosm*a, *Arnebia* and *Lithospermum* genera of the Boraginaceae family which are widely distributed from Europe to Eastern Asia. These dye-yielding plants are used as dyes for fabrics, cosmetics, and food and as traditional medicines against ulcers, inflammation, and wounds. Different anticancer properties have been published in recent years [6]. Around the world, several other naphthoquinones are used as cosmetics or hair dyes, such as the colorants of henna (e.g. the lawsone, CI Natural orange 6, CI 75480) and of walnut shell extracts (e.g. the naphthoquinone juglone, CI Natural brown 7, CI 75520). Interestingly, some of these naturally-occurring naphthoquinone dyes from Boraginaceae exhibit similar biological activities to those of natural anthraquinone dyes: the known spectrum of activity of naphthoquinones includes antibiotic, antiviral, anti-inflammatory, antiproliferative, and antitumoral effects [118,120]. The induction of cell death by juglone is related to the p53 oxidation, DNA damage by phosphorylation of the histone variant H2AX, and consequent inhibition of transcription and of mRNA [121,122]. In the case of other naturally-occurring naphthoquinones, the main interest lies in their broad spectrum of pharmacologically relevant properties, with important examples being the discovery of the anticancer naphthoquinone compounds β-lapachone, lapachol, and lawsone.

Quinochalcone C-glycosides form another group of natural quinonoid dyes of interest. They are quinone-containing chalcones. Almost all of the red and yellow pigments derived from the flowers of *Carthamus tinctorius* (Asteraceae) (Natural Red 26 & Natural Yellow 5) are classified as members of this C-glucosylquinochalcone family. The major red pigment is carthamin [123]. The water-soluble yellow pigments of quinochalcone C-glycosides have strong commercial value as cost-effective valuable colorants which are currently added to juices, yogurt, gelatin desserts, and candy to improve the aspect of beverages, dairy products, and confectionaries [124]. Recently, quinochalcone C- glycosides were found to have multiple pharmacological activities (antioxidant, hepatoprotective, anti-diabetic, and anti-tumoral activities), which has drawn the attention of many researchers to explore these compounds [123].

1-5-3 Flavonoid dyes

Flavonoids, a group of natural substances with variable phenolic structures, are water-soluble compounds widely present in plant species. They are found in fruits, vegetables, grains, bark, roots, stems, flowers, etc. The basic structure of these molecules is composed of fifteen carbon atoms which contain two phenyl radicals connected to another carbon bridge to form a third ring. Anthocyanins, such as the red colorant cyanidin present in Hibiscus (*Hibiscus sp.*) flowers, used as textile dyes in

Madagascar, are the most common flavonoids in plants [109,125]. Anthocyanins are glycosides of anthocyanidins. Though the number of known anthocyanidins is quite limited (around 25), several hundreds of anthocyanins can be formed through various processes of glycosylation and acylation. [109] Anthocyanins are responsible of most of the yellow, orange, pink, red, magenta, and purple colors of flowers, vegetables and fruits [109,125]. Anthocyanin colors change with pH. At low pH (around 3), the anthocyanins are most strongly colored, exhibiting their well-known purple–red color. Around pH 5, anthocyanins turn almost colorless, and at neutral and alkaline pH the color goes from blue to green. [126] Some anthocyanins are already permitted as food colorants in the EU (e.g., E163: Anthocyanins) and in the US (such as US.CFR 73.169: Grape color extract; 73.170: Grape skin extract; and 73.250: Blackcurrant juice color).

Then flavones, e.g. the artocarpin present in jackfruit (*Artocarpus integer)* [127] and luteolin (CI Natural yellow 2, CI 75590 – a very important yellow dye plant in Europe) the main colorant in the weld herb (*Reseda luteola*) [128] are among the best sources of fast yellow dyes for textiles. They also have very good fastness properties [14]. Some flavones derivatives, flavonols (such as quercetin from leaves of the Malagasy plant *Catharanthus roseus*, rutin from *Cussonia racemosa* from Madagascar, or quercetagetol from petals of *Tagetes erecta*) also give different shades of yellow [112].

Flavonoids are now considered as an indispensable component in a variety of nutraceutical, pharmaceutical, medicinal and cosmetic applications. These natural products are well known for their beneficial effects on health. This is attributed to their anti-inflammatory, anti-mutagenic, anti-carcinogenic properties and anti-oxidative [112]. Flavonoids are usually extracted using water, methanol or ethanol [129].

1-5-4 Tannin-based dyes

Condensed tannins are polyphenolic compounds, more precisely flavonoid polymers consisting of oligomers of non-hydrolysable tannins. They are composed of proanthocyanidin polymers which consist of combinations of flavan-3-ol molecules such as catechin. The tannins found in red wines are examples of these condensed tannins [114,130]. One example of plant sources rich in tannin-based dyes from Madagascar is the bark of the mangrove trees of the Rhizophora genus which contains, for example, the red compound epigallocatechin gallate [96] and other tannins that should be identified. The tannin-based dyes do not necessary need mordanting processes to get fixed onto textile fibers, the tannins themselves acting as efficient plant mordants. If used however in combination with various metallic salts, they can provide a wider range of brown, reddish, or black shades with very good fastnesses.

1-5-5 Carotenoid dyes

These are lipid-soluble colorants, responsible for the orange-reddish, and yellow colors of many flowers and fruits [131]. Carotenoids occur in the chromoplasts in plants and two major types of carotenoids can be observed: carotenes and xanthophylls (oxygenated carotenoids). They usually consist of 40 carbon atoms, with a structure characterized by an extensive conjugated double bond system that determines the color: as the number of conjugated double bond increases, the color changes from pale yellow, to orange and then to red [113]. In that group, bixin and norbixin, the orange-red colorants in the seeds of annatto, *Bixa orellana*, are used for dyeing cotton, wool, and silk in Madagascar, while they are also widely used in other parts of the world as food-grade colorants in butter and cheese processing [11]. Annatto is the source of the orange-red colorant E-160(b) (US.CFR n°73.30) [11]. The golden yellow colorant lutein, the main carotenoid extracted from the petals of *Tagetes erecta* (Aztec marigold) is also permitted as food colorant in the EU, while in the US only the Tagetes erecta meal and extract (US.CFR 73.295) is permitted as color additive for use in Human food [12]. Yellow dyes derived from carotenoid colorants mostly have rather poor fastness properties on textile fibers, unlike many yellow flavonoids. Red carotenoids from plants are quite frequent. Natural carotenoids exhibit different health benefits confirmed by recent studies: strong antioxidant property, anti-inflammatory effects, anti-obesity, anticancer, prevention of cardiovascular diseases, of night blindness, and of liver fibrosis, etc. [111,118,132,133].

1-5-6 Others plant dyes (curcuminoid, betalains…)

Other less common groups of natural colorants [68-134] include the curcuminoid dyes present in the rhizome of turmeric *Curcuma longa* [135] the main one being the yellow-coloured curcumin (E 100; US.CFR 73.600, 73.615). Other examples are xanthonoid dyes such as mangiferin present in *Aphloia theiformis*, pyrrole derivatives such as chlorophyll [109] alkaloid dyes such as berberine present in the roots of *Thalictrum flavum* [136] and betalain dyes [137]. These are water-soluble colorants which differ from anthocyanins, particularly, because of the presence of nitrogen in their chromophore group [137]. Betalains include two groups of colorants, both water-soluble: the yellow betaxanthins and the red–purple betacyanins [137]. Betalains are found in other plants beside beetroot red (*Beta vulgaris*); However, beetroot red is the only plant source of betalains colorant permitted in the EU and in the US (Table 5). Compared to anthocyanins, beetroot red color (E-162; US.CFR 73.40) is more purple and brighter, and the color hue does not change with the pH in the 4 to 7 range [138]. The major disadvantage of beetroot red color is its low heat stability, which represents an obstacle for textile applications [138]. In Madagascar, however, the red dye betanin contained in the mature fruit of prickly pear called *Opuntia ficus-indica*, is used for wool dyeing [6]. Therefore, the dye plants of Madagascar that are sources of betalains need to be further studied as potential sources of coloring bioactive compounds in food coloring, as dietary antioxidant components which may have beneficial effects on consumers' health.

Chlorophyll molecules (pyrrole derivatives) are colorants which are responsible for photosynthesis in plants. There are two forms of chlorophyll (a and b) which only differ in the substitution pattern of the tetrapyrrole ring [139,140]. Chlorophyll molecules, like chlorophyll a in green leaves, belong to the same chemical class than vitamin B12 but there is a small difference between them, namely the presence of a magnesium ion attached in the former [139,140]. Chlorophyll is soluble in fats and oils and can be used as food colorant (additive E-140) in the EU when extracted from edible plants, such as nettle, grass, or alfalfa [109] while it is not allowed as color additive in the US. However, because of the lability of the coordinated magnesium ion and the color change induced, the uses of chlorophylls as colorants remain limited, and especially since they have a low thermal stability, they are rarely used to dye textiles [109]. For textile dyeing, the color green is often obtained by top-dyeing an indigo dye with various yellow dyes of different chemical groups (flavonoids, carotenoids, curcuminoids…) [25].

1-6 Conclusion and future prospects

The use of dye plants as biological sources of natural colorants for both food and non-food applications (textiles, cosmetics and others) is a promising field of research and development, considering the ever-rising demand by consumers to replace their synthetic counterparts. Malagasy dye plants are readily available raw materials that could be cultivated to produce natural colorants for several different sectors of industries, because of the diversity of their chemical profiles and the large gamut of colors they can provide. The long history of well-known uses of many dye plant species demonstrate that they could be cultivated to produce a range of natural substances, besides natural colorants. There is a clear need, nevertheless, to continue further documenting traditional knowledge on the dye plants of all regions of Madagascar before such precious knowledge vanishes to future generations. This study has already identified a large number of important dye plants used by traditional dyers in Madagascar. More than 128 dye plants – of which 34 are endemic – have been inventoried. However, the lack of scientific records on the uses of such important dye plants of Madagascar such as *Acridocarpus excelsus, Paracarphalea kirondron*, *Harungana madagascariensis*, *Xylocarpus granatum*, *Psiadia altissima*, *Rhizophora mucronata*, *Ceriops tagal*, and *Woodfordia fruticosa*, shows that more phytochemical and pharmacological studies are necessary to find improved applications of the natural colorants from these plants in the textile industry, as well as in the food industry and in other industrial sectors (cosmetics, pharmacological industry, paint and coatings, packaging and plastics). The present work provides a baseline for future research into the beneficial dyeing properties of such natural resources.

Appearance, consumer preferences and safety standards of textiles, foods, cosmetics and pharmaceutics coupled with economics and application technology will always play a key role in the success of new products containing natural colorants. The commercial success of a natural colorant of plant origin depends on the approval of regulatory agencies, market acceptance, and the availability of investment capital. At present, the production of natural colorants from plants is subject to the following limitations which slow down the expansion of this sector from the local to the global level:

- *The limited availability of the raw materials and the high cost of their production*. Several factors concur to the final assessment that natural products mostly involve expensive eco-extraction processes to obtain them from the biological resources. Firstly, the raw materials are bound to be expensive whether the plants are collected from natural environment or cultivated. In the case of Madagascar, the production cost of natural dyes from direct harvesting are often high as compared to production costs from agroindustrial waste and byproducts. Furthermore, for commercial exploitation, the first selection criterion of dye plant species from Madagascar should be the sustainability of collection and cultivation techniques. Direct commercial use of native plant colorants without previous ascertainment of sustainability issues seems utterly undesirable and counterproductive since it would lead to overexploitation and the extinction of the natural resources. There is an urgent need for economic evaluation and environmental monitoring studies that would explicitly focus on potential natural dye crops that are not commercialized, but rather harvested and consumed directly by indigenous households. The standardized collection from local inhabitants of information on the indigenous natural dye sources that can be harvested in every particular environmental conditions would be the first step in assessing the present environmental and socio-economic reality. Based on such enquiry, national biodiversity conservation strategies and good harvesting practices and reforestation programs should be defined for those dye plants that are already used by local populations, as well as for all the other plants that are still collected in their natural environments to ensure the sustainability of their uses. In addition to this first step, a combination of different sourcing strategies (obtaining the dye plants from direct forestry harvesting, promoting dye crops from local cultivation, and valorizing the waste products (leaves, bark) from the timber and wood industry, etc.) could to some extent help minimize the costs. The average production cost of the total resulting color portfolio could then possibly approximate the range of production costs of synthetic colorants.

- *The difficulty of use and the relative instability in time (insufficient fastness to light, hue sensitiveness to pH, temperature and solvents) of natural colorants.* These have been put forward as the first encountered limitations to industrial uses of the conventional natural colorants of plant origin (carotenoids from carrot, anthocyanins from beetroot and grape juice, etc.). Most of the currently used natural colorants from plants are sensitive to changes in pH and temperature and prone to degradation by light, heat and oxygen. Ascertaining the color stability of natural colorants being a prerequisite for their successful application, a number of researchers have focused on improving the color stability of different classes of natural food colorants. Furthermore, dyeing of fabrics with natural dyes come with challenges such as reduced color gamut and insufficient color fastness of the dyed textiles. Synthetic dyes can produce fluorescent tones impossible to obtain from natural dyes [141]. Some natural dyes also show insufficient covering power. Nevertheless, many dye plants have been recently reported as capable of producing fast dyes and pigments in textile applications using improved mordanting [6,25,142] or extraction techniques [143]. In food industries, new techniques of extractions and pre-treatment can also

increase the stability of colorants from natural sources [144]. Any process based on the use of natural colorants will obviously have to involve environmentally sound processing techniques while the overall process will have to be competitive with regard to the use of chemicals, energy, to the processing of wastes and wastewater and to overall costs.

- *Information about their biological and especially toxicological properties*. Natural colorants extracted from plants, are generally composed of many types of molecules because plant cells contain other secondary metabolites. Natural colorants derived from different sources with active functional components have shown high biological activities, and exhibited different properties depending on the nature of the colorants present. This makes them excellent coloring materials for functional health foods and natural cosmetics. However, the lack of sufficient data regarding the toxicology of natural colorants contained in many underutilized plants constitutes a barrier to the development of this sector both in the food industry and in the other non-food applications (including cosmetics or pharmacological products). For instance, in the food industry, there has been much interest in developing of new natural colorants in the continuing replacement of synthetic food dyes because natural products from plants are associated with quality and health promotion, whereas synthetic pigments are critically assessed by consumers. A number of reports are available on exploitation of the potential of new sources of food colorants from plant origin [10,13]. However, some people can be intolerant to some natural colorants from plants (allergic reaction) [145] and some of them, such as madder red, formerly used as food colorant in Japan, have been reported to be toxic or carcinogenic [146,147]. In most countries, strict regulations have been formulated regarding the use of food additives, including colorants. In 2009, a research made by the European Food Safety Authority (EFSA) about food colorants caused some food colorants to be taken off from the market or the amount of their acceptable daily intake to be significantly reduced [148,149]. Although a wealth of information is now available on new sources for food colorants, any new coloring source would require a rigorous assessment of established safety tolerances and should meet the economic, legal and aesthetic requirements, for approval by food regulatory authorities. In addition to their primary function of improving the visual quality of food products, naturally derived food colorants from plants may improve the nutritional value of the target food. These prospective nutraceutical properties may play an increasingly important role in choices between natural or synthetic food colors, at a time when human – and pet animals – diet is more and more based on processed foods. Cosmetic industry is an even more sensitive sector because manufacturers often use other additives to fix the color. In a study of henna tattoo from *Lawsonia inermis* [150] in cases of dermatitis, Kluger [63] showed that allergic reactions came from paraphenylenediamine (PPD), an additive used to reduce the application time and to intensify the color of the tattoo. It is therefore necessary to continue looking for more natural sources of dyes with high efficiency and desirable properties in textile applications, without using other chemical additives. A number of reports are now available on natural colorants for imparting multifunctional properties to textiles such as antimicrobial, insect repellent, deodorizing and UV-

protective properties [4]. However, despite the facts that numerous patents have been accepted, the launching of new products on the market remain highly restricted by the Institutes for Public Health Surveillance (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) in Europe, or the US Food and Drug Administration (FDA) in the US). Before authorizing any natural products, clinical tests on allergic, dermatologic or endocrine responses properties are required. Moreover, in the case of cosmetic products, each ingredient, and the final cosmetic product must have been authorized by the appropriate authority. These regulation elements are one of the major points slowing down the use of plant colorants. Nevertheless, a market is growing for natural colorants and bioingredients and for new offers of natural dyestuffs, such as the natural colorants from dye plants of Madagascar. Lastly, it must be mentioned that there is a growing interest for using natural dyes from plant origin to dye leather, to stain wood, pulp and some plastics, to dye hair and to impart color to some pharmaceutical preparations.

Future will tell us if there may be any industrial large-scale application of colorants coming from Malagasy dye-yielding plants in the industries, other than the current uses for craft textile dyeing, with new natural colorants having the following properties: non-allergic and non-toxic molecules, no toxic secondary metabolites produced in the human body following ingestion, and good fastness property as well as adequate stability in the industrial coloring processes. Knowing the limitations of each dye and pigment from plants means that a specific compound can be avoided for certain applications, in which processing conditions are unfavorable for the colorant, and that alternatives can be sought, or that attempts can be made to increase the stability of the colorants by formulation. The production of natural colorants from dye plants of Madagascar by local dyers should be an adequate biodiversity-related activity for the future. This potential activity could contribute to maintaining the complex and fragile relationship between the preservation of plant biodiversity, economic and social development, and the material and spiritual well-being of the local populations. It could also prevent biodiversity loss in Madagascar by developing natural capital knowledge through scientific research and enhancement of traditional knowledge on natural dyes, and by undertaking studies on the rational use of natural colorants from Madagascar plant resources while adopting collaborative and participatory approaches in order to get the support of all stakeholders.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the Terre-Là Company (Majunga, Madagascar), the Missouri Botanical Garden, Mrs. Alice Ange-Line Rasoanirainy (master dyer from Arivonimamo, Madagascar), and Pr. Laurent Dufossé (Université de La Réunion) for his helpful discussion about the global colorant market.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

Funding Sources

This work was financially supported by grants from the Conseil Régional de La Réunion, Réunion island (France) (Grant number: DIRED/20161450).

Author Contribution Statement

YC and TP supervised the findings of this work. FRF, PD and BR helped supervise the project. MA carried out the ethnobotanical studies, contributed to data collection and data analysis. DC and AE helped supervise the ethnobotanical studies, provided critical feedback and helped shape the research and manuscript. VER and SR contributed to plant identification. TP and YC conceived the original idea and were in charge of overall direction and planning. MA drafted the manuscript and designed the figures and tables. MA and YC wrote the final version of the manuscript with input from all authors. All authors have made critical revisions and have approved the final version of the manuscript.

References

[1] R. P. Senthilkumar, V. Bhuvaneshwari, S. Sathiyavimal, R. Amsaveni, M. Kalaiselvi, V. Malayaman, 'Natural Colours from Dyeing Plants for Textiles', International Journal of Biosciences and Nanosciences 2015, 2, 160–174.

[2] M. A. Hassaan, A. E. Nemr, 'Health and Environmental Impacts of Dyes: Mini Review', American Journal of Environmental Science and Engineering 2017, 1, 64–67.

[3] P. Amchova, H. Kotolova, J. Ruda-Kucerova, 'Health safety issues of synthetic food colorants', Regulatory Toxicology and Pharmacology 2015, 73, 914–922.

[4] M. Shahid, Shahid-ul-Islam, F. Mohammad, 'Recent advancements in natural dye applications: a review', Journal of Cleaner Production 2013, 53, 310–331.

[5] M. Yusuf, M. Shabbir, F. Mohammad, 'Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects', Natural Products ans Bioprospecting 2017, 7, 123–145.

[6] D. Cardon, in 'Le Monde des teintures naturelles', Edition Belin 2014.

[7] R. M. Selvam, G. Athinarayanan, A. U. R. Nanthini, A. J. A. R. Singh, K. Kalirajan, P. M. Selvakumar, 'Extraction of natural dyes from *Curcuma longa*, *Trigonella foenum graecum* and *Nerium oleander*, plants and their application in antimicrobial fabric', Industrial Crops and Products 2015, 70, 84–90.

[8] R. Siva, 'Status of natural dyes and dye-yielding plants in India', Current Science 2007, 92, 10.

[9] Y. Caro, L. Anamale, M. Fouillaud, P. Laurent, T. Petit, L. Dufossé, 'Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview', Natural Products and Bioprospecting 2012, 2, 174–193.

[10] L. Dufossé, M. Fouillaud, Y. Caro, S. A. Mapari, N. Sutthiwong, 'Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry', Current Opinion in Biotechnology 2014, 26, 56–61.

[11] D. de Araujo Vilar, M. S. de Araujo Vilar, T. F. A. de Lima e Moura, F. Nnervo Raffin, M. R. de Oliveira, C. F. de Oliveira Franco, P. F. de Athayde-Filho, M. de F. Formiga Melo Diniz, J. M. Barbosa-Filho, 'Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of Bixa orellana L.: A Review', The Scientific World Journal 2014, 2014, 1–11.

[12] G. Gopi, A. Elumalai, P. Jayasri, 'A consive review on *Tagetes arrecta*', International Journal of PhytoPharmacy research 2012, 3, 16–19.

[13] H.O. Boo, S.-J. Hwang, C.-S. Bae, S.-H. Park, B.-G. Heo, S. Gorinstein, 'Extraction and characterization of some natural plant pigments'. Industrial Crops and Products 2012, 40, 129–135.

[14] M. Mirjalili, K. Nazarpoor, L. Karimi, 'Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye', Journal of Cleaner Production 2011, 19, 1045–1051.

[15] D. Frick, ‘The coloration of food: Review of Progress in Coloration and Related Topics’, Coloration Technology 2003, 33, 15–32.
[16] A. C. Dweck, ‘Natural ingredients for colouring and styling’, International Journal of Cosmetic Science 2002, 24, 287–302.
[17] B. Chengaiah, K. M. Rao, K. M. Kumar, M. Alagusundaram, C. M. Chetty. ‘Medicinal importance of natural dyes, a review’, International Journal of PharmTech Research 2010, 2, 144–154.
[18] M. Fouillaud, Y. Caro, M. Venkatachalam, I. Grondin, L. Dufossé, in ‘Anthraquinones. In: 'Phenolic compounds in food: characterization and analysis', CRC Press 2017, 129.
[19] G. E. Schatz. in ‘Generic Tree Flora of Madagascar’, Royal Botanical Garden, Kew & Missouri Botanical Garden 2001, 492p.
[20] N. Myers, R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, J. Kent, ‘Biodiversity hotspots for conservation priorities’, Nature 2000, 403, 853–858.
[21] S. M. Goodman, J. P. Benstead, ‘Updated estimates of biotic diversity and endemism for Madagascar’, Oryx 2005 39, 73–77.
[22] R. Decary, ‘Plantes utiles de la flore malgache’, Revue internationale de botanique appliquée et d’agriculture tropicale 1946, 26, 383–389.
[23] E. Heckel, J. Henri H. Jumelle, H. Perrier dela Bâthie, in ‘Les Plantes Utiles de Madagascar’, Annales Du Musée Colonial De Marseille, 1910.
[24] H. Perrier de la Bâthie, ‘Les plantes introduites à Madagascar’, Revue internationale de botanique appliquée et d’agriculture tropicale 1931/1932, 121, 719-729 ; 122, 833-837 ; 123, 920-923 ; 124, 991-999 ; 125, 48-52 ; 126, 128-133 ; 127, 213-220 ; 128, 296-301 ; 129, 372-383 ; 130, 462-468 ; 131, 530-543.
[25] A.M. Etheve, in ‘Manuel de Teinture Naturelle : Exemple de Madagascar’, Cite 2005, 52p.
[26] E. De Flacourt, C. Allibert, in ‘Histoire de La Grande Ile de Madagascar’, Inalco-Karthala 2007, 113-114.
[27] R. Decary, ‘L’emploi des succédanés végétaux à Madagascar pendant la dernière guerre’, Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée 1968, 15, 286–296.
[28] L. Allorge Boiteau, M. Allorge, in ‘Faune et flores de Madagascar’, Karthala - Tsipika 2011, pp. 126–146.
[29] S. Fee, B. Rasoarifetra. In ‘Recipes from the past: Highland textile dyes in 19th century Merina sources, with a translation of passages from the "Ombiasy’s manuscript.", Études Océan Indien 2009, 143–173.
[30] P. C. M. Jansen, D. Cardon, R. H. M. J. Lemmens, L. P. A. Oyen, in ‘Plant Resources of Tropical Africa’, Fondation PROTA: CTA, Backhuys Publishers, Wageningen, Leiden 2004, 238p.
[31] H. Rakotomanana, H. R. Farasoa, B. Ramaroson Raonizafinimanana. In ‘Etude des propriétés pharmacologiques de *Aloe Macroclada* : utilisation ethnopharmacologique, activités antioxydante et antimiocrobienne et composition chimique de *Aloe Macroclada*’, Editions Universitaires Européennes 2016.
[32] K. Mahadeo, I. Grondin, H. Kodja, J. Soulange Govinden, S. Jhaumeer Laulloo, M. Frederich, A. Gauvin-Bialecki, ‘The genus *Psiadia* : Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology’, J. Ethnopharmacol. 2018, 210, 48–68.
[33] P. Danthu, M. Rakotobe, P. Mauclère, H. Andrianoelisoa, O. Behra, V. Rahajanirina, B. Mathevon, E. Ralembofetra, P. Collas de Chatelperron, ‘Essential oil production increases value of *Psiadia altissima* fallows in Madagascar’s eastern forests’, Agroforestery System 2008, 72, 127–135.
[34] V. Lakshmi, P. Gupta, ‘An overview of the genus *Xylocarpus*’, Natural Product Research 2008, 22, 1197–1224.
[35] G. H. Schmelzer, A. Gurib-Fakim, R. Arroo, R. H. M. J. Lemmens, in ‘Plants Resources of Tropical Africa 11: Medicinal Plants’, PROTA Foundation, Backhuys Publishers, CTA, Leiden, Wageningen 2013, 869p.
[36] J. N. Andriamparany, K. Brinkmann, V. Jeannoda, A. Buerkert, ‘Effects of socio-economic household characteristics on traditional knowledge and usage of wild yams and medicinal plants

in the Mahafaly region of south-western Madagascar', Journal of Ethnobiology Ethnomedicine 2014, 10, 1, 82-86.
[37] S. Afoulous, H. Ferhout, E. G. Raoelison, A. Valentin, B. Moukarzel, F. Couderc, J. Bouajila, 'Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*', Food Chemistry and Toxicology 2013, 56, 352–362.
[38] C. L. S. Junior, 'Antifungal properties of combined plant extracts against papaya anthracnose', Revue verde 2014, 9, 167–172.
[39] C. F. Tchinda, I. K. Voukeng, V. P. Beng, V. Kuete, 'Antibacterial activities of the methanol extracts of *Albizia adianthifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and three other Cameroonian plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria', Saudi Journal of Biological Sciences 2017, 24, 950–955.
[40] S. Kouam, D. Yapna, K. Krohn, B. Ngadjve, J. Ngoupayo, M. Choudhary, B. Schulz, 'Antimicrobial prenylated anthracene derivatives from leaves of *Harungana madagascariensis*', Journal of Natural Products 2007, 70, 600–603.
[41] E. Ebelle R., S. Mouokeu R., J. Pa. Assam, L. Hopogap M., M. Masoohe A, 'Potentiating Antifungal Activity of Fluconazole or Nystatin with Methanol Bark Extract of *Harungana madagascariensis* Stem Bark', International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Research 2017, 9, 65–77.
[42] S. F. Kouam, B. T. Ngadjui, K. Krohn, P. Wafo, A. Ajaz, M. I. Choudhary, 'Prenylated anthronoid antioxidants from the stem bark of *Harungana madagascariensis*', Phytochemistry 2005, 66, 1174–1179.
[43] P. Pisitsak, J. Hutakamol, R. Thongcharoen, P. Phokaew, K. Kanjanawan, N. Saksaeng, 'Improving the dyeability of cotton with tannin-rich natural dye through pretreatment with whey protein isolate', Industrial Crops and Products 2016, 79, 47–56.
[44] M. Chacha, 'Flavanol derivatives with antioxidant activity from the stem bark of *Xylocarpus granatum*', International Journal of Biological and Chemical Sciences 2010, 4, 371-374.
[45] J. N. Eloff, 'Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves', Journal of Ethnopharmacology 2001, 76, 305–308.
[46] M. Moyo, A. R. Ndhlala, J. F. Finnie, J. Van Staden, 'Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of S*clerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts', Food Chemistry. 2010, 123, 69–76.
[47] K. Seshathri, T. Thiyagarajan, 'Antimicrobial activity of chewing sticks of jimma', Journal of Phytological research 2011, 3, 8, 34-37.
[48] F. B. Magassouba, A. Diallo, M. Kouyaté, F. Mara, O. Mara, O. Bangoura, A. Camara, S. Traoré, A. K. Diallo, M. Zaoro, K. Lamah, S. Diallo, G. Camara, S. Traoré, A. Kéita, M. K. Camara, R. Barry, S. Kéita, K. Oularé, M. S. Barry, M. Donzo, K. Camara, K. Toté, D. V. Berghe, J. Totté, L. Pieters, A. J. Vlietinck, A. M. Baldé, 'Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine', Journal of Ethnopharmacology 2010, 128, 705–708.
[49] B. Sultana, F. Anwar, R. Przybylski, 'Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica, Terminalia arjuna, Acacia nilotica,* and *Eugenia jambolana* Lam. Trees', Food Chemistry. 2007, 104, 1106–1114.
[50] J. S. Londhe, T. P. A. Devasagayam, L. Y. Foo, S. S. Ghaskadbi, 'Antioxidant activity of some polyphenol constituents of the medicinal plant Phyllanthus amarus Linn.', Redox Report 2008, 13, 199–207.
[51] P. C. Facey, K. O. Pascoe, R. B. Porter, A. D. Jones, 'Investigation of plants used in jamaican folk medicine for anti-bacterial activity', Journal of Pharmacy and Pharmacology 1999, 51, 1455–1460.
[52] Ezekiel. O. Iwalewa, Mohammed. M. Suleiman, Lazarus. K. Mdee, Jacobus. N. Eloff, 'Antifungal and antibacterial activities of different extracts of *Harungana madagascariensis* stem bark', Pharmaceutical Biology 2009, 47, 878–885.
[53] S. Khan, A. Jabbar, C. M. Hasan, M. A. Rashid, 'Antibacterial activity of *Barringtonia racemosa*', Fitoterapia 2001, 72, 162–164.

[55] D. Singh, B. Singh, R. K. Goel, 'Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Ficus religiosa: A review', Journal of Ethnopharmacology 2011, 134, 565–583.
[56] I. Norscia, S. M. Borgognini-Tarli, 'Ethnobotanical reputation of plant species from two forests of Madagascar: A preliminary investigation', South African Journal of Botany 2006, 72, 656–660.
[57] P. M. Udia, V. B. Braide, D. U. Owu, 'Antispasmodic and spasmolytic effects of methanolic extract from seeds of Garcinia kola on isolated rat small intestine', Niger. Journal of Physiological Sciences 2010, 24, 2,111-116.
[58] W. M. Bandaranayake, 'Traditional and medicinal uses of mangroves', Mangroves Salt marshes 1998, 2, 133–148.
[59] R. Nurdiani, M. Firdaus, A. A. Prihanto, 'Phytochemical screening and antibacterial activity of methanol extract of mangrove plant (*Rhizophora mucronata*) from Porong river estuary', International Journal of BioSciences and Technology 2012, 1,2, 27-29.
[60] S. M. Mahlo, H. R. Chauke, L. J. McGaw, J. N. Eloff, 'Antioxidant and antifungal activity of selected plant species used in traditional medicine', Journal of Medicinal Plants Research 2013, 7,33, 2444-2450.
[61] O. Pedersen, A. Gurib-Fakim, H. Subratty, A. Adsersen, 'Pharmacological properties of seven medicinal plants of the Rubiaceae from Mauritius', Pharmaceutical Biology 1999 37, 202–207.
[62] K. Kamanzi Atindehou, C. Schmid, R. Brun, M. W. Koné, D. Traore, 'Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire', Journal of Ethnopharmacology 2004, 90, 221–227.
[63] N. Kluger, 'De l'art du henné (Mehndi) au henné noir – From the art of henna (Mehndi) to black henna', Images Dermatology 2009, 2,100-104.
[64] H. M. Raharitsiadiana, in 'Etude en vue de l'obtention de la teinture Indigo d'origine végétale pour la soie de Madagascar et Analyses chimique et structurale approfondies de l'indigotine, isolée de *Indigofera arrecta* Hochst de Madagascar' (DEA University of Antananarivo) 2008.
[65] L. Fagbohoun, in 'Etude chimique de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels au Bénin dans le domaine artisanal', (Organicchemistry PhD, University of Avignon) 2014.
[66] O. T. Ogunmefun, E. A. Ekundayo, F. C. Akharaiyi, D. Ewhenodere, 'Phytochemical screening and antibacterial activities of *Tectona grandis* L. f. (Teak) leaves on microorganisms isolated from decayed food samples', Tropical Plant Research 2017, 4, 376–382.
[67] P. Vyas, D. K. Yadav, P. Khandelwal, '*Tectona grandis* (teak) – A review on its phytochemical and therapeutic potential', Natural Product Research 2018, 1–17.
[68] M. G. Uddin, 'Extraction of eco-friendly natural dyes from mango leaves and their application on silk fabric', Textiles and Clothing Sustainability 2015, 1, 7-12.
[69] G. S. Bbosa, D. B. Kyegombe, J. Ogwal-Okeng, R. Bukenya-Ziraba, O. Odyek, P. Waako, 'Antibacterial activity of *Mangifera indica* (L.)', African Journal of Ecology 2007, 45, 13–16.
[70] G. Gopi, A. Elumalai, P. Jayasri. 'A consive review on *Tagetes arrecta*', International Journal of Production Research 2012, 3, 1, 16-19.
[71] A. H. Gilani, S. Bashir. Studies on the antioxidant and analgesic activities of Aztec marigold (*Tagetes erecta*) flowers. PhytotherapyResearch. 2008, 22,12, 1692-1694.
[72] D. de A. Vilar, M. S. de A. Vilar, T. F. A. de L. e Moura, F. N. Raffin, M. R. de Oliveira, C. F. de O. Franco, P. F. de Athayde-Filho, M. de F. F. M. Diniz, J. M. Barbosa-Filho. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. The Scientific World Journal 2014, 2014, 1–11.
[73] T. C. Fleischer, E. P. K. Ameade, M. L. K. Mensah, I. K. Sawer, 'Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*', Fitoterapia 2003, 74, 136–138.
[74] S. Badami, S. Moorkoth, B. Suresh, 'A medicinal and dye yielding plant', Natural Product Radiance 2004, 3, 2, 75-82.
[75] R. Naz, A. Bano, 'Antimicrobial potential of Ricinus communis leaf extracts in different solvents against pathogenic bacterial and fungal strains', Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2012, 2, 944–947.
[76] T. Mythili, R. Ravindhran, 'Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Sesbania sesban* L.', Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2012, 5, 4, 179-182.

[77] S. M. Maregesi, L. Pieters, O. D. Ngassapa, S. Apers, R. Vingerhoets, P. Cos, D. A. V. Berghe, A. J. Vlietinck, 'Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities', Joournal of Ethnopharmacology 2008, 119, 58–66.
[78] A. Rahman, M. Anisuzzaman, S. A. Haider, F. Ahmed, R. Islam, A. T. M. Naderuzzaman, 'Study of medicinal plants in the graveyards of Rajshahi city', Research journal of agriculture and biological sciences 2008, 4, 70–74.
[79] S. K. Jain, S. Srivastava, 'Traditional uses of some Indian plants among islanders of the Indian Ocean', Indian Journal of Traditional Knowledge 2005, 4, 4, 347-357.
[80] S. Arabshahi-Delouee, A. Urooj, 'Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves', Food Chemistry. 2007, 102, 1233–1240.
[81] J. Silva, W. Abebe, S. M. Sousa, V. G. Duarte, M. I. L. Machado, F. J. A. Matos, 'Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus', Journal of Ethnopharmacology 2003, 89, 277–283.
[82] S. B. Sharma, A. Nasir, K. M. Prabhu, P. S. Murthy, G. Dev, 'Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits', Journal of Ethnopharmacology 2003, 85, 201–206.
[83] H.-L. Huang, D.-L. Li, X.-M. Li, B. Xu, B.-G. Wang, 'Antioxidative principals of *Jussiaea repens*: an edible medicinal plant', International Journal of Food Science and Technology 2007, 42, 1219–1227.
[84] M. S. Marzouk, F. M. Soliman, I. A. Shehata, M. Rabee, G. A. Fawzy, 'Flavonoids and biological activities of *Jussiaea repens*', Natural Product Research 2007, 21, 436–443.
[85] F. D. Mabou, J.-D. Tamokou, D. Ngnokam, L. Voutquenne-Nazabadioko, J.R. Kuiate, P. K. Bag, 'Complex secondary metabolites from *Ludwigia leptocarpa* with potent antibacterial and antioxidant activities', Drug Discoveries 2016, 10, 141–149.
[86] I. Smida, C. Charpy-Roubaud, S. Y. Cherif, F. Torre, G. Audran, S. Smiti, J. Le Petit, 'Antibacterial properties of extracts of *Ludwigia peploides* subsp. montevidensis and *Ludwigia grandiflora* subsp. hexapetala during their cycle of development', Aquatic Botany 2015, 121, 39–45.
[87] D. Tadesse, T. Eguale, M. Giday, A. Mussa, 'Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Maesa lanceolata* and *Plectranthus punctatus* against *Haemonchus contortus*', Journal of Ethnopharmacology 2009, 122, 240–244.
[88] P. O. Okemo, H. P. Bais, J. M. Vivanco, 'In vitro activities of *Maesa lanceolata* extracts against fungal plant pathogens', Fitoterapia 2003, 74, 312–316.
[89] D. J. Mabberley, in 'The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants', Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press 1997.
[90] I. Aibinu, T. Adenipekun, T. Adelowotan, T. Ogunsanya, T. Odugbemi, 'Evaluation of the antimcrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally', African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2007, 4, 185–192.
[91] M. Viji, S. Murugesan, 'Phytochemical analysis and antibacterial activity of medicinal plant *Cardispermum halicacabum* Linn.', Journal of Phytology Phytopharmacology 2010, 2, 68–77.
[92] M. H. Huang, S. S. Huang, B. S. Wang, C. H. Wu, M. J. Sheu, W.C. Hou, S. S. Lin, G. J. Huang, 'Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo', Journal of Ethnopharmacology 2011, 133, 743–750.
[93] P. A. Meléndez, V. A. Capriles, 'Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico', Phytomedicine 2006, 13, 272–276.
[94] S. Rane, M. Hate, P. Hande, A. Bs, A. Datar, 'Dyeing of cotton with *Tectona grandis* leaves and *Terminalia arjuna* bark extracts', International Journal of Textile Science 2017, 6,2,72-77.
[95] I. J. Seabra, R. B. Chim, P. Salgueiro, M. E. Braga, H. C. de Sousa, 'Influence of solvent additives on the aqueous extraction of tannins from pine bark: potential extracts for leather tanning', Journal of Chemical technology and Biotechnology 2017,93,4,1169-1182,
[96] N. Punrattanasin, M. Nakpathom, B. Somboon, N. Narumol, N. Rungruangkitkrai, R. Mongkholrattanasit, 'Silk fabric dyeing with natural dye from mangrove bark (*Rhizophora apiculata* Blume) extract', Industrial Crops and Products 2013, 49, 122–129.

[97] O. E. Afieroho, S. S. Izontimi, O. Dorcas, C. Blessing, 'Antibacterial and phytochemical evaluation of *Harungana madagascariensis* L. (Hypericaceae) seeds', International research journal of pharmacy 2012, 3, 75–77.
[98] S. Dhingra, in 'Dyeing with Morinda citrifolia: In pursuit of sustainable future', Textile Society of America Symposium 2016, p. 957.
[99] R. André, F. Bailleul, P. Delaveau, 'Etude chimique de *Danais fragrans* (Rubiaceae)', Plantes Médicinales et Phytothérapie 1976, 10, 18–110.
[100] C. Andary, S. Prunac, D. Cardon, 'Yellow dyes of historical importance, a multidisciplinary study II. Chemical analysis of weld and sawwort', Dyes in History and Archaeology 1996 14, 8–31.
[101] S. Jansen, E. Robbrecht, H. Beeckman, 'Aluminium accumulation in Rubiaceae: an additional character for the delimitation of the subfamily Rubioidae?', IAWA Journal 2000, 21, 197–212.
[102] J. W. Anderson, 'Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues', Phytochemistry 1968, 7, 1973–1988.
[103] K. M. Davies, in 'An introduction to plant pigments in biology and commerce', Plants pigments and their manipulation, Annual Plant Reviews, CRC Press, Blackwell Publishing 2004, 1–22.
[104] C. Kull, J. Tassin, S. Carriere, 'Approaching invasive species in Madagascar', Madagascar Conservation & Development 2015, 9, 60.
[105] Z. A. Rabesa, E. Rakotobe, J. C. Rasolomanana, S. S. Randranasolo. In 'Pharmacopées de l'Ambongo et Du Boina', CIDST, Antananarivo, 1993,727p.
[106] B. E. Van Wyk. A review of commercially important African medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 2015, 176, 118–134.
[107] S. B. Tankeo, F. Damen, L. P. Sandjo, I. Celik, P. Tane, V. Kuete, 'Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae)', Journal of Ethnopharmacology 2016, 190, 100–105.
[108] R. Pernet and G. Meyer, in'Pharmacopée de Madagascar', L'institut de recherche scientifique, Antananarivo - Tsimbazaza, 1957, 86p.
[109] K. M. Davies, in 'Plant Pigments and Their Manipulation', Blackwell, Oxford 2004, 12,352p.
[110] N. Sutthiwong, M. Fouillaud, A. Valla, Y. Caro, L. Dufossé, 'Bacteria belonging to the extremely versatile genus Arthrobacter as novel source of natural pigments with extended hue range', Food Research International 2014, 65, 156–162.
[111] Y. Caro, M. Venkatachalam, J. Lebeau, M. Fouillaud, L. Dufossé, 'Pigments and colorants from filamentous fungi', in Fungal Metabolites 2015, 1–70.
[112] Ø. M. Andersen, K. R. Markham, Eds., in 'Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications', CRC Taylor & Francis, Boca Raton 2006, 1237p.
[113] A. Cuttriss, B. Pogson, in 'Carotenoids, plants pigments and their manipulation, Annual Plant Reviews', CRC Press, Blackwell Publishing 2004, 57–91.
[114] G. Tanner, in 'Condensed tannins', Plants pigments and their manipulation, Annual Plant Reviews, CRC Press, Blackwell Publishing 2004, 150–184.
[115] L. Meijer, N. Guyard, L. Skaltsounis, G. Eisenbrand, in 'Indirubin, the red shade of indigo', Life in Progress 2006.
[116] N. Chanayath, S. Lhieochaiphant, S. Phutrakul, 'Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and chemical structure analysis of their major components', CMU journal 2002, 1, 149–160.
[117] K. P. Renukadevi, S. S. Sultana, 'Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicty effect of *Indigofera tinctoria* on lung cancer cell line NCI-h69', International Journal of Pharamacology 2011, 7, 356–362.
[118] J. Lebeau, T. Petit, P. Clerc, L. Dufossé, Y. Caro, 'Isolation of two novel purple naphthoquinone pigments concomitant with the bioactive red bikaverin and derivates thereof produced by F*usarium oxysporum*', Biotechnology Progress 2019, 35, 2738.
[119] K. S. Mahesh, N. A. Jayakumaran, 'Anthraquinones from leaves of *Tectona grandis:* A detailed study on its antibacterial activity and other biological properties', International Journal of Phytomedicine 2011, 3, 50–58.
[120] A. V. Biankin, N. Waddell, K. S. Kassahn, M.C. Gingras, L. B. Muthuswamy, A. L. Johns, D. K. Miller, P. J. Wilson, A.-M. Patch, J. Wu, D. K. Chang, M. J. Cowley, B. B. Gardiner, S.

Song, I. Harliwong, S. Idrisoglu, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Manning, S. Wani, M. Gongora, M. Pajic, C. J. Scarlett, A. J. Gill, A. V. Pinho, I. Rooman, M. Anderson, O. Holmes, C. Leonard, D. Taylor, S. Wood, Q. Xu, K. Nones, J. Lynn Fink, A. Christ, T. Bruxner, N. Cloonan, G. Kolle, F. Newell, M. Pinese, R. Scott Mead, J. L. Humphris, W. Kaplan, M. D. Jones, E. K. Colvin, A. M. Nagrial, E. S. Humphrey, A. Chou, V. T. Chin, L. A. Chantrill, A. Mawson, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Lovell, R. J. Daly, N. D. Merrett, C. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, N. Kakkar, F. Zhao, Y. Qing Wu, M. Wang, D. M. Muzny, W. E. Fisher, F. Charles Brunicardi, S. E. Hodges, J. G. Reid, J. Drummond, K. Chang, Y. Han, L. R. Lewis, H. Dinh, C. J. Buhay, T. Beck, L. Timms, M. Sam, K. Begley, A. Brown, D. Pai, A. Panchal, N. Buchner, R. De Borja, R. E. Denroche, C. K. Yung, S. Serra, N. Onetto, D. Mukhopadhyay, M.-S. Tsao, P. A. Shaw, G. M. Petersen, S. Gallinger, R. H. Hruban, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, R. D. Schulick, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, P. Capelli, V. Corbo, M. Scardoni, G. Tortora, M. A. Tempero, K. M. Mann, N. A. Jenkins, P. A. Perez-Mancera, D. J. Adams, D. A. Largaespada, L. F. A. Wessels, A. G. Rust, L. D. Stein, D. A. Tuveson, N. G. Copeland, E. A. Musgrove, A. Scarpa, J. R. Eshleman, T. J. Hudson, R. L. Sutherland, D. A. Wheeler, J. V. Pearson, J. D. McPherson, R. A. Gibbs, S. M. Grimmond, 'Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes', Nature 2012, 491, 399–405.

[121] M. T. Paulsen, M. Ljungman, 'The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts', Toxicology and Applied Pharmacology 2005, 209, 1–9.

[122] B. Kiran Aithal, M. R. Sunil Kumar, B. Nageshwar Rao, N. Udupa, B. S. Satish Rao, 'Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells', Cell Biology International 2009, 33, 1039–1049.

[123] S. Yue, Y. Tang, S. Li, J.-A. Duan, 'Chemical and biological properties of quinochalcone C-glycosides from the florets of *Carthamus tinctorius'*, Molecules 2013, 18, 15220–15254.

[124] J.-M. Yoon, M.-H. Cho, J.-E. Park, Y.-H. Kim, T.-R. Hahn, Y.-S. Paik, 'Thermal stability of the pigments hydroxysafflor yellow A, safflor yellow B, and precarthamin from safflower (*Carthamus tinctorius*)', Journal of Food Science 2003, 68, 839–843.

[125] J. C. del Valle, M. L. Buide, I. Casimiro-Soriguer, J. B. Whittall, E. Narbona, 'On flavonoid accumulation in different plant parts: variation patterns among individuals and populations in the shore campion (*Silene littorea*)', Frontiers in Plant Science 2015, 6, 939, 1-13.

[126] F. Delgado-Vargas, A. R. Jiménez, O. Paredes-López, 'Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability', Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2000, 40, 173–289.

[127] U. B. Jagtap, V. A. Bapat, '*Artocarpus*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology', Journal of Ethnopharmacology 2010, 129, 142–166.

[128] D. Cristea, 'Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola* L.)', Dyes Pigments 2003, 57, 267–272.

[129] Y. S. Oh, J. H. Lee, S. H. Yoon, C. H. Oh, D.-S. Choi, E. Choe, M. Y. Jung, 'Characterization and quantification of anthocyanins in grape juices obtained from the grapes cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS', Journal of Food Science 2008, 73, 378–389.

[130] K. Khanbabaee, T. van Ree, 'Tannins classification and definition', Natural Products Report. 2001, 18, 641–649.

[131] C. I. Cazzonelli, B. J. Pogson, 'Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants', Trends in Plant Science 2010, 15, 266–274.

[132] R. K. Saini, S. H. Nile, S. W. Park, 'Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities', Food Research International 2015, 76, 735–750.

[133] M. Gong, A. Bassi, 'Carotenoids from microalgae: A review of recent developments', Biotechnology Advances 2016, 34, 1396–1412.

[134] N. Niamsa, C. Sittiwet, 'Antimicrobial activity of *Curcuma longa* aqueous extract', Journal of Pharmacology and Toxicology 2009, 4,4, 173-177.

[135] P. Danthu, C. Lubrano, L. Flavet, V. Rahajanirina, O. Behra, C. Fromageot, R. Rabevohitra, E. Roger, 'Biological Factors Influencing Production of Xanthones in *Aphloia theiformis'*, Chemistry & Biodiversity 2010, 7, 140–150.

[136] G. Pandey, S. Khatoon, M. M. Pandey, A. K. S. Rawat, 'Altitudinal variation of berberine, total phenolics and flavonoid content in *Thalictrum foliolosum* and their correlation with antimicrobial and antioxidant activities', Journal of Ayurveda and Integrative Medicine 2018, 9, 169–176.
[137] J.P. Zryd, L. Christinet, in 'Betalains: Plants Pigments and Their Manipulation', Annual plants review, CRC Press, Blackwell Publishing 2004, 185–213.
[138] A. Gengatharan, G. A. Dykes, W. S. Choo, 'Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods', LWT - Food Science and Technology 2015, 64, 645–649.
[139] B. Schoefs, 'Determination of pigments in vegetables', Journal of Chromatography A. 2004, 1054, 217–226.
[140] R. D. Willows, in 'Chlorophylls: Plants Pigments and Their Manipulation', Annual. Plants Review, CRC Press, Blackwell Publishing 2004,23–56.
[141] M. Voith, 'Coloring food, naturally: The effort to eliminate synthetics gives chemists the blues', Chemical & Engineering News 2008, 86, 18–19.
[142] M. Toussirot, W. Nowik, E. Hnawia, N. Lebouvier, A.E. Hay, A. de la Sayette, M.-G. Dijoux-Franca, D. Cardon, M. Nour, 'Dyeing properties, coloring compounds and antioxidant activity of *Hubera nitidissima* (Annonaceae)', Dyes Pigments 2014, 102, 278–284.
[143] A. A. Khan, N. Iqbal, S. Adeel, M. Azeem, F. Batool, I. A. Bhatti, 'Extraction of natural dye from red calico leaves: Gamma ray assisted improvements in colour strength and fastness properties', Dyes Pigments, 2014 103, 50–54.
[144] L. Ngamwonglumlert, S. Devahastin, N. Chiewchan, 'Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods', Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2017, 57, 3243–3259.
[145] T. Bourrier, 'Intolérances et allergies aux colorants et additifs', Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 2006, 46, 68–79.
[146] F. R. Abe, J. N. Mendonça, L. A. B. Moraes, G. A. R. de Oliveira, C. Gravato, A. M. V. M. Soares, D. P. de Oliveira, 'Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life', Chemosphere 2017, 178, 282–290.
[147] G. A. R. de Oliveira, J. de Lapuente, E. Teixidó, C. Porredón, M. Borràs, D. P. de Oliveira, 'Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages: Developmental toxicity of textile dyes to zebrafish', Environmental Toxicology and Chemistry 2016, 35, 429–434.
[148] European Food Safety Authority. Refined exposure assessment for Allura Red AC (E 129). EFSA Journal 2015, 13, 4007
[149] European Food Safety Authority. Refined exposure assessment for Ponceau 4R (E 124). EFSA Journal 2015, 13, 4073
[150] F.-Z. Lamchahab, B. Guerrouj, S. Benomar, M. Ait Ourhroui, K. Senouci, B. Hassam, L. Benzekri, 'Du henné d'un tatouage symbolique à une vraie dermatose', Archives de Pédiatrie 2011, 18, 653–656.

Conclusions générales sur le chapitre I

La recherche de nouveaux colorants d'origine naturelle est aujourd'hui une voie largement étudiée et de nombreuses pistes sont proposées. Pour ce qui concerne la recherche de solutions alternatives dans le règne végétal, la stratégie actuellement choisie par les industriels, à savoir l'extraction des pigments de fruits et de légumes comestibles (raisins, betterave, chou rouge, etc.), révèle aujourd'hui ses faiblesses en l'occurence le manque de stabilité des pigments pour des applications variées dans tous les secteurs (textile, agroalimentaire, cosmétique, pharmacologique) et leur coût d'exploitation élevé. Les prochaines alternatives envisagées devront permettre de sélectionner des colorants plus résistants aux conditions physicochimiques imposées par les industriels et des productions à moindre coût. Les colorants naturels recherchés devront donc provenir de ressources renouvelables non alimentaires, être stables aux conditions physiques (pH, température, etc.) et leur innocuité vis-à-vis de la santé humaine devra être prouvée scientifiquement. Dans ce contexte, les plantes tinctoriales de Madagascar dont certaines parties (feuilles, écorces, racines adventives, etc.) renferment des pigments végétaux de composition chimique variée et aux multiples couleurs, pourraient être de parfaits candidats pour produire des nouveaux colorants naturels, stables et non toxiques, au relais de leur pendant d'origine artificielle. Par ailleurs, certaines de ces plantes qui sont en voie d'extinction sont utiles pour l'environnement et la biodiversité et il serait intéressant de pouvoir les réhabiliter durablement. Elles font partie du patrimoine artisanal et culturel de Madagascar et, à ce titre, elles servent également au faire-valoir touristique de cette île.

A travers cette étude bibliographique, complétée par une enquête ethnobotanique sur les plantes tinctoriales utilisées dans les régions Boeny, Itasy et Analamanga de Madagascar, il apparait clairement que la biodiversité de Madagascar, liée à une grande tradition d'utilisation des plantes tinctoriales, représente une source renouvelable de pigments végétaux, jusqu'alors inexploitée. L'histoire des plantes tinctoriales de Madagascar a été décrite, depuis les premières observations faites par Etienne de Flacourt, gouverneur français à Madagascar, durant son séjour sur la grande île entre 1648 et 1655, jusqu'à nos jours. L'inventaire conduit à une liste de 128 espèces de plantes tinctoriales qui poussent à Madagascar, dont une grande majorité n'a jamais été décrite sur le plan chimique, provenant de 61 familles botaniques (représentant 109 genres) dominées par les Rubiaceae et les Fabaceae. Parmi ces plantes listées, 34 espèces sont endémiques de la grande île, 43 y sont indigènes et 51 sont des espèces introduites. Une centaine d'autres espèces sont mentionnées dans la littérature en tant que plantes tinctoriales, mais il s'avère que leurs propriétés tinctoriales n'ont pas encore été étudiées scientifiquement.

L'enquête ethnobotanique et la description des principales caractéristiques chimiques et biologiques de ces plantes tinctoriales ont permis de mettre en lumière (i) les espèces les plus utilisées par les artisans locaux pour produire des teintures naturelles, (ii) les parties de plantes les plus couramment utilisées pour extraire les pigments, (iii) les couleurs les plus représentées, (iv) les pigments les plus représentatifs et (v) les propriétés biologiques les plus observées. Certaines espèces ont fait l'objet d'échantillonnages pour permettre leur identification botanique précise et leur conservation. Parmi les plantes tinctoriales disponibles et non protégées à Madagascar, il s'avère que les espèces *Acridocarpus excelsus* (Malphigiaceae), *Xylocarpus granatum* (Meliaceae), *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae), *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae), *Woodfordia fruticosa* (Lythraceae), *Harungana madagascariensis* (Hypericaceae) et *Paracarphalea kirondron* (Rubiaceae) sont les plus prometteuses. En effet, les propriétés biologiques de ces extraits végétaux, telles que les propriétés médicinales et autres activités biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, etc.), s'expliquent par la nature des principes actifs (molécules colorantes et autres métabolites secondaires) qu'ils renferment : polyphénols de types anthocyanes ou proanthocyanidines (tannins condensés), caroténoïdes, indigoïdes, quinones ou autres.

En définitive, la recherche portant sur la valorisation des plantes tinctoriales à Madagascar, et plus particulièrement sur les plantes tinctoriales endémiques et indigènes de ce vaste territoire, reste à ce jour très peu développée et progresse très lentement. Il reste beaucoup à faire pour améliorer les connaissances scientifiques en la matière. Les travaux de recherche présentés dans les chapitres suivants visent à caractériser plus finement les propriétés chimiques, fonctionnelles et biologiques des principaux pigments extraits des plantes tinctoriales retenues dans ce travail de thèse afin de pouvoir les valoriser à terme comme colorants naturels bioactifs dans les industries.

Chapitre II :

Etudes ethnobotaniques, études préliminaires et choix des espèces

Présentation générale du chapitre :

Les études ethnobotaniques réalisées dans trois différentes régions à Madagascar à savoir la région de Boeny, Analamanga et Itasy et les études bibliographiques ont permis d'établir une liste des plantes tinctoriales qui présentent un intérêt de valorisation et qui ont été ou qui sont encore utilisées par la population. Dans la plupart des localités investiguées, les principales raisons qui ont amenées les artisans locaux à délaisser les sources naturelles de colorants au profit des colorants artificiels sont liées au coût et à la facilité d'utilisation des colorants artificiels. Les sources naturelles de colorants ne sont utilisées que lorsque le produit n'est pas remplaçable par un colorant synthétique moins cher et souvent plus facile à préparer et à utiliser. Les méthodes de teinture naturelle prennent plus de temps, nécessitent plus de main d'œuvre et demandent un savoir et savoir-faire important et original qui est en train de disparaitre.

Toutefois, des actions pour conserver et promouvoir ce patrimoine sont aujourd'hui engagées. Ainsi, dans la région de Boeny, la collaboration entre l'entreprise Terre-Là SARL (une société artisanale située à Mahajanga et dirigée par Andrée Ethève et dont l'activité principale est la teinture naturelle et la transformation du raphia, du coton et de la soie) et l'association Femmes Entrepreneurs Environnement de Madagascar FEEM (une association crée en 2002 et dont l'objectif est d'améliorer la condition des femmes et en particulier de artisanes du textile et des teintures en mutualisant leur connaissance, en assurant la vente de leur création et en développant des actions de protection de l'environnement) a permis de sauvegarder les traditions, les savoir-faire et les techniques de tissage et de teinture naturelle de fibres de raphia, de soie ou de coton dont les dépositaires étaient très généralement des femmes. Toutefois, freinée par la disponibilité de matières premières et la stabilité des pigments, l'utilisation de ces plantes tinctoriales est restée confinée au seul secteur artisanal. Les potentialités sont cependant nombreuses car répondant à la demande de produits naturels mais leur développement se heurte souvent à des contraintes législatives. En particulier dans des domaines tels l'agroalimentaire et la cosmétique, des législations strictes limitent actuellement l'utilisation de ces sources même à l'échelle artisanale faute de données sur les propriétés physico-chimiques, technologiques et toxicologiques des pigments issus de ces plantes.

C’est dans ce contexte contrasté, d’un côté des connaissances empiriques détenues par ces teinturières, validées par des siècles de pratique et de l’autre une impossibilité de transférer cette expertise à des domaines industriels en raison de l’absence de données scientifiquement validées que nous avons réalisé cette étude. Afin d’éviter la dispersion, nous avons décidé de restreindre cette étude à quelques plantes tinctoriales utilisées actuellement par les artisans de la région Boeny. Ainsi, ce chapitre fera le point sur les différents critères retenus afin de sélectionner huit plantes tinctoriales pour la suite de l’étude. Dans une seconde partie, il décrira les caractéristiques ethnobotaniques des espèces sélectionnées.

Critères de choix et caractérisations ethnobotaniques de huit plantes tinctoriales de Madagascar

Mahery Andriamanantena[a, b], Pascal Danthu[c, d], Fanjaniaina R. Fawbush[b], Béatrice Raonizafinimanana[b], Thomas Petit[a, e], and Yanis Caro*[a, e]

[a] Laboratoire de Chimie et Biotechnologie des Produits Naturels, Université de La Réunion, FR- 97490 Sainte-Clotilde, Réunion, e-mail: yanis.caro@univ-reunion.fr

[b] Département Industries Agricoles et Alimentaires (IAA-ESSA), Université d'Antananarivo, MG-101 Antananarivo, Madagascar

[c] Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité HortSys, FR-34000 Montpellier, France

[d] Université de Montpellier, FR-34000 Montpellier, France

e Département Hygiène Sécurité Environnement (HSE), IUT de La Réunion, Université de La Réunion, 40 Avenue de Soweto, FR-97410 Saint-Pierre, Réunion

Résumé

Très peu d'information (voire aucune pour certaines espèces) sur les plantes tinctoriales malgaches sont disponibles dans la littérature quand à leurs utilisations, leurs propriétés colorantes ou encore l'état de la ressource. Ce manque de données scientifiques qualitatives et quantitatives constitue le principal frein à leur exploitation. A partir de critères définis dans ce travail dont la zone d'étude, la plage des couleurs produites, la disponibilité de la plante et la partie de la plante utilisée pour un développement durable, nous avons ciblé plusieurs espèces dont l'usage traditionnel permet d'envisager leur développement économique. Ainsi, huit plantes tinctoriales présentes dans la région de Boeny, sources de couleurs rouge et jaune, les couleurs les plus recherchées dans les industries, ont été retenues. Une première caratérisation de chaque espèce est énoncée dans cette étude. Il s'agit de *Acridocarpus excelsus* (Malphigiaceae), *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae), *Harungana madagascariensis* (Hypericaceae), *Paracarphalea kirondron* (Rubiaceae), *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae), *Tectona grandis* (Verbenaceae), *Woodfordia fruticosa* (Lythraceae) et *Xylocarpus granatum* (Meliaceae).

Mots-clés : Biodiversité ; Madagascar, plantes tinctoriales, ethnobotanie, critères de choix

2-1 Introduction

Madagascar est un hot-spot de la biodiversité mondiale dont 83% des espèces végétales sont endémiques [1,2]. A travers différents domaines et filières d'exportation, nombre de ces plantes se sont révélées avoir un intérêt socio-économique : en parfumerie, dans l'industrie des huiles et matières grasses, dans les épices et condiments ou comme produits de bases de diverses industries. Certaines sont aujourd'hui négligées et abandonnées comme les plantes productrices de caoutchouc naturel [3], et d'autres émergent comme le poivre sauvage ou Tsiperifery [4]. D'autres, très peu exploitées, pourraient bénéficier de la demande des consommateurs pour des produits naturels, à faible empreinte écologique. C'est le cas notamment des plantes à propriétés tinctoriales qui sont des végétaux contenant des colorants et des pigments naturels et dont la biodiversité est particulièrement développée à Madagascar[4] [5–9].

L'utilisation des plantes tinctoriales à Madagascar a été mentionnée depuis plus d'un siècle par différents auteurs à l'exemple de Heckel en 1910 dans les « Plantes utiles de Madagascar » [10] ou de Raymond Decary en 1946 dans les « Plantes utiles de la flore malgache » [5] et dans les « Plantes et animaux utiles de Madagascar » [11]. Elles ont été utilisées jadis pour la teinture artisanale de fibre naturelle comme le raphia, le coton ou la soie [12]. Actuellement, l'état d'exploitation de cette filière reste encore au niveau de cette échelle artisanale et a même régressé vu que les sources naturelles de colorants ont été supplantées par les sources artificielles. Même avec la nouvelle tendance mondiale liée à la recherche de produits d'origine naturelle, seulement quelques régions ont conservé les savoir-faire et disposent encore de l'expertise pour l'utilisation de ces plantes tinctoriales à l'exemple de la région Boeny à l'Ouest de Madagascar [9]. Concrètement, une société spécialisée en teinture naturelle et en tissage de fibre naturelle appelée Terre là Sarl en partenariat avec une association dénommée Femmes Entrepreneurs Environnement de Mahajanga (FEEM) restent encore très active au niveau de cette région. De ce fait, de nombreuses plantes tinctoriales sont utilisées par les artisans teinturiers dans cette région.

Pour notre étude, nous avons retenu huit espèces. Ce choix a pris en compte en premier lieu, les connaissances que les artisanes encadrées par Terre-Là SARL et FEEM avaient des plantes, des méthodes de production et couleurs obtenues. Les autres critères pris en compte ont été, la disponibilité de la ressource, la partie de la plante utilisée afin de privilégier une collecte durable, la gamme de couleurs attendues et leur valorisation économique potentielle, la généricité des questions scientifiques et techniques que leur étude et leur utilisation pouvaient soulever. Ainsi, huit plantes tinctoriales ont été retenues et vont faire l'objet d'une description ethnobotanique que nous présentons dans cette partie. Il s'agit de *Acridocapus excelsus A. Juss ; Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob., *Harungana madagascariensis*

[4] Voir Chapitre I

Lam. Ex Poir, *Paracarphalea kirondron (Baill.) Razafim., Ferm, B. Bremer & Kårehed, Rhizophora mucronata* Lam., *Tectona grandis* L. f., *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz, *Xylocarpus granatum* J. König.

2-2 Critères de sélection des plantes tinctoriales cibles pour la suite de l'étude

Des éléments qui permettent de déterminer les potentialités de ces plantes tinctoriales de la biodiversité malgache ont été pris en compte afin de sélectionner quelques plantes intéressantes dont les propriétés mériteraient d'être approfondies pour la suite. Ces critères concernent :

2-2-1 La zone d'étude

La zone d'étude prise en compte pour la sélection des espèces étudiées a été focalisée sur la région Boeny à Madagascar où œuvrent FEM et Terre-Là SARL. Trois localités ont été considérées (voir figure 7) :

- Amborovy dans la commune de Mahajanga II, qui est située à quelques kilomètres au nord de Majunga I qui est le chef-lieu de région ;
- Boanamary, un village situé dans les estuaires du fleuve Betsiboka à 35 km au sud-ouest de la ville de Majunga. Au niveau de ces estuaires se trouvent des mangroves qui sont des écosystèmes protégés mais où la collecte de matériels végétaux est permise par la législation sous réserve d'une autorisation ;
- Ampombilava, qui est un village implanté dans la commune de Marosakoa à 112 km au sud-est de Mahajanga. Ce village fait partie des zones périphériques du parc national d'Ankarafantsika. Les prélèvements ont été effectués à l'extérieur du Parc National dans des zones non protégées.

Les différentes collectes de matières premières et enquêtes ethnobotaniques ont été réalisées avec l'autorisation de recherche N° 184/17 MEEF/SG/DGF/DSAP/SCB du 21/06/2017 et N° 027/18/MEEF/SG/DGF/DSAP/SCB.Re du 20/02/2018 délivrée par le secrétariat général du Ministère des eaux et forêts du gouvernement malgache, la Direction générale des forêts et la Direction du système des aires protégées.

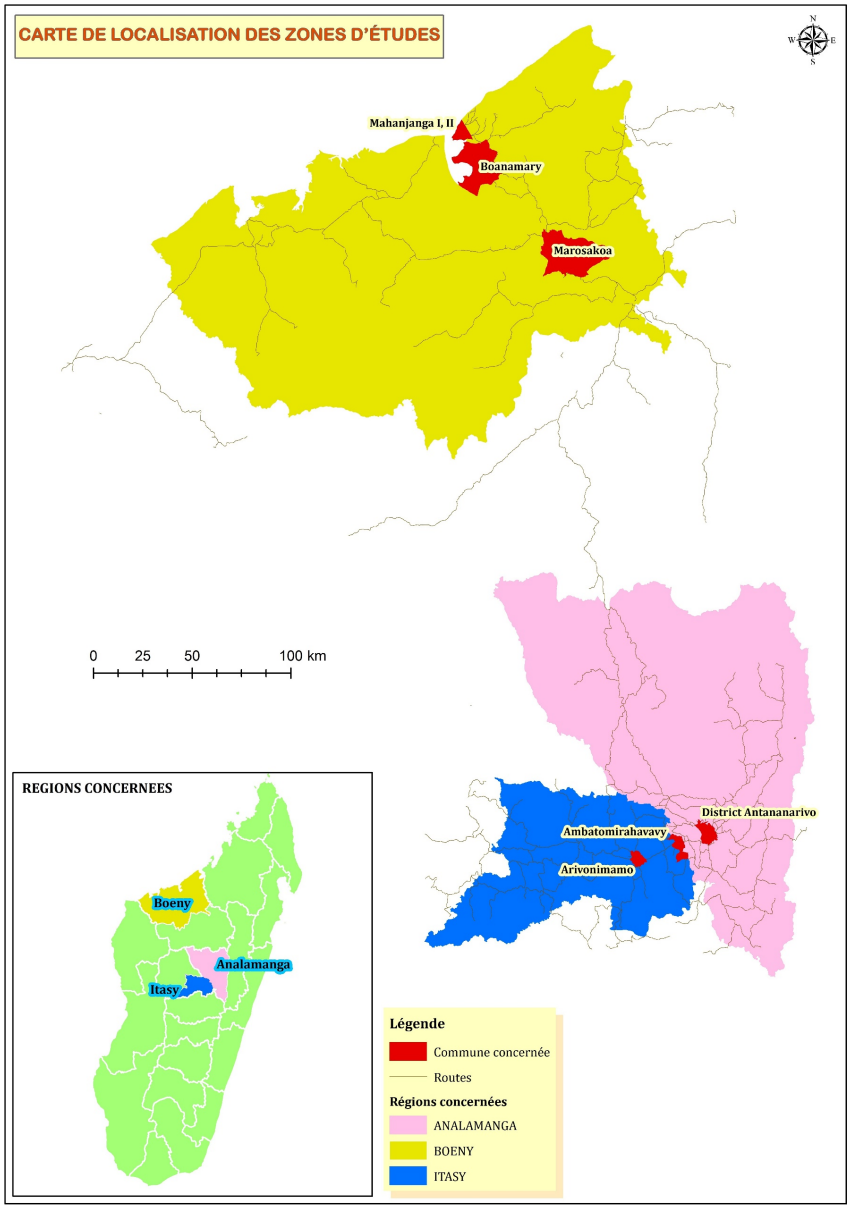


Figure 7. Carte de localisation des zones sélectionnées pour l'étude

2-2-2 La plage de couleur

La couleur a une grande influence sur les consommateurs que ce soit dans le cadre physiologique, à travers leurs comportements, ou psychologique sur le choix d'un produit. En effet, elle est le premier critère qui attire un client et qui détermine en premier lieu son appréciation vis-à-vis de la qualité du produit. [13, 14]. Certaines couleurs sont plus recherchées que d'autres en vue de leur application dans différentes filières industrielles, en particulier l'agro-alimentaire. Le rouge et le jaune sont les deux couleurs les plus demandées dans les industries. 50 % des recherches effectuées sur les colorants se portent sur la couleur rouge [13]. Le jaune, est très utilisé dans les industries des matières grasses et des céréales tandis que les teintes de rouge sont utilisées dans l'industrie de la viande. La confiserie recherche plutôt une panoplie de couleurs vives et distinctives pour attirer les enfants.

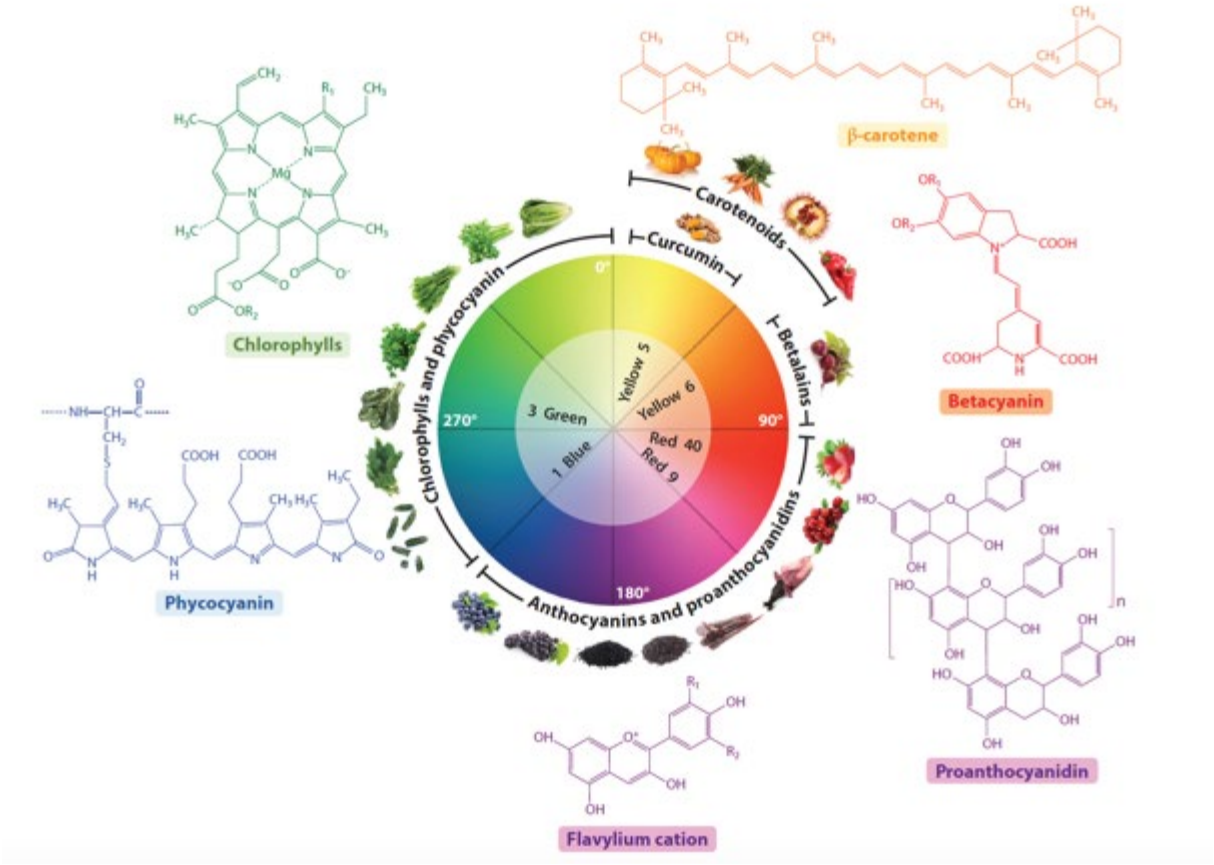


Figure 8. Exemple de pigments naturels issus des plantes (Source : De Mejia *et al.,* 2019 [15])

2-1-3 La disponibilité et la partie de la plante utilisée pour un développement durable

La couleur provient de la synthèse de certains métabolites secondaires qui peuvent être contenus dans différentes parties de la plante (fruits, fleurs, racines, tiges, feuilles, etc.). Les sources communes végétales de teinte rougeâtres sont les bétalaines et pro anthocyanidines. Le jaune et l'orange proviennent généralement des caroténoïdes ou de la curcumine et le vert s'obtient à partir de la chlorophylle. Les sources de bleus utilisables sont assez rares dans la nature à l'image des phycocyanines (Figure 8).

Dans le contexte actuel, l'accès aux ressources biologiques naturelles, lorsqu'elles sont non domestiquées ni cultivées limite souvent la disponibilité en matière première, en particulier dans les cas où les prélèvements sont destructeurs pour la plante (cas où les parties utiles sont les plantes entières ou les racines). Les espèces choisies dans cette étude sont donc des espèces qui ont des propriétés colorantes intéressantes déjà utilisées par la population locale, dont la ressource est abondante et dont les prélèvements ne sont pas limités par des mesures de protection de la biodiversité.). Les plantes retenues seront des espèces qui auront au plus un statut « Less Concern (LC) » dans la liste rouge des espèces établie par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN). Cela signifie que ces espèces sont considérées comme une préoccupation mineure en termes de risques d'extinction et de

conservation. Ce choix préalable permettra d'envisager des perspectives par rapport à une éventuelle maitrise de la cueillette et/ou de la culture de ces espèces en vue d'une exploitation industrielle. Pour toutes les espèces sélectionnées dans cette étude. D'après les expertises de la population locale, la méthode de collecte qu'elle utilise n'est pas dénaturante pour la plante et est faite de façon à ce que la plante puisse continuer à se développer.

2-1-4 Usages traditionnels des espèces de plantes tinctoriales et aspects économiques

La filière des plantes tinctoriales peine à se lancer à Madagascar alors qu'elle connait un essor considérable dans le monde durant ces dernières décennies dans plusieurs domaines comme le textile, l'agroalimentaire ou la cosmétique. Dans un pays où la population locale manque définitivement de sources de revenus, les plantes tinctoriales peuvent participer au développement de futures régions productrices.

Toutefois, le choix des plantes d'intérêt dépend aussi de leurs utilisations actuelles en dehors de leurs propriétés tinctoriales (Figure 9) et de leur intérêt économique à court et long terme. En effet, la plupart des plantes tinctoriales de la biodiversité malgache ont d'autres utilisations ou d'autres propriétés qui peuvent être complémentaires ou même plus intéressantes que leur valeur tinctoriale si on se rapporte à leur potentiel de valorisation économique ou à leur intérêt pour les populations locales. La sélection des espèces a donc été effectuée en tenant compte de l'ensemble de leur potentiel d'utilisation actuel ou futur et leur potentiel tinctorial sera mis en balance avec les autres formes de valeurs ajoutées.

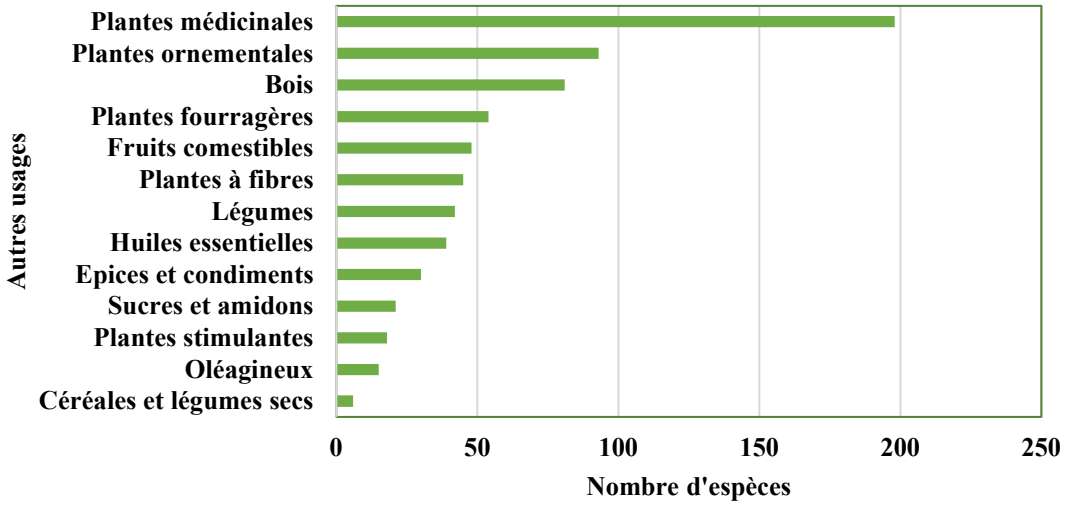


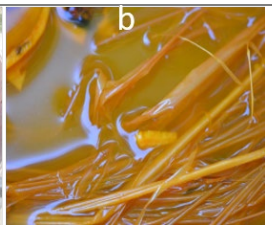
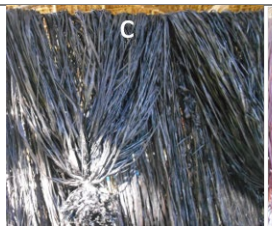
Figure 9. Autres usages des plantes ayant potentiellement des propriétés tinctoriales identifiées dans la biodiversité malgache (le graphique a été établi à partir d'une liste de plus de 200 espèces potentiellement tinctoriales sur la base des différentes types d'utilisations décrites dans les ouvrages PROTA (Plant Resources of Tropical Africa) ; chaque espèce peut avoir plusieurs types d'applications différentes).

Toutes les plantes tinctoriales (ou potentiellement tinctoriales) recensées à Madagascar ont généralement d'autres utilisations en dehors de leurs propriétés colorantes. Plus de 80% des plantes tinctoriales de Madagascar disposent de principes actifs qui leur donnent à la fois des propriétés tinctoriales et médicinales (Figure 9). Certaines plantes tinctoriales peuvent avoir des rôles auxiliaires pour améliorer les plantations (fixatrice d'azote par exemple) ce qui susciterait un intérêt de les mettre en association avec d'autres cultures. D'autres peuvent être utilisées comme sous-produits des utilisations primaires de la plante comme les écorces des bois de chauffe ou de bois d'œuvre.

2-1-5 Limite d'adaptation des pratiques locales à un usage agro-alimentaire

Les bases de documentation ou les expertises disponibles actuellement portent seulement sur quelques plantes tinctoriales malgaches et sont généralement axées sur leur utilisation comme teinture naturelle pour le textile (Tableau 6). Les teintures peuvent être réalisées à partir de la plante, directement sur la fibre naturelle ou avec l'aide de mordants pour stabiliser et fixer la couleur. Dans un objectif d'utiliser ces sources de colorants dans d'autres domaines tels les industries agroalimentaires, cosmétiques ou pharmacologiques, le choix des plantes tinctoriales a été axé sur les espèces qui ne nécessitent ni stabilisateurs ni fixateurs métalliques ou chimiques (mordants) et dont la teinture se fait par simple bain ou par différents bains successifs en milieu aqueux ou en utilisant des solvants compatibles avec les domaines d'utilisation.

Table 6. Techniques traditionnelles de teinture naturelle utilisées à Madagascar [8]

Méthodes traditionnelles de teintures	**Exemples de techniques et couleurs obtenues sur des fibres de raphia**	**Illustrations**
Bain de teinture La couleur peut se fixer sur les fibres par simple décoction et bain de teinture	- Ecorces de *R. mucronata* -> rouge (a) - Feuilles *d'I. tinctoria* -> bleu - Ecorces de *H. madagascariensis* -> jaune (b)	
Bain de teinture et mordançage Des fruits acides, du sulfate d'ammonium, de la cendre etc. sont utilisés pour fixer et stabiliser la couleur	- Ecorces de *T. mantaly* + boue ferrugineuse -> noir (c) - Ecorce de *A. excelsus* + cendre -> Rouge (d) - Fruit de *E. jambolena* + citron -> Vert	
Bains successives Des bains successives ou des superpositions de différentes couleurs par différents bain de teinture permettent d'obtenir d'autres teintes	- Feuilles d'*I. tinctoria* -> bleu (e) -> violet (f) - *Ecorce de H. madagascariensis* (jaune) + Feuille d'*I. tinctoria* (bleu) -> vert olive	

2-3 Les plantes retenues dans notre étude

Sur la base des documents bibliographiques consultés, des observations et des entretiens avec les artisanes, et recommandations des botanistes, nous avons retenu un ensemble de huit plantes qui répondent aux critères que nous avons établis. Elles sont listées dans le tableau 27.

Table 7. Liste des plantes tinctoriales retenues pour la suite de cette étude.

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Famille botanique	Couleur	Partie de la plante utilisée	Autres utilisations à Madagascar
***Acridocarpus excelsus* c**	*Mavoravo*	Malpighiaceae	Rouge	Ecorces	Médicinales (feuille), bois d'énergie
***Ceriops Tagal* (Perr.) C.B. Rob.**	*Honkovavy*	Rhizophoraceae	Rouge	Ecorces	Bois d'œuvre, bois d'énergie
***Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir**	*Harongana*	Hyperaceae	Jaune	Ecorces	Médicinales (feuilles et tiges)
***Paracarphalea kirondron* (Baill.) Razafim., Ferm, B.Bremer & Kårehed**	*Hazomenavony*	Rubiaceae	Jaune, orange	Racines adventives	Plantes ornementales
***Rhizphora mucronata* Lam**	*Honkolahy*	Rhizophoraceae	Rouge intense	Ecorces	Bois d'œuvre, bois d'énergie
***Tectona Grandis* L. f.**	*Kesika*	Verbenaceae	Rouge, violet	Feuilles	Bois d'œuvre
***Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz**	*Lambohenjana*	Lythraceae	Rouge	Racines adventives	Médicinales (feuilles, fleurs)
***Xylocarpus granatum* J.König**	*Tavela*	Meliaceae	Rose, rouge	Ecorces	Bois d'énergie

2-3-1 Caractéristiques botaniques de *Acridocarpus excelsus* A. Juss

L'écorce de *A. excelsus est* riche en pigments rouges qui sont utilisés localement par les teinturières de la commune de Marosakoa (Figure 10). La préparation se fait par grattage de l'écorce à l'aide d'un couteau qui est ensuite pilée avant d'être chauffée dans l'eau. La teinture se fait par simple immersion des fibres dans le bain de teinture. L'ajout de cendre de bois permet de faire virer la couleur sur le raphia. Les caractéristiques éthnobotaniques de cette espèce sont décrites ci-après [8,16].

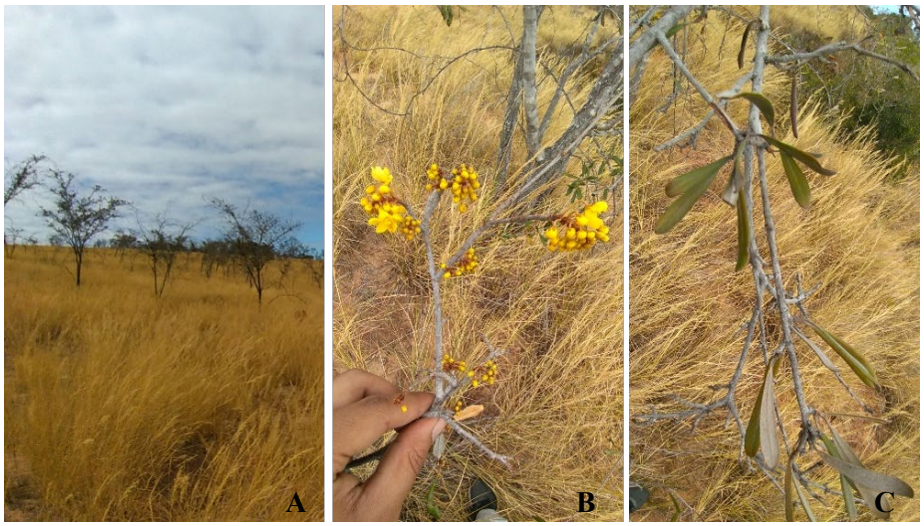


Figure 10. Photographie de l'espèce *Acridocarpus excelsus*
(A : plants dans la savane sèche de l'Ouest de Madagascar ; B : inflorescences ; C : feuilles et tiges)

Famille : Malpighiaceae

Nom vernaculaire : Mavoravo (mdg)

Origine, écologie et répartition géographique : Le genre *Acridocarpus* comprend une trentaine d'espèces, réparties entre l'Afrique continentale (23 espères), Madagascar (4 espèces), la péninsule Arabique, l'Inde et la Nouvelle-Calédonie. *Acridocarpus excelsus* est endémique de Madagascar. Elle est largement répandue dans les zones sèches de la région Ouest de Madagascar. Elle se rencontre depuis la forêt littorale humide jusqu'à la forêt sèche décidue et aux fourrés. Cette plante pousse généralement sur des sols secs rocheux et sableux, depuis le niveau de la mer jusqu'à 1250 m d'altitude. Elle est passablement résistante aux feux de brousse quand elle est encore sur pieds.

Aspects botaniques : C'est un petit arbre à feuilles caduques pouvant atteindre 15 m de hauteur avec une écorce épaisse, grise et grossièrement fissurées. Les feuilles sont opposées, alternes ou groupées à l'extérieur des rameaux, simples et entières. Les inflorescences sont composées d'une grappe terminale portant de 8 à 15 fleurs. Les fleurs sont bisexuées et zygomorphes.

Autres propriétés : L'écorce est riche en tannin, ayant des propriétés astringentes. Le bois est rouge et dur, utilisée dans la pharmacopée locale pour lutter contre la diarrhée ou la dysenterie. Le bois découpé de *A. excelsus* est aussi utilisé comme combustible.

Perspectives : Dans une perspective d'utilisation durable et raisonnée, il est possible de concilier les usages combustibles et tinctoriaux : les écorces utilisées pour l'extraction des pigments pourront être prélevées du bois avant qu'il soit utilisé comme bois de feu.

2-3-2 Caractéristiques botaniques de *Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob.

L'écorce du tronc est utilisée pour la teinture en Asie et en Afrique dont Madagascar. En Asie du Sud-Est, l'écorce de *C. tagal* est un ingrédient important pour la coloration des batiks javanais inscrit sur la liste du patrimoine culturel immatériel de l'humanité depuis 2009. Il produit des colorations rouges, brunes violettes ou noires. Les caractéristiques éthnobotaniques de *C. tagal* sont décrites ci-après [8,16–19].

Famille : Rhizophoraceae

Nom vernaculaire : Honkolahy (mdg), *Yellow mangrove* (en), Palétuviers (fr)

Origine, écologie et répartition géographique : Le genre *Ceriops* comprend deux espèces, *C. tagal* et *C. decandra* (Griff.). Ce sont des arbres de mangrove. L'origine de *C. tagal* n'est pas bien définie mais il est maintenant répandu et commun sur les côtes de l'Afrique orientale et les îles de l'Océan Indien en passant par l'Asie tropicale, l'Australie et le Pacifique. A Madagascar, il est présent dans tous les estuaires de mangroves du Nord au Sud de l'île. *C. decandra* se rencontre principalement en Asie tropicale.

Aspects botaniques : C. tagal et un arbuste ou petit arbre glabre pouvant atteindre 6 m de hauteur. L'écorce est de couleur grise à brun rouge, parfois profondément fissurée avec un système racinaire constitué de quelques racines profondes et de racines superficielles rayonnant à partir du tronc et comprenant des pneumatophores. Les feuilles sont opposées et groupées à l'extrémité des rameaux, simples et entières. L'inflorescence comprend jusqu'à dix fleurs. Les fleurs sont bisexuées, régulières, avec un calice charnu et d'une couleur brun rougeâtre. Les fruits sont des baies indéhiscentes ovoïdes renfermant une unique graine dont la germination produit un hypocotyle pouvant atteindre jusqu'à 35 cm de longueur, arrondi ou à côtes longitudinales anguleuses, et à extrémité pointue. *Ceriops tagal* peut pousser en mélange avec d'autres palétuviers tels que *Bruguiera*, *Rhizophora* et *Xylocarpus* spp., mais on l'en distingue aisément par ses feuilles d'un vert brillant et arrondies (jamais pointues ou apiculées), ses bourgeons aplatis, ses hypocotyles côtelés, minces et relativement courts, et son écorce relativement claire.

Autres Propriétés : Cet arbre a été très utilisé en médecine traditionnelle. Dans certains pays d'Asie, l'écorce est utilisée dans la préparation de lotion anti-ulcère, pour le traitement de douleurs abdominales ou pour soigner le paludisme en substitut de la quinine. Il est aussi utilisé aux Philippines pour soigner le diabète. La teneur en tannin de l'écorce de *C. tagal* peut varier dans de larges proportions, de 13 % à plus de 40 %, ce qui est une caractéristique commune et notable des écorces de palétuviers. Leurs tanins appartiennent au groupe des tanins condensés de type procyanidine. Les feuilles contiennent moins de tanins, environ 15 %, et l'écorce des rameaux en contiennent de 25-41 %. Dans les communautés de pêcheurs, les filets et les voiles sont traités avec un extrait d'écorce pour les préserver de la pourriture.

Le bois de cette plante est utilisé autant dans les autres pays qu'à Madagascar pour fournir des bois droits et longs pour les toitures de maison et des planches pour la construction de bateau. Il peut aussi être utilisé comme bois d'énergie ou pour fabriquer du charbon de bois.

Perspectives : Les mangroves font parties des écosystèmes protégés à Madagascar et leur exploitation est régulée par une législation très stricte. Toutefois une gestion stricte de la ressource liée à des actions de reboisement peut être envisagée, au bénéfice des populations locales. Dans ce contexte, les écorces et leur propriétés tinctoriales, mais aussi tannantes et médicinales, pourraient être un des sous-produits de l'industrie du bois.

Figure 11. Photographie de l'espèce *Ceriops tagal*
(A : arbre ; B : propagules ; C : écorce rouge du tronc)

2-3-3 Caractéristiques botaniques de *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir

H. madagascariensis (Figure 12) est utilisé par les teinturiers malgaches pour colorer des textiles, des nattes, des fibres en un jaune très intense. Une substance gommeuse de couleur rouge orangé s'écoule de l'écorce lorsque celle-ci est entaillée. La teinture est obtenue par simple décoction des morceaux d'écorce et une immersion des fibres à colorer. Les caractéristiques éthnobotaniques de cette plante sont décrites ci-après [8,16,20] :

Figure 12. Photographie de l'espèce *Harungana madagascariensis*
(A : feuilles et tiges ; B : inflorescence ; C : écorce jaunâtre du tronc)

Famille : Hypericaceae

Nom vernaculaire : Harongana (mdg)

Origine, écologie et répartition géographique : H. madagascariensis est originaire de Madagascar et se développe dans les forêts pluviales des basses terres et des hautes terres du niveau de la mer à 1800 m d'altitude. Il peut aussi pousser dans les forêts tropicales. C'est un arbre héliophile pionnier qui se développe dans les savanes, les clairières, les jachères ou les recrus secondaires à la suite d'un feu de brousse. Il est largement répendu en Afrique de l'Ouest comme au Nigeria ou en Côte d'Ivoire mais aussi en Afrique de l'Est. A Madagascar, *H. madagascariensis* se développe surtout dans les Hautes Terres et sur la partie ouest de l'île.

Aspects botaniques : H. madagascariensis est un arbre à feuillage persistant avec un couvert très ramifié, lourd et étalé. Il pousse généralement jusqu'à 12 m de haut, avec des spécimens qui peuvent atteindre plus de 25 m. Le fût est droit et cylindrique. Il possède un duvet jaune orangé sur ses parties jeunes et de petites fleurs jaunâtres.

Autres propriétés : Cette plante a démontré plusieurs propriétés médicinales connues par la population locale et utilisée dans la médecine traditionnelle. Les feuilles sont utilisées pour faire des décoctions aux propriétés anti-ulcères et digestives. Ces propriétés peuvent provenir de leur richesse en alcaloïdes, flavonoïdes et tannins. Elles ont aussi des effets sur les affections hépatiques et ont démontrés des propriétés antidiabétiques. Le bois de *H. madagascariensis* est utilisé comme bois de service dans la construction comme la production de poteaux, de planches ou d'éléments de toitures. Il est aussi utilisé comme combustible.

Perspectives : Dans les régions couvertes par cette étude, *H. madagascariensis* semble très peu utilisée pour ses propriétés tinctoriales. Pourtant cette espèce est commune à Madagascar, elle est peu exigeante en terme écologique, se propage facilement et croît rapidement. Le développement d'une filière de production de colorant semble donc envisageable à moyen terme et sans risque quant à la préservation de l'espèce.

2-3-4 Caractéristiques botaniques de *Paracarphalea kirondron* (Baill.) Razafim., Ferm, B. Bremer & Kårehed

Des études effectuées sur quelques Rubiaceae de Madagascar ont mis en évidence la présence de quinones dans les racines de *P. kirondron* (Figure 13) qui leur confèrent des propriétés tinctoriales. Aujourd'hui, seules quelques teinturières du village d'Ampombilava (commune Marosakoa) utilisent leurs racines adventives de *P. kirondron* comme source de couleur orangée pour teindre les fibres de raphia de *P. kirondron*. Les caractéristiques éthnobotaniques du *P. kirondron* sont définies ci-dessous [21–23]:

Figure 13. Photographie de l'espèce *Paracarphalea kirondron*
(A : tige ; B : fleurs ; C : fragments de racine montrant la coloration jaune)

Famille : Rubiaceae

Nom vernaculaire : Hazomenavony (mdg), *Flaming beauty* (en)

Origine, écologie et répartition géographique : Paracarphalea kirondron est une plante endémique de Madagascar, répandue au Nord, Nord-Ouest, Ouest et dans le Sud de Madagascar. Cette espèce était rattachée au genre *Carphalea* qui comportait six espèces, mais des études phylogénétiques récentes ont abouti à la création du genre *Paracarphalea*, qui, rassemble *C. angulata*, *C. kirondron* et *C. pervilleana*. Le genre *Paracarphalea* diffère du genre *Carphalea* par un calice rouge à rose foncé. Généralement,

les fleurs du genre *Paracarphalea* ont un lobe du calice qui est plus grand que les autres, contrairement aux fleurs des espèces du genre *Carphalea*.

A*spects botaniques* : *P. kirondron* est un arbuste d'environ 5 m de hauteur dont les plus grands spécimens peuvent atteindre jusqu'à 10 m. Le tronc n'est pas ramifié et dispose d'une couronne de plusieurs mètres de diamètre. La disposition des feuilles est essentiellement décussée avec des limbes disposés immédiatement en dessous de l'inflorescence et rarement poilus. Les fleurs sont toujours hermaphrodites avec un calice rouge vif à poils courts. Les lobes sont très inégaux avec la présence d'un lobe plus grand que les autres. La corolle est aussi rougeâtre et poilue à l'extérieur. Les fruits sont indéhiscents. Les racines sont fasciculées et de couleur jaune orangée.

Autres propriétés : P. kirondron est avant tout utilisée comme plante ornementale sur les bords de route ou dans les jardins. Ses fleurs rouges intense lui ont donné son nom de « flaming beauty ». Son écorce contient des tanins et ses feuilles des flavanols et des flavonosides. Les feuilles et tiges semblent avoir des propriétés médicinales.

Perspectives : *P. kirondron* est très répandue et elle est utilisée en tant que plante ornementale, bien que la multiplication végétative soit assez difficile. Toutefois, certains horticulteurs semblent maitriser sa propagation, ce qui renforce l'intérêt qui peut être porté à cette espèce comme source de colorant. Dans cette perspective, les techniques de collecte pourront être optimisées afin d'assurer une gestion durable de la ressource et préservant le développement de la plante après la découpe des racines adventives.

2-3-5 Caractéristiques botaniques de *Rhizophora mucronata* Lam

R. mucronata (Figure 14) est, comme les autres arbres de la famille des Rhizophoraceae, riche en tanin. La quantité de tanin dans l'écorce peut varier considérablement. Dans l'écorce séchée à l'air, la teneur en tanin peut atteindre 40%. L'écorce est utilisée pour le tannage du cuir et pour durcir et teindre les lignes, les filets, les cordes utilisées par les pêcheurs. Elle sert aussi de matières premières pour la teinture des fibres de raphia et de soie en rouge et rouge brunâtre. Les caractéristiques éthnobotaniques de cette espèce sont décrites ci-dessous [8,16,24,25] :

Figure 14. Photographie de l'espèce *Rhizophora mucronata*
(A : jeune sujet ; B : feuilles ; C : écorce rouge du tronc)

Famille : Rhizophoraceae

Nom vernaculaire : Honkovavy (mdg) ; palétuvier (fr)

Origine, écologie et répartition géographique : R. mucronata est une espèce courante dans les mangroves des estuaires de l'océan Indien et du Pacifique. A Madagascar, elle est largement répandue du Nord au Sud.

Aspects botaniques : Les arbres de cette espèce peuvent atteindre jusqu'à 10 m de hauteur et peuvent développer un tronc de 50 à 70 cm de diamètre. Les racines sont pivotantes, avec de nombreuses racines latérales développées à partir de la base du tronc, très ramifiées, généralement appelées racines-échasses qui partent en arcs-boutants du tronc principal. Le tronc est cylindrique, recouvert d'une écorce presque noire ou rougeâtre, rugueuse ou parfois écailleuse, avec des fissures horizontales proéminentes. Le houppier développe un port étalé ou semi-prostré surtout dans des conditions défavorables. Les feuilles sont coriaces, largement elliptiques à oblongues, avec des points noirs très distincts sur la face inférieure, de couleur vert brillant sur le dessus et plus pâle dessous. Le calice est profondément lobé, de couleur jaune pâle ou presque blanc avec des pétales lancéolés et légèrement jaunâtres. Les fruits mûrs sont des baies ovoïdes allongées, de 5 à 7 cm de longueur.

Autres utilisations : La ressource en R. *mucronata* est abondante pour produire du charbon de bois de bonne qualité et pour le bois de chauffage à Madagascar même si son exploitation est très règlementée.

Les tiges et les feuilles ont des propriétés médicinales et sont utilisées par exemple comme médicament en cas d'hématurie ou en tant qu'anticholinestérase. Cette plante a montré des propriétés antioxydantes et antibactériennes [24, 25]

Perspectives : Dans la perspective d'une exploitation de leur propriété tinctoriale à Madagascar, cette plante a un intérêt considérable au même titre que le *Ceriops tagal*, à conditions de pouvoir assurer la gestion durable de la ressource et le maintien de la mangrove.

2-3-6 Caractéristiques botaniques de *Tectona grandis* L. f.

L'écorce de racine et les jeunes feuilles de *Tectona grandis* (Figure 15) produisent une teinture brun jaunâtre, rouge ou jaune, qui sert à teindre le papier et les textiles (soie, coton ou laine). Les jeunes feuilles rouges sont les parties utilisées par les artisans teinturiers à Madagascar pour la teinture de fibre naturelle. Les caractéristiques éthnobotaniques de cette espèce sont décrites ci-après [8,16,26].

Figure 15. Photographie de l'espèce *Tectona grandis*
(A : jeune teck ; B : feuille verte mature et jeune feuille rougeâtre)

Famille : Verbenaceae

Nom vernaculaire : Kesika (mdg), Teck (fr)

Origine, écologie et répartition géographique : Le teck est originaire des forêts tropicales du Sud et du Sud-Est asiatique. Il est une des espèces les plus plantées sous les tropiques pour ses qualités de bois d'œuvre, car les climats tropicaux sont favorables au teck tant que les températures minimales moyennes ne descendent pas sous 18°C, qu'il y a une saison sèche marquée d'au moins deux mois et que la pluviométrie annuelle dépasse 1000 mm sans excéder 2500 mm ; plus la saison sèche est longue, mieux le teck supporte des pluviométries élevées. Au cours du 20ème siècle, il a été introduit dans de nombreux pays africains dont Madagascar où on peut trouver des tecks sous formes de peuplements disséminés ou d'arbres de bordure essentiellement dans la zone occidentale de l'Île, en particulier dans la région d'Ankarafantsika. Il n'existe pas de données précises mais la surface totale de plantation de tecks sur Madagascar ne doit pas excéder quelques centaines d'hectare.

Aspects botaniques : T. grandis est un arbre caducifolié de taille moyenne atteignant jusqu'à 50 m de haut. L'écorce est fissurée longitudinalement et finement écailleuse de couleur grise à brune. Les feuilles sont opposées décussées, simples et entières avec un limbe largement ovale. Les nouvelles feuilles sont de couleur rouge puis virent au vert. Les inflorescences sont disposées en grandes panicules terminales atteignant 70 cm de long. Les fleurs sont bisexuées, régulières, et petites avec une corolle à tube court et à lobes plus longs, étalés ou réfléchis. Les fruits sont drupes globuleuses et densément poilues, contenant généralement un ou deux graines.

Autres propriétés : Bois de haute qualité technologique, imputrescible, le teck est une essence très utilisée pour la construction navale et dans la menuiserie de luxe. Elle est largement utilisée dans la fabrication de porte et de fenêtre, ainsi que de meubles, poteaux électriques et téléphoniques. Les feuilles sont utilisées pour l'emballage des produits alimentaires sur les marchés. Elles contiennent des tannins, des flavonoïdes, des quinonoides ainsi que de nombreux autres alcaloïdes. Elles ont des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. En médecine traditionnelles, les feuilles sont réputées diurétiques, dépuratives, stimulantes, anti-dysentériques et vermifuges. Elles sont utilisées pour soigner l'anémie, l'asthénie, les fièvres et le paludisme.

Perspectives : T. grandis a démontré une bonne adaptation au climat et aux différents types de sols de la région Ouest de Madagascar même si les arbres issus des plantations malgaches sont rarement bien venant, ni de grande qualité technologique car constituée de matériel végétal non sélectionné et souvent conduits sans sylviculture spécifique. Cette hétérogénéité est accentuée par le passage fréquent des feux de brousse qui contribuent aux mauvaises croissances et formes des arbres observés. Aussi, la valorisation tinctoriale des jeunes feuilles pourrait donner une nouvelle valeur à ces plantations.

2-3-7 Caractéristiques botaniques de *Woodfordia fruticosa* L. Kurz

Le *W. fruticosa* (Figure 16) est exploité commercialement en Inde comme source de tanins et de colorants extrait à partir de ses fleurs. A Madagascar, les racines sont aussi utilisées comme source de colorant rouge et brun rougeâtre par les artisans de la commune de Boanamary. Les caractéristiques éthnobotaniques du *W. fruticosa* sont décrites ci-après [27–29].

Figure 16. Photographie de l'espèce *Woodfordia fruticosa*
(A ; jeune sujet de W. fruticosa ; B : racine dont on note la coloration rouge)

Famille : Lythraceae

Nom vernaculaire : Lambohenjana (mdg), *fire-flam bush* (en)

Origine, écologie et répartition géographique : W. fruticosa est une espèce répandue en Afrique de l'Est et en Asie. Elle est indigène de Madagascar. C'est un arbuste grégaire commun qui colonise les perturbés et les terres agricoles abandonnées ou en jachère.

Aspects botaniques : W. fruticosa est un arbuste bien ramifié atteignant 5 à 7 m de hauteur avec une écorce brun rougeâtre qui se décolle en bandes. Les nouvelles pousses et feuilles ont des points noirs et des cercles de glandes. Les feuilles sont simples, couvertes de poils blancs et opposées ou en verticille de trois. Les fleurs sont en grappes jusqu'à une vingtaine sur de courtes pousses à l'aisselle des feuilles. Les fleurs individuelles sont grandes et de couleur rouge-orange d'où leur nom « fire-flam bush » en anglais. Les fruits sont des capsules irrégulières sèches contenant de nombreuses petites graines lisses et brunes.

Autres propriétés : Cette plante est célèbre pour ses propriétés médicinales grace à ses feuilles et ses fleurs, en ne citant par exemple que leur effet anthelminthique, les effets contre la lèpre, la leucorrhée, la ménorragie et le traitement de la dysenterie. Les fleurs sont aussi consommées comme nourriture et utilisées dans la préparation d'une boisson rafraîchissante. Elle dispose aussi de propriétés aphrodisiaques. L'écorce et la racine seraient les parties les plus actives.

Perspectives : Cette plante pousse sur les sols délaissés ou vieilles terres agricoles ce qui en fait une parfaite culture pour valoriser les zones marginales ou dégradées. Les racines adventives, exploitées à Madagascar, sont très longues ce qui facilitent la récolte tout en préservant la plante. La possibilité d'utiliser les fleurs comme matière première pour la production de pigments pourrait rendre la collecte complétement durable.

2-3-8 Caractéristiques botaniques de *Xylocarpus granatum* J. König

L'écorce de *Xylocarpus excelsus* (Figure 17) est utilisée localement pour le tannage et la teinture. La couleur extraite donne un teint rosâtre vif plus attirant comparé aux autres plantes des mangroves qui ont des écorces produisant des colorations brunes rougeâtres. Les caractéristiques éthnobotaniques de cette espèce sont définies ci-après [8,16,30,31].

Figure 17. Photographie de l'espèce *Xylocarpus granatum*
(A : feuilles ; B : écorce du tronc, riche en colorant)

Famille : Meliaceae

Nom vernaculaire : Tavela (mdg), *Cannonbal mangrove* (en)

Origine, écologie et répartition géographique : Xylocarpus granatum est une espèce de plante de mangrove que l'on trouve sur les sols vaseux, notamment vers leur limite supérieure. Il est largement réparti dans les régions côtières depuis l'Afrique orientale en passant par l'Asie tropicale jusqu'en Australie tropicale et en Polynésie. A Madagascar, elle est présente dans tous les écosystèmes de mangroves.

Aspects botaniques : X. granatum est un arbre de taille moyenne, atteignant 15 m de hauteur et 90 cm de diamètre. Cet arbre dispose de racines superficielles fines, ramifiées, rubanées. L'écorce est mince, lisse, écailleuse se desquamant irrégulièrement et de couleur blanchâtre à brun-jaune à l'extérieur et rose rougeâtre à l'intérieur. Les feuilles sont alternes, composées et paripennées. Les fleurs sont unisexuées et régulières avec des pétales libres, oblongs, blancs crémeux ou rosés. Les graines en forme de tétraèdre irrégulier, jusqu' à 6 cm de long, brunes, avec un tégument liégeux.

Autres propriétés : Presque toutes les parties de l'arbre contiennent du tanin : écorce, bois, feuilles et fruits. Toutefois, c'est l'écorce des arbres adultes qui est la plus riche en tanin, en comptant 20 - 34% de la matière sèche. L'écorce astringente a quelques usages médicinaux. Elle sert à traiter la dysenterie, la diarrhée et autres troubles intestinaux. Elle est également employée comme fébrifuge. Le bois contiendrait des métabolites ayant une action antipaludique. Cet arbre est aussi employé dans la construction de bateaux, pour fabriquer des chevilles, des poteaux de construction, des objets sculptés, des manches d'outils et des meubles. Il est aussi utilisé comme bois de feu. Son écorce est employée pour tanner les peaux épaisses, ainsi que pour renforcer et préserver les filets de pêche.

Perspectives : Cet arbre ne pousse généralement pas en peuplements purs et son écorce est peu épaisse. Toutefois son exploitation peut être intéressante dans le cadre où *X. granatum* reconstitue sont écorce après écorçage. Mais comme pour toutes les espèces de mangroves, la gestion de cette ressource doit prendre en compte la fragilité de cet écosystème.

Conclusion

La biodiversité malgache est source d'une multitude de plantes riches en pigments et en colorants qui ont manifestement des potentiels très intéressants pour devenir de futures sources de matières premières pour les industries des colorants. Cependant, les seules connaissances actuelles sont celles issues des savoirs et des savoir-faire traditionnels et empiriques transmis de génération en génération, et elles se limitent généralement à la teinture des textiles. Il n'existe pas ou peu d'information sur d'autres utilisations de leurs propriétés colorantes ou sur l'état de la ressource, en particulier leur disponibilité. Ce manque de données scientifiques qualitatives et quantitatives constitue le principal frein à leur exploitation. Sur la base des critères définis dans ce chapitre, en particulier, la zone d'étude, la plage des couleurs produites, la disponibilité de la plante et la partie de la plante utilisée pour un développement durable, nous avons pu cibler plusieurs espèces dont l'usage traditionnel permet d'envisager leur développement économique, à condition que celui-ci soit précédé d'une recherche permettant de préciser les conditions d'utilisation et de valorisation de ces plantes. Ainsi, huit plantes tinctoriales présentes dans la région Boeny, sources de couleurs rouge et jaune, les couleurs les plus recherchées dans les industries, ont été retenues pour la suite de notre étude. Il s'agit de l'*Acridocarpus excelsus* (Malphigiaceae), *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae), *Harungana madagascariensis* (Hypericaceae), *Paracarphalea kirondron* (Rubiaceae), *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae), *Tectona grandis* (Verbenaceae), *Woodfordia fruticosa* (Lythraceae) et *Xylocarpus granatum* (Meliaceae). Ces huit plantes sont encore utilisées par la population locale dont l'expertise et le savoir-faire quant aux modes d'extraction des pigments et d'utilisation des teintures ainsi obtenues peuvent nous servir de données de base pour construire un programme de recherche.

Ainsi, dans l'objectif de fournir des données scientifiques qui seront utiles à l'industrie des pigments, ces huit plantes seront caractérisées pour la suite de l'étude. Ces nouvelles données pourront initier la création ou la relance d'une filière génératrice de revenus durables pour les populations locales dans ces zones ou les sources de revenus sont très limitées. Ainsi, des parties de la plante (racines adventives, écorces ou feuilles) utilisées par les teinturières ont été collectées. Par la suite, différentes études plus approfondies dont les propriétés physico-chimiques, technologiques, toxicologiques et biologiques des différents extraits obtenus à partir de ces plantes seront effectuées.

Références

[1] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 2000, 403 :853–858.

[2] Goodman SM, Benstead JP. Updated estimates of biotic diversity and endemism for Madagascar. Oryx 2005; 39:73–7.

[3] Danthu P, Razakamanarivo R-H, Deville-Danthu B, Razafy F-L, Le Roux Y, Penot E. The short and forgotten history of rubber in Madagascar: The first controversy between biodiversity conservation and natural resource exploitation. Bois et Forêts des Tropiques 2016 ;328 :27–43.

[4] Razafimandimby H, Benard A-G, Andrianoelisoa H, Leong Pock Tsy J-M, Touati G, Levesque A., Tsiperifery, the wild pepper from Madagascar, emerging on the international spice market whose exploitation is unchecked: current knowledge and future prospects. Fruits 2017 ;72 : 331–40.

[5] Decary R. Plantes utiles de la Flore Malgache. Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale 1946 ; 26 :383–9.

[6] Decary R. Plantes textiles introduites ou spontanées à Madagascar. Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale 1946 ; 26 :454–9.

[7] Decary R. L'emploi des succédanés végétaux à Madagascar pendant la dernière guerre. Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée 1968 ;15 :286–96.

[8] Etheve A-M. Manuel de teinture naturelle : Exemple de Madagascar. Edition Cite; 2005, 52p.

[9] Andriamanantena M, Danthu P, Cardon D, Fawbush FR, Raonizafinimanana B, Razafintsalama VE, Rakotonandrasana S.R., Ethève A., Petit T. and Caro Y. Malagasy Dye Plant Species: A Promising Source of Novel Natural Colorants with Potential Applications – A Review. Chemistry & Biodiversity 2019 ;16.

[10] Heckel E, Henri J, Perrier dela Bâthie H. Les Plantes utiles de Madagascar. Annales du Musée colonial de Marseille. Annales du Musée colonial de Marseille ; 1910, 8.

[11] Decary R. Plantes et animaux utiles de Madagascar. Marseille, Faculté des Sciences, Musée colonial, 1946. Annales du Musée colonial de Marseille ; 1946, 4.

[12] Cardon D. Le monde des teintures naturelles. Edition Belin. 2014, 500p.

[13] Causse J-G. L'étonnant pouvoir des couleurs. Edition J'ai lu. 2016, 224p.

[14] Pastoureau M. Figures et couleurs : études sur la symbolique et la sensibilité médiévales. Edition Paris, le Léopard d'Or. 1986, 244p.

[15] de Mejia EG, Zhang Q, Penta K, Eroglu A, Lila MA. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. Annu Rev Food Sci Technol 2020; 11:145–82.

[16] Jansen PCM, Cardon D, Lemmens RHMJ, Oyen LPA, Plant Resources of Tropical Africa (Program). Ressources végétales de l'Afrique tropicale. Wageningen ; Leiden : Fondation PROTA : CTA ; Backhuys Publishers ; 2004, 238p.

[17] Sudheer NS, Philip R, Singh ISB. In vivo screening of mangrove plants for anti WSSV activity in Penaeus monodon, and evaluation of Ceriops tagal as a potential source of antiviral molecules. Aquaculture 2011; 311:36–41.

[18] Robert EMR, Oste J, Van der Stocken T, De Ryck DJR, Quisthoudt K, Kairo JG. Viviparous mangrove propagules of Ceriops tagal and Rhizophora mucronata, where both Rhizophoraceae

show different dispersal and establishment strategies. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2015; 468:45–54.
[19] Giri C, Muhlhausen J. Mangrove Forest Distributions and Dynamics in Madagascar (1975–2005). Sensors 2008; 8:2104–17.
[20] Tankeo SB, Damen F, Sandjo LP, Celik I, Tane P, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). Journal of Ethnopharmacology 2016; 190:100–5.
[21] Ferm J, Kårehed J, Bremer B, Razafimandimbison SG. Paracarphalea, a new genus of the coffee family segregated from the Malagasy endemic genus *Carphalea* (Rubiaceae, Rubioideae, Knoxieae). Phytotaxa 2016; 263:98.
[22] Puff C. Observation on *Carphalea Juss*. (Rubiaceae, Hedyotideae), with particular reference to the Madagascan taxa and its taxonomic position. Bulletin Jardin Botanique Nationale Belge 1988 ;58 :271–323.
[23] Paris RR, Jaquemin H. Sur quelques Rubiacées malgaches. Plantes médicinales et phytothérapie, vol. Tome IX, 1975, p. 118–24.
[24] Sur T, Hazra A, Bhattacharyya D, Hazra A. Antiradical and antidiabetic properties of standardized extract of Sunderban mangrove *Rhizophora mucronata.* Pharmacognosy Magazine 2015; 11:389.
[25] Suganthy N, Pandima Devi K. *In vitro* antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Rhizophora mucronata*. Pharmaceutical Biology 2016; 54:118–29.
[26] Vyas P, Yadav DK, Khandelwal P. *Tectona grandis* (teak) – A review on its phytochemical and therapeutic potential. Natural Product Research 2018:1–17.
[27] Das PK, Goswami S, Chinniah A, Panda N, Banerjee S, Sahu NP, *Woodfordia fruticosa*: Traditional uses and recent findings. Journal of Ethnopharmacology 2007; 110:189–99.
[28] Parekh J, Chanda S. In vitro antibacterial activity of the crude methanol extract of *Woodfordia fruticosa* Kurz. flower (Lythraceae). Brazilian Journal of Microbiology 2007; 38:204–7.
[29] Rani S, Rahman K, Younis M, Basar SN. Dhawa (*Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz.): A Versatile Medicinal Plant. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 2015; 7:315–20.
[30] Shen L-R, Guo D, Yu Y-M, Yin B-W, Zhao L, Shi Q-W,. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Xylocarpus*. Chemistry & Biodiversity 2009; 6:1293–308.
[31] Jones T, Ratsimba H, Ravaoarinorotsihoarana L, Cripps G, Bey A. Ecological Variability and Carbon Stock Estimates of Mangrove Ecosystems in Northwestern Madagascar. Forests 2014 ;5 :177–205.

Chapitre III :

Propriétés physico-chimiques et technologiques (couleur, stabilité, propriétés antioxydantes, etc.) de pigments rouges extraits de plantes endémiques et indigènes de Madagascar.

Présentation générale du chapitre :

La région Ouest de Madagascar est encore très active dans l'utilisation des plantes tinctoriales à travers la teinture artisanale de fibres naturelles comme le raphia, la soie ou le coton. Le manque de données scientifiques limite cependant l'utilisation de ces ressources végétales autant pour leur expansion dans cette filière du textile, que pour leur usage pour d'autres types d'application. En effet, les expertises et savoir-faire locaux ont fourni quelques informations préliminaires intéressantes. Par exemple, certaines de ces plantes sont mises en décoction dans de l'eau bouillante pour extraire leurs principes colorants, suggérant dans le même temps une bonne stabilité des pigments à la température. Toutefois, des données scientifiques complémentaires (stabilité au pH, pouvoir colorant, activités antioxydantes, etc.) sont indispensables pour élargir les domaines d'application de ces sources végétales de pigments et de colorants.

La majorité des espèces de plantes tinctoriales actuellement utilisées par la population locale pousse à l'état sauvage à Madagascar ou se développent dans des écosystèmes protégés, comme les mangroves de la région de Boeny. Toutefois, de nombreuses espèces sont particulièrement intéressantes car elles sont disponibles, cultivables et non protégées (et ne sont donc pas menacées d'extinction). Par ailleurs ces plantes tinctoriales n'ont pas simplement des propriétés colorantes car elles sont également utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés médicinales et biologiques, telles qu'anti-diarrhéiques, anti-inflammatoires, antioxydantes ou antimicrobiennes, ce qui augmente leur valeur ajoutée pour d'autres applications commerciales. Dans la perspective de trouver de nouvelles sources de pigments d'origine naturelle, les principes actifs de ces plantes doivent avoir des propriétés au moins similaires aux colorants naturels qui existent déjà sur le marché, entre autres en termes de pouvoir colorant, de stabilité par rapport aux conditions physiques (pH, haute température) et/ou en termes de propriétés biologiques intéressantes.

Le présent chapitre décrit ainsi l'extraction (en utilisant un procédé éco-responsable avec des solvants 'verts') et la stabilité des extraits de cinq plantes tinctoriales malgaches endémiques et/ou indigènes de Madagascar source de pigments rouges, dont l'*Acridocarpus excelsus* (endémique), le *Ceriops tagal* (indigène), le *Rhizophora mucronata* (indigène), le *Xylocarpus granatum* (indigène) et le *Woodfordia fruticosa* (indigène), en comparaison avec deux colorants commerciaux rouges naturels (l'extrait de garance et le carmin de cochenille) connus pour leur stabilité et largement utilisés par les industriels (textiles, alimentaire et cosmétique). Par ailleurs, la description des propriétés physico-chimiques, colorantes et antioxydantes des extraits de ces cinq plantes tinctoriales est également présentée dans ce chapitre.

Le travail réalisé dans ce chapitre fait l'objet d'un projet de publication intitulé *Chemical stability, coloring and antioxidant properties of five red dyes extracted from endemic and native plant species used in Madagascar*, soumis en juillet 2020 dans la revue *Journal of Cleaner Production.*

Chemical stability, coloring and antioxidant properties of five new red dyes extracted from endemic and native plant species used in Madagascar

Mahery Andriamanantena[1,2], Pascal Danthu[3], Dominique Cardon[4], Andrée-Mathilde Ethève[5]

Fanjaniaina Fawbush Razafimbelo [2], Béatrice Raonizafinimanana[2], Thomas Petit[1,6] and Yanis Caro[1,6].

[1]*Laboratoire de Chimie et Biotechnologie des Produits Naturels (ChemBioPro) - EA 2122, Université de La Réunion, Réunion island, France ;*
[2]*Département Industries Agricoles et Alimentaires (IAA-ESSA), Université d'Antananarivo, Madagascar*
[3]*HortSys, Université de Montpellier, CIRAD, France ;*
[4]*CIHAM/UMR 5648, CNRS, FR-69000 Lyon, France*
[5]*Association Femmes Entrepreneurs Environnement Mahajanga (FEEM), MG-401 Mahajanga, Madagascar*
[6]*Département HSE, IUT de La Réunion, Université de La Réunion, Réunion island, France.*

Highlights

- Coloring properties of dyestuffs from typical plant species from Madagascar are highlighted.
- Mangrove plants barks are promising sources of red dyestuff materials for non-food applications.
- *W. fruticosa* roots & *A. excelsus* barks revealed interesting coloring and antioxidant properties.
- Pressurized liquid solvent extraction is more efficient than traditional decoction on pigments.
- Their properties generate new areas of industrial applications beyond their traditional use

Abstract

The extraordinary biodiversity of plants from Madagascar offers a wide source of natural dyestuffs and a promising alternative to synthetic colorants. For this purpose, the coloring and chemical properties of novel red dyestuffs, not yet investigated so far, from five endemic/native plant species from Madagascar are described in this study. This included one endemic plant (*Acridocarpus excelsus*) and four native species (*Ceriops tagal*, *Rhizophora mucronata*, *Xylocarpus granatum*, *Woodfordia fruticosa*). These species grow currently in the wild or in protected ecosystems (e.g. mangrove forest) but are particularly interesting because they can easily be cultivated and they harbored interesting coloring and antioxidant properties that may increase their added value for the industries. Colorants from the barks or adventitious roots of the selected plants were extracted using "green" solvents. Optimal extraction of the red pigments using an alternative pressurized liquid extraction was found to be a faster and greener extraction technique as compared to conventional extraction techniques. The color coordinates in the CIELAB system of the crude pigment extracts showed interesting various hues from yellow to red, depending on the concentration of pigments in the sample. Their stability against pH and temperature was found to be significantly better as compared to the two red industrial dyestuffs (carmine and madder color) that we used as control. The chemical identification and quantification of the dyes revealed that the extracts of *A. excelsus, W. fruticosa*, and *X. granatum* were particularly rich in polyphenols, including condensed tannins (proanthocyanidins). In addition, the radical scavenging activity assays showed that the extracts have better antioxidant activity as compared to controls (ascorbic acid and butyl-hydroxyanisol). Taken together, our results suggested that these red dyestuffs from plant are good candidates to replace for synthetic sources of red dyes and open up new applications in textile finishing, cosmetics, nutraceutical and pharmaceutical industries. At the same time, the rational and sustainable exploitation of these plant species is expected to contribute to their conservation.

Keywords: Malagasy plant biodiversity, mangrove plants, red dyes, natural dyeing, pigment stability, antioxidant properties, *Acridocarpus excelsus, Ceriops tagal*, *Rhizophora mucronata*, *Xylocarpus granatum*, *Woodfordia fruticosa.*

3-1 Introduction

Due to the harmful effects of some synthetic dyes on the environment and on the human health, there has been an increased interest in replacing synthetic dyes by colorants extracted from natural sources [1]. Furthermore, consumers are looking for novel natural products that would also promote health-promoting properties. The majority of natural dyes are generated from plant sources (e.g., roots, berries, bark, leaves, and wood) and from other biological sources such as microorganisms, or insects. Currently, natural red pigments of high-quality hold spacious market. The up-market red pigments in the world is the carminic acid extracted from the dried bodies of female cochineals, which is approved for use in food, drug and cosmetics by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). In the plant kingdom, there are a wide variety of species that produce red dyes, including henna, alkanet or dyer's bugloss (root of *Alkanna tinctoria*), and madder color (root of *Rubia tinctorum*). These red dyes extracted from plants are traditionally used in textile coloring, hair dyes, coating and painting, but some red pigments of plant origin (e.g., annatto, paprika, tomato lycopene, beetroot red, anthocyanins) are also used as color additives in various industrial applications such as in the pharmaceutical, cosmetic and food industries [2]. Additionally, natural pigments like coloured polyphenolic compounds can harbor other biological properties, such as antioxidant [3,4] and antimicrobial activities [5,6]. These particular biological properties have made it possible to widen their potential area of specific applications (such as in textile finishing, functional foods, etc.) and increased their added-values with respect to industries.

To better understand the usefulness of colors from plant sources, it is necessary to extend our knowledge gained from well-studied plants (e.g., henna, madder color, annatto, etc.) towards underutilized plant species, such as endemic or native species from tropical regions. We previously undertook to research issues related to specific dye sources from Madagascar plants – some currently threatened with extinction – and described several techniques used to extract and to fix the dyes from some plant species to natural fabrics [7]. We suggested compelling reasons for undertaking new studies of traditional dyeing in Madagascar to discover new dye plant species which could be used as alternative crops with potential industrial uses. Their usage should not be limited to textile, but also in textile finishing, plastic coloring, cosmetics and pharmaceutical applications. Madagascar is one of the eight 'hottest' biodiversity hotspots based on the exceptional richness and concentrations of its indigenous flora. Its extraordinary biodiversity of plants with not less than 128 dye plant species – of which 34 are endemic [7] – may offer a wide source of natural dyestuffs and a promising alternative to synthetic colorants. For instance, some specific Malagasy dye plant species, including native plants of mangroves, are being traditionally used by local population to dye natural fabrics in red hue, like raffia, silk or cotton [8]. Malagasy dye plants are promising and readily available raw materials for the industries if they could be cultivated. They may also offer a wide range of colors with different chemical profiles [7]. In

addition, Madagascar's mangrove ecosystems afford a remarkably diverse habitat with unique properties brought together in a single ecosystem. Thus, the plant species which have colonized this particular environment offer an important reservoir for significant novel and biologically active compounds such as bioactive pigments. However, the lack of scientific knowledge on these unconventional plant species limits their development and their use for broad applications. Additional phytochemical and pharmacological studies are therefore necessary to expand the natural colorants from Malagasy dye plants in different industries.

For this purpose, we are currently investigating the coloring properties of novel red dyes from endemic and native plant species from the west-northwest region of Madagascar which are traditionally used by local population to dye fabrics in reddish hues [7]. Among those plants species, we are particularly interested in endemic species such as *Acridocarpus excelsus* (Ace), as well as native species including *Xylocarpus granatum* (Xyg), *Ceriops tagal* (Cet), *Rhizophora mucronata* (Rhm), and *Woodfordia fruticosa* (Wof) (Figure 18). These five natural red dyestuffs have been chosen according to different main criteria. Indeed, they present several technical and agricultural advantages such as the availability of the raw materials in Madagascar, the advantageous geographical situation for harvesting the plant materials, a non-endangered status of the species, and the availability of traditional knowledge including the dyeing process of natural fibers. Exploration of these plants and more particularly the mangrove ones will nevertheless require a good management of the biological resource because some of them are part of the protected ecosystem program in Madagascar. The mangrove plants, e.g. *X. granatum, R. mucronata*, and *C. tagal* and grow in sensitive ecosystems that are subject to deforestation in many regions of the world, including Madagascar. Also, the mangrove forest has strongly declined in these few last decades in Madagascar due to human activities and to climate change [9,10]. Nevertheless, these plant species are relatively easy to grow and some reforestation campaigns are currently occurring in Madagascar, as exemplified by the efforts made by the authorities to restore the mangrove forest of Bombetoka bay. Hence, we believe that if these plant species can be sustainably used to produce reliable sources of income, the local population will definitely plant trees and participate to the reforestation. Concerning endemic *A. excelsus* and native *W. fruticose* species, they are widely spread on the areas where they grow in Madagascar and are not endangered species.

Nowadays, the challenges facing the color industry include raw material availability and industrial sustainability of their production and final applications. Natural dyes of plant origin should offer a sustainable alternative but they have also some limitations, such as difficulty in reproducing colors, standardization of recipes for dyeing, restricted color range, and low levels of solidity compared with artificial dyes [11]. Other features that limit the application of natural pigments obtained from plants are associated with their chemical characteristics such as sensitivity towards various environmental parameters (e.g., light, heat, or oxygen and instability in different conditions of pH) [12]. Moreover, the

production and effective application of novel natural dyestuffs are limited by expensive extraction procedures. In fact, it is considered an extractive activity since it is necessary a large quantity of plant materials to obtain small pigment amounts by conventional extraction process. Thus, growth and sustainability of the industry of pigments rely on four important factors: (i) pigment yield, (ii) pigment stability against environment factors such as pH and temperature, (iii) pigment purity such as absence of toxic metabolites in the final product, and (iv) another major challenge is to keep the extraction process efficient, fast and more sustainable, green and economically favorable.

In this present study, we investigated the pigment extraction process, the coloring and antioxidant properties of five red dyestuffs obtained from the plant species listed above (Figure. 18). As far as we know, the characterization of the coloring properties of these five dyestuffs from endemic and native species to Madagascar which grow along the Boanamary mangroves or inside the highlands of Madagascar have not been previously reported in the literature. We tested two different extraction processes (traditional decoction *versus* an alternative pressurized liquid solvent extraction with hydroalcoholic solutions) and compared the extraction yield. The chemical composition (e.g., total polyphenols, anthocyanins, proanthocyanidins contents) of the pigment extracts, and their chemical stability towards pH and temperature were also characterized. Finally, the antioxidant activity of these extracts were determined using two analytical methods in order to set up new future industrial applications beyond natural fibers dyeing, like in textile finishing, plastic coloring, cosmetic, pharmaceutical and nutraceutical applications.

Figure 18. Dye plants species: ***Ceriops tagal*** (**1**: tree, **2**: propagules, **3**: red bark of the trunk), ***Rhizophora mucronata*** (**4**: young shrub, **5**: leaves, **6**: red bark on the trunk**), *Xylocarpus granatum*** (**7** : leaves, **8**: bark of the trunk), ***Acridocarpus excelsus*** (**9**: development area, **10**: flowers, **11**: leaves and stems), ***Woodfordia fruticosa*** (**12**: shrub, **13** : red root)

3-2 Materials and methods

3-2-1 Plant materials

Table 1 showed the botanical and other known properties of the five plant species investigated in this study. Barks have been collected for *A. excelsus*, *C. tagal*, *R. mucronata* and *X. granatu*m. Only adventitious roots have been used for *W. fruticosa* (research authorization N°027/18-MEEF/SG/DGF/DSAP/SCB/2018). The identification of each species has been made by the department of the zoological and botanical garden of Tsimbazaza (PBZT), Antananarivo-Madagascar and a voucher specimen with the corresponding identification number was kept for each harvested species (Table. 8). The harvesting was done according to good practice in order to reduce adverse effect on the plants [13]. For each plant species, 150 grams of barks or roots were collected from three different trees from the same geographical and geological area. They were then mixed to constitute one representative sample

(450 grams in total for each sample). The collection was repeated three times for each plant species for confirmation. Then, the collected parts were cut into small pieces and kept fresh in a plastic bag in a cooler. After 24 to 48h of transport, they were lyophilized and stored at cold temperature.

Table 8. Botanical details and known properties of the studied plant species

Species **(Botanical family)**	**Identification number*[1] (herbarium)**	**Harvested parts**	**IUCN Status*[2] (Date assessed)**	**Harvest date and location**	**Availability and current uses in Madagascar**	**Uses around the world**	**Other properties**	**References**
Rhizophora mucronata **(Rhizophoraceae)**	Id number: 2017-129Rfd	Barks	Least concern (2008)	January 2018 *Boanamary mangroves*	Silk and cotton dyeing, construction	Leather tanning, Silk dyeing	Antidiabetic	[14,15]
Ceriops tagal **(Rhizophoraceae)**	Id number: 2017-128Rfd	Barks	Least concern (2008)	January 2018 *Boanamary mangroves*	Silk and cotton dyeing, construction	Leather tanning, silk an cotton dyeing,	Antinociceptive, antihyperglycemic, antibacterial	[16,17]
Xylocarpus granatum **(Meliaceae)**	Id number: 2017-127Rfd	Barks	Least concern (2008)	January 2018 *Boanamary mangroves*	Silk and cotton dyeing	Cotton dyeing	Antidepressant effect	[18,19]
Acridocarpus excelsus **(Malphigiaceae)**	Id number: 2017-131Rfd	Barks	Least concern (2019)	February 2018 *Marosakoa highlands*	Raffia dyeing, craft rum production, fire woods	-	Astringent, rich in tannins	[20]
Woodfordia fruticosa **(Lythraceae)**	Id number: 2017-134Rfd	Adventitious roots	Least concern (1997)	January 2018 *Boanamary highlands*	Silk dyeing, traditional medicine	Leather tanning	Antiulcer activity,	[21,22]

*[1] deposit number of the herbarium

*[2] www.iucnredlist.org, Least concern means that the species are not in focus of species conservation.

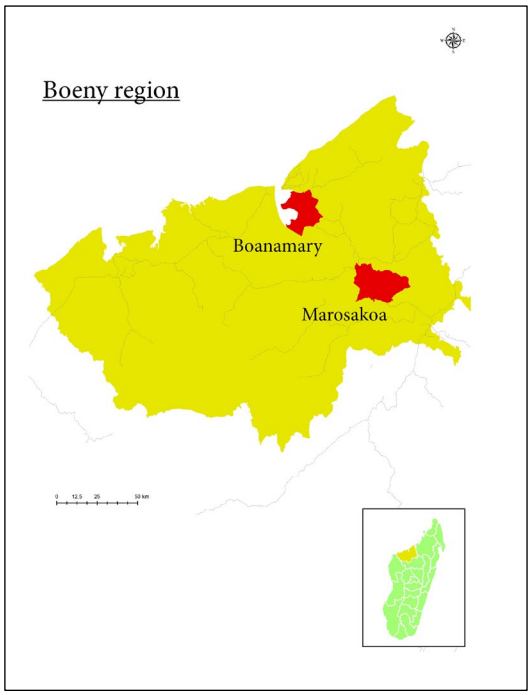


Figure 19. Localization map of the different areas

3-2-2 Chemicals

Ethanol absolute anhydrous, methanol, hydrochloric acid, sodium hydroxide and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Carlo Erba. Chemical standard including gallic acid, quercetin, epigallocathechin and cyanidine-3-glucoside were supplied by Extrasynthese. Sodium carbonate, sodium nitrite, aluminium chloride deshydrate and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6 Tripyridyl-5-triazine (TPTZ) trolox, ammonium sulfate, $FeCl_3$, Fe_2SO_4, bacteriological agar and dextrose broth were supplied by VWR.

3-2-3 Extractions

Before extraction, each sample was finely grinded to homogenize the batch and 50 grams of finely powdered raw materials was used for extraction and analysis. Two different extraction processes have been compared. Hydro alcoholic solution (70% (v/v) ethanol-water) which is classified as green solvent has been used for all extractions. Ethanol and water (70 % v/v) were chosen as extraction solvents to meet the requirements of the industries about the research of ecological products and processes. Study made by Altemimi *et al.* (2017) [23] also showed that ethanol was most appropriate either for the extraction of phenolics or any bioactive compounds .

The first extraction process was made by decoction using either fresh materials or lyophilized materials. The color and the yield of crude pigment extract obtained from fresh and lyophilized materials were compared to verify if the drying can affect the extraction procedure with respect to color and quantity of pigment extract. The extractions were made according to Mabika *et al.* (2013) [24] and Toussirot *et al.* (2014) [25] with some modifications suggested by the local Malagasy dyers. Briefly, the method

chosen in this study is a 3 hours hot decoction at 65°C with 70% (v/v) hydro alcoholic solution and a ratio of 1:5 (w/w) of raw materials and solvents. The decoction was performed under manual agitation every 30 minutes and followed by filtration in vacuum flask with Whatman filter paper n°13. A second extraction procedure was based on pressurized liquid solvent extraction (PLE) using accelerated solvent extraction Dionex 300 apparatus. Pure water was used as solvent A and absolute ethanol as solvent B. The following experimental conditions were applied for the pressurized extraction: 30 % of A and 70 % of B, which is the same ratio used for the above conventional extraction, a temperature of 85 °C, 6 minutes of preheat, and five cycle of 5 minutes (static time) and pressure of 100 bars, following the method used by Ju and Howard (2003) [26] with some modifications.

Then, all the filtrates were evaporated in a C 3900 rotavapor and the liquid extracts were lyophilized in order to generate crude dry pigment extract in powder. The crude dry pigment extracts were stored at 4°C prior to use. The extraction yields of the crude pigment extracts (dry weight) have been compared for the uses of fresh or lyophilized plants as raw materials and the two different extraction methods. It is calculated from the following equation (Equation 1).

$$\text{Extraction yield (\%)} = \frac{\text{Weight of crude pigment extract in powder (g)}}{\text{Weight of plant material (in dry weight) (g)}} \times 100 \qquad \text{(Equation 1)}$$

3-2-4 Determination of main phenolic compounds

The analysis of the bioactive compounds present in the crude pigment extracts was done using phytochemical studies. The phenolic compounds content including flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins (or condensed tannins) were determined by using the standards reported in Figure 20, and according to the following methods from stock solutions of 8 mg/mL of crude dry pigment extract dissolved in aqueous ethanolic solution 70% (v/v).

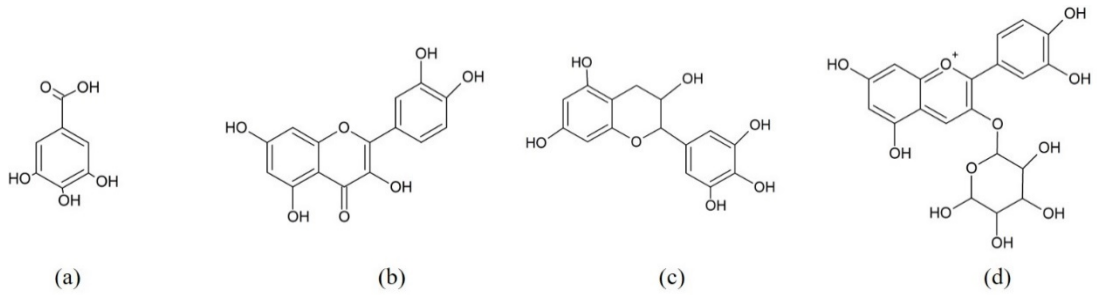


Figure 20. Chemical formulas of the different standards used
((a) gallic acid, (b) quercetin, (c) epigallocatechin, (d) cyanidin – 3 glucoside)

Total phenolic compounds were determined using a method published by Boo *et al*. (2012) [27] and Singleton *et al.* (1999) [28]. 3 mL of distilled water, 1 mL of the stock solution and 1 mL of Folin – Ciocalteu reagents were mixed in test tubes. After 5 minutes of incubation at 30°C, 1 mL of 7 % Na_2CO_3

was added and the tube was filled with distilled water to reach a final volume of 25 ml. After 2 hours in the dark, the optical density (O.D) was measured at 765 nm by a spectrophotometer model Evolution 60S (Thermo Scientific), with a methanolic solution used as blank. The same manipulation was made with gallic acid (standard) at different concentration to establish the standard curve.

Total flavonoid contents were determined according to the method used by Sun *et al.* (2011) [29] and Ksibi *et al.* (2015) [30]. 250 µl of stock solution and 500 µl of 5 % $NaNO_2$ were mixed and stand for 6 minutes. Then, 500 µL of 10% Al_2Cl_3, 5mL of NaOH (1N) and 70% (v/v) ethanol-water were added to the first solution of extract and $NaNO_2$ to a final volume of 12.5 ml. The final solution was kept at room temperature during 15 min. The O.D. was measured at 510 nm and quercetin was used as standard.

Total monomeric anthocyanin contents were calculated using the method based on the reduction of anthocyanin by acidic environment according to the method used by Lee *et al.* (2005) [31]. Two solutions were prepared at pH 1.0 and at pH 4.5. An aliquot of the stock solution was added to each solution and absorbance was measured at 520 and 700 nm. The total monomeric anthocyanin (TMA) was calculated using the following equations:

$$TMA = A * \frac{MW*DF*1000}{\varepsilon*1} \qquad \text{(Equation 2)}$$

$$A = (A_{520\,nm} - A_{700\,nm})_{at\,pH1.0} - (A_{700\,nm} - A_{520\,nm})_{at\,pH4.5} \qquad \text{(Equation 3)}$$

where: TMA: total monomeric anthocyanin content expressed in cyanidin-3-glucoside equivalents/ litre of solution (cyd-3-gluE/l solution extract); A: Absorbance of the sample; MW (molecular weight) = 449.2 g/mol for cyanidin-3-glucoside (cyd-3-glu); DF = dilution factor; l = pathlength in cm (1 cm); ε = 26 900 molar extinction coefficient, in $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, for cyd-3-glu; and 1000 = factor for conversion from g to mg.

TMA is expressed as cyanidin-3-glucoside equivalent which is the most common anthocyanin encountered in plants species. This method doesn't measure polymeric anthocyanin pigments.

Total condensed tannins *contents* were measured according to Sun *et al.* (2011) [29]. 100 µl of the stock solution was mixed with 6 mL of 4 % vanillin solution in methanol and 3 mL of concentrated H_2SO_4 (0.5 N) and left for 5 minutes at 30 °C. Epigallocatechin was used to produce the standard curve at 500 nm.

3-2-5 Coloring properties

The crude dry pigment extracts were dissolved in 70% (v/v) ethanol-water solution at different concentrations, *i.e.*, from 1.0 to 32 mg/ml of dry powder extract in ethanol-water solution, to show the evolution of the shade of the extract by their color value measured in the international CIELAB color system in terms of L* (lightness), a* (greenness versus redness), b* (blueness versus yellowness), C* (chroma expresses saturation or intensity and vividness degree of the color), and h° (hue angle indicates the observed color) values. C* and h° values are calculated from a* and b* values. The optical density measured at different visible wavelengths, e.g., at 400-450 nm, 450-490 nm, 490-520 and 520-580 nm

will confirm if the extracts have major yellow, orange, red and purple-red pigments, respectively. A spectrophotometer model CM-3500d (Minolta) has been used to identify the color coordinates in the CIELab color system, and the spectrophotometer model Evolution 60S (Thermo Scientific) for absorbance analysis.

3-2-6 Physico-chemical stability tests

The stability towards pH and temperature of each crude pigment extracts has been compared with those of two commercial red dyes, carmine and madder extract which are natural red colorants obtained from the cochineal (*Dactylopius coccus*) and madder roots (*Rubia tinctorium*), respectively. Both colorants are widely used in food, cosmetics and textile industries.

***pH Stability**:* To demonstrate the stability of the crude pigment extracts towards pH, stock solution was prepared with 200 mg of dry powder extract dissolved in 5 ml of 70% (v/v) ethanol-water. Then, 70% hydroalcoholic solutions were prepared in different pH values (pH 3, 5, 7, 9 and 11) by adding sodium hydroxide or hydrochloric acid. An aliquot of the stock solution were added to each solution at various pH following the method used by Torskangerpoll and Andersen (2005) [32], in order to reach a final concentration of 2 mg/ml of dry powder extract in the final solution. The color value measured in terms of L*, a*, b*, C* and h° values, and delta E (ΔE) *i.e.* total color variation between the initial (neutral) and the final (acidic or basic) state were recorded for all the samples using a spectrophotometer model CM-3500d (Minolta). ΔE is was calculated using the following equation [25,33] :

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \qquad \text{(Equation 4)}$$

where ΔL^* is the difference between the final and the initial value of L*, Δa^* is the difference between the final and the initial value of a* and Δb^* is the difference between the final and the initial value of b*.

Then, pH changes can cause irreversible or reversible color transition of the pigments. Therefore, some drops of diluted sodium hydroxide were added to the acidic colored solution (pH 3 and 5) to restore the initial neutral pH and to check whether the color transition was reversible or not. The same procedure was used for the alkaline colored solutions (pH 9 and 11) using a diluted hydrochloric acid solution.

Thermal stability: Three step assays were performed to study the thermal stability of these pigment extracts. A first test was made by putting the colored solution (extract powder in hydroalcoholic solution) in a heated bath (90°C) during 3 hours. Second test was conducted by combining pH and temperature parameters: colored solutions with the previous different pH (from 3 to 11) were put on the same heated bath at 90°C in order to have acid hydrolytic and alkaline hydrolytic conditions, and variations of the color were observed after 3 hours. The last thermal stability assay was performed directly on dry powder extract. Actually, 120 mg of dry powder extract were heated in an oven at 105, 205, 250 and 305°C for 30 minutes according to the method developed by Marzec *et al.* (2019) [33]. Then, 15 ml of 70% (v/v) ethanol-water were added to these thermally-treated pigment extracts to obtain

a final concentration of 8 mg/mL of dry powder extract in ethanol-water solution. The physicochemical modification and/or the thermal degradation of the pigments was checked by measuring the total color variation ΔE between the non-thermally treated solutions and the thermally treated ones.

3-2-7 Antioxidant activity

Antioxidant activity has been determined using two classical methods. The first method is based on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability as described by Singleton *et al.* (1999) and Yeo *et al*. (2019) considering the pigments effect on absorbance at 515 nm. Ascorbic acid and butylhydroxyanisol (Bha) were used as antioxidant standard. The second method based on Ferric reducing antioxidant power (FRAP) was developed by Benzie *et al.* (1996) [35] and Thatoi *et al.* (2014) [36]. This method relies on the reduction of the complex ferric ion-2,4,6-Tripyridyl-5-triazine (TPTZ) by the antioxidants**.** FRAP solution is prepared from sodium acetate, TPTZ and FeCl3 solutions (10:1:1). 285 µl of the FRAP solution were added into a well of a microtiter plate and the reaction was started by adding 15 µl of the sample. The absorbance was measured at 593 nm after 4 min of incubation at 37°C. Trolox and Iron sulfate have been used as standards.

3-2-8 Statistical analysis

The statistical analysis for each test was performed using analysis of variance (ANOVA) and expressed as mean ± standard deviation of three replicates. The procedure was followed by Duncan test to determine the statistical significance ($p < 0.05$) [27,29].

3-3 Results

3-3-1 Pigment extraction yield and coloring properties of the crude plant extracts

Different techniques can be used for the extraction of natural products like pigments from plant materials either by conventional extractions (decoction, hot water, solid-liquid extraction by soxhlet, etc.) or by alternative technologies (e.g. extraction with supercritical carbon dioxide, assisted by ultrasound, enzymatic, microwave, or high-pressure systems) [37]. With the aim of using environmentally friendly processes and materials based on the experience of the dyers in the west region of Madagascar, two different extraction techniques have been used here to obtain crude pigment extracts. First, hot decoction is a conventional process which is the most common method used by craftsmen. Then, pressurized liquid solvent extraction (PLE) is the alternative greener extraction process which is currently underused for the extraction of plant pigments.

Pigment extraction yields presented in Figure 21 are calculated from the weight of dry raw materials and dry extract powders. Decoction of fresh materials showed an extraction yield between 7.27 % (w/w/) for *W. fruticosa* and 28.80 % (w/w) for *R. mucronata.* Decoction of dry raw materials (*i.e.*, lyophilized barks or roots) demonstrate an extraction yield between 8.03 and 30.73 % (w/w) for

W. fruticosa and *C. tagal*, respectively. Thus, the results concluded that there is not much difference between the extraction yields obtained from dry materials and those obtained from fresh materials. Consequently, the state of the raw materials (fresh or dry) did not seem to impact the extraction yield, as well as the color of the extracts (no difference was observed). Our findings suggested that the fresh raw materials (roots and barks) collected from these dye plant species listed above can be pre-dried and stored at room temperature by the craftsmen at least a few days before the dyeing application, without changing their coloring properties for dyeing application.

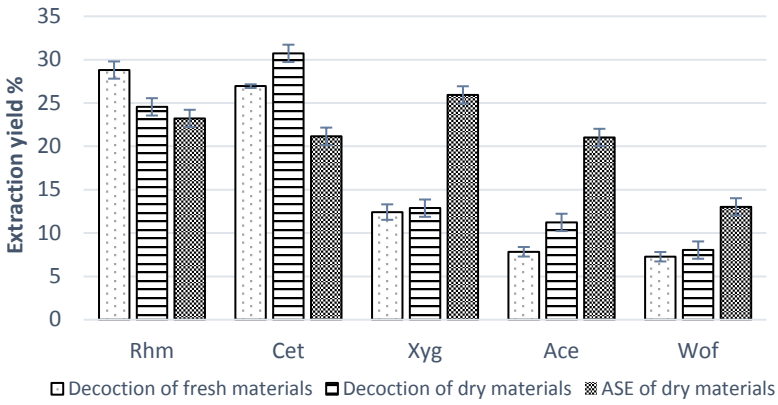


Figure 21. Extraction yields of the pigment from 5 different plant species and using different extraction methods (Rhm: *R. mucronata*, Cet: *C. tagal*, Xyg: *X. granatum*, Ace: *A. excelsus*, Wof: *W. fruticosa*). Mean values were calculated from three independent experiments. Standard deviation is indicated for each mean value)

As shown in Figure 21, it can also be concluded that the best pigment extraction yields were observed for barks of the three mangrove plants, and more particularly from ones belonging to Rhizophoraceae family: 30.7 % (w/w) for *C. tagal* and 28.8 % for *R. mucronata* after material decoction. These pigment extraction yields were higher than the ones reported by previous studies performed on stem barks. Baliarsingh *et al*. (2012) [38] obtained an average extraction yield of 15 % (w/w) for several dyes extracted from barks, and a value ranging from 15 to 25 % (w/w) was reported in the study performed by Kechi *et al*. (2013) [39]. Then, our results showed that the alternative high-pressure PLE extraction (with a cycle of 5 min) is less efficient for pigment extraction from barks of *C. tagal* and *R. mucronata,* compared to the traditional decoction (during 3 hours) performed on this study. The pigment extraction yields obtained from barks of *C. tagal* were 30.7 and 21.1 % (w/w) after dry material decoction and PLE extraction, respectively. Concerning the pigment extraction yields from barks of *R. mucronata,* 23.2 % (w/w) was observed by PLE extraction compared to 28.8 % (w/w) by fresh material decoction. Nevertheless, the pomace obtained after the PLE extraction is still colored for these two last plant species, and obviously still contains non-extracted compounds. Otherwise, results obtained by this alternative high-pressure PLE extraction revealed some differences for the three others dyestuffs investigated here.

Interestingly, this alternative extraction method appeared as more efficient than the conventional decoction for pigment extraction from barks of *X. granatum* and *A. excelsus*, and from roots of *W. fruticosa*, by respectively +100%, +88% and +62% higher in term of pigment extraction yield (Fig. 4). The pressurized liquid extraction method, comparing to the decoction traditionally used, is more sustainable, green and economically favorable because this technique uses much less volume of solvents. The extraction time are also reduced by PLE, e.g. it is performed by cycle of 5 minutes, whereas decoction is made during several hours at ambient pressure (3 hours in our study). Consequently, less energy is required for the extraction by PLE. Additionally, the use of increased (nitrogen) pressure during the extraction protects the compounds of interest from oxygen oxidation, and ensures a higher quality of the recovered biochemicals. Thus, the simultaneous use of higher pressure, higher temperature and environmentally benign solvents (mix of ethanol and water) allows to significantly reduce the extraction time, the amount of solvent needed, as well as the potential degradation of target biochemicals due to pH, O_2, temperature oxidation and/or harsh solvents exposure, among others. According to our knowledge, this study is the first investigation on pigment extraction by PLE for these kinds of dyestuffs (e.g. roots and barks of tropical mangrove plants) and chemical families (e.g., plant polyphenol compounds), and it displays interesting results for this alternative green and sustainable method. On the other hand, even if the two Rhizophoracea species (e.g., *C. tagal* and *R. mucronata)* demonstrated lower extraction yield by this alternative extraction technique*,* the PLE process reported here offers a standardized way of extracting water-soluble pigments from raw plant materials. Furthermore, this process can be still improved separately for each plant materials.

The spectrocolorimetric properties (expressed in terms of CIE L*, a*, b*, C* and h° values) of the pigment extracts dissolved at different concentrations in water-ethanol solution was assessed, and the results are presented in Table 2. A strong variation of the hues of the extracts, from yellowish to reddish hue, was observed by increasing the concentrations of the dry pigment powder in solution. For instance, the crude pigment extracts obtained from the barks of *R. mucronata* and *C. tagal* appeared as golden yellow to orange color at low concentration (*e.g*., from 1 to 8 mg/mL in aqueous ethanolic solution) and turned to red at high concentration of more than 16 mg/mL as shown in Table 9. For the crude pigment extracts obtained from roots of *W. fruticosa*, and from barks of *X. granatum* and *A. excelsus*, the hues appeared as soon as reddish from 8 mg/mL (Table 9). Thus, the pigment extracts from these three above mentioned plant materials, *W. fruticosa*, *X. granatum* and *A. excelsus,* showed the higher red coloring properties (*i.e*., best red tinctorial power) to be used as natural sources for red dyes in the industries (for textile dyeing, textile finishing, pharmaceutical, etc.). As demonstrated by Willemen *et al*. (2019) [40], the use of total plant extract is considered to be advantageous over the use of individual dye compounds in terms of solubility, color and stability. The other non-coloring compound may play an important role in coloring properties. Extracts obtained either by decoction or by PLE extraction process with ethanol-water are not purified pigments but they can contain other compounds extracted by the hydroalcoholic

solution from the plant material. Therefore, crude pigment extracts have been used for the rest of this study.

Table 9. Color expressed in terms of CIE L*, a*, C* and h° values of the crude pigment extracts depending on concentration range in hydroalcoholic solution.

		Dissolution of the dry color extracts* in hydro alcoholic solution at different concentrations				
	Species	**L***	**a***	**C***	**h°**	**Visual color**
2 mg /ml	*W. fruticosa*	68.32±0.86	25.96±0.86	66.92±0.57	67.16±1.00	
	X. granatum	70.19±3.20	25.06±2.84	62.82±2.72	66.52±1.74	
	A. excelsus	68.88±2.97	28.12±3.46	73.07±3.66	67.19±3.79	
	R. mucronata	66.65±1.37	36.40±4.76	112.27±5.99	71.12±1.62	
	C. tagal	77.93±2.61	20.70±3.62	85.30±2.48	75.90±2.93	
		L*	**a***	**C***	**h°**	
8 mg /ml	*W. fruticosa*	32.41±2.69	54.82±0.49	78.04±2.92	45.29±2.63	
	X. granatum	38.83±3.06	57.35±2.05	84.12±2.49	47.02±0.32	
	A. excelsus	38.54±2.51	58.62±2.77	88.26±0.82	48.36±1.99	
	R. mucronata	52.65±6.38	50.17±6.32	103.04±3.78	60.90±2.88	
	C. tagal	52.15±5.70	50.32±4.59	102.31±5.94	60.34±4.85	
		L*	**a***	**C***	**h°**	
16 mg /ml	*W. fruticosa*	18.22±2.55	49.23±2.34	58.34±4.38	32.31 ±2.50	
	X. granatum	27.58±1.97	58.78±0.14	73.86±0.26	37.28±0.08	
	A. excelsus	27.12±3.14	59.13±3.12	75.22±2.64	38.19±1.45	
	R. mucronata	37.24±1.75	57.58±1.60	86.02±2.32	47.90±2.58	
	C. tagal	36.97±4.36	57.79±1.78	85.86±4.33	47.52±4.25	

Captions: Mean values of three replicates are indicated in each box of concentration for the L, C* and h° values; L describe the lightness, C* and h° describe the chroma and the hue angle (or tone) of the color, respectively. The value of chroma C* is 0 at the center and increases according to the distance from the center. The hue angle h◦ is defined as starting at the +a* axis and is expressed in degrees: 0◦ would be +a* (red), 90◦ would be +b* (yellow), 180◦ would be −a* (green), and 270◦ would be −b* (blue). Hue values correspond to the angle of the a*/b* coordinates of the points.*

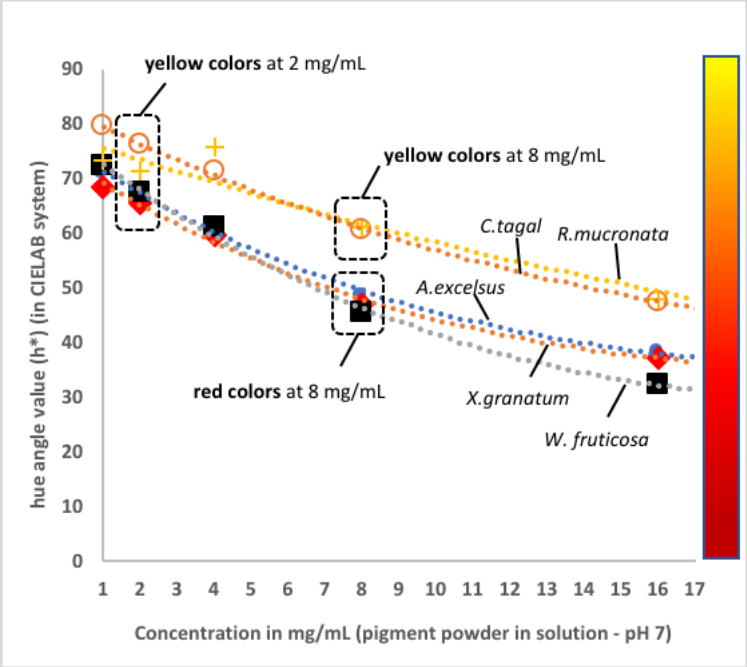


Figure 22. Color of the crude pigment extracts from the five red dyestuffs investigated in this study (*W. fruticosa, X. granatum, A. excelsus, C. tagal* and *R. mucronata*) measured in terms of hue angle (h°) value in the CIELAB system, according to the concentration of the pigment (crude powder) dissolved in aqueous ethanolic solution at pH 7. (h° from 90° to 0° represents variation of yellowness to redness hue, respectively).

Interestingly, it is worth noting that the three crude pigment extracts which exhibit high red tinctorial properties, *i.e.* extracts from *W. fruticosa, X. granatum and A. excelsus*, showed similar UV-visible spectral characteristics as shown in Figure 23. Indeed, the three extracts showed two maximum absorption (λ_{max}) at the following visible wavelengths, 450 and 580 nm which confirm the presence of both orange and purple-red pigments, respectively, in these three closely related red dyes of plant origin (Fig. 23a). Not surprisingly, the two other pigment extracts from the mangrove plants of the Rhizophoraceae family, *C. tagal* and *R. mucronata,* exhibited λ_{max} at the visible wavelengths 400, 450 and 480 nm (in addition with a lower absorbance at 580 nm), which especially confirm the presence of yellow, orange and red pigments (in addition with minor purple-red pigments), respectively, in these extracts (Fig. 23b; Fig. 31-32). All the extracts also exhibited maximum absorption in the ultra-violet region, at about 300, 310 or 330 nm (Fig. 23). This finding clearly revealed the presence of colored aromatic compounds like polyketide-based pigments (e.g. flavonoids, …). Interestingly, the shift of the absorption spectrum towards the red part of the spectrum (i.e., towards longer wavelengths in the range of 500 to 550 nm) by increasing the concentration of the pigment powder in the solution (in the range of 1 to 32 mg/mL, dissolved in 70% aqueous ethanolic solution) was confirmed by the experimental results reported in Fig. 28-32.

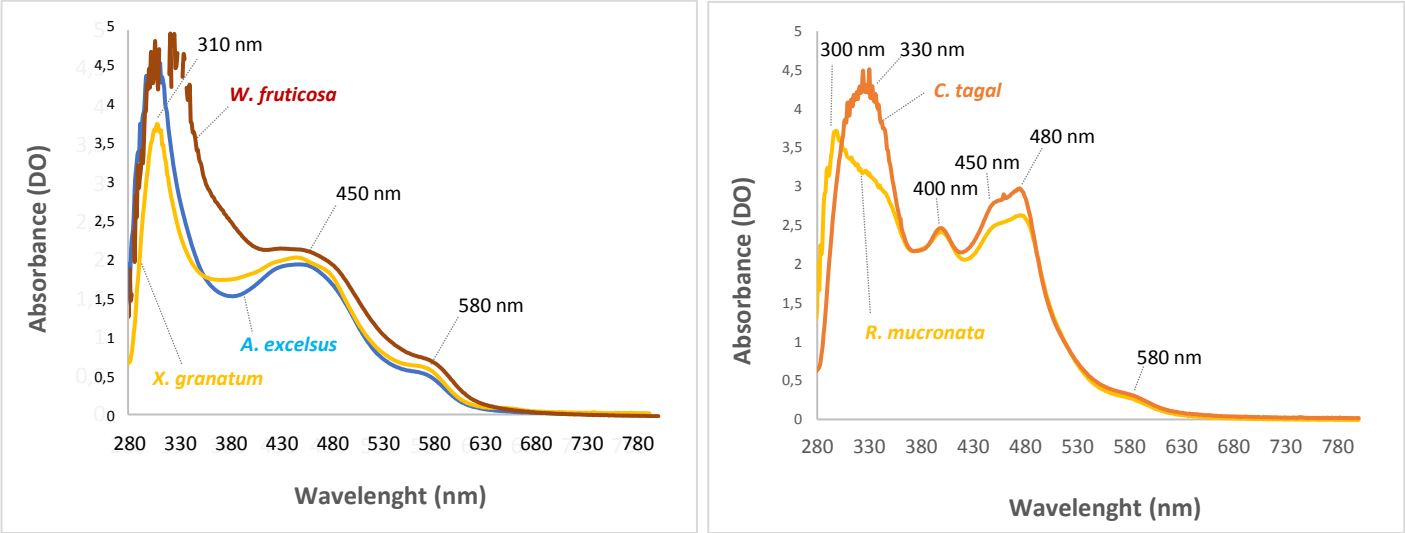


Figure 23. Overlay of UV-visible spectra from 280-800 nm of the crude pigment extracts from the five red dyestuffs. (Figure at left shows UV-visible spectra of the three closely related red dyes from *W. fruticosa, X. granatum* and *A. excelsus* exhibited λ_{max} at 310, 450 and 580 nm; Right figure indicates UV-visible spectra of the two others closely related red dyes from *C. tagal* and *R. mucronata* exhibited λ_{max} at 300/330 nm, 400, 450, 480 and 580 nm).

2-3-2 Main chemical groups of coloring compounds

It has been shown in previous studies that plants pigments encountered in barks of trees are mostly composed by polyphenols such as flavonoids [41], condensed tannins [42] and anthocyanins [32] that can be extracted using a mixture of water and ethanol. Roots may also contain polyphenols, quinonoids (*e.g* alizarin from *Rubia tinctorium*) or other natural compounds [40]. The polyphenol contents of the dye plant species investigated in this study are presented in Figure 24.

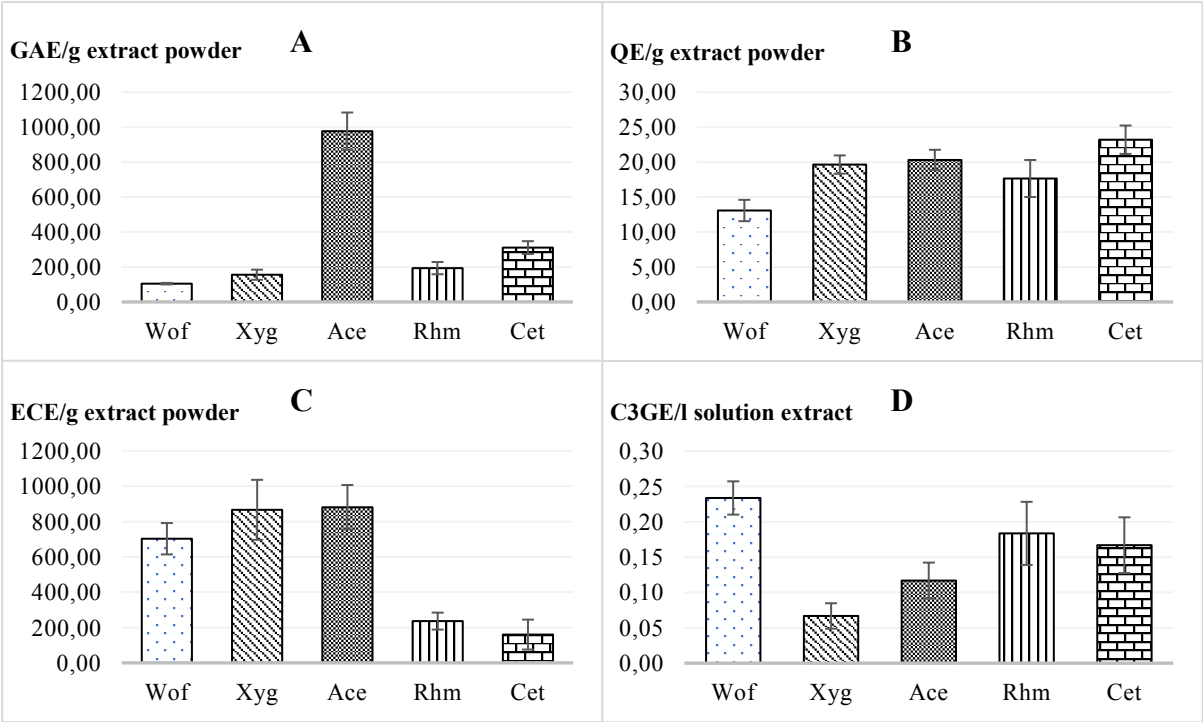


Figure 24. Polyphenol contents of the plant extracts (Wof: *W. fruticosa*, Xyg: *X. granatum,* Ace: *A. excelsus*, Rhm: *R. mucronata*, Cet: *C. tagal*,; **A** : Total polyphenol content expressed in equivalent of gallic acid/ g of extract (GAE/g extract powder); **B**: Flavonoid content expressed in quercetin equivalent/ g of extract (QE/g extract powder); **C**: Total condensed tannins expressed in epigallocatechin equivalent/ g of extract (ECE/g extract powder); **D** : Total monomeric anthocyanin expressed in cyanidin-3-glucoside equivalent/ l of solution (C3GE/l solution extract))

The total polyphenolic contents, flavonoids contents, total condensed tannins and total monomeric anthocyanin contents of the five samples showed important variations from one another. The polyphenol content of the barks of *A. excelsus* was found to be notably high (up 3 to 10 time higher) as compared to the other plant extracts, and reached 977 mg equivalent of gallic acid/g of extract. For comparison, the pigment extracts from *R. mucronata* roots contain about 193 mg of total polyphenols per gram which is a value slightly greater than the ones (150 mg/g) obtained by Banerjee *et al.* (2008) [43] for *R. mucronata* roots collected in the Sundarbans mangroves (Bay of Bengal). The three plants which turned to have red deep hues, namely *W. fruticosa, X. granatum* and *A. excelsus* also showed high content of condensed tannins, e.g. 680 - 850 mg epigallocatechin equivalent/g of extract, as compared to the two others closely related species of the Rhizophoraceae family, *C. tagal* and *R. mucronata*. We also noticed that the pigment extracts from roots of *W. fruticosa* which showed the most intense red coloring power, contained the highest amount of monomeric anthocyanin with 0.25 mg cyanidin-3-glucoside equivalent /l of solution (made with 8 mg of dry powder extract in 1 ml of hydroalcoholic solution 70%). As might be expected, the anthocyanin contents of all the crude extracts were found to be much lower than those generally observed in fruits and flowers [44]. These results highlighted that the coloring properties of the three species, *W. fruticosa, X. granatum* and *A. excelsus* are strongly related to their contents in phenolic compounds, and more particularly in proanthocyanidins (condensed tannins), flavonoids and anthocyanins. Plant polyphenols, beyond their coloring properties

are also important for their bioactive properties in the food and heath industries. The antioxidant activity of these phenolic compounds is attributed to their ability to act as reducing agents for free radicals. They have received attention because their intake is related to the lower incidence of degenerative diseases, such as cancer, diabetes, Alzheimer, and cardiovascular diseases [45].

2-3-3 pH and thermal stabilities

pH and temperature are the main factors that may strongly affect the coloring properties of the pigment extracts under conditions of industrial application. Ngamwonglumlert *et al.* (2007) [46], described that the temperature is the second major factor, after the pH, that affect the color. For instance, in natural dyeing industries, pH variations is a method used by dyers to modify the color by acidifying with acidic fruit or vinegar or by adding ashes for the basic environment [8,13]. On the other side, temperature is important for the stability of the color towards their uses at high temperature for different industries like plastic, bio composites, or food industries. Most of the pigments extracted from fruit or leaves, such as chlorophylls, are sensitive to temperature, and the thermal stability limits their use in the industries [27,46]. In addition, natural red pigments currently in use in industry comes essentially from the anthocyanins from red cabbage and the betalain from red beet, and have their limits in stability (pH, oxidation, and heat-degradation) and vividness upon used in industrial processes [32]. Thus, for the five new red dyes investigated in this study to be any industrial interest, it is necessary to establish that the pigment extracts are stable under different industrial processing conditions (pasteurizing, fabrication of bio-composites, etc.). If the natural colorants are too labile, their industrial applications will be limited. The stability toward pH conditions of the five pigment extracts obtained from the endemic and native plant species to Madagascar are presented in Figure 25 (suppl. data are reported in Tab. 11-17). In this study, the effect of pH conditions on the changes in color was evaluated by measuring the color coordinates L* (lightness), C* (chroma, *i.e.*, the intensity of the color) and h° (hue angle, *i.e.*, the tone of the colour) in the CIELab color system. The color variations under different conditions of pH (at room temperature) have been compared to those of carmine and madder roots extract submitted to similar pH conditions (Tab. 16-17).

Carmine was the best stable standard towards pH changes as shown in Figure 8, *i.e.,* no color variation was observed within a pH range of 3 to 11 (Tab. 17). Madder extract was particularly sensitive towards pH changes because the red color became more pronounced in an alkaline environment (the hue angle strongly decreased; Fig. 34). When compared to madder extract, all the crude pigment extracts from these five endemic and native dye plant species of Madagascar were found to be more stable with respect to pH condition, and more particularly within a pH range of 3 to 9 (Fig. 34; Tab. 16). From pH 3 to pH 9, the color of the sample expressed in terms of lightness, as well as chroma and hue angle didn't change significantly for the five pigment extracts investigated in this study (Fig. 34; Tab. 11-15). However, when the pH of the solution was set at pH 11, the L* and chroma C* coordinates, as well as the hue angle strongly decreased for all pigment extracts indicating a browning of the dye (Fig. 34), and

the a* (red) value increased (Tab. 11-15). This was also true for the control madder extract, but not for the colorant carmine which remained unaffected by the pH changes as mentioned above. Indeed, carmine as reported by Borges *et al*. (2012) [47] and Dufossé (2014) [48], and confirmed in this study, is highly stable towards pH in acidic and alkaline environments. Thus, these findings highlighted that the five new red dyes described in this study, comparing to other natural pigments extracted from fruit or vegetables currently used in the industries, are interesting for different coloring applications both for acidic and basic environments. For instance, anthocyanin pigments obtained from red cabbage are very non-stable towards pH [32] and betacyanin pigments extracted from berry juice are only stable until pH 7 [46], while these five new red dyes are stable within a pH range of 3 to 9.

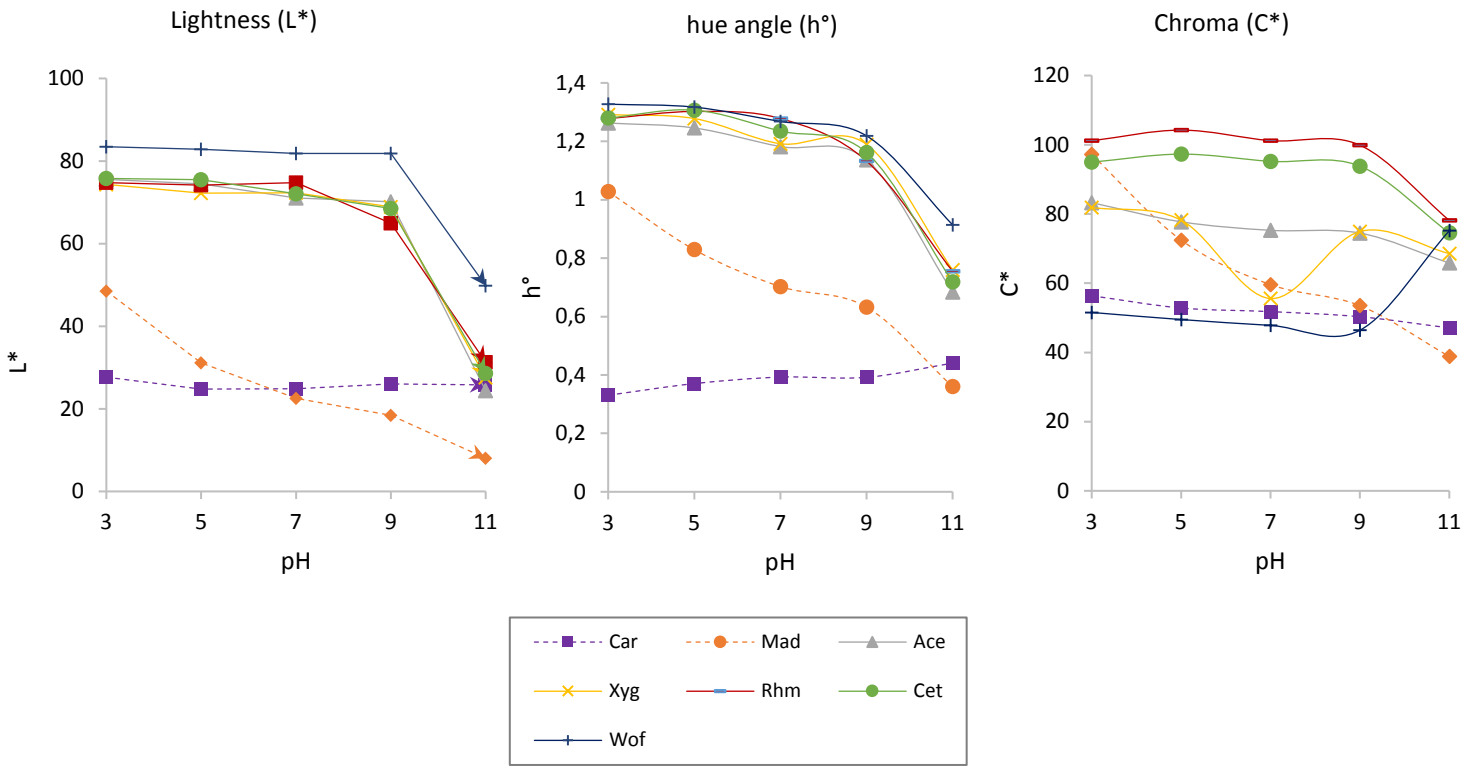


Figure 25. Effect of pH on color characteristics and stability of crude pigment extracts expressed as lightness (L*), chroma (C*) and hue (h°) values in the CIELab system (Ace = *A. excelsus*, Cet = *C. tagal*, Rhm = *R. mucronata*, Xyg = *X. granatum*, Wof = *W. fruticosa*. Carmine (Car) and Madder (Mad) were used as standards.

Additionally, the thermal stability of the different samples has been evaluated following three step tests. This thermal stability is critical because thermal treatments are applied in the dye industries: for example, the dyeing textiles process usually involves high temperatures at 90 °C with duration time between 30 and 180 min [7,8,13]. First, experimentation was conducted to evaluate the stability of the pigment powder extracts dissolved in hydroalcoholic solution at a temperature range of 40-90 °C for 3 h at a neutral pH (about the same temperatures are used by the craftsmen for natural dyeing at

Madagascar) [13]. Our results indicated that all the samples were stable, *i.e.*, no change in color was observed by measuring the CIELab color coordinates. Then, a second assay was performed by combining both pH and temperature conditions. The colored solutions at different pH values (from 3 to 11) were put in a heated bath (90 °C) for 3 h. This generated acid hydrolytic conditions (pH 3 or 5 at 90 °C) and alkaline hydrolytic conditions (pH 9 or 11 at 90 °C). The changes in color between the initial time (t= 0h) and the final state (after 3 h of exposition at acidic or alkaline hydrolytic conditions) was observed. The results indicated that a browning due to the high alkaline pH (pH 11) as described previously was observed for all the extracts, but the thermal hydrolytic conditions doesn't significantly affect the color of the solution in the pH range of 3 to 9 (Fig. 33). Thus, a third thermal stability assay was carried out on the pigment powder extracts in order to define more precisely the thermal stability and the degradation of the pigmented molecules with respect to the exposition temperature. The pigment powder extracts were therefore exposed for 30 minutes in an oven to different high temperatures, e.g. 105, 155, 205, and 305 °C. The total color variation (ΔE) in the CIELAB color system between the non-thermally treated and the thermally treated pigment extracts was monitoring as shown in Figure 9. In comparison with the control carmine (which is stable until 105 °C in this thermal exposure condition, ΔE < 10), the results confirmed that four of new red dyes investigated in this study were also stable until 105 °C for 30 minutes of exposure (which is the maximum temperature used by craftsmen for natural fabric dyeing), *i.e.,* ΔE < 10 at 105 °C for the pigment extracts of *W. fruticosa, X. granatum, A. excelsus*, and *C. tagal* (Fig. 35; Tab. 18-21). However, the pigment extract from *R. mucronata* showed a different profile as shown in Fig. 35 and Tab. 22, indicating that it was less stable (ΔE: +23.7) than the previous ones when it was subjected to 105 °C for 30 minutes of exposure. Its heat stability was comparable to that of madder extract (ΔE: +28.6 at 105 °C for 30 min), which was less heat stable than carmine. In higher exposition temperatures, our results confirmed that the four pigment extracts from *W. fruticosa, X. granatum, A. excelsus*, and *C. tagal* have excellent heat stability until 155 °C for 30 minutes of exposure (ΔE < 10 for all these samples; Fig. 35; Tab. 18-21). Interestingly, only the ones from *W. fruticosa, X. granatum and A. excelsus* remained relatively stable even when samples were exposed up to 205 °C for 30 minutes (ΔE: +28.8, +36.9, and +50.9, respectively; *i.e.*, the pigments retained more than 50% of intensity after the thermal exposure condition) (Fig. 9; Tab. 18-20). In this thermal exposure condition at 205 °C, the pigment extracts from *C. tagal and R. mucronata* have lost more than 90% of their color intensity (ΔE: +89.6 and +110.6, respectively; Tab. 21-22). Lastly, when temperature reached 305 °C, results concluded that color of all the pigment extracts became darker, they completely lost their original color (ΔE: +97.5 to +113.2) (Tab. 18-22). These pigment degradations were also confirmed by measuring the losses in optical density at the pigment specific absorbance wavelengths (400–580 nm) as shown in Fig 33; the OD of the solution tended to zero at 305 °C (Fig. 34). These findings confirmed previous study performed by Marzec *et al*. (2019) [33] on thermal denaturation of azo dyes, a class of synthetic colorant commonly used in the dye industries.

These authors have demonstrated that these kind of pigments were also denatured up to 300 °C [33]. Compared to madder root extract, which is one of the most commonly used natural red dyes in textile industries and which is recognized as a good indicator for heat stability [49], our results highlighted that the five pigment extracts characterized here, and more particularly those from roots of *W. fruticosa* and from barks of *X. granatum* and *A. excelsus*, presented excellent thermal stability up to 205 °C (in the thermal exposure condition performed in this study). Such results imply that these red dyes presented higher retention of the color intensity during thermal processing conditions (pasteurizing, fabrication of bio-composites, etc.) than other natural pigments.

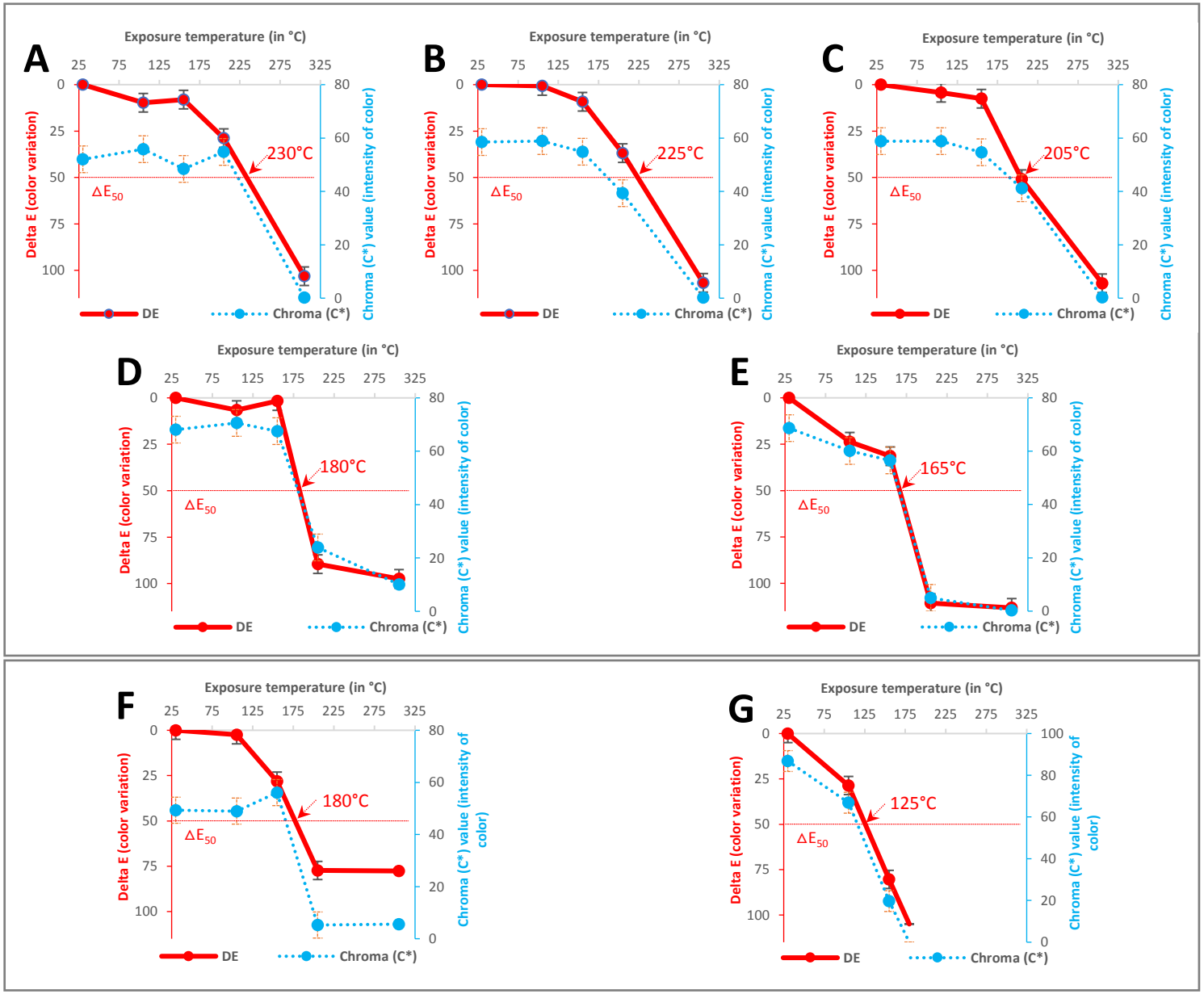


Figure 26. Total color variation (ΔE) of the plant extracts depending on temperature (Ace = *A. excelsus*, Cet = *C. tagal*, Rhm = *R. mucronata*, Xyg = *X. granatum*, Wof = *W. fruticosa*, Carminic acid and Madder are used as standard; the red lines show the limit of stability of the color)

2-3-4 Antioxidant activities

The antioxidant properties of the plant extracts come generally from their polyphenolic compounds and their active metabolites due to their structure. These activities were measured using two representative methods namely 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP). A control experiment was performed using ascorbic acid and butylated hydroxyanisole. Both molecules are known to have antioxidant activities and are widely used in the food and cosmetic industries. The results of this experiment are presented in Table 10.

Table 10. Antioxidant activities of the crude extracts (DPPH and FRAP methods)

	IC 50 means (µg/mL)*	**Standard deviation**	**mMol Trolox equivalent/g***	**Standard deviation**
C. tagal	396	± 47	9.37	± 0.99
R. mucronata	485	± 23	8.31	± 0.81
X. granatum	441	± 80	7.49	± 0.37
A. excelsus	521	± 74	7.40	± 0.44
W. fruticosa	540	± 258	6.61	± 0.11

Each value is a mean of three independent replicates; *Lower IC 50 or higher mMol Trolox equivalent mean higher antioxidant activity.

The inhibition concentrations (IC_{50}) of the five pigment extracts, ranging from 540 to 396 µg/mL, were globally lower than ascorbic acid (753 µg/mL) and butylated hydroxyanisol (605 µg/mL), two famous antioxidants used as controls. This result indicated that all the pigment extracts from Malagasy plants characterized on this study had higher antioxidant activity as compared to both standards. The best antioxidant properties were exhibited by the pigment extracts of *C. tagal* and *W. fruticosa*: 396 and 540 µg/mL, respectively (Tab. 10). Then, these first results obtained by DPPH reducing method were confirmed by the second technique based on FRAP. Indeed, Yeo and Shahidi (2019) [34] have recently published a critical review about the DPPH method and explained that some pigments or colored compounds can have an absorbance at 517 nm and may affect the results of the IC_{50} estimated by this method. Nevertheless, the low concentration of the pigmented solutions carried out in our experiments for the determination of the antioxidant activities of the extracts (< 1 mg/L of crude pigment powder dissolved in hydroalcoholic solution) should not sufficiently affected the absorbance value at 517 nm. The results based on the second method PRAP, also concluded that *R. mucronata* and *C. tagal* presented higher antioxidant values of 0.99 and 0.81 mmol trolox equivalent per gram, respectively (Tab. 10). Thus, these two pigment extracts were the best extracts which have the highest antioxidant activity demonstrated with the first DPPH method. Lastly, our results confirmed the ones from previous studies

performed by Thatoi *et al*. (2014) [36] and Das *et al*. (2019) [50]. These authors have demonstrated in the same way that mangrove plants such as species from *Xylocarpus*, *Avicennia*, *Bruguiera* and *Ceriops* genera exhibited high antioxidant activities, as effective as ascorbate and tocopherols. The antioxidant properties of these mangrove plants should be attributed to the presence of high amount of phenolic compounds (proanthocyanidins, flavonoids and anthocyanins).

3-4 Discussion

3-4-1 Exploitations as crops for new sources of plant pigments

The current study is the first which aimed at characterizing the physicochemical properties, and especially the coloring properties of bark extracts of *A. excelsus* and roots extracts of *W. fruticosa* (two endemic and native species of Madagascar which have never been reported in the literature to the best of our knowledge). Additionally, although the barks or the roots of mangroves plant species like *R. mucronata* of Sunderban mangroves [14], *C. tagal* of east coast Africa, south Asia or south Pacific [17] , and *X. excelsus* from Malaysia [50] have already been described for their chemical composition in terms of bioactive compounds (mainly non-pigmented compounds reported in the literature) and their biological properties. These mangrove plants should be good candidates for producing natural pigments in Madagascar. These species could be cultivated easily in the estuaries of Madagascar and could be of interest as potential sources of incomes for Malagasy farmers, as described below.

Ceriops tagal and ***Rhizophora mucronata*** (Rhizophoraceae) dyeing properties should be linked to their richness in total polyphenols (tannins, etc.), reported first by Jansen *et al*. (2004) [20]. Indeed, our results confirmed that the crude pigment extracts from *C. tagal* and *R. mucronata* barks contain 311 and 193 mg gallic acid equivalent/g of dry extract powder, respectively, which are values slightly greater than the ones (150 mg/g) obtained by Banerjee *et al*. (2008) [43] for *R. mucronata* roots collected in the Sundarbans mangroves (Bay of Bengal). The flavonoid content of *C. tagal* and *R. mucronata* barks (*i.e.,* in the range of 17.6 to 23.2 mg quercetin equivalent/g crude pigment powder) is very similar to the one of the crude pigment extracts obtained from the three other dye species investigated in this study, *X. granatum, A. excelsus* and *W. fruticosa.* Crude pigment extracts of *C. tagal* and *R. mucronata* contain about 160 to 236 mg of total condensed tannins (expressed in epigallocatechin equivalent) per gram of crude pigment powder, and a total monomeric anthocyanin content of about 0.17 mg cyanidin-3-glucoside equivalent per liter of solution extract. Moreover, the results confirmed that crude pigment extracts of *C. tagal* and *R. mucronata*, extracted from barks by eco-friendly solvents, gave interesting and bright orange color even at low concentration of 2 mg/mL. Above 16 mg/mL of crude pigment powder dissolved in hydroalcoholic solution, the color of the bark extracts turned into reddish hues and could be used to colour fabrics as reported earlier by Andriamanantena *et al*. (2019) [7] . Their stability against pH, more particularly in the range of 3 to 11, was found to be significantly better as compared to the madder color that we used as control in this study. Moreoever, *C. tagal* and *R. mucronata* barks

have the best pigment extraction yield among the five dye plant species described on this study: 28.8 and 30.7 % (w/w) for *R. mucronata* and *C. tagal,* respectively. Furthermore, the antioxidant properties of the crude pigment extracts from barks of *R. mucronata* and *C. tagal* presented an IC_{50} (DPPH method) scavenging activity of 485 and 396 µg/ml, respectively, and they were almost twice time better than ascorbic acid (753 µg/ml). Antioxidants are important for the protection of the cells against free radicals and are also used as preservatives in several industries. Other studies demonstrated that *R. mucronata* have also medicinal properties such as antidiabetic activity by reducing the blood glucose level in type 2 diabetic rats, as well as neuroprotective effects [52] and antimicrobial activities [14] that are particularly interesting properties to be associated with the coloring ones. All of these coloring and biological properties extended the range of applications of these two Malagasy mangrove trees. With respect to biodiversity, both species seemed to play an important role in mangroves ecosystem in Madagascar. They are present in all mangrove estuaries from the north to the south of the island. These mangrove trees are currently used by local population as lumber for the construction of house roofs and boat floors, and they can also be used as firewood or to make charcoal. In Madagascar, their exploitation is regulated by very strict legislation. Nevertheless, reforestation programs are already underway in the regions where these plants have been collected and can allow a sustainable exploitation of these mangrove plants as crops with potential industrial uses as natural colorants for textile dyeing and finishing, and/or coloring the materials in the non-food industrial sectors (pharmaceutical, cosmetics, plastics, paints and coating, etc.) at least.

Xylocarpus granatum belongs to the family of *Meliaceae* and is one another mangrove tree species that has been collected from the same area of Madagascar than the *Rhizophoraceae* species described above. In Madagascar, it is present in all mangrove ecosystems. The barks of this dye plant are currently used in Madagascar to dye raffia fabrics with an original pink hue as reported previously [7], and they are also used in other parts of the world in cotton dyeing. This study highlighted that the bark extracts of *X. granatum* presented promising coloring properties for the industries, mainly due to the presence of condensed tannins in the crude pigment extract obtained after the extraction (866 mg epigallocatechin equivalent/g dry powder). These findings confirmed the ones previously observed by Pisitsak *et al*. (2016) which have analysed the tannin content in the bark extracts of *X. granatum*. The pH stability assays carried out in this study suggested that *X. granatum* pigment extract was more sensitive to the variation of the pH both in acidic and alkaline environments, as compared to the other mangrove plants described above (*R. mucronata* and *C. tagal*). Other studies have also demonstrated that bark of this species contained bioactive compounds with medicinal and biological activities [53]. For instance, flavanol derivatives in stem barks of *X. granatum* showed antioxidant activities as well as anti-depressing properties [18]. Our results confirmed interesting antioxidant properties with an IC_{50} scavenging activity around 441 µg/mL for *X. granatum* bark extracts.

In Madagascar, *X. granatum* is used by local population as lumber or firewood, and its exploitation is also strictly regulated. Even if its bark is not very thick, its industrial exploitation can be interesting in the context where *X. granatum* reconstitutes its bark after cutting and debarking wood. Nevertheless, the management of this resource must consider the fragility of the sensitive mangrove ecosystem in Madagascar. This tree does not generally grow in pure stands.

Acridocarpus excelsus species (Malphigiaceae) is an endemic tree of Madagascar and it widely spread in the west region of Madagascar. This tree is currently used as firewood by local population, and also used as source of dyestuff materials for raffia fibers dyeing [7] . However, to the best of our knowledge, the chemical composition and the characterization of the coloring properties of *A. excelsus* bark extract have never been studied so far. Only Jansen (2004) [20] reported that *A. excelsus* bark is rich in tannins, and our results thus confirmed these findings. Indeed, the hydroalcoholic extracts of *A. excelsus* bark contained 880 mg epigallocatechin equivalent/g which is the higher content of condensed tannins found among the five plant species characterized on this study. Moreover, the polyphenol content of the barks of *A. excelsus* was found to be notably high as compared to the other dye plant extracts reported in this study, and reached 977 mg equivalent of gallic acid/g of extract. Interestingly, the bark extracts of *A. excelsus* dissolved in hydroalcoholic solution displayed great coloring properties (with intense red hues) and a high stability towards pH conditions (both in acidic and alkaline environments) and heat treatment (up to 205 °C). This suggested that the coloring properties and the stability of its polyphenolic pigments make them very attractive as crops with potential industrial uses as natural colorants. The IC_{50} scavenging activity of about 521 µg/mL of its crude pigment extract was lower than two famous antioxidants used as controls (*e.g.,* ascorbic acid and butylated hydroxyanisol). Thus, its antioxidant properties can also be used for specific applications such as textile finishing, cosmetics, pharmaceutical, etc.

Woodfordia fruticosa (Lythraceae) is a native plant species collected in dry areas next to the estuary of mangroves in Madagascar. The flowers, leaves and stem bark of *W. fruticosa* were very rich in tannins and flavonoids, and leave extracts are currently used in other countries like India as natural colorants. According to Das *et al*. (2007) [21], they also have some interesting medicinal properties and biological activities. So far, no information about the root extracts of *W. fruticosa*, that is the part currently used by local population in Madagascar to dye natural fabrics, were available in the literature. The analysis of the *W. fruticosa* roots in this study revealed that, in addition to their good coloring properties (intense red hue), the crude extracts are rich in condensed tannins and flavonoids, and they have interesting antioxidant properties with an IC_{50} scavenging activity around 540 µg/mL. Surprisingly, even if the extracts from *W. fruticosa* adventitious roots showed the lowest pigment extraction yield (13 %, w/w) as compared to the other plant species characterized in the current study, the crude pigment powder

extracted showed deeper red color despite at low concentration when dissolved in hydroalcoholic solution (*i.e.*, from 8 mg/mL of crude pigment powder in solution). Finally, the root extracts of *W. fruticosa* displayed both great red coloring properties and a high stability towards pH conditions and heat treatment (up to 205 °C). Thus, we believe that the roots of *W. fruticosa* may be a promising source of novel dyestuffs with potential applications for other industrial sectors such as pharmaceutical, cosmetics and plastics coloring. Their adventitious roots are very long which facilitate the harvest while preserving the plant.

2-4-2 Range of potent applications in the industries

In this study, we demonstrated that five endemic/indigenous dye plant species growing in the west area of Madagascar are interesting sources of red dyestuff materials rich in phenolic compounds such as proanthocyanidins, flavonoids and anthocyanins. The pigments can be easily extracted from their stem bark or roots by eco-friendly solvents. Our results demonstrated that the pigment extracts from these dyestuffs displayed greater color stability towards acidic and alkaline environments and high temperature (up to 205 °C for some of these red dyes), as compared to madder roots extract at least. Thus, these crude pigment extracts can be classified as stable natural dyes, like carmine (E-120) which is the most famous natural dye currently used in several industries for red coloring. In the range of experimental conditions evaluated in this study, these novel red dyestuffs showed a good potential for applications in heat pasteurized food matrices, and more particularly under the acidic conditions generally encountered in foods. The pigment extraction yield, the polyphenols content and the high antioxidant activities give to these plant extracts a promising added value and open up potential applications for further exploitation in the industries.

Concerning the underutilized plant species *A. excelsus* and *W. fruticosa,* which were only used to dye natural fiber like raffia and silk in Madagascar, besides their applications in textile dyeing, their uses can be extended to other industrial fields such as textile finishing, pharmaceutical, cosmetics and plastics coloring. For instance, the processing temperature for the fabrication of bio-composites is around 160°C. All of the pigment extracts investigated here are suitable for such industrial applications because their colors are stable at this temperature. For processes of fabrication of bioplastics using higher temperatures up to 200 °C, pigment extracts from *W. fruticosa or A. excelsus* with high temperature stability could be particularly suitable. Moreover, pharmaceutical industries need red dyestuff for capsules and tablets. The color extracts obtained from *A. excelsus* and *W. fruticosa* which have shown great stability with regard to the coloring and antioxidant properties could be particularly useful. Cosmetic industries do not require such high temperature and the products are used in neutral and acidic pH condition. Therefore, the *A. excelsus* and *W. fruticosa* pigment extracts, that are stable in acidic environment, as coloring materials are reliable natural alternatives for these kinds of industrial applications. Preliminary experiments were performed in the lab to produce colored soap using crude extracts of these plant species with promising results (Fig. 35). Works are in progress in our laboratory to fully characterize

the toxicological properties of these crude pigment extracts, in order to investigate their potential effect on animal and human health.

The three mangrove trees of Madagascar investigated here, *R. mucronata*, *C. tagal* and *X. granatum* are growing in a protected and sensitive ecosystem. Nevertheless, they can be easily cultivated. Reforestation program will help to preserve the forest and to exploit these natural resources because the collection of barks does not impair growth of those trees. Wood of mangrove trees are also used by local population as lumber for construction or as firewood and enriched pigment barks are interesting by-products for such applications. Then, the two species *A. excelsus* and *W. fruticosa* grow in dry areas where only a very few species of plants can grow and make their exploitations as crops for new sources of pigments a very promising and interesting issue for local population. Industries are researching new sustainable and environmentally friendly products and these dyestuffs extracted from endemic and native dye plants species of Madagascar which are available and easy to grow are one of the solutions for this research of new sources of natural dyestuffs.

3-5 Conclusions

Lastly, it must be mentioned that there is a growing interest for using natural dyes from plant origin to dye leather, to stain wood, pulp and some plastics, to dye hair and to impart color to some pharmaceutical preparations. Thus, an international market is growing for natural colorants and bioingredients and for new offers of natural dyestuffs, such as the natural colorants from dye plants of Madagascar. Our results suggested that dyestuffs extracted from the endemic *A. excelsus,* and the native *C. tagal, R. mucronata, X. granatum,* and *W. fruticosa* species of Madagascar should be good candidates to replace for synthetic sources of red dyes and open up new applications in textile finishing, food, cosmetics, nutraceutical and pharmaceutical industries. Future will tell us if there may be any industrial large-scale application of natural colorants coming from Malagasy dye-yielding plants in the industries, other than the current uses for craft textile dyeing, with new natural colorants having the following properties: nonallergic and non-toxic molecules, no toxic secondary metabolites produced in the human body following ingestion, and good fastness property as well as adequate stability in the industrial coloring processes. The production of natural colorants from dye plants of Madagascar by local dyers should be an adequate biodiversity-related activity for the future. This potential activity could contribute to maintaining the complex and fragile relationship between the preservation of plant biodiversity, economic and social development, and the material and spiritual well-being of the local populations. It could also prevent biodiversity loss in Madagascar by developing natural capital knowledge through scientific research and enhancement of traditional knowledge on natural dyes, and by undertaking studies on the rational use of natural colorants from Madagascar plant resources while adopting collaborative and participatory approaches in order to get the support of all stakeholders.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Terre-Là Company, Majunga, Madagascar) and FEEM Association (Boanamary and Ampombilava) for their expertise, Jean Michel Leong Pock from CIRAD / DP Forêts Biodiversité (Madagascar) and Thierry Regnier from the Tshwane University of technology for their support during some laboratory works, and also the department of the zoological and botanical garden of Tsimbazaza (Madagascar) for the identification of the plant species.

Funding

This study was financially supported by grants from the Conseil Régional de La Réunion, Réunion Island (France) (Grant N°. DIRED/20161450).

Appendix A. Supplementary data

The following is Supplementary data to this article: See Appendix A.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

References

[1] Marketsandmarkets. Colorants Market by Type, End-Use Industry, Region - Global Forecast to 2022. Https://WwwMarketsandmarketsCom/ 2017. https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/colorant-market-181900395.html.
[2] Dweck AC. Natural ingredients for colouring and styling. International Journal of Cosmetic Science 2002; 24:287–302.
[3] Lee SE, Hwang HJ, Ha J-S, Jeong H-S, Kim JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Life Sciences 2003; 73:167–79.
[4] Rather LJ, Akhter S, Padder RA, Hassan QP, Hussain M, Khan MA., Colorful and semi durable antioxidant finish of woolen yarn with tannin rich extract of Acacia nilotica natural dye. Dyes and Pigments 2017; 139:812–9.
[5] Singh R, Jain A, Panwar S, Gupta D, Khare SK. Antimicrobial activity of some natural dyes. Dyes and Pigments 2005; 66:99–102.
[6] Kasiri MB, Safapour S. Natural dyes and antimicrobials for green treatment of textiles. Environmental Chemistry Letters 2014; 12:1–13.
[7] Andriamanantena M, Danthu P, Cardon D, Fawbush FR, Raonizafinimanana B, Razafintsalama VE, Rakotonandrasana S, Ethève A., Thomas P., Caro Y. Malagasy Dye Plant Species: A Promising Source of Novel Natural Colorants with Potential Applications – A Review. Chemistry & Biodiversity 2019 ;16.
[8] Cardon D. Le monde des teintures naturelles. Edition Belin. 2014, 500p.
[9] Gilman EL, Ellison J, Duke NC, Field C. Threats to mangroves from climate change and adaptation options: A review. Aquatic Botany 2008; 89:237–50.
[10] Giri C, Muhlhausen J. Mangrove Forest Distributions and Dynamics in Madagascar (1975–2005). Sensors 2008; 8:2104–17.

[11] Gebhardt B, Sperl R, Carle R, Müller-Maatsch J. Assessing the sustainability of natural and artificial food colorants. Journal of Cleaner Production 2020; 260:120884.
[12] Yusuf M, Shabbir M, Mohammad F. Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. Natural Products and Bioprospecting 2017 ; 7 :123–45.
[13] Etheve A-M. Manuel de teinture naturelle : Exemple de Madagascar. Cite; 2005, 52p.
[14] Sur T, Hazra A, Bhattacharyya D, Hazra A. Antiradical and antidiabetic properties of standardized extract of Sunderban mangrove *Rhizophora mucronata*. Pharmacognosy Magazine 2015; 11:389.
[15] Verenkar N, Krishnan S. Dyeing of cotton and silk with eco-friendly dyes extracted from bark of mangrove species *Rhizophora mucronata* and *Ceriops tagal*. International Journal of ChemTech Research 2017:9.
[16] Kasmudjiastuti E, Murti RS. The effect of level concentration *ceriops tagal* on leather tanning of barramundi (*Lates calcarifer*) fish skin on chemical, mechanical and leather morphology properties. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 2019; 536:012076.
[17] Wang H, Li M-Y, Wu J. Chemical Constituents and Some Biological Activities of Plants from the Genus *Ceriops*. Chemistry & Biodiversity 2012; 9:1–11.
[18] Gao Q, Gao Y, Song H, Li J, Wu Y, Shi X., Cipadesin A, a bioactive ingredient of *Xylocarpus granatum*, produces antidepressant-like effects in adult mice. Neuroscience Letters 2016; 633:33–9.
[19] Pisitsak P, Hutakamol J, Jeenapak S, Wanmanee P, Nuammaiphum J, Thongcharoen R. Natural dyeing of cotton with *Xylocarpus granatum* bark extract: Dyeing, fastness, and ultraviolet protection properties. Fibers and Polymers 2016; 17:560–8.
[20] Jansen PCM, Cardon D, Lemmens RHMJ, Oyen LPA, Plant Resources of Tropical Africa (Program). Ressources végétales de l'Afrique tropicale. Wageningen ; Leiden : Fondation PROTA : CTA ; Backhuys Publishers ; 2004, 238p.
[21] Das PK, Goswami S, Chinniah A, Panda N, Banerjee S, Sahu NP, *Woodfordia fruticosa*: Traditional uses and recent findings. Journal of Ethnopharmacology 2007; 110:189–99.
[22] Kumar D, Sharma M, Sorout A, Saroha K, Verma S. *Woodfordia fruticosa* Kurz.: A Review on its Botany, Chemistry and Biological activities. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2016; 5:293–8.
[23] Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson D, Lightfoot D. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. Plants 2017 ;6 :42.
[24] Mabika A, Loumpangou C, Agnaniet H, Moutsamboté J, Ouamba J. Les plantes tinctoriales d'Afrique Centrale : enquête ethnobotanique et screening phytochimique. Journal of Applied Biosciences 2013 ;67 :5236.
[25] Toussirot M, Nowik W, Hnawia E, Lebouvier N, Hay A-E, de la Sayette A., Dyeing properties, coloring compounds and antioxidant activity of *Hubera nitidissima* (Dunal) Chaowasku (Annonaceae). Dyes and Pigments 2014; 102:278–84.
[26] Ju ZY, Howard LR. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2003; 51:5207–13.
[27] Boo H-O, Hwang S-J, Bae C-S, Park S-H, Heo B-G, Gorinstein S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. Industrial Crops and Products 2012; 40:129–35.
[28] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 1999, 299:152–78.
[29] Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food and Chemical Toxicology 2011; 49:2689–96.
[30] Ksibi IE, Slama RB, Faidi K, Ticha MB, M'henni MF. Mixture approach for optimizing the recovery of colored phenolics from red pepper (*Capsicum annum* L.) by-products as potential source of natural dye and assessment of its antimicrobial activity. Industrial Crops and Products 2015; 70:34–40.

[31] Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. 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 2005; 88:1269–78.
[32] Torskangerpoll K, Andersen ØM. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. Food Chemistry 2005; 89:427–40.
[33] Marzec A, Szadkowski B, Rogowski J, Maniukiewicz W, Zaborski M. Characterization and Structure–Property Relationships of Organic–Inorganic Hybrid Composites Based on Aluminum–Magnesium Hydroxycarbonate and Azo Chromophore. Molecules 2019; 24:880.
[34] Yeo J, Shahidi F. Critical Re-Evaluation of DPPH assay: Presence of Pigments Affects the Results. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2019; 67:7526–9.
[35] Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Analytical Biochemistry 1996; 239:70–6.
[36] Thatoi HN, Patra JK, Das SK. Free radical scavenging and antioxidant potential of mangrove plants: a review. Acta Physiologiae Plantarum 2014; 36:561–79.
[37] Shahid M, Shahid-ul-Islam, Mohammad F. Recent advancements in natural dye applications: a review. Journal of Cleaner Production 2013; 53:310–31.
[38] Baliarsingh S, Panda AK, Jena J, Das T, Das NB. Exploring sustainable technique on natural dye extraction from native plants for textile: identification of colourants, colourimetric analysis of dyed yarns and their antimicrobial evaluation. Journal of Cleaner Production 2012; 37:257–64.
[39] Kechi A, Chavan RB, Moeckel R. Dye Yield, Color Strength and Dyeing Properties of Natural Dyes Extracted from Ethiopian Dye Plants. Textiles and Light Industrial Science and Technology 2013; 2:9.
[40] Willemen H, van den Meijdenberg GJP, van Beek TA, Derksen GCH. Comparison of madder (*Rubia tinctorum* L.) and weld (*Reseda luteola* L.) total extracts and their individual dye compounds with regard to their dyeing behaviour, colour, and stability towards light. Coloration Technology 2019; 135:40–7.
[41] Andersen ØM, Markham KR, editors. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, Fla.: CRC Taylor & Francis; 2006, 1237p.
[42] Tanner G. Condensed tannins. Plants pigments and their manipulation, Annual plant reviews, vol. 14. Kevin Davies, CRC Press, Blackwell publishing; 2004, p. 150–84.
[43] Banerjee D, Chakrabarti S, Hazra AK, Banerjee S, Ray J, Mukherjee B. Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. African Jounal of Biotechnology 2008; 7:805–10.
[44] Chandra A, Rana J, Li Y. Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC−MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001;49:3515–21.
[45] Ngamwonglumlert L, Devahastin S, Chiewchan N. Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2017; 57:3243–59.
[46] Borges ME, Tejera RL, Díaz L, Esparza P, Ibáñez E. Natural dyes extraction from cochineal (Dactylopius coccus). New extraction methods. Food Chemistry 2012; 132:1855–60.
[47] Dufossé L. Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the food pigment family. Food Research International 2014; 65:132–6.
[48] Deveoglu O, Sahinbaskan BY, Torgan E, Karadag R. Investigation on colour, fastness properties and HPLC-DAD analysis of silk fibres dyed with *Rubia tinctorium* L. and *Quercus ithaburensis* Decaisne: Investigation of silk fibres dyed with madder and walloon oak. Coloration Technology 2012; 128:364–70.
[49] Das SK, Samantaray D, Sahoo SK, Pradhan SK, Samanta L, Thatoi H. Bioactivity guided isolation of antidiabetic and antioxidant compound from *Xylocarpus granatum* J. Koenig bark. 3 Biotech 2019; 9:198.
[50] Shahid-Ud-Daula AFM, Basher MA. Phytochemical screening, plant growth inhibition, and antimicrobial activity studies of Xylocapus granatum. Malaysian Journal Pharmaceutical Sciences 2009; 7:9–21.

[51] Tekupalli R, Anand S, Ramachandregowda S, Kariyappa AS, Dundaiah B, Gopinath MM. Neuroprotective effects of mangrove plants. Biotechnological Utilization of Mangrove Resources, Elsevier; 2020, p. 261–273.
[52] Shen L-R, Guo D, Yu Y-M, Yin B-W, Zhao L, Shi Q-W., Chemical Constituents of Plants from the Genus Xylocarpus. Chemistry & Biodiversity 2009; 6:1293–1308.

Appendix A. Supplementary data

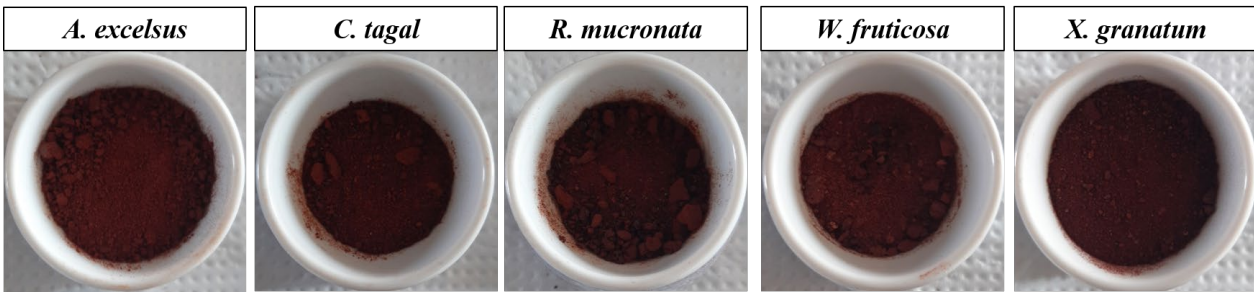


Figure 27. Crude dry pigment extracts in powder obtained from the five endemic/native plant species used in Madagascar: *A. excelsus, C. tagal, R. mucronata, W. fruticosa,* and *X. granatum.*

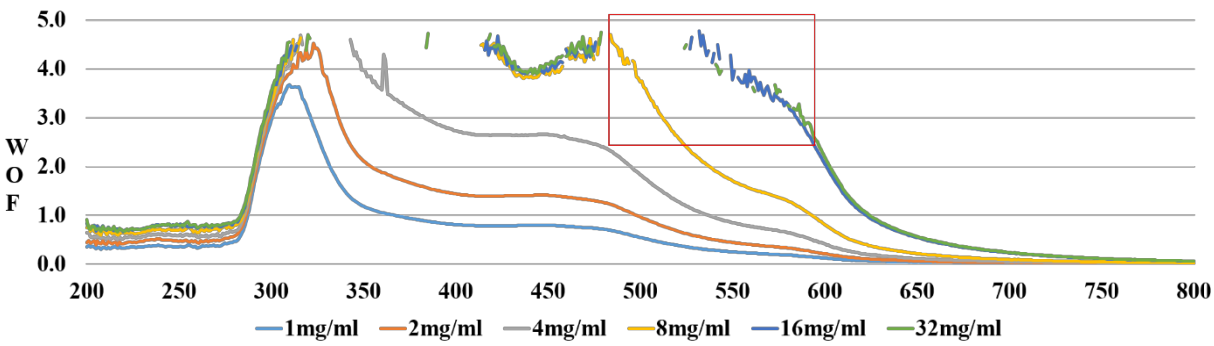


Figure 28. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *W. fruticosa* crude pigment extracts according to the concentration in the range 1 to 32 mg/mL (in 70% aqueous ethanolic solution).

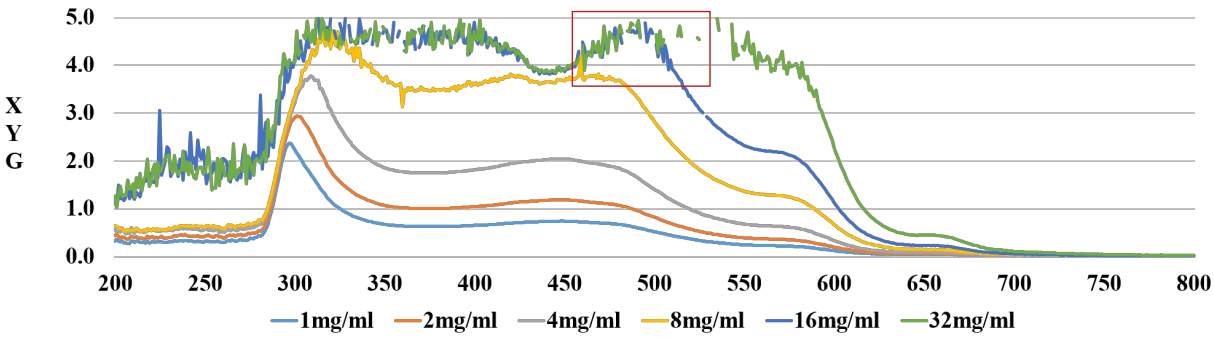


Figure 29. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *X. granatum* crude pigment extracts according to the concentration in the range 1 to 32 mg/mL (in 70% aqueous ethanolic solution).

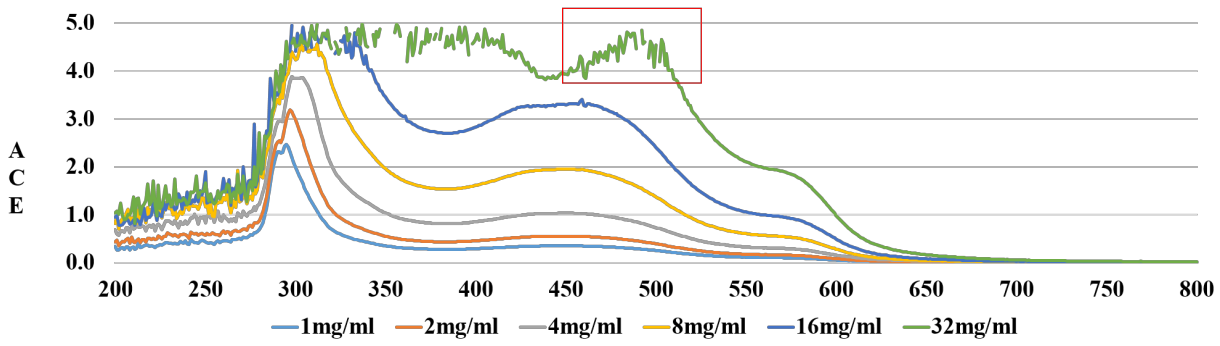


Figure 30. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *A. excelsus* crude pigment extracts according to the concentration in the range 1 to 32 mg/mL (in 70% aqueous ethanolic solution).

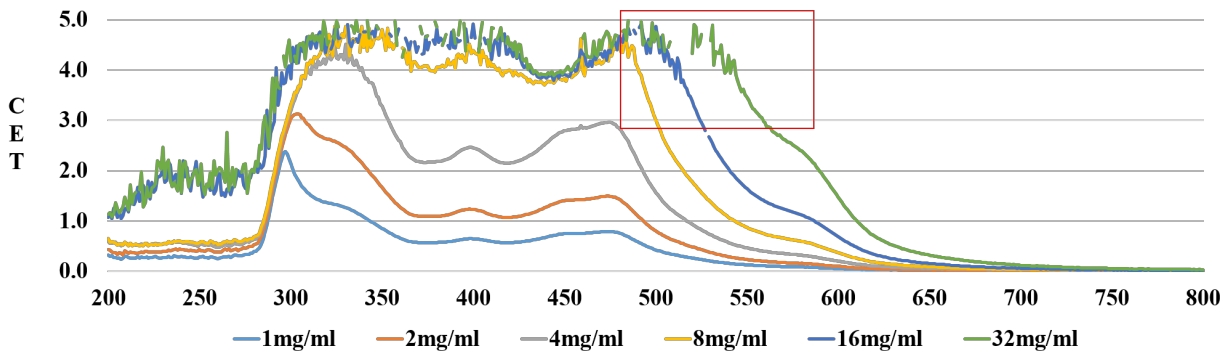


Figure 31. Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *C. tagal* crude pigment extracts according to the concentration in the range 1 to 32 mg/mL (in 70% aqueous ethanolic solution).

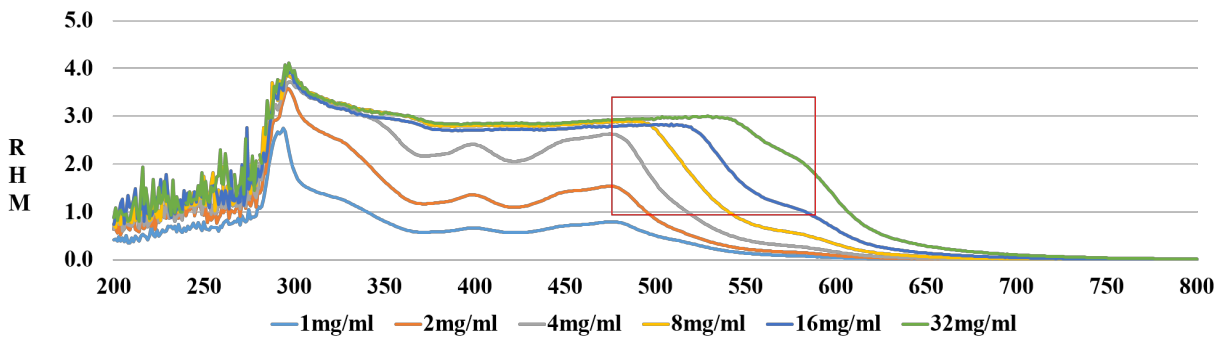


Figure 32: Overlay of UV-visible spectra from 200-800 nm of *R. mucronata* crude pigment extracts according to the concentration in the range 1 to 32 mg/mL (in 70% aqueous ethanolic solution).

Table 11. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *W. fruticosa* depending on pH conditions

Woodfordia fruticosa	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution pH7	+81.81	+14.26	+45.63	+47.81	+72.64
pH 3	+83.46 ΔL*= +1.65 ΔE= +5.03	+12.43 Δa*=-1.82	+50.02 Δb*=+4.39	+51.54 ΔC*=+3.73	+76.04 ΔH*= +3.39
pH 5	+82.85 ΔL*= +1.04 ΔE= +3.10	+12.43 Δa*= -1.83	+47.91 Δb*=+2.27	+49.49 ΔC*= +1.68	+76.46 ΔH*= +2.81
pH 9	+81.83 ΔL*= +0.01 ΔE= +2.70	+16.00 Δa*=+1.74	+43.56 Δb*= -2.07	+46.41 ΔC*=-1.40	+69.83 ΔH*= -2.81
pH 11	49.84 ΔL*= -31.97 ΔE= +47.06	+45.88 Δa*= +31.62	+59.52 Δb*= +13.89	+75.15 ΔC*=+27.34	+52.37 ΔH*= -20.27

ΔL* is the variation of the coordinate L* between the final pH (3 or 5 or 9 or 11) and neutral pH (7), Δa* is the variation of a*, Δb* is the variation of b*, ΔC* is the variation of C*, ΔH* is the variation of H* and ΔE is the total color variation ($\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$)

Table 12. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *X. granatum* depending on pH conditions

Xylocarpus granatum	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution pH7	+73.30	+20.56	+51.61	+55.55	+68.28
pH 3	+74.35 ΔL*= +2.04 ΔE= +27.24	+22.58 Δa*= +2.02	+78.70 Δb*= +27.09	+81.88 ΔC*=+26.32	+73.89 ΔH*= +5.70
pH 5	+72.19 ΔL*= -0.11 ΔE= +23.35	+22.57 Δa*= +2.01	+74.88 Δb*= +23.26	+78.21 ΔC*= 22.64	+71.48 ΔH*= +3.20
pH 9	+68.87 ΔL*= -3.43 ΔE= +19.62	+27.88 Δa*= +7.32	+69.57 Δb*= +17.95	+74.95 ΔC*= +19.39	+68.15 ΔH*= -0.12
pH 11	+27.54 ΔL*= -44.76 ΔE= +53.59	+49.70 Δa*= +29.14	+47.22 Δb*= -4.39	+68.56 ΔC*= +12.99	+43.53 ΔH*= -24.74

For captions, see Table 11.

Table 13. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *A. excelsus* depending on pH conditions

Acridocarpus excelsus	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution pH7	71.04	28.54	69.65	75.27	67.75
pH 3	75.56 ΔL*= +04.52 ΔE= +11.17	25.25 Δa*= -03.28	79.34 Δb*= +09.68	83.25 ΔC*= +07.98	72.38 ΔH*= +04.62
pH 5	74.45 ΔL*= +03.41 ΔE= +6.43	24.83 Δa*= -03.70	73.66 Δb*= +04.01	77.73 ΔC*= +02.46	71.41 ΔH*= +03.65
pH 9	70.10 ΔL*= -00.94 ΔE= +3.60	31.32 Δa*= +02.78	67.57 Δb*= -02.08	74.48 ΔC*= -00.79	65.16 ΔH*= -02.59
pH 11	24.38 ΔL*= -46.66 ΔE= +58.91	51.02 Δa*= +22.48	41.8 Δb*= -28.07	65.82 ΔC*= -09.45	39.20 ΔH*= -28.55

For captions, see Table 11.

Table 14. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *C. tagal* depending on pH conditions

Ceriops tagal	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution pH7	72.09	31.35	89.88	95.19	70.76
pH 3	75.79 ΔL*= +3.70 ΔE= +5.63	27.25 Δa*= -4.10	90.96 Δb*= +1.08	94.95 ΔC*= -0.23	73.32 ΔH*= +2.55
pH 5	75.47 ΔL*= +3.38 ΔE= +7.95	25.39 Δa*= -5.96	93.92 Δb*= +4.04	97.19 ΔC*= +2.09	74.87 ΔH*= +4.10
pH 9	68.47 ΔL*= -3.61 ΔE= +7.97	37.35 Δa*= +5.95	86.06 Δb*= -3.82	93.81 ΔC*= -1.38	66.53 ΔH*= -4.23
pH 11	28.61 ΔL*= -34.30 ΔE= -43.47	56.08 Δa*= +27.72	49.05 Δb*= -40.83	74.50 ΔC*= -20.68	41.17 ΔH*= -29.59

For captions, see Table 11.

Table 15. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *R. mucronata* depending on pH conditions

Rhizophora mucronata	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution pH7	+74.77	+29.19	+96.88	+101.19	73.23
pH 3	+74.77 ΔL*= +0 ΔE= +0.05	+29.22 Δa*= +0.03	+96.84 Δb*= +0.04	+101.15 ΔC*=-0.03	+73.20 ΔH*= -0.02
pH 5	+74.18 ΔL*= -0.58 ΔE= +3.96	+27.65 Δa*= -1.54	+100.49 Δb*= +3.61	+104.23 ΔC*=+3.04	+74.61 ΔH*= +1.38
pH 9	+64.92 ΔL*=-9.85 ΔE= +17.66	+42.36 Δa*= +13.17	+90.44 Δb*= -6.44	+99.87 ΔC*=-1.31	64.89 ΔH*= -8.33
pH 11	+31.27 ΔL*= -43.5 ΔE= +67.34	+56.87 Δa*= +27.68	+53.56 Δb*= -43.32	+78.13 ΔC*=-23.06	+43.28 ΔH*= -29.94

For captions, see Table 11.

Table 16. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the madder extract (used as control) depending on pH conditions

Madder extract	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution pH7	+22.52	+45.47	+38.5	+59.57	+40.25
pH 3	+48.53 ΔL*= +26.01 ΔE= +51.94	+50.19 Δa*= +4.72	+83.22 Δb*= +44.72	+97.18 ΔC*=+44.72	+58.90 ΔH*= +18.65
pH 5	+31.15 ΔL*= +8.63 ΔE= +17.59	+48.95 Δa*= +3.48	+53.43 Δb*= +14.93	+72.46 ΔC*=+14.9	+47.50 ΔH*= +7.25
pH 9	+18.46 ΔL*= -4.06 ΔE= +8.30	+43.16 Δa*= -2.31	+31.64 Δb*= -6.86	+53.51 ΔC*=-6.06	+36.22 ΔH*= -4.01
pH 11	+8.04 ΔL*=-14.48 ΔE= +30.15	+36.33 Δa*= -9.14	+13.68 Δb*= -24.82	+38.82 ΔC*=-20.75	+20.63 ΔH*= -19.62

For captions, see Table 11.

Table 17. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the carmine extract (used as control) depending on pH conditions

Carmine	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution pH7	+24.86	+47.84	+19.82	+51.78	+22.50
pH 3	+27.67 ΔL*= +2.81 ΔE= +6.33	+53.31 Δa*= +5.47	+18.30 Δb*= -1.52	+56.36 ΔC*=+4.58	+18.94 ΔH*= -3.55
pH 5	+24.78 ΔL*= -0.08 ΔE= +1.57	+49.25 Δa*= -1.41	+19.13 Δb*= -0.69	+52.83 ΔC*=+1.05	+21.22 ΔH*= -1.27
pH 9	+26.00 ΔL*= +1.14 ΔE= +1.86	+46.49 Δa*= -1.35	+19.22 Δb*= -0.6	+50.30 ΔC*=-1.47	+22.46 ΔH*= -0.04
pH 11	+25.80 ΔL*=+0.94 ΔE= +5.34	+42.58 Δa*=-5.26	+20.08 Δb*= +0.26	+47.07 ΔC*=-4.70	+25.24 ΔH*= +2.74

For captions, see Table 11.

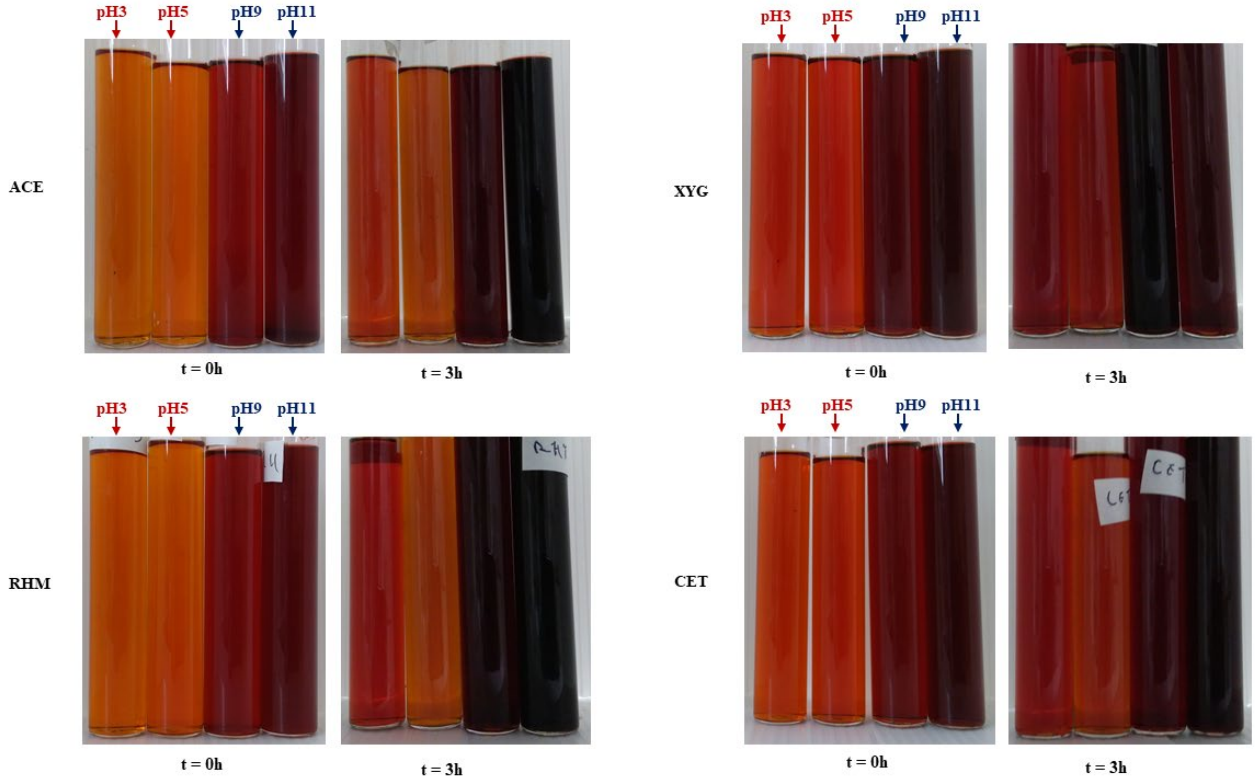


Figure 33. Stability of the crude pigment extracts from some endemic/native plant species used in Madagascar depending on acid hydrolytic conditions (pH 3 or 5, at 90 °C) and alkaline hydrolytic conditions (pH 9 or 11, at 90 °C). Color variation observed between the initial time (t= 0h) and the final state (after 3 hours of exposition at acidic or alkaline hydrolytic conditions). Each tube test was immersed in a 90°C hot bath during 3 hours. Captions: ACE: *A. excelsus*, XYG: *X. garantum*; RHM: *R. mucronata*, and CET: *C. tagal.*

Table 18. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *W. fruticosa* depending on temperature.

Woodfordia fruticosa	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution 30°C	+32.41	+54.82	+55.48	+78.04	+45.29
105°C	+37.5 ΔL*= +5.08 ΔE= +9.75	+54.23 Δa*= -0.59	+63.78 Δb*= +8.31	+83.73 ΔC*=+5.73	+49.65 ΔH*= +4.33
155°C	+28.36 ΔL*= -4.05 ΔE= +8.05	+53.99 Δa*= -0.83	+48.56 Δb*= -6.91	+72.62 ΔC*=-5.38	+41.99 ΔH*= -3.32
205°C	+52.08 ΔL*= +19.66 ΔE= +28.81	+40.91 Δa*= -13.91	+71.28 Δb*= +15.80	+82.19 ΔC*=+4.19	+60.17 ΔH*= +14.86
305°C	+100.27 ΔL*= +67.86 ΔE= +103.17	+0.08 Δa*=-54.74	+0.31 Δb*= -55.16	+0.33 ΔC*=-77.67	+75.66 ΔH*= +30.34

ΔL* is the variation of the coordinate L* between the final temperature (105° or 155° or 205° or 305°) and initial temperature (30°), Δa* is the variation of a*, Δb* is the variation of b*, ΔC* is the variation of C*, ΔH* is the variation of H* and ΔE is the total color variation ($\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$)

Table 19. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *X. granatum* depending on temperature.

Xylocarpus granatum	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution 30°C	+38.83	+57.35	+66.27	+84.12	+47.02
105°C	+39.03 ΔL*= +0.19 ΔE= +0.69	+53.93 Δa*= +0.58	+66.60 Δb*= +0.33	+88.27 ΔC*=+0.63	+49.01 ΔH*= -0.09
155°C	+34.13 ΔL*= -4.70 ΔE= +9.22	+58.02 Δa*= +0.67	+58.36 Δb*= -7.90	+82.30 ΔC*=-5.34	+45.19 ΔH*= -3.91
205°C	+20.89 ΔL*= -17.94 ΔE= +36.87	+46.87 Δa*= -10.47	+35.80 Δb*= -30.46	+58.99 ΔC*=-28.65	+37.39 ΔH*= -11.71
305°C	+99.87 ΔL*= +61.03 ΔE= +106.75	-0.14 Δa*=-59.49	+0.20 Δb*= -66.07	+0.25 ΔC*=-87.39	-54.07 ΔH*= -103.2

For captions, see Table 18.

Table 20. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *A. excelsus* depending on temperature.

Acridocarpus excelsus	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution 30°C	+38.54	+58.62	+65.92	+88.26	+48.36
105°C	+40.12 ΔL*= +1.57 ΔE= +4.36	+55.52 Δa*= -3.09	+68.58 Δb*= +2.66	+88.24 ΔC*=+0.03	+51.03 ΔH*=+2.66
155°C	+34.9 ΔL*=-3.65 ΔE= +7.58	+56.18 Δa*= -2.43	+59.74 Δb*= -6.18	+82.01 ΔC*=-6.21	+54.67 ΔH*= -1.59
205°C	+71.62 ΔL*= +33.07 ΔE= +50.91	+20.67 Δa*= -37.94	+58.22 Δb*= -7.7	+61.79 ΔC*=-26.43	+41.19 ΔH*=-22.11
305°C	+99.73 ΔL*=+61.18 ΔE= +106.98	+0.24 Δa*= -58.37	+0.39 Δb*= -65.53	+0.46 ΔC*= -87.76	+0.30 ΔH*= 10.03

For captions, see Table 18.

Table 21. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *C. tagal* depending on temperature.

Ceriops tagal	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution 30°C	+52.15	+50.32	+88.68	+102.31	+60.34
105°C	+55.32 ΔL*= 3.18 ΔE= +6.57	+48.51 Δa*= -1.82	+94.14 Δb*= +5.46	+105.91 ΔC*=+3.93	+62.77 ΔH*= +2.46
155°C	+51.28 ΔL*= -0.85 ΔE= +1.69	+51.13 Δa*= +0.80	+87.46 Δb*= -1.22	+101.31 ΔC*=-0.66	+59.71 ΔH*= -0.59
205°C	+7.52 ΔL*= -44.62 ΔE= +89.56	+33.54 Δa*= -16.79	+12.86 Δb*= -75.82	+35.92 ΔC*=-66.05	+20.99 ΔH*= -39.31
305°C	+93.49 ΔL*= +41.35 ΔE= +97.49	+1.61 Δa*= -48.72	+15.05 Δb*= -73.63	+15.14 ΔC*=-86.83	+83.93 ΔH*= +23.62

For captions, see Table 18.

Table 22. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the crude pigment extract from *R. mucronata* depending on temperature.

Rhizophora mucronata	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution 30°C	+52.65	+50.32	+89.89	+102.31	+60.34
105°C	+41.01 ΔL*= -11.64 ΔE= +23.67	+56.42 Δa*=+6.24	+70.25 Δb*= -19.64	+90.11 ΔC*=-12.84	+51.25 ΔH*= -9.6
155°C	+36.98 ΔL*= -15.67 ΔE= +31.45	+56.40 Δa*= +6.22	+63.34 Δb*= -26.55	+84.81 ΔC*=-18.14	+48.33 ΔH*= -12.52
205°C	+1.15 ΔL*=-51.50 ΔE= +110.63	+7.21 Δa*= -42.97	+1.91 Δb*= -87.98	+7.46 ΔC*=-95.49	+14.84 ΔH*= -46.01
305°C	+100.13 ΔL*= +47.47 ΔE= +113.22	-0.22 Δa*= -50.4	+0.30 Δb*= -89.59	+0.38 ΔC*=-102.58	-54.24 ΔH*= -115.1

For captions, see Table 18.

Table 23. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the madder extract depending on temperature.

Madder extracts	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution 30°C	+39.78	+53.79	+68.15	+86.82	+51.71
105°C	+27.44 ΔL*= -14.34 ΔE= +28.64	+50.71 Δa*= -3.08	+43.55 Δb*= -24.6	+66.84 ΔC*=-19.97	+37.40 ΔC*=-14.30
155°C	+3.27 ΔL*= -36.51 ΔE= +80.40	+18.93 Δa*= -34.86	+5.56 Δb*= -62.59	+19.72 ΔC*=-67.09	+16.36 ΔH*= -35.34
205°C	+19.06 ΔL*= -20.72 ΔE= +42.57	+42.69 Δa*= -11.1	+32.65 Δb*= -35.5	+53.74 ΔC*=-33.07	+37.40 ΔH*= -14.30
305°C	+50.74 ΔL*= +10.96 ΔE= +40.50	+24.48 Δa*= -29.31	+42.43 Δb*= -25.72	+48.98 ΔC*=-37.83	+60.01 ΔH*=+8.30

For captions, see Table 18.

Table 24. Total color variation (ΔE) and L*a*C*h* coordinates of the carmine extract depending on temperature.

Carmine	**CIEL*a*b***				
	L*	a*	b*	C*	H*
Original solution 30°C	+33.08	+47.49	+13.32	+49.32	+15.66
105°C	+34.57 ΔL*= +1.49 ΔE= +2.50	+46.60 Δa*= -0.89	+15.13 Δb*= +1.81	+48.99 ΔC*=-0.32	+17.98 ΔH*= +2.31
155°C	+35.35 ΔL*= +2.27 ΔE= +28.05	+39.27 Δa*= -8.22	+40.05 Δb*= +26.73	+56.09 ΔC*=+6.76	+45.56 ΔH*= +29.89
205°C	+93.91 ΔL*= +60.83 ΔE= +77.34	+0.41 Δa*= -47.08	+5.26 Δb*= -8.06	+5.27 ΔC*=-44.04	+85.54 ΔH*= +69.87
305°C	+88.70 ΔL*= +55.62 ΔE= 72.62	+1.46 Δa*= -46.03	+5.42 Δb*= -7.9	+5.61 ΔC*=-43.70	+74.92 ΔH*= +59.25

For captions, see Table 18.

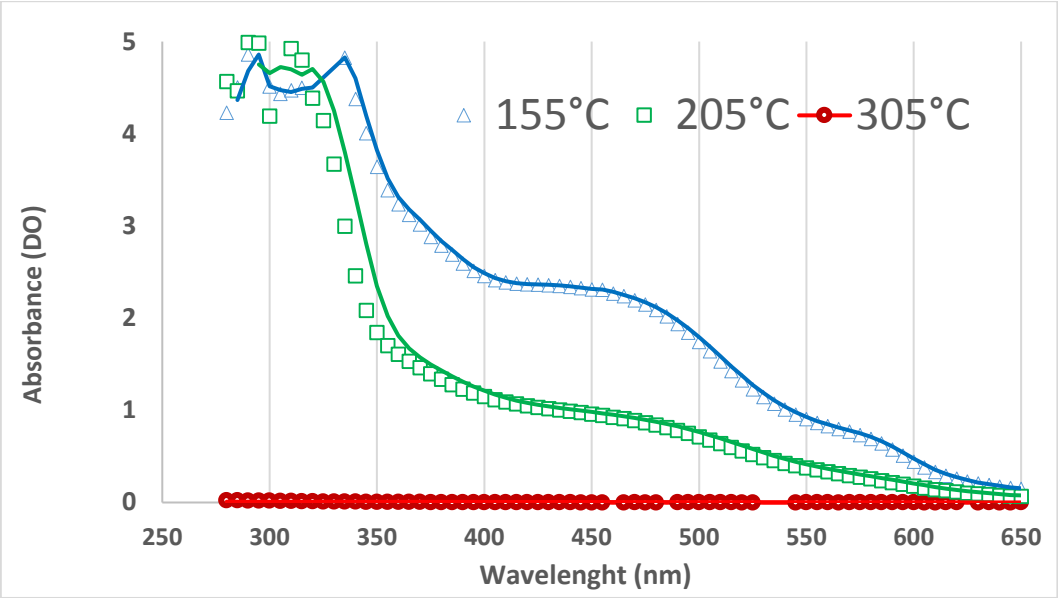


Figure 34. Overlay of UV-visible spectra from 280-650 nm of *W. fruticosa* crude pigment extracts according to the temperature at 155, 205 and 305 °C (dissolved in 70% aqueous ethanolic solution).

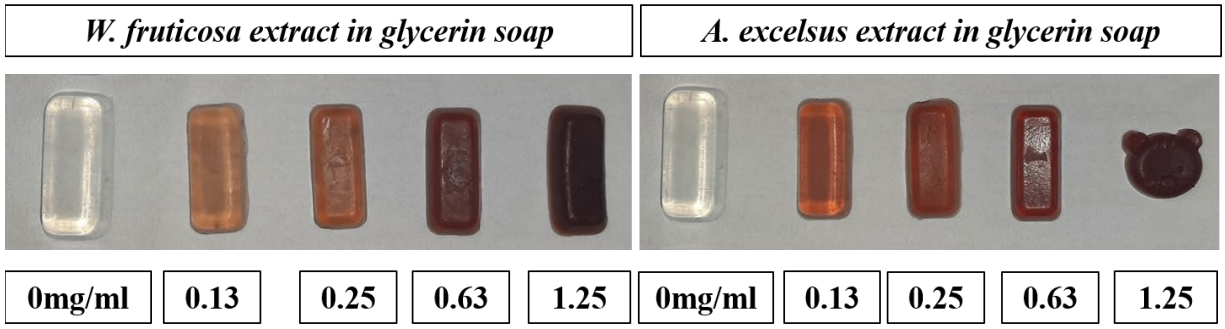


Figure 35. Glycerin soaps colored with crude pigment extracts of *W. fruticosa* and *A. excelsus*

Conclusions partielles sur le chapitre III

Malgré les expertises et savoir-faire traditionnels qui se sont transmis à travers les générations, l'utilisation des plantes tinctoriales issues de la biodiversité malgache reste mimisée par l'absence ou l'insuffisance de données scientifiques par rapport à leurs compositions chimiques, les propriétés physicochimiques des pigments, les procédés efficaces d'extraction, etc. Pour lever certains de ces verrous, cinq plantes tinctoriales de Madagascar dont une espèce endémique, *Acridocapus excelsus*, et quatre espèces indigènes, *Ceriops tagal, Rhizophora mucronata, Woodfordia fruticosa* et *Xylocarpus granatum* ont été caractérisées du point de vu chimique et physicochimique dans cette partie de la thèse.

Par une approche phyto-chimique, en utilisant un mélange d'eau et d'éthanol comme solvant d'extraction (solvants non nocifs), notre étude a permis l'extraction des colorants par un procédé alternatif éco-responsable et la caractérisation physico-chimique et technologique des extraits obtenus. La technique alternative d'extraction mise en œuvre, l'extraction par solvant sous pression, a démontré une meilleure performance pour l'extraction des pigments végétaux, en comparaison avec le procédé traditionnel utilisé jusqu'alors par les artisans malgaches (décoction à chaud). L'extraction sous pression par ASE, plus écologique car utilisant moins de solvants et nécessitant une durée plus courte d'extraction, a montré des rendements d'extraction qui sont de 60 à 90 % supérieurs aux rendements obtenus par simple décoction pour les plantes suivantes : *A. excelsus*, *W. fruticosa* et *X. granatum*. Les résultats exceptionnels en termes de pouvoir colorant, de stabilité (au pH, et à la température) et de propriétés antioxydantes des pigments extraits de ces espèces, soulignent leurs potentialités à des fins d'usage comme colorants naturels bioactifs. L'analyse par spectrocolorimétrie quantitative a également révélé une forte variabilité en termes de teinte colorée obtenue en fonction de la concentration des extraits en solution (passant du beige/ jaune au rouge foncé). Ces extraits sont stables à haute température jusqu'à 155 °C (stabilité comparable à celle de l'extrait de carmin de cochenille), voire plus pour certains extraits comme l'*A. excelsus*, le *W. fruticosa* et le *X. granatum* (> 205 °C). De plus, les tests de stabilité ont montré que les extraits présentent une bonne stabilité à la fois en milieu acide et en milieu alcalin. Seul des pH fortement alcalins (pH > 11) induisent une variation importante de la couleur de l'extrait (brunissement). Ainsi, en comparaison avec les extraits de garance et de carmin de cochenille, deux sources de colorants rouges très utilisées dans les industries textile et agroalimentaire, les extraits pigmentés caractérisés dans ce chapitre présentent de meilleures stabilités au pH et à la température. En termes de composition chimique, pour ce qui concerne les principales familles de pigments identifiées, la majorité des extraits étudiés sont riches en polyphénols, et plus particulièrement en tannins, en flavonoïdes et en anthocyanes. Par ailleurs, le pouvoir antioxydant déterminé par deux méthodes

distinctes mais complémentaires, utilisant le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le test de réduction du fer (FRAP), ont démontré que ces extraits pigmentés ont une meilleure activité antioxydante que l'acide ascorbique et le butyl-hydroxyanisol, qui sont les deux antioxydants le plus utilisés actuellement en industrie.

Les résultats obtenus démontrent tout l'intérêt que présentent ces plantes tinctoriales en tant que nouvelles sources naturelles de colorants. Afin d'étendre leurs applications à d'autres domaines (tels que la cosmétique, la nutraceutique ou la pharmacologie), les propriétés toxicologiques (en lien avec la santé humaine et l'impact sur l'environnement), ainsi que les propriétés biologiques de ces extraits doivent être davantages étudiée. En définitive, ces plantes tinctoriales qui sont répandues dans leurs zones de développement respectives peuvent représenter les solutions alternatives naturelles recherchées, mais des mesures d'accompagnement devront être prises en compte pour une éventuelle exploitation durable de cette biodiversité.

Chapitre IV :

Activités biologiques et propriétés toxicologiques de quelques plantes tinctoriales de Madagascar.

Présentation générale du chapitre :

L'industrie des colorants artificiels est probablement l'une des plus polluantes de la planète, en raison entre autres du déversement dans l'environnement des eaux usées polluées par les résidus chimiques. D'ailleurs, les produits dérivés issus de ce domaine ont connu de nombreuses controverses du fait de leur toxicité provoquant par exemple des réactions allergiques, toxiques, voire cancérigènes. Dans de nombreuses industries telles l'agroalimentaire, la cosmétique ou le textile, les colorants restent indispensables dans les produits car la couleur est un critère de choix et de qualité envers les clients d'où l'importance de leur utilisation. L'opportunité de trouver des homologues naturels, à l'exemple des pigments issus des plantes tinctoriales dont la biodiversité malgache est particulièrement riche, arrive donc au premier plan en tant que source prometteuse de nouveaux colorants respectueux de l'environnement et de la santé humaine. Toutefois, tous les produits naturels ne sont pas forcément inoffensifs. L'effet toxique d'un produit dépend fortement de la dose utilisée, d'où la nécessité d'étudier leurs propriétés toxicologiques.

Dans ce sens, une caractérisation des propriétés toxicologiques et biologiques des extraits de pigments a été conduite et les résultats sont présentés dans le présent chapitre pour les huit plantes étudiées dans ce manuscrit dont les écorces de *Acridocarpus excelsus*, *Ceriops tagal*, *Harungana madagascariensis*, *Rhizophora mucronata*, *Xylocarpus granatum*, les feuilles de *Tectona grandis* et les racines adventives de *Woodfordia fruticosa*.

La toxicité aigüe des extraits a été étudiée à l'aide de deux modèles animaux. Dans un premier temps, il s'agira de faire ingérer différentes concentrations d'extrait brut par voie orale à des souris de type « souris albinos ». Ensuite, un deuxième test de toxicité a été réalisé sur des embryons de poissons de type « zebrafish » pendant 96 heures post-fertilisations. Enfin, un criblage des activités antimicrobiennes de ces sept extraits a été effectué sur les principaux pathogènes microbiens rencontrés dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmacologiques. Ce criblage permet d'ouvrir de nouvelles perspectives quant à l'utilisation future de ces sources naturelles de pigments.

Cette partie fait l'objet d'un article rédigé en anglais intitulé *Antimicrobial activities and toxicological effects of natural pigments derived from plant species of Madagascar* à soumettre prochainement dans le journal International Journal of Toxicology.

Antimicrobial activities and toxicological effects of natural pigments derived from plant species of Madagascar.

Mahery Andriamanantena[1], Pascal Danthu[2], Fanjaniaina Fawbush Razafimbelo[3], Béatrice Raonizafinimanana[3], Zoarilala Razafindrakoto[4], Thierry Regnier[5], Belinda du Plessis[5], Thomas Petit[1,6], Yanis Caro[1,6*]

[1]*Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels, CHEMBIOPRO, EA 2212, 15 Avenue René Cassin, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France ;*

[6] *IUT de la Réunion, Département HSE, 40 avenue de Soweto Terre-Sainte, BP 373 - 97455 Saint-Pierre Cedex, La Réunion, France ;*

[2]*HortSys, Université de Montpellier, CIRAD, France ;*

[3]*Département Industries Agricoles et Alimentaires (IAA-ESSA), Université d'Antananarivo, Madagascar ;*

[4] *Institut Malgache de Recherche Appliquée, (IMRA-Fondation Ratsimamanga), Antananarivo, Madagascar.*

[5] *Tshwane University of Technology (TUT), PO Box 56208, Arcadia, Pretoria, 0001, South Africa.*

** Corresponding author*

Highlights

- All the extracts are virtually non toxic with an LC 50> 4000 mg/kg of body weight on albino mice.
- Extracts of *H. madagascariensis* and *T. grandis* have the lowest toxicity on zebrafish embryo models.
- Most of the extracts are less toxic comparing to common artificial red and yellow colorants used in the industries.
- These pigments have interesting bacterial growth inhibitory effect on several common pathogens.

Abstract

Malagasy dye plants are readily available raw materials that can be cultivated to produce dyestuffs for the production of natural colorants. These plants species have chemical and color versatility in their dye profile. The potential of using dye plants as natural colorant sources for food and non-food applications is promising considering the ever-rising demand by the consumers to replace their synthetic counterparts. Natural dyes do not necessary mean non-harmful or ecological substances, hence the need of the study of their toxicological effects. Thus, toxicological assays performed on zebrafish embryos and albino mice models demonstrate that the pigments characterized on this study are globally less toxic than the artificial colorants used currently on the market by comparing their lethal concentration (LC_{50}) and their no observed adverse effect level (NOAEL). Furthermore, most of these plants are also used for their biological properties by local population in Madagascar. These traditional uses led us to study their biological activity. A screening of their antimicrobial activity has been conducted on common pathogen bacteria encountered in food industries such as *Streptococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, in cosmetics like *Proprionibacterium acnes*, and in pharmacological industries as the example of *Pseudomonas aeruginosa.*

Keywords: Dye plants, Madagascar, toxicity, zebrafish, albino mice, antimicrobial

4-1 Introduction

Several natural sources of colorants are being put forward to substitute the artificial ones. Plant species are one the most interesting sources of pigments in the world especially in the Indian Ocean islands by its rich biodiversity. Dyes and pigments are used in several fields such as textiles, food, cosmetics, pharmacological, plastics industries, etc and are essential raw materials for the industries. Colors are thought to be the first visible criterion for consumers and influence their behavior and choice [1], having important psychological implications, thereby heavilily influencing design and marketing strategies. Natural colorants have been substituted by artificial ones because of their stability, availability on the market and ease of use. Nevertheless, one century after the first use of artifical colorants such as mauvine (developed by Sir Perkin in 1856), many contentious issues have arisen over the harmful effects of these artificial products on both environmental and human health effects. In this era where climate changes are a big concern, the industries producing dyestuffs materials and those using these products have been denounced as one of the most polluting sectors in the world [2–4]. Large quantities of dye waste are released into the environment, mainly from dispersed dye classes which have mutagenic porperties and contaminate the water [5]. In addition to these environmental concerns, some colorants from artificial sources can have allergenic, toxic or carcinogenic effects on human beings [6–8]. This led to the creation of the REACH program conducted by the European Food Safety Authority

(EFSA) which carried out the reevaluation of 41 food coloring in order to reduce the acceptable daily intake (ADI) for some of them or to withdraw some colorants from the market [9–11].

Due to these environmental and health concerns, natural dyes appear to be a more ecological and less toxic alternative to the artificial dyestuff materials. These natural alternative sources can come from microorganisms [12] plant species [13] and to a lesser extent, from animal sources (e.g of carmine). The rich biodiversity of Madagascar offers a multitude of potential sources of pigments and colorants for the industries which come from dye plants species [14]. Furthermore, dye plants have revealed important medicinal properties and biological activities, for the example *Curcuma longa* (turmeric) [15], *Lawsonia inermis* (henna) [16] and *Rubia tinctorium* (madder) [17]. In addition, Siva *et al.* (2011) have been working on some pigments of natural origin and demonstrated that red pigments have shown the best antibacterial properties, such as *Punica granatum* [16].

With the aim of finding new ecofriendly and harmless sources of colorants, this study focuses on the acute toxicity of colored extracts obtained from seven dye plant species, which are currently used by dyers in the Boeny region of Madagascar and which display interesting coloring properties [14b]. Two animal models are used in this study, namely the albino mice model and the zebrafish embryos model. Moreover, a screening of the antimicrobial activities of the crude extracts was carried out on pathogenic microorganisms encountered in different industries. Hydroalcoholic extracts of the barks of *Acridocarpus excelsus*, *Ceriops tagal*, *Rhizophora mucronata*, *Xylocarpus granatum*, *Harungana madagascariensis*, the adventitious roots o*f Woodfordia fruticosa* and the leaves of *Tectona grandis* have been chosen to be studied in the current work for their interesting coloring properties previously demonstrated [14].

4-2 Materials and methods

4-2-1 Plant materials and extracts

The bark, adventitious roots or leaves of dye plant species were collected in the Boeny region in the west of Madagascar. The sampling methods and the extraction of the plant colorants by accelerated solvent extraction (ASE) with hydroalcoholic solution were conducted as described in a previous work of the authors[5]. The different species, investigated in this study and their sampling data are presented in Table 25.

[5] Chapter III of this study

Table 25. Description of the plant species used in this study

Species (botanical family)	**Collected parts**	**IUCN Status *** (Assessement date)	**Sampling date and location**	**Range of color produced**
A. excelsus (Malphigiaceae)	Bark	LC (2019)	February 2018 *Ampombilava*	Beige, orange, red
C. tagal (Rhizophoraceae)	Bark	LC (2008)	January 2018 *Boanamary*	Orange, red
R. mucronata (Rhizophoraceae)	Bark	LC (2008)	January 2018 *Boanamary*	Orange, red
W. fruticosa (Lythraceae)	Adventitious roots	LC (1997)	January 2018 *Boanamary*	Beige, orange, red
X. granatum (Meliaceae)	Bark	LC (2008)	January 2018 *Boanamary*	Beige, orange, red
T. grandis (Verbenaceae)	Leaves	n/a	January 2018 *Boanamary*	Red, dark red
H. madagascariensis (Hypericaceae)	Bark	LC (2018)	February 2018 *Ampombilava*	Yellow

* www.iucnredlist.org, LC or Least concern means that the species are evaluated as not being a focus of species conservation.

4-2-2 Chemicals and reagents

Other chemicals, like 3,4 dichloroaniline, HCl, NaOH, buffers, DMSO, KCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $NaHCO_3$, were purchased at the highest purity available from Sigma Aldrich and Merck (Darmstadt, Germany).

4-2-3 Albino mice

The albino mice spawners (*Mus musculus*) OF 1 used in this study were obtained from the Pasteur Institute of Madagascar then bred and kept at the Malagasy Institute of Applied Research - Antananarivo - Madagascar (IMRA-Ratsimamanga Foundation) following all the conditions required for the breeding described in the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD guide No 423). The mice which were used for the experiments had an average weight of 35 grams (Figure 37).

4-2-4 Zebrafish embryos

The embryos were obtained by breeding *Danio rerio* zebrafish in the laboratory of Biotechnology and Food technology of the Tshwane University of Technology (TUT) - Pretoria - South Africa (Figure 37). The husbandry and reproduction conditions were in accordance with the optimal conditions required by the OECD guide No 236 on fish embryo acute toxicity in aqueous phase of chemicals.

The project was approved by Tshwane University of Technology Animal Research Ethics Committee°AREC2019/03/005. The TUT Research Ethics Committee is registered with the South African National Health Research Ethics Council (REC-160509-21) and has the status of an Institutional Review Board (IRB 00005968) with the US Office for Human Research Protections (IORG# 0004997) [18].

Figure 37. Animal models (left: albino mice, right: « zebrafish » adult)

4-2-5 Microorganisms

The extracts of dye plants were tested on a selection of pathogenic bacteria encountered in food industries including *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhi* (ATCC 14028), *Bacillus cereus* (ATCC 80876) and *Escherichia coli* (ATCC 8739), in pharmacology with *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and finally in cosmetic fields with *Propionibacterium acnes*. The bacterial strains were stored frozen at -80° in the biotechnology laboratory of the Tshwane University of Technology.

4-2-6 Acute toxicity tests

4-2-6-1 Albino mice model (OF 1)

The acute toxicity tests on the *albino mice* model were carried out according to the OECD guide No 426 [19]. It was already used by several authors for the analysis of the toxicity of several plant extracts [20,21]. The test consists in administering orally different doses of the product dissolved in an aqueous solution in order to determine the mortality rate and the lethal dose 50 of each group of mice. Female albino mice weighing 30 to 35 grams were divided into eight groups of 5 mice per cage (seven groups for each species and one groupe as negative control). The mice were fasted 24 hours before the oral administration of the product. The pigment extracts were dissolved in distilled water using magnetic

stirrer and ultrasonic bath in order to obtain three different concentrations: 1000, 2000 and 4000 mg/kg of body weight. Each aqueous extract was shaken vigorously before being administered orally in a single dose because some of the extracts are not completely soluble in aqueous solution.

After administration, regular monitoring was made after 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h and every 24 hours during 7 days. Any differences in behavior comparing to the control group were noted and only the death of an individual was taken into consideration for the calculation of the lethal dose LC_{50}. Replicates were conducted independently each week during three successive weeks.

4-2-6-2 Fish embryos test

To complete the *albino mice* test, another toxicity test was carried out using zebrafish embryos based on the method described in the OECD guide No 236 [22]. This method was completed by the work of Abe *et al.* (2018) [23] on acute toxicity of colorants found in wastewater from industrial effluents and the studies of some azo dyes toxicity conducted by Jiang *et al.* (2020) [24]. The assay consists in exposing the newly fertilized eggs to different concentrations of plant extract for a period of 96 hours post-fertilization (hpf). Every 24 hours post-fertilization (24hpf, 48hpf, 72hpf and 96hpf), observation of the embryos is made using an Olympus IX71 inverted microscope coupled with an Olympus S30 camera. At the end of the exposure period, acute toxicity is determined by calculating the lethal dose 50 (LC_{50}) according to the number of deaths.

The pigment extracts were diluted in a reconstituted solution containing 1.75% DMSO. This concentration of DMSO was proved to had no influence on the development of embryos [25]. Reconstitute solution is an oxygenated mix of water, KCl, $CaCl_2 2H_2O$, $MgSO_4 7H_2O$ and $NaHCO_3$ in order to create a perfect environment for the optimum development of the embryos.

Two different phases were conducted with a preparation of respectively 20 mg/mL and 8 mg/mL stock solutions. Into a 24 wells microtiterplate, 125 µL of each solution was added to 875 µl of the reconstituted solution for each well in order to obtain a final concentration of 2500 µg/mL respectively for the first phase and 1000 µg/mL for the second phase. Successive dilutions were made to obtain different concentrations of 1250, 625, 313 µg / mL and 500 and 250, 125, 63, 31 and 16 µg/mL.

Three different controls including two negative controls and one positive control were setted up as described in the OECD protocol. The solution used for the first negative control is composed by only the reconstituted solution. The second negative control is a solvent control composed by the reconstituted water and 1.75% of DMSO. Finally, solution of 3,4-dichloroaniline at 4 mg/L was used as positive control. The LC_{50} and the no-observable adverse effect level (NOAEL) were calculated from the linear regression curve of mortality depending on concentration. Two replicates were performed.

4-2-7 Screening for the antimicrobial activity

A screening of the antimicrobial activities was conducted using the diffusion method based on a filter paper disc impregnated with different concentrations of the plant extracts according to the method described by Siva *et al.* (2011) [26]. Nutritive agar was heat sterilised at 120 ° C for 15 minutes. Petri dishes were filled with the agar solution in order to have the same thickness to constitute a nutritive medium on which the microorganisms can grow. The nutritive agar was composed of 1.0 g/L of meat extract, 5.0 g/L of peptone, 2.0 g/L of yeast extract, 8.0 g/L of sodium chloride and 15.0 g/L of agar. Then, lyophilized microorganisms were reactivated in nutritive broth composed of 10.0 g/L of casein peptone, 5.0 g/L of yeast extract and 10.0 g/L of sodium chloride. Pigment extracts were dissolved in distilled water containing 2.5% DMSO in order to have two different concentrations of 5 mg/mL and 10 mg/mL. Then, for each concentration and each plant species, respectively 10 µL of colored solutions were placed on 5 mm paper discs and dried in an oven at low temperature. The dried discs were respectively deposited on the discs for each Petri dish. A third disc impregnated with 2.5% DMSO was used as a negative control while a fourth disc containing ampicillium was used as positive control. The plates were then incubated at 35 °C overnight and the Inhibition Zone (IZ) were observed.

4-3 Results and discussions

4-3-1 Acute oral toxicity on albino mice

Three different concentrations of crude colored extracts obtained from the plant species investigated in this study were administered orally for acute toxicity tests on albino mice. According to daily monitoring conducted during 5 days, the number of dead mice was noted. No abnormality in the behavior of the mice was observed with the concentrations of 1000 and 2000 mg/kg of body weight. The number of dead mice observed with the highest administered concentration of 4000 mg/kg of body weight, was listed in the following table (Table 26).

Table 26. Daily mortality of albino mice
(oral administration of the extracts, the mortality rate listed in this table is the mean of three replicates obtained with the highest concentration administered: 4000 mg/kg of body weight, average weight of mouse = 35 grams)

Extracts/Day	J1	J2	J3	J4	J5
A. excelsus	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
C. tagal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
H madagascariensis	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
R. mucronata	**2/5**	0/3	0/3	0/3	0/3
X. granatum	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
W. fruticosa	**1/5**	0/4	0/4	0/4	0/4
T grandis	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

The results presented in table 26 indicated that none of the mice was killed by the extracts even after 5 days feeding with high doses up to 4000mg/kg. Lethal concentration LC_{50} of more than 4000 mg/kg of body weight means that the extracts are considered to be virtually non-toxic by oral ingestion [27]. Similar results were obtained by Athinarayanana *et al.* (2017) [20] in bark extracts of *Caesalpinia sappan* which is a plant widely used in India as a source of natural dyes or by Kifayatullah *et al.* (2015) [21] on the acute toxicity test of several medicinal plants. In the present study, drowsinesses have been observed in mice which have received the maximum doses of *R. mucronata and W. fruticosa* few minutes after the administration of the extracts and cases of death have been observed the first day. After 5 days of observation, the remaining mice become healthier and return to their normal self. The mice have different responses to the extracts of *R. mucronata* and *W. fruticosa*. It means that these extracts contain a considerable content of toxic substances on mice but are eliminated rather quickly by their organism after a maximum of one day. However, there is a big difference between pure products and crude extracts. For information, the doses without observable effect of the dyes currently used and defined by the European Food Safety Authority (EFSA) are in the range of 1500 mg/kg of body weight for human beings on pure pigments [9,10].

Consequently, more subchronic and chronic toxicity assays made on the same crude extracts or pure pigments should be implemented to support these results obtained with acute toxicity tests. These other toxicity tests will confirm the real toxicity of these extracts for the human body at these different concentrations.

4-3-2 Acute toxicity on zebrafish embryos

In 24-wells microplates, the fertilized embryos of zebrafish were immersed in solutions composed of extract of dye plants and reconstituted solution in order to obtain a serial dilution of the extracts corresponding to concentrations of 2500, 1250, 625, 313 µg/mL for the first serial dilution and

500, 250, 125, 63, 31 and 16 µg/mL for the second dilution. Observations were carried out under the microscope after 24, 48, 72 and 96 hours post-fertilization (hpf) by comparing the development of the embryos with the negative controls (Figure 38). Mortality rate and LC_{50} were calculated based on dead embryos observed after 96 hpf. In addition, the NOAEL was deducted according to the number of embryos without abnormalities during the whole duration of the experiment. The main lethality indicators were (i) coagulation of fertilized eggs, (ii) absence of somite formation, (iii) absence of detachment of the caudal bud from the yolk sac, and (iv) absence of cardiac beat. Any sign that differs from normal development was considered as abnormality.

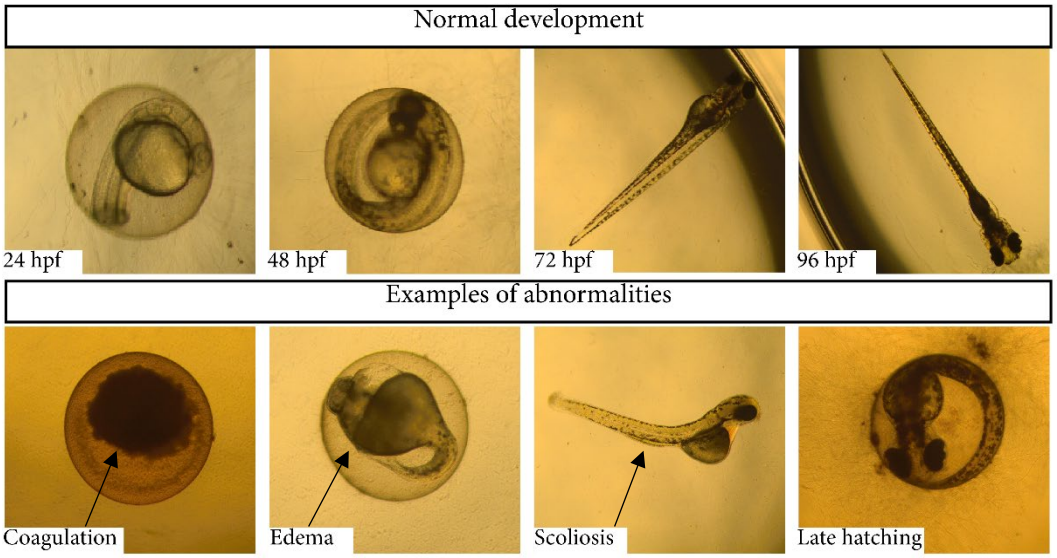


Figure 38. Development of zebrafish embryos during 96 hours post-fertilizations (hpf)

We therefore tested the development of the eggs when incubated in presence of the seven plant extracts. The fertilized eggs subjected to higher concentrations (more than 500 µg/ml) coagulated and died during the first 24 hours post-fertilization. With a concentration of 313 µg/ml, embryos development started to be observed and survived up to 48 hpf as the example of those treated with extracts of *A. excelsus* and *H. madagascariensis*. However, the mortality rate still reached 100% at the end of the 96 hpf of observation with this concentration.

With lower concentrations from 250 µg/mL, the means of the mortality rates from two replicates are presented in table 27. For all the extracts derived from these seven dye plant species, the mortality rate reached 100% at 250 µg / mL and stay to 0% at 16 µg / mL. Extracts of *Tectona grandis* appear to be the the less toxic extracts because the first death is only observed at 63 µg/mL. For the other extracts, the mortality rate gradually decreases with the concentration.

Table 27. Mortality rate of zebrafish embryos during the 96 hpf follow-up
(* 24: 1/10 means that after 24 hours post-fertilization (hpf), 1 case of mortality has been recorded among 10 individuals, the value is the mean of two replicates)

Controls		**Negative**	**Solvent**	**Positive**	
		24 : 1/10 48 : 1/10 72 : 1/10 96 : 1/10	24 : 1/10 48 : 1/10 72 : 1/10 96 : 1/10	24 : 2/10 48 : 3/10 72 : 8/10 96 : 8/10	
Extracts/ Concentration (µg/ml)	**C = 250**	**C = 125**	**C = 63**	**C = 31**	**C= 16**
A. excelsus	24 : 4/10 48 : 7/10 72 : 10/10 96 : 10/10	24 : 4/10 48 : 5/10 72 : 6/10 96 : 6/10	24 : 3/10 48 : 3/10 72 : 3/10 96 : 3/10	24 : 2/10 48 : 2/10 72 : 2/10 96 : 2/10	24 : 0/10 48 : 0/10 72 : 0/10 96 : 0/10
C. tagal	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a	24 : 2/10 48 : 3/10 72 : 3/10 96 : 3/10	24 : 1/10 48 : 1/10 72 : 1/10 96 : 1/10	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a
H madagascariensis	24 : 7/10 48 : 8/10 72 : 10/10 96 : 10/10	24 : 3/10 48 : 3/10 72 : 3/10 96 : 4/10	24 : 2/10 48 : 2/10 72 : 2/10 96 : 2/10	24 : 1/10 48 : 1/10 72 : 1/10 96 : 1/10	24 : 0/10 48 : 0/10 72 : 0/10 96 : 0/10
R. mucronata	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a	24 : 2/10 48 : 2/10 72 : 6/10 96 : 6/10	24 : 2/10 48 : 2/10 72 : 4/10 96 : 4/10	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a
X. granatum	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a	24 : 3/10 48 : 3/10 72 : 3/10 96 : 3/10	24 : 2/10 48 : 3/10 72 : 3/10 96 : 3/10	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a
W. fruticosa	24 : 7/10 48 : 10/10 72 : 10/10 96 : 10/10	24 : 5/10 48 : 5/10 72 : 8/10 96 : 8/10	24 : 4/10 48 : 4/10 72 : 4/10 96 : 4/10	24 : 2/10 48 : 2/10 72 : 2/10 96 : 2/10	24 : 0/10 48 : 0/10 72 : 0/10 96 : 0/10
T grandis	24 : n/a 48 : n/a 72 : n/a 96 : n/a	24 : 2/10 48 : 3/10 72 : 3/10 96 : 3/10	24 : 2/10 48 : 2/10 72 : 2/10 96 : 2/10	24 : 0/10 48 : 0/10 72 : 0/10 96 : 0/10	24 : 0/10 48 : 0/10 72 : 0/10 96 : 0/10

*negative control 1: reconstituted solution
*negative control 2: reconstituted solution containing 1.75% of DMSO
*positive control: 4 mg/l solution of 3,4-dichloroaniline
*n/a means that the experiments were not conducted

Lethal concentration LC_{50} of each extract are calculated from the regression curve obtained from the mortality rate for each concentration. The LC_{50} values obtained in table 28. The data showed that extracts of *Tectona grandis* and *Harungana madagascariensis* have the highest LC_{50} with respectively > 125 µg/ml and 144.32 µg/ml. It means that they have the lowest toxicity profile among the plant extracts investigated on this study. *R. mucronata* is the most toxic with the lowest LC_{50} of 47 µg / ml.

The No Observable Adverse Effect Level (NOAEL) observed from these assays showed a concentration of more than 31 µg / ml for *C. tagal*, *H. madagascariensis*, *T. grandis* and more than 16 µg / ml for *A. excelsus* and *W. fruticosa*.

Table 28. Lethal dose 50 (LC_{50}) and dose without observable harmful effect (NOAEL) (calculated from zebrafish toxicity model)

Extracts	LC_{50} (µg/ml)	NOAEL (µg/ml)	Colorants	LC 50 (µg/ml)	References
A. excelsus	99.26	> 16	**Hc Orange n°1**	**4.04**	[29]
C. tagal	> 63	> 31	**Basic violet 14**	**60.63**	[30]
H madagascariensis	**144.32**	> 31	**Erythrostominone**	26.68	[23]
R. mucronata	**47**	n/a	**Basic red 51**	7.5	[2]
X. granatum	95	n/a	**Tartrazine**	15.7	[28]
W. fruticosa	78.75	> 16	**Sunset yellow**	17.61	[24]
T grandis	**> 125**	> 31	**Amaranthe**	24.10	[24]

Most of the toxicity studies available on zebrafish model were conducted on extracts or products with pharmaceutical and pharmacological properties or toxic molecules. Nevertheless, recent studies carried out by Joshi *et al.* (2018) and Jiang *et al.* (2020) have been performed on azo dyes [22, 28]. Other studies on the subject are generally related to the environmental toxicity caused by the effluent of wastewater from the industries. The toxicity assay of crude colored extracts from dye plants extracts using the zebrafish embryos model presented here showed promising results. Actually, the lethal concentration LC_{50} of colorants found in the litterature on pure artificial colorants are generally below 60 µg/ml or even much lower (see Table 28). The work of Abe *et al* (2017) and Shen *et al* (2015) on the discharge of wastewater from the dye industries has demonstrated LC_{50} values of 4.04 µg/mL and 7.5 µg/ml respectively for HC Orange n° 1 and basic red 51. Fish acute toxicity assays made on some azo dyes showed similar results. Tartrazine has a relatively low LC_{50} of 15.7 µg/mL [28] as well as amaranth with 24.10 µg/mL [24]. Comparing to the LC_{50} of artificial colorants currently used in the industries, the crude extracts of dye plants characterized in the present study showed much higher LC_{50} for most of the pigments extracts. Any changes made from this study such as other extraction methods, other choice of solvents or use of pure pigments isolated from these crude extracts can lead to a signifaicant change of the LC_{50}.

The results obtained with these two assays, mice albino model and zebrafish embryo model, gave us important informations about the toxicity of these pigments derived from seven dye plant species. Oral administration of the pigments extracts on mice model showed that most of the pigment extracts don't have apparent toxicity on mammal. The zebrafish embryo assays confirm this statement especially for

the extracts of *T. grandis*, *H. madagascariensis* and *A. excelsus* that have the best LC_{50} which are much higher than those described in the literature. It can be deducted that pigment extracts from dye plant species are less toxic and more ecological for the environment and for human being comparing to the artificial colorants currently used in the industries. Only *R. mucronata* and *W. fruticosa* display signs of toxicity on mice at the maximum concentration used on this study. At the same time *R. mucronata* and *W. fruticosa* have also shown the lowest LC_{50} with the tests conducted on zebrafish embryos. It can be concluded that the bark extracts and roots extracts of these species are potentially toxic to the organism by ingestion.

4-3-3 Antimicrobial activities

A screening of the antimicrobial activities of crude extracts of dye plants was carried out on the main pathogenic microorganisms in the fields of the food industry, cosmetics and pharmacology. The filter paper disc diffusion test on a petri dish made it possible to assess the zones of inhibition in three categories: good antimicrobial activity, moderate antimicrobial activity and no antimicrobial activity (Table 29). Actually 5 mm disc have been impregnated with respectively 10 µl of two different stock solutions of crude extracts dissolved in water and ethanol in order to have respectively 50 and 100 µg of extract on each disc. Disc impregnated with water has been used as negative control and ampicilline has been used for positive control.

Table 29. Screening of antimicrobial activities of dye plant extracts

Plants/Bacteria	*P. acnes*	*S. typhi*	*S. aureus*	*E. coli*	*B. cereus*	*E. aerogenes*	*P. aeroginosa*
A. excelsus	++	+	++	+	++	±	++
C. tagal	±	+	++	±	+	±	+
H. madagascariensis	+	+	++	+	++	-	±
R. mucronata	±	+	++	±	+	-	-
X. granatum	±	+	++	±	+	-	-
W. fruticosa	-	±	+	±	+	±	++
T. grandis	±	-	+	+	++	+	+

++: good antimicrobial activity, +: moderate activity, ±: the inhibition zone is affected by the color diffusion of the extracts, moderate activity or no activity, -: no antimicrobial activity

A. excelsus displays the most interesting antimicrobial activity with important bacterial growth inhibitory effect on *P. acnes,* a pathogenic bacterium frequently encountered in cosmetics, *S. aureus, B. cereus* and *P aeruginosa. H.* madagascariensis and *T. grandis* have also interesting antimicrobial activity against *S. aureus* and *B. cereus*. Growth of *S. aureus* was sensitive to all the extracts including *C. tagal*, *R. mucronata*, and *X. granatum.* Acitvity on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* are important for food industries because there are two of the most common pathogens encounterd on this industry. Only *W. fruticosa* doesn't have antimicrobial activity against *S. aureus* but has important inhibition

action on *P. aeruginosa* which is a common pathogen of cosmectics industry. Such antimicrobial activities have been previously observed by different authors on leaves of *Tectona grandis* as well as the barks of *Xylocarpus granatum* or *Harungana madagascariensis*, and species from the Rhizophoraceae family [31–33]. On the other hand, unfortunately, no extract demonstrated significant antimicrobial activity against *E. coli* and *E. aerogenes*.

An intense red color is obtained with *Acridocarpus excelsus* from a concentration of 8 mg/ml in solution and a bright yellow color is obtained from *Harungana madagascariensis* from a concentration of 4 mg/ml. At these low concentrations, extracts from *H madagascarensis* and *A excelsus* have demonstrated high antimicrobial. In such cases, pigment extracts derived from dye plant species can be used both for their coloring and antimicrobial properties. These extracts are intersting especially for their coloring properties. Consequently, higher concentrations will be used to obtain the desired color and will foster their antimicrobial activity.

4-4 Conclusions

The present study provided the first toxicological data on pigment extracts derived from several dye plant species used in the Boeny region of Madagascar. The highest concentration of 4000 mg/kg of body weight administered orally to albino mice revealed no mortality for five of the seven plants characterized in this study. For the remaining extracts namely *R. mucronata* and *W. fruticosa*, we found that the extracts displayed signs of toxicity. These results were corroborated by the results obtained with zebrafish model that showed the lowest LC_{50} for these two plants. On the other hand, extracts of *T. grandis*, *H. madagascariensis* and *A. excelsus* appear to be the less toxic extracts as demonstrated by the two methods. In addition, acute toxicity tests conducted on the zebrafish model have shown that these natural extracts have a lower toxicity or higher lethal dose LC_{50} on fish embryos compared to many artificial and natural colors currently used on the industries. Furthermore, the antimicrobial properties demonstrated against several pathogenic bacteria open up new fields of application beyond their uses in natural dyeing. In terms of toxicity and antimicrobial activity, *A. excelsus* is interesting source of red for cosmetics by their action on *P. acnes*, and pharmacological industry by their effect on *P. aeruginosa*. *H. madagascariensis* is promising as a source of yellow colorants in food industries and extracts of *T. grandis* is an interesting source of red for its low toxicity even if they don't have great antimicrobial activities. However, only acute toxicity assay is not sufficient to determine exactly the harmlessness of a product for human being. Further subchronic and chronic toxicity tests should be implemented. Moreover, for another fields of application such as cosmetics, toxicity tests have to be carried out according to the part of the human body which will be in contact with the product. These natural sources of colorants from Malagasy biodiversity have demonstrated promising potential that should be further exploited.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Terre-Là (Majunga, Madagascar) and to the FEEM association (Boanamary and Ampombilava) for their expertise. This work was supported financially by grants from the Réunion Regional Council, Reunion Island (France) (Grant number: DIRED / 20161450) and funding from Erasmus MIC project AC107 2018, réf 2018-1-FR01-KA107-047557 between the University of La Réunion (La Réunion-France) and Tshwane university of Technology (Pretoria-South Africa).

References

[1] Causse J-G. L'étonnant pouvoir des couleurs. Edition J'ai lu. 2016, 224p.
[2] Abe FR, Soares AMVM, Oliveira DP de, Gravato C. Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. Environmental Pollution 2018 ; 235 :255–62.
[3] de Oliveira GAR, de Lapuente J, Teixidó E, Porredón C, Borràs M, de Oliveira DP. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages: Developmental toxicity of textile dyes to zebrafish. Environmental Toxicology and Chemistry 2016; 35:429–34.
[4] Zhang W, Liu W, Zhang J, Zhao H, Zhang Y, Quan X., Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. Journal of Environmental Sciences 2012; 24:2019–27.
[5] Chequer FMD, Lizier TM, de Felício R, Zanoni MVB, Debonsi HM, Lopes NP., The azo dye Disperse Red 13 and its oxidation and reduction products showed mutagenic potential. Toxicology in Vitro 2015; 29:1906–15.
[6] Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2015 ;73 :914–22.
[7] Gallen C, Pla J. Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. Revue Française d'Allergologie 2013 ; 53 :9–18.
[8] Senthilkumar RP, Bhuvaneshwari V, Sathiyavimal S, Amsaveni R, Kalaiselvi M, Malayaman V. Natural Colours from Dyeing Plants for Textiles. International Journal of Biosciences and Nanosciences 2015; 2:160–74.
[9] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Reconsideration of the temporary ADI and refined exposure assessment for Sunset Yellow FCF (E 110): Reconsideration of the temporary ADI and refined exposure assessment for Sunset Yellow FCF (E 110). EFSA Journal 2014; 12:3765.
[10] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of Patent Blue V (E 131) as a food additive: Re-evaluation of Patent Blue V (E 131) as a food additive. EFSA Journal 2013; 11:2818.
[11] European Food Safety Authority. Refined exposure assessment for Allura Red AC (E 129). EFSA Journal 2015 ;13.
[12] Caro Y, Venkatachalam M, Lebeau J, Fouillaud M, Dufossé L. Pigments and Colorants from Filamentous Fungi. In: Merillon J-M, Ramawat KG, Editor Fungal Metabolites, Cham: Springer International Publishing; 2015, p. 1–70.
[13] Cardon D. Le monde des teintures naturelles. Edition Belin. 2014, 500p.
[14] Andriamanantena M, Danthu P, Cardon D, Fawbush FR, Raonizafinimanana B, Razafintsalama VE, Rakotonandrasana S.R., Ethève A., Petit T. and Caro Y. Malagasy Dye Plant Species:

A Promising Source of Novel Natural Colorants with Potential Applications – A Review. Chemistry & Biodiversity 2019;16.
[15] Selvam RM, Athinarayanan G, Nanthini AUR, Singh AJAR, Kalirajan K, Selvakumar PM. Extraction of natural dyes from Curcuma longa, Trigonella foenum graecum and Nerium oleander, plants and their application in antimicrobial fabric. Industrial Crops and Products 2015; 70:84–90.
[16] Yusuf M, Ahmad A, Shahid M, Khan MI, Khan SA, Manzoor N., Assessment of colorimetric, antibacterial and antifungal properties of woollen yarn dyed with the extract of the leaves of henna (*Lawsonia inermis*). Journal of Cleaner Production 2012; 27:42–50.
[17] Shahmoradi F, Mortazavi SM, Alihosseini F, Fassihi A, Nateri AS, Abedi D. Assessment of antibacterial activity of wool fabrics dyed with natural dyes. Journal of Cleaner Production 2014;72.
[18] du Plessis B, Regnier T, Combrinck S, Heinrich P. Effect of pH on the toxicity of fumonisins towards the RTL-W1 cell line and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Toxicology Letters 2019; 313:101–7.
[19] OCDE. Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 2001.
[20] Athinarayanana G, Ranjitsingh AJA, Usha Raja Nanthini A, Padmalatha C. Toxicological studies of *Caesalpinia sappan* wood derived dye in Wister albino rats. Food Science and Human Wellness 2017; 6:34–8.
[21] Kifayatullah M, Mustafa MohdS, Sengupta P, Sarker MdMR, Das A, Das SK. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. Journal of Acute Disease 2015; 4:309–15.
[22] OCDE. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 2013.
[23] Abe FR, Mendonça JN, Moraes LAB, Oliveira GAR de, Gravato C, Soares AMVM., Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. Chemosphere 2017; 178:282–90.
[24] Jiang L-L, Li K, Yan D-L, Yang M-F, Ma L, Xie L-Z. Toxicity Assessment of 4 Azo Dyes in Zebrafish Embryos. International Journal of Toxicology 2020:109158181989839.
[25] Maes J, Verlooy L, Buenafe OE, de Witte PAM, Esguerra CV, Crawford AD. Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. PLoS ONE 2012;7: e43850.
[26] Siva R, Palackan MG, Maimoon L, Geetha T, Bhakta D, Balamurugan, Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes. Food Science and Biotechnology 2011; 20:7–13.
[27] Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. Arch Toxicol 1983; 54:275–87.
[28] Joshi V, Katti P. Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. International Journal of Toxicology 2018; 37:38–44.
[29] Liu H, Yu H, Giesy JP, Sun Y, Wang X. Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*). Chemosphere 2007; 66:2159–65.
[30] Shen B, Liu H-C, Ou W-B, Eilers G, Zhou S-M, Meng F-G., Toxicity induced by Basic Violet 14, Direct Red 28 and Acid Red 26 in zebrafish larvae: Toxicity induced by dyes in zebrafish larvae. J Appl Toxicol 2015; 35:1473–80.
[31] Iwalewa EzekielO, Suleiman MohammedM, Mdee LazarusK, Eloff JacobusN. Antifungal and antibacterial activities of different extracts of Harungana madagascariensis stem bark. Pharmaceutical Biology 2009; 47:878–85.
[32] Mahesh KS, Jayakumaran NA. Anthraquinones from leaves of Tectona grandis: A detailed study on its antibacterial activity and other biological properties. International Journal of Phytomedicine 2011; 3:50–8.
[33] Nurdiani R, Firdaus M, Prihanto AA. Phytochemical screening and Antibacterial activity of methanol extract of mangrove plant (*Rhyzophora mucronata*) from Porong River Estuary. Journal Basic Science And Technology 2012; 1:27–9.

Conclusions partielles sur le chapitre IV

Le marché des colorants est directement concerné par la tendance actuelle des consommateurs qui vise la recherche de produits naturels, durables et écologiques. Les colorants d'origine artificielle sont globalement de moins en moins appréciés par les consommateurs et cela motive les industriels à rechercher de nouvelles sources de pigment plus respectueux de la santé et de l'environnement. Néanmoins, avant de pouvoir envisager une exploitation industrielle, ces sources naturelles alternatives de colorants doivent d'abord démontrer leur innocuité. Cette étude a donc été mise en place pour vérifier que les extraits bruts de pigments obtenus à partir des plantes tinctoriales malgaches les plus représentatives présentent de faible toxicité autant pour la santé humaine que pour l'environnement.

Des tests de toxicité aigüe ont été réalisés sur les mammifères de types « souris albinos » par administration orale de différentes doses de pigments. Aucun signe de toxicité n'a été observé pour cinq des sept plantes étudiées dont l'*A. excelsus*, le *C. tagal*, le *T. grandis*, le *W fruticosa* et le *X. granatum* même avec la concentration la plus élevée. Un deuxième test de toxicité réalisé sur les embryons de « zebrafish », a démontré des doses létales LC_{50} de 144.32 µg/mL (*H. madagascariensis*), plus de 125 µg/mL (*T. grandis*), 99.26 µg/mL (*A. excelsus*), 97.66 µg/mL (*C. tagal*), 95 µg/mL (*X. granatum*), 78.75 µg/mL (*W. fruticosa*) et 47 µg/mL (*R. mucronata*). Ces concentrations létales sont largement inférieures par rapport à celles trouvées dans la littérature sur des colorants artificiels actuellement uilisés dans certaines industries à l'exemple de la tartrazine (15.7 µg/mL), du sunset yellow (17.61 µg/mL) et de l'amaranthe (24.10 µg/mL). Les données obtenues à partir de ces deux tests (modèle souris albinos et modèle embryon de « zebrafish ») nous ont donné des informations importantes sur la toxicité de ces pigments issus de sept espèces végétales colorantes. L'administration orale des extraits de pigments sur un modèle de souris a montré que la plupart des extraits de pigments n'ont pas de toxicité apparente sur les mammifères. Ces résultats ont été confirmés par les tests effectués sur les embryons de « zebrafish ». Les extraits de *T. grandis*, de *H. madagascariensis* et de *A. excelsus* ont montré des doses létales LC_{50} largement supérieures à celles trouvées dans la littérature. Nous pouvons ainsi conclure que les pigments extraits de ces plantes tinctoriales sont moins toxiques et plus écologiques pour l'environnement et pour l'être humain que les colorants artificiels couramment utilisés dans les industries. Seuls les extraits de *R. mucronata* et *W. fruticosa* ont présenté des signes de toxicité sur les souris. Les extraits de *R. mucronata* et *W. fruticosa* ont également montré des doses létales LC_{50} plus faibles sur le modèle « zebrafish ». Nous pouvons en déduire que les extraits d'écorce et de racines de ces deux dernières espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme par ingestion.

Par ailleurs, le criblage anti-microbien effectué sur plusieurs souches de microbes pathogènes a démontré des activités antimicrobiennes importantes. En combinant leurs propriétés toxicologiques et biologiques, nous pouvons en déduire que l'extrait d'*A. excelsus* est une source intéressante de colorant rouge pour les cosmétiques en raison de leur action sur le *Propionibacterium acnes*, et pour l'industrie

pharmacologique par leur effet sur le *Pseudomonas aeruginosa*. Les extraits d'écorce *H. madagascariensis* sont des sources prometteuses de colorants jaunes pour les industries alimentaires en raison de leur effet sur le *Staphylococcus aureus* et le *Bacillus cereus*. Les extraits de feuilles de *T. grandis* de par leur faible toxicité apparaissent comme une source intéressante de colorants rouges.

Les tests de toxicité réalisés dans cette étude ont permis de cibler les domaines d'application potentiels pour chaque espèce de plante tinctoriale en tant que sources de colorants bioactifs et d'orienter d'éventuelles analyses de toxicité sub-chronique ou chronique plus poussées en fonction de chaque type d'application.

Chapitre V :

Paracarphalea kirondron : une plante endémique de Madagascar, source potentielle de nouveaux pigments anthraquinoniques.

Présentation générale du chapitre :

La richesse de la biodiversité malgache en plantes tinctoriales a généré un intérêt considérable tant sur le plan économique que du point de vue scientifique. Parmi les plantes tinctoriales utilisées par les artisans de la région Boeny, une plante endémique de Madagascar, *Paracarphalea kirondron*, présente un intérêt scientifique particulier. Cette plante appartient à la famille des Rubiaceae dans laquelle sont repertoriées plusieurs espèces de plantes tinctoriales largement utilisées dans le monde à l'exemple de la garance (*Rubia tinctorium*). Les racines des Rubiaceae sont potentiellement riches en anthraquinones, une famille de molécules présentant un intérêt particulier. Les anthraquinones sont utilisées dans de nombreux domaines d'application, tant pour leurs propriétés colorantes (hydroxyanthraquinones) que pour leurs activités biologiques (anti- inflammatoires, antitumorale, antimicrobienne, etc.). A notre connaissance, aucune étude ne traite des propriétés physico-chimiques et biologiques des extraits obtenus à partir des racines de cette plante endémique de Madagascar. Cette dernière est surtout utilisée en tant que plantes ornementales de par ses fleurs rouges. Les seuls usages recensés à ce jour dans la bibliographie se limitent à l'utilisation des racines ou des fleurs pour la teinture de fibre naturelle par simple immersion dans un bain de teinture.

La présente étude est donc la première qui vise à étudier les propriétés physico-chimiques, biologiques et toxicologiques des extraits de pigments issus des racines adventives de *P. kirondron*. Afin d'extraire les pigments, deux types d'extraction ont été réalisés : une première décoction conventionelle à chaud et une seconde extraction par solvant sous pression. Ensuite, la caractérisation chimique de l'extrait a été réalisée par fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte, puis par analyse par chromatographie liquide (HPLC) couplée avec un détecteur UV-visible à barettes d'iode (DAD), un détecteur aérosol chargé (CAD) et un spectre de masse (MS) (HPLC/DAD/CAD/MS). En outre, l'analyse de toxicité de ces extraits bruts a été effectuée sur deux modèles animaux : un modèle mammifère « *albinos mice* » et le modèle « zebrafish embryos ». Le *P. kirondron*, du fait de son endémicité et de son potentiel tinctorial démontré par les artisans teinturiers, apparaît donc comme une plante prometteuse pour être utilisée en tant que source naturelle de colorants.

Cette partie fait l'objet d'un article rédigé en anglais intitulé *Paracarphalea kirondron : a new source of pigments rich in anthraquinone from Malagasy biodiversity and their toxicological properties* à soumettre prochainement dans le journal Dyes and Pigments.

Paracarphalea kirondron: a new source of pigments rich in anthraquinone from Malagasy biodiversity and their toxicological properties

Mahery Andriamanantena[1,2*], Patricia Clerc[1], Pascal Danthu[3], Fanjaniaina Fawbush Razafimbelo[4], Béatrice Raonizafinimanana[4], Zoarilala Razafindrakoto[5], Thierry Regnier[6], Belinda Du Plessis[6], Thomas Petit[1,2*], Yanis Caro[1,2*]

[1]*Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels, CHEMBIOPRO, EA 2212, 15 Avenue René Cassin, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France ;*

[2] *IUT de la Réunion, Département HSE, 40 avenue de Soweto Terre-Sainte, BP 373 - 97455 Saint-Pierre Cedex, La Réunion, France ;*

[3]*HortSys, Université de Montpellier, CIRAD, France ;*

[4]*Département Industries Agricoles et Alimentaires (IAA-ESSA), Université d'Antananarivo, Madagascar ;*

[5] *Institut Malgache de Recherche Appliquée, (IMRA-Fondation Ratsimamanga), Antananarivo, Madagascar.*

[6]*Tshwane University of Technology (TUT), PO Box 56208, Arcadia, Pretoria, 0001, South Africa.*

Highlights

- Chemical and toxicological properties of adventitious roots of *Paracarphalea kirondron,* endemic plant species from Madagascar, have been studied for the first time.
- Hydroalcoholic extract revealed the presence of several anthraquinone-based dyes with potentially new anthraquinones molecules discovered in Rubiaceae plant family.
- Acute toxicity assays made on albino mice and zebrafish embryos demonstrated that the extracts don't have apparent toxicity and higher LC_{50} common artificial yellow colorants.

Abstract

Paracarphalea kirondron is an endemic plant species from Madagascar terrestrial environment and is currently used by local population to dye natural fibers like raffia, silk or cotton. In different areas, *Paracarphalea* genera is usually used as ornamental plants. Their beautiful red deep flower is at the origin of their common name "flaming beauty". The adventitious roots of this plant are currently used by the local population in the west region of Madagascar to dye natural raffia fiber. However, only few studies have been conducted on this plant species, in particular concerning the physicochemical and biological properties of dyes extracted from roots of *P. kirondron.* In this study, several assays have been conducted as a contribution to the knowledge on the coloring properties of the roots of this endemic plant species from Madagascar. The hydroalcoholic extraction of the roots gave an extract with yellow to orange color. After a first column chromatography separation, three different main fractions were collected. The chromatograms obtained by UHPLC-DAD/MS showed one major compound in hexanic fraction, six major compounds in ethyl acetate fraction and four major compounds in the hydroalcoholic fraction. UV/Vis and mass spectra of all the compounds isolated revealed that most of the compounds have similar profiles than anthraquinone-based dyes. Investigations of new sources of natural anthraquinones are of interest as they exhibited a wide range of biological activities. Then, we were also interested in the toxicity of the crude extracts obtained from the roots of *P. kirondron*. Oral acute toxicity assays made on albino mice (OF1) and fish embryos toxicity assays on zebrafish model (*Danio rerio*) demonstrated a lower toxicity of the crude extracts comparing to standard artificial yellow colorants. *P. kirondron* demonstrated interesting potential to be used as sources of natural colorants for industrial applications like cosmetics, foods and pharmaceuticals.

Keywords: *Paracarphalea kirondron,* dyes*,* anthraquinone, HPLC/DAD/MS, acute toxicity.

5-1 Introduction

Research for natural, safe and ecological products during these last decades renew the interest for the exploration of new pigments from natural sources to replace the synthetic chemicals ones [1,2]. Pigments play a key role in the industries because color is one of the most important quality criteria for consumers. With this increasing demands, Madagascar offers a wide sources of raw materials by its unique plant biodiversity with not less than 34 endemic dye plants species [1]. Among them, *Paracarphalea kirondron* is used on the west region of Madagascar to dye natural fabrics from its adventitious roots. It gives a deep yellow to orangish color on raffia fiber without mordanting. This plant species is a woody shrub famous for its pretty red flowers used as ornamental plants which are called "flaming beauty" (see figure 1). *Carphalea* genera is composed by ten species with six endemic species growing in Madagascar: *C. cloiselii*, *C. linearfolia*, *C. angulata*, *C pervilleana*, *C. kirondron* subsp. *kirondron* and *C. kirondron* subsp. *geayi* [3]. After further studies, *C. kirondron*, *C. pervilleana* and *C.*

angulata have been segregated from the Malagasy endemic genus *Carphalea* to be reclassified as a new genera called *Paracarphalea* [4]. Rakotoarisoa *et al.* (2016) [5] made a phytochemical screening of seven plants species from Rubiaceae family in 2016 and showed that stems and leaves of *P. kirondron* are rich in coumarins, anthraquinones, anthracenes, condensed tannins and unsaturated sterols. Nevertheless, adventitious roots (Figure 39) are the part that dyers use for coloring applications but there is currently no study available about the chemical and physicochemical properties of the pigments produced by this plant. Roots of plants from Rubiaceae family are famous to contain high quantities of anthraquinone dyes of commercial importance such as alizarin from *Rubia* genera or emodine from *Rheum* genera [6–8]. This suggests that anthraquinones may constitute the main compounds responsible of this deep yellow orangish color given by the roots of *P. kirondron.*

Figure 39. *Paracarphalea kirondron* (Baill.) Razafimandimbison *et al.*
(left: flowers and leaves, right: yellow adventitious roots)

Anthraquinones are important through the great potential of natural anthraquinones from several sources like insects, microbes or dye plants to replace synthetic ones. In addition to their coloring properties, natural anthraquinones as the examples of rhein, aloe emodin, emodin, physcion or chrysophanol are also interesting due to their wide spectrum of applications and bioactive properties [2,9,10]. Nevertheless, as described by Dufossé (2014) and Duval *et al.* (2016), anthraquinone dyes can have positive or/and negative effects on the organism [9,11]. Toxicological properties are among the main concerns of the products currently used inmanufacturing products. These outstanding properties of anthraquinones and related issues on this fields make the research of new natural sources of anthraquinones with dyeing properties still of interest.

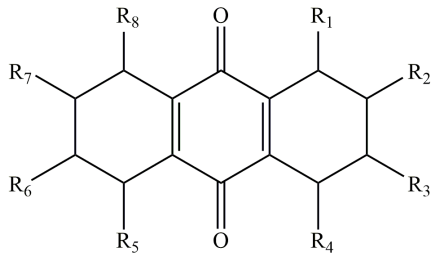


Figure 40. Anthraquinone-based dye (the anthraquinone chemical structure)

For these purposes, we initiated a research in order to identify the chemical and technical properties of the adventitious roots extracts of *P. kirondron.* The extraction yield of different hydroalcoholic extraction processes, the screening and identification of the main chemical compounds of the extract by UHPLC-DAD/MS and their toxicological properties according to two different animal models, namely albino mice and zebrafish embryo will be characterized.

5-2 Materials and methods

5-2-1 Plant materials

Adventitious roots of *Paracarphalea kirondron* were collected in February 2018 in Ampombilava - Marosakoa village (16°16'33.90"S, 46°48'39.12"E) which is located at 102 km from Mahajanga and 10 km from the Ankarafantsika National Park. The plant species were identified as *Paracarphalea. kirondron* (Baill.) Razafimandimbison *et al.* (local name: "Hazomenavony") by the TEF herbarium of FOFIFA and Flora department of the PBZT Madagascar under the research authorization N°027/18-MEEF/SG/DGF/DSAP/SCB/2018. Sampling was made by collecting adventitious roots from three different trees and the pieces of roots have been mixed to constitute one sample. Experiments were perfomed in triplicate. The roots were rinsed quickly with water to remove the dust and dried under shade for a couple of hours before putting them into the fridge.

5-2-2 Extraction of pigments

Samples were lyophilized and cut in small pieces using an electric grinder. Two different methods were used for the extraction of the pigments from the adventitious roots of *P. kirondron.* The first extraction process is a conventional decoction made at 65°C on a reflux flask heater. A second extraction has been conducted using a pressurized liquid extraction (PLE) technique using an accelerated solvent extraction apparatus (ASE™) Dionex 300 which is classified as an eco-friendly extraction technique. The same methods described previsously by the authors[6] were used for each extraction. Hydroalcoholic solution (70% v/v) was used as solvent to obtain the crude extract powder.

[6] Chapter III of this study

Color solutions were obtained by dissolving the crude extract powder in ethanol-water solution (70%) at different concentrations (0, 5, 1, 2, 4, 8 and 16 mg/mL). Color value was measured in the international CIELAB color system in terms of L* (lightness), a* (greenness versus redness), b* (blueness versus yellowness) with a spectrocolorimeter CM-3500d (Minolta).

5-2-3 Chemical analysis

First separation of the crude extracts was made using column liquid chromatography. It was performed on a glass column filled with 25 cm length of Silicagel 30 and conducted with four successive solvents with different polarity: hexane ($p = 0,009$), ethyl acetate ($p = 0,228$), chloroform ($p = 0,259$) and EtOH 70% ($p > 0,700$).

Each fraction was dried on speed vacuum evaporator and dissolved using methanol. Then, analysis of the fraction was carried out in a UHPLC ThermoScientific Ultimate 3000 coupled with a diode array detector (DAD) and a fraction collector for the purification. Mass spectral (MS) analysis was performed on UHPLC/MS Vanquish ThermoScientific to identify the mass of the main isolated compounds. Phenomenex Synergi 4µm Hydro-RP 80 Å/ LC column, 250*4.6mm, was used for the identification of the compounds fitted with a guard column of the same properties. Column Synergi 4µm Hydro-RP 80 Å/ LC column 250*10mm was used for the purification. Chromatographic gradient program of each experimentation is described in Table 30 and samples were filtered on 0.25 µm mini Satorius syringe filter before the injection.

Table 30. Gradient programs used for chromatography.

	Flow (ml.min^{-1})	**Methods (A: H_2O + 0,1 % formic acid/B : Acetonitrile)**					
Analytical							
HPLC/DAD/CAD/MS	0,8	**Time**	- 20	0	8	30	55
		%B	10	10	10	45	95
Purification							
Hexane fraction	4.5	**Time**	-20	0	15		
		%B	66	66	66		
Ethyl acetate fraction	4.5	**Time**	-20	0	8	45	55
		%B	25	25	25	80	95
EtOH fraction	4.5	**Time**	-20	0	16	45	55
		%B	25	25	25	77	95

5-2-4 Toxicity tests

Acute oral toxicity tests

Albinos mice (OF 1) genitors were supplied by the Institut Pasteur of Madagascar and the Institut Malgache de Recherche Appliquée, Antananarivo, Madagascar. They were housed under standard laboratory conditions. This acute toxicity assay was carried out according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OCDE) guideline No. 423 [13]. Briefly, three groups of five mice were administrated with crude extracts of *P. kirondron* dissolved in water at respective oral

doses of 1000mg, 2000mg and 4000mg per kg body weight. One group was kept as control group. Any signs of toxicity and number of death have been monitored regularly during the 5 first hours after oral administration and every 24h during one week. Experimentations were performed in triplicate.

Fish embryo acute toxicity (Danio rerio)

A complementary toxicological assay was performed using zebrafish embryos model following the recommendation of the OCDE guidelines No. 236 on fish embryo acute toxicity (FET) [14] and Abe *et al.* (2017) about toxicity of natural and synthetic dyes [15]. Briefly, viable eggs were exposed in a 24 well plates containing different concentrations of the crude extracts dissolved in water containing 1.75% of DMSO. 10 eggs per replica were used for all experiments and 4 wells of each plate were used as internal control (reconstitute solution without plant extracts). Stock solution of 8 mg/mL were prepared and 125 µL of this stock solution was added to 875 µL of reconstitute solution in the first 10 wells of the 24- well plates to reach a concentration of 1000µg/mL. Reconstitute solution is an oxygenated mix of water, KCl, $CaCl_2 2H_2O$, $MgSO_4 7H_2O$ and $NaHCO_3$ in order to create a perfect environment for the optimum development of the embryos.

Dilutions were made from this first 10 wells in order to have successively 500, 250, 125, 63 and 32 µg/mL. The reconstitute solution was used as negative control. It was prepared by adding KCl, $CaCl_2 2H_2O$, $MgSO_4 7H_2O$ and $NaHCO_3$ in water in order to create a perfect environment for the optimum development of the embryos. The same solution with 1.75% DMSO was used as solvent control and 4.0 mg/L of 3,4-dichloroaniline as positive control. Embryos were observed at 24 hpf (hour post-fertilization), 48 hpf, 72 hpf and 96 hpf by microscope with four times and ten times magnification and coupled with Olympus camera SC30. At the end of the experiments, lethal dose LC50 was calculated according to the number of embryos displaying signs of lethality such as: coagulation (24 hpf), not detached tail (48 hpf), no heartbeat (72 and 96 hpf) and no observable adverse effect level (NOAEL) was deducted. LC_{50} is the dose required to kill half of a tested population after a specified test duration. It is used to evaluate the toxicity of a substance or product.

5-3 Results and discussion

5-3-1 Extraction yields and range of color

Two different extractions have been processed to extract the pigments form the roots of *P. kirondron.* The first one is a hot decoction made and the second one is a pressurized liquid extraction (PLE). The extraction yields are presented in figure 41. It is observed that the green extraction performed with pressurized liquid extraction was almost twice time more efficient (extraction yield of 7% w/w) than the conventional decoction (extraction yield of 4% w/w).

P. kirondron root extracts appeared as a yellow to orangish color powder. When the crude extract was dissolved at different concentrations in ethanol 70% v/v, the color of the resuspended extracts turned to a nice yellow bright color from 0.5 mg/mL and became orangish at 2 mg/mL. It became light brown to dark brown from a concentration of 8.0 mg/mL (Figure 41).

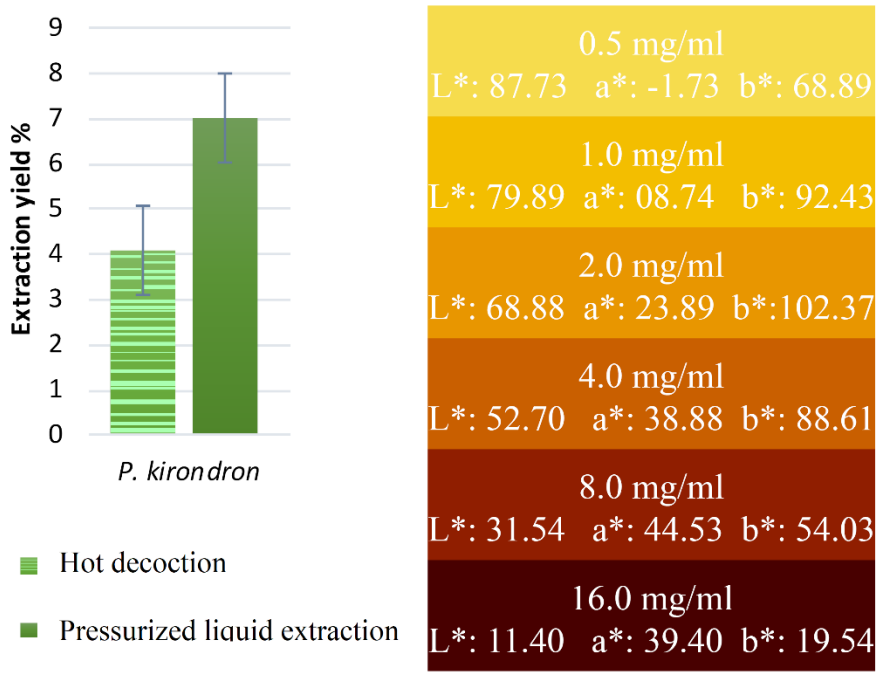


Figure 41. Extraction yield (left) and range of hues (right)
(The value of extraction yield is the mean of three replicates with the standard deviations, the range of hue is the color obtained by dissolving the crude extract in 70% hydroalcoholic solution, L*a*b* expressed the color value with L*: lightness, a*: greenness versus redness, and b*: blueness versus yellowness).

5-3-2 Chemical compounds

Different separations have been processed in order to identify the main compounds responsible of the yellow-orangish color given by the crude extracts of *P. kirondron*. The first separation has been conducted on an open silica gel column and has given three different main fractions that were depending on the solubility of the compounds in hexane (A), ethyl acetate (B) and the remaining compounds eluted with ethanol-water (C), respectively.

A reverse phase high pressure liquid chromatography analysis coupled with diode array detection (UHPLC-DAD) performed on each fraction revealed one major compound in the hexanic fraction, six major compounds in ethyl acetate fraction and four major compounds in the remaining ethanolic fraction

(Figure 42). The UV-Vis and mass spectrum revealed that most of the major compounds were anthraquinone-based dyes. The UV-Vis spectra obtained from the diode array detection (DAD) were similar to the spectra of some anthraquinone dyes identified in other species of Rubiaceae family like munjistin, rubiadin and lucidin in *Rubia tinctorium* roots [7,16] or physcion and aloe emodin in *Rheum* roots [9]. Mass spectrometry (MS) analyses were coupled with the results obtained by DAD to identify the pigments (Table 31).

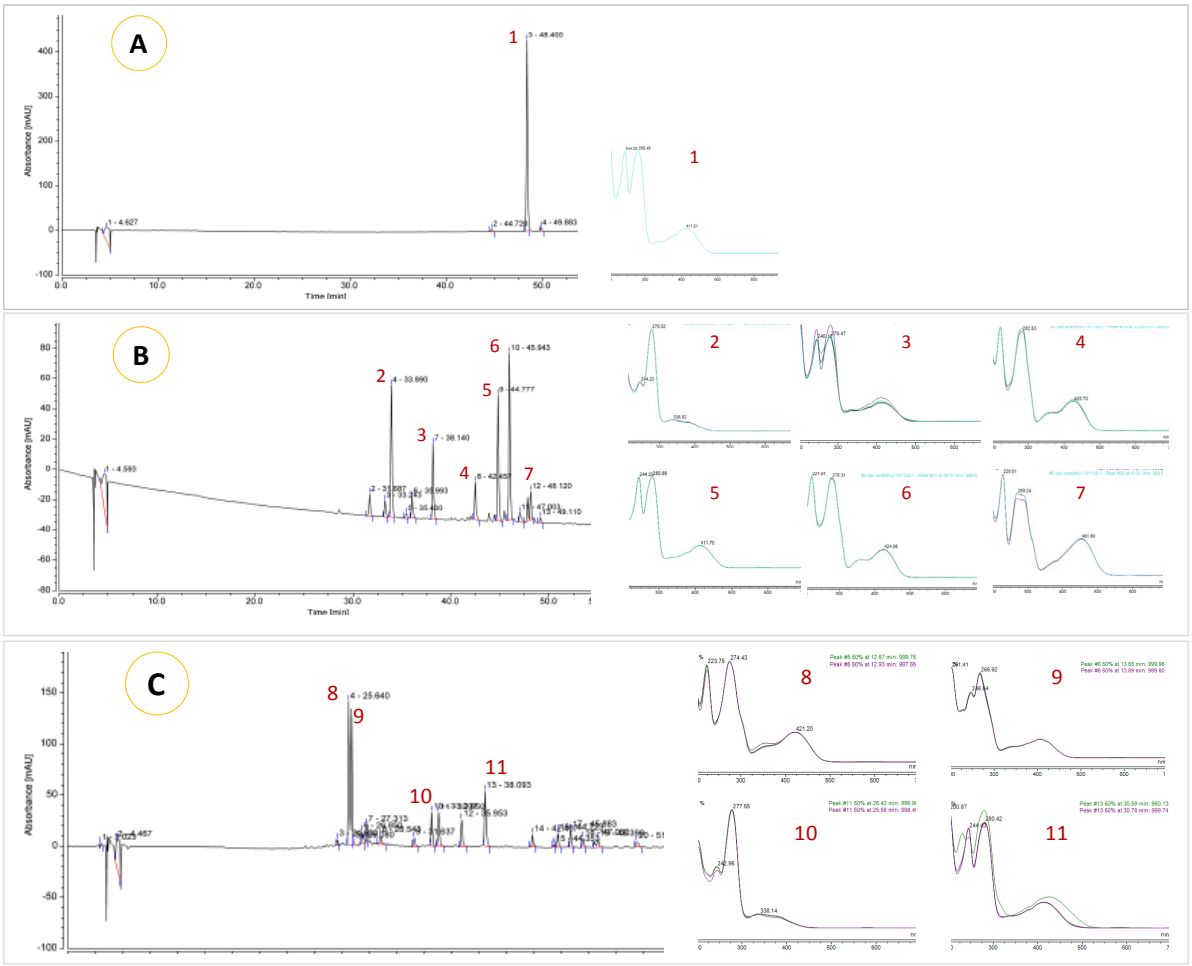


Figure 42. HPLC/DAD chromatogram
(Taken at 400nm following the analytical method described on table 1, UV/Vis spectrum are represented for each main compound, (A) is the hexanic fraction, (B) is the ethyl acetate fraction and (C) is the remaining ethanol-water fraction)

Table 31. Chemical analysis of *Paracarphalea kirondron* hydro alcoholic roots extracts.

No of the compound	Retention time *[1]	Mass (*m/z*)	UV-Vis	Anthraquinone-based compounds with the same mass (*m/z*)
Hexane fraction				
Compound No 1	48.40	298	244, 281, 412	3,5-Dihydroxy-4-methylanthraquinone-2-carboxylic acid
Ethyl acetate fraction				
Compound No 2	33.89	284	244, 276, 336, 380	Munjistin, or Questin
Compound No 3	38.14	270	202; 245; 279, 415	Emodin, Lucidin, or Morindone
Compound No 4	42.46	344	222, 282, 425	Dermorubin
Compound No 5	44.78	270	200, 244, 281, 412	Emodin, Lucidin, or Morindone
Compound No 6	45.94	358	222, 278, 425	Asparsone A, Skyrin
Compound No 7	48.12	344	229, 269, 452	Dermorubin,
Remaining ethanol-water fraction				
Compound No 8	25.64	330	200, 223, 274, 421	Kermesic acid
Compound No 9	25.90	270	202, 247, 267, 412	Emodin, Lucidin, or Morindone
Compound No 10	33.85	280	200, 243, 277, 338, 380	Munjiston, or Questin
Compound No 11	38.09	252 or 293	201, 244, 280, 412, 425	3-Ethyl-1 hydroxyanthraquinone

*[1]Retention time (in min) with the HPLC analytical method

Three different compounds were found to be of special interest from the compounds isolated in the different extracts. Compound No.1 (*m/z* 298) seems to be similar to the compound 3,5-Dihydroxy-4-methylanthraquinone-2-carboxylic acid that was discovered in roots of *Rheum emodi* [17]. Nevertheless, the absorption peak at 244 nm observed with the UV-VIS spectra of the compound No.1 did not appear on the UV spectra of 3,5-Dihydroxy-4-methylanthraquinone-2-carboxylic acid. We may be in presence of a similar anthraquinone-based compound with the same mass for the molecular ion. The second most interesting coumpound was compound No.6 (*m/z* 358). It had a similar mass comparing to Asparasone A and skyrin. Asparasone A was extracted form an *Aspergillus* strain [18] but has never been detected in plant materials. The third interesting molecule was compound No.8 (*m/z* 330) which have the same mass for the molecular ion and similar UV-visible profile than kermesic acid [19]. Interestingly, kermesic acid was only observed in insect and not in plant materials. Hence, probably, these compounds No.1, No.6 and No.8 may be new anthraquinone-based compounds that have never been described in the plant species of the Rubiaceae family. Further analysis by RMN is requiered to further characterise the chemical formula of these compounds.

5-3-3 Toxicological properties

Albino mice model:

Firstly, the toxicity of the extracts was estimated using the albino mice model. Different concentrations of *Paracarphalea kirondron* crude extracts, respectively 1000 mg, 2000 mg and 4000 mg per kg body weight, have been administrated orally to white albino mice (OF 1) (average weight of 35 g) in three groups of five mice each. The mice were monitored after 15min, 30 min, 1h, 3h and every day for 5 days. The results have shown no sign of abnormalities and no death of mice for all the duration of the study. It indicates that crude extracts of *P. kirondron* have no apparent toxicity even with the highest concentration used for these experiments. Hence, the LC_{50} of the crude extracts of *P. kirondron* on albino mice was higher than of 4000 mg/kg of body weight. According to Lorke *et al.*(1983) [20] and Athinarayanana *et al.* (2017) [21], this range of LC_{50} suggests that the substance is not toxic for mice as well as human being.

Fish embryos acute toxicity:

Acute toxicity assays were made on fertilized zebrafish eggs and the development of the embryos were monitored for 96-hour post fertilization. At the end of the experiments, the number of dead embryos was recorded for each concentration and LC_{50} were calculated. Abnormalities have been observed to determinate the no observed adverse effect level (NOAEL). The main lethality indicators were (i) coagulation of fertilized eggs, (ii) absence of somite formation, (iii) absence of detachment of the caudal bud from the yolk sac, and (iv) absence of cardiac beat. Any sign that differs from normal development was considered as abnormality[7]. The highest concentrations used for these assays kill all the embryos (1000, 500 and 250 µg/g). The first embryos surviving after 72 hpf were observed from 125 µg/ml of crude extracts. Number of lethality are recorded on table 32 for the lower concentration with the median LC_{50} and the NOAEL of the crude extracts on zebrafish embryos.

Table 32. Lethality rate from fish embryos acute tests on *Paracarphalea kirondron*
(24: 10/10 means that after **24** hpf**, 10** fish embryos of **10** show signs of lethality)

Concentrations	250 µg/ml	125 µg/ml	61 µg/ml	31 µg/ml	15 µg/ml	7 µg/ml
P. kirondron	24 : 10/10*	24 : 6/10	24 : 5/10	24 : 3/10	24 : 1/10	24 : 1/10
	48 : 10/10	48 : 6/10	48 : 5/10	48 : 3/10	48 : 1/10	48 : 1/10
	72 : 10/10	72 : 8/10	72 : 5/10	72 : 4/10	72 : 1/10	72 : 1/10
	96 : 10/10	96 : 10/10	96 : 5/10	96 : 4/10	96 : 2/10	96 : 1/10
	LC_{50} = 55.90 µg/ml			**NOAEL< 7 µg/ml**		

[7] See Chapter IV

The artificial colorants used as control displayed LC_{50} and NOAEL concentrations at 17,61 µg/ml and 2.26 µg/ml, respectively, *for the sunset yellow* (E 110) [22], and 15,7 µg/ml and 2.67 µg/ml, respectively, for tartrazine (E 102) [23] which are much higher than the LC_{50} and NOAEL values of the crude extract of *P. kirondron* (55.90 µg/ml and 7 µg/ml). These two artificial colorants, sources of yellow colors are currently used in several applications such as in foods, cosmetics or pharmaceutical industries. Hence, crude extracts of *P. kirondron* roots revealed lower toxicity comparing to the artificial ones. It can be concluded that these plant pigments should be less toxic and more ecological for the environment.

5-4 Conclusions and prospects

Plant material appears to be a promising source of natural colorants that can be used as substitute of the artificial ones. *Paracarphalea kirondron,* a shrub belonging to the Rubiaceae family is one of the numerous endemic plant species from Malagasy biodiversity that produce pigments. This dye plant has been widely used for years by local population in the west region of Madagascar to dye natural fibers in yellow by their adventitious roots but it had so far never been studied with respect to their coloring properties and the chemical composition of the dyes. Only its botanical classification has been discussed recently in the literature with the reclassification from *Carphalea* genera to a new one called *Paracarphalea.* In this current work, coloring properties, chemical composition and acute toxicity have been studied on adventitious roots of *P. kirondron.* The comparison between two different methods of extraction showed that the pressurized liquid extraction technique, which is classified as ecological extraction techniques displayed better extraction yield with almost twice time higher than conventional extraction. Column chromatography and UHPLC-DAD/MS analysis showed that eleven major compounds were isolated from the *P. kirondron* root extracts. Most of the main pigments isolated are anthraquinone-based dyes. Three compounds showed special interest because they appear to have a different chemical structure comparing to other common well-known anthraquinone molecules found in the plant species of the Rubiaceae family. The acute toxicological assays conducted on albino mice and zebrafish embryos model demonstrated that root extracts of *P. kirondron* present lower toxicity and are more ecological than two yellow artificial dyes (i.e, sunset yellow and tartrazine).

Adventitious root extract of *P. kirondron* demonstrated great coloring properties. The extract was found to be a wide source of anthraquinone-based dyes that are of interest because of their several biological properties. For example, emodin and rhein, two anthraquinone derivatives, have proven to be promising bioactive molecules for treating several skin disorders thanks to their pleiotropic pharmacological activities like antimicrobial, antifungal, antioxidant, and anticancer. Coloring properties of *P. kirondron* are only used in Madagascar for natural fabric dyeing. However, we found that it can be particularly interesting to extend their usage to other applications such as food, cosmetics or pharmaceutical industries. It involves sustainable production and exploitation to preserve the biodiversity. Further

studies should be made on their cultivation, the optimization of their extraction yield and characterization of the biological properties of their compounds. It can definitely increase its added-value in order to become one of the new sources of yellow and orange colorants for the green industries.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the Terre-Là Company (Majunga, Madagascar) and FEEM association (Boanamary and Ampombilava) for their expertise. This work was financially supported by grants from the *Conseil Régional de La Réunion*, Réunion island (France) (Grant number: DIRED/20161450) and funding from Erasmus MIC project AC107 2018, réf 2018-1-FR01-KA107-047557 between the University of La Réunion (La Réunion-France) and Tshwane university of Technology (Pretoria-South Africa).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

References

[1] Andriamanantena M, Danthu P, Cardon D, Fawbush FR, Raonizafinimanana B, Razafintsalama VE, Rakotonandrasana S.R., Ethève A., Petit T. and Caro Y. Malagasy Dye Plant Species: A Promising Source of Novel Natural Colorants with Potential Applications – A Review. Chemistry & Biodiversity 2019;16.

[2] Caro Y, Anamale L, Fouillaud M, Laurent P, Petit T, Dufossé L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. Natural Products and Bioprospecting 2012; 2:174–93.

[3] Puff C. Observations on *Carphalea Juss*. (Rubiaceae, Hedyotideae), with particular reference to the Madagacsan taxa and its taxonomic position. Bulletin du Jardin Botanique Nationale Belge 1988 :271–323.

[4] Ferm J, Kårehed J, Bremer B, Razafimandimbison SG. *Paracarphalea*, a new genus of the coffee family segregated from the Malagasy endemic genus *Carphalea* (Rubiaceae, Rubioideae, Knoxieae). Phytotaxa 2016 ;263 :98.

[5] Rakotoarisoa MA, Rakotoarivelo H, Rakotonandrasana S, Randriamialinoro F, Ranarivelo L, Ratsimbason M., Etudes chimique et biologique de sept plantes médicinales de Madagascar de la famille Rubiaceae. Mada-Hary 2016; 5:11.

[6] Wei S, Yao W, Ji W, Wei J, Peng S. Qualitative and quantitative analysis of anthraquinones in rhubarbs by high performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. Food Chemistry 2013; 141:1710–5.

[7] Derksen GCH, Niederländer HAG, van Beek TA. Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A 2002; 978:119–27.

[8] Willemen H, van den Meijdenberg GJP, van Beek TA, Derksen GCH. Comparison of madder (*Rubia tinctorum* L.) and weld (*Reseda luteola* L.) total extracts and their individual dye compounds with regard to their dyeing behaviour, colour, and stability towards light. Coloration Technology 2019; 135:40–7.

[9] Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. Industrial Crops and Products 2016; 94:812–33.

[10] Bussmann RW, Hennig L, Giannis A, Ortwein J, Kutchan TM, Feng X. Anthraquinone Content in Noni (*Morinda citrifolia* L.). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013; 2013:1–5.

[11] Dufossé L. Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the food pigment family. Food Research International 2014; 65 :132–6.
[12] Andriamanantena M., Danthu P., Cardon D., Ethève A., Fawbush F. R., Raonizafinimanana B., Petit P., Caro Y. Chemical stability, coloring and antioxidant properties of five new red dyes extracted from endemic and native plant species used in Madagascar. Journal of Cleaner Production (*under review*).
[13] OCDE. Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 2001.
[14] OCDE. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 2013.
[15] Abe FR, Mendonça JN, Moraes LAB, Oliveira GAR de, Gravato C, Soares AMVM. Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. Chemosphere 2017; 178:282–90.
[16] Deveoglu O, Sahinbaskan BY, Torgan E, Karadag R. Investigation on colour, fastness properties and HPLC-DAD analysis of silk fibres dyed with Rubia tinctorium L. and Quercus ithaburensis Decaisne: Investigation of silk fibres dyed with madder and walloon oak. Coloration Technology 2012; 128:364–70.
[17] Singh NP, Gupta AP, Sinha AK, Ahuja PS. High-performance thin layer chromatography method for quantitative determination of four major anthraquinone derivatives in *Rheum emodi.* Journal of Chromatography A 2005; 1077:202–6.
[18] Malysheva SV, Arroyo-Manzanares N, Cary JW, Ehrlich KC, Vanden Bussche J, Vanhaecke L. Identification of novel metabolites from *Aspergillus flavus* by high resolution and multiple stage mass spectrometry. Food Additives & Contaminants: Part A 2014; 31:111–20.
[19] Lech K, Jarosz M. Novel methodology for the extraction and identification of natural dyestuffs in historical textiles by HPLC–UV–Vis–ESI MS. Case study: chasubles from the Wawel Cathedral collection. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2011; 399:3241–51.
[20] Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. Archives of Toxicology 1983; 54:275–87.
[21] Athinarayanana G, Ranjitsingh AJA, Usha Raja Nanthini A, Padmalatha C. Toxicological studies of *Caesalpinia sappan* wood derived dye in Wister albino rats. Food Science and Human Wellness 2017; 6:34–8.
[22] Jiang L-L, Li K, Yan D-L, Yang M-F, Ma L, Xie L-Z. Toxicity Assessment of 4 Azo Dyes in Zebrafish Embryos. International Journal of Toxicology 2020:109158181989839.
[23] Joshi V, Katti P. Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (Danio *rerio*) Embryo Cultures. (Nom du journal en toutes lettres) International Journal of Toxicology 2018 ; 37 :38–44.

Conclusions partielles du chapitre V

Paracarphalea kirondron est une plante qui est largement répandue à Madagascar et elle est utilisée pour l'essentiel en tant que plantes ornementales. Dans la commune de Marosakoa, ses racines adventives sont également utilisées artisanalement pour teindre les fibres naturelles des tissus en jaune et en orange. Cette plante n'est utilisée actuellement qu'à l'état sauvage par la population locale. Des essais d'extraction réalisés au laboratoire à partir des racines ont donné des extraits bruts de l'ordre de 4% en rendement de matière sèche pour une décoction conventionelle et de 7% pour une extraction accélérée par solvant sous pression.

Une analyse préalable de la composition chimique a été menée en trois phases. Un premier fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte a d'abord été réalisé avec des solvants de polarité différente. Trois fractions ont ainsi été obtenues : une fraction hexanique (A), puis une fraction acétate d'éthyle (B), et enfin une fraction éthanolique à 70% (C). Chacune des trois fractions a ensuite été étudiée par analyse chromatographique UHPLC-DAD/MS et les résultats ont montré que ces extraits sont riches en composés anthraquinoniques. La présence de 11 composés majoritaires a été décellée, dont un composé majoritaire dans la fraction hexanique, six composés dans la fraction acétate d'éthyle, et quatre composés dans la fraction éthanolique à 70%. Enfin, des fractionnements sélectifs ont été réalisés par HPLC semi-préparative afin d'obtenir des composés purs pour permettre leur identification ultérieure par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces travaux portant sur l'élucidation structurelle de ces molécules pigmentées sont en cours en partenariat avec l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims.

D'autre part, des tests de toxicité aigüe ont été réalisés sur les extraits bruts et ont permis de démontrer une faible toxicité des extraits. En effet, les tests effectués par voie orale sur des modèles « albinos mice » ont démontré aucun signe de létalité même pour les concentrations les plus élevés qui ont été administrées (4000 mg/kg de masse corporelle). Les analyses effectuées sur les embryons de « zebrafish » ont montré une dose létale (DL_{50}) de l'ordre de 55.90 µg/ml et une dose minimale sans effet observable (DSENO) de 7 µg/mL. En comparaison, ces concentrations sont largement supérieures aux concentrations observées dans la bibliographie pour ce qui concerne deux colorants jaunes synthétiques, à savoir le jaune orangé S (E 110) et la tartrazine (E 102). Toutefois, d'autres tests de toxicité sub-chroniques et chroniques devront être mis en œuvre par la suite pour confirmer ces données.

La *Paracarphalea kirondron* apparait donc comme une source prometteuse de colorants jaunes naturels de nature anthraquinonique qui pourraient être utiles à des fins industrielles, au-delà de leur utilisation dans la teinture de fibre naturelle. Dans cette perspective, comme il s'agit ici d'une éventuelle exploitation des racines adventives, des mesures spécifiques d'accompagnement devront être mises en œuvre pour la culture et l'exploitation durable de cette ressource végétale afin de protéger cette biodiversité à Madagascar.

Conclusions générales et perspectives

La biodiversité malgache, de par sa richesse et son endémicité, est une source importante de matières premières valorisables pour l'industrie. Elle regorge de nombreuses espèces de plantes utiles et à hautes valeurs ajoutées comme les plantes médicinales, les plantes riches en huiles essentielles, les épices, les condiments, etc. Depuis plus d'un siècle, de nombreux auteurs ont décrits le fait que Madagascar regorge de plantes tinctoriales (ou plantes riches en pigments) inexploitées jusqu'à ce jour dans d'autres secteurs que celui de la teinture artisanale de fibres naturelles.

Les consommateurs étant de plus en plus attirés par des produits plus sains et plus écologiques, les industriels recherchent des solutions alternatives naturelles. D'ailleurs, la réglementation européenne en matière de sûreté des produits a largement évolué ces dernières années et les législations sont devenues plus contraignantes. L'industrie des colorants de synthèse est parmi l'une des plus polluantes de la planète et elle est directement concernée par cette évolution. Une des solutions alternatives que nous avons proposées dans ce travail est la valorisation de la biodiversité malgache comme une source renouvelable alternative de pigments végétaux à travers sa richesse en plantes tinctoriales. Cet objectif a été abordé en étudiant la chimio-diversité des ressources végétales tinctoriales de Madagascar à travers des études ethnobotanique, phyto-chimique et toxicologique pour proposer de nouvelles sources de colorants qui pourraient être appliquées dans divers domaines (agroalimentaires, cosmétiques, pharmacologiques).

Les résultats de ce travail ont été présentés en cinq chapitres distincts. Dans le premier chapitre, nous avons cherché à démontrer que les plantes tinctoriales de Madagascar sont des sources prometteuses de nouveaux colorants avec de potentielles applications. Dans le second, nous avons défini des critères de choix afin de sélectionner huit plantes tinctoriales économiquement et scientifiquement intéressantes. Le troisième chapitre a ensuite permis de caractériser cinq extraits de plantes tinctoriales à des fins d'usage comme nouvelles sources de pigments rouges. Des tests physico-chimiques, des tests de stabilité et des tests d'activités antioxydantes ont été réalisés afin de mieux valoriser ces extraits végétaux. Le quatrième chapitre a été dédié aux analyses de toxicité menées sur les plantes tinctoriales sélectionnées. Un criblage de leurs activités antimicrobiennes a également été mené. Enfin, le cinquième chapitre détaille l'étude des propriétés chimiques et toxicologiques d'une plante endémique de Madagascar, source de pigments jaunes anthraquinoniques, à savoir *Paracarphalea kirondron*.

Au total, huit espèces de plantes tinctoriales de Madagascar ont été décrites et caractérisées dans cette étude, principalement en termes de pouvoir colorant et d'activités biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, toxicologiques). Il est utile de rappeler que ces plantes ont été principalement

collectées dans la région Ouest de Madagascar où œuvre l'entreprise Terre là Sarl et l'association FEM. Ainsi, les huit espèces qui ont été retenues dans cette étude sont l'*Acridocarpus excelsus* (Malphigiaceae), *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae), *Harungana madagascariensis* (Hypericaceae), *Paracarphalea kirondron* (Rubiaceae), *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae), *Tectona grandis* (Verbenaceae), *Woodfordia fruticosa* (Lythraceae) et *Xylocarpus granatum* (Meliaceae).

Cette étude nous a permis de tirer quelques conclusions qui sont présentées ci-après quant à l'importance de la biodiversité en plantes tinctoriales à Madagascar dans un objectif de valorisation de nouvelles sources naturelles de colorants.

- **La biodiversité malgache est une source prometteuse de colorants naturels bioactifs**

Le criblage de la biodiversité malgache a permis de recenser pas moins de 128 plantes tinctoriales qui ont montré des propriétés tinctoriales dont 34 espèces endémiques, 43 espèces indigènes et 51 espèces introduites. Ces plantes tinctoriales renferment des pigments de couleurs variées, allant du jaune (à l'exemple des pigments extraits de l'espèce *Paracarphalea kirondron*) au rouge (*Acridocarpus excelsus*), en passant par la couleur verte (*Psiadia altissima)* et le bleu (feuilles d'*Indigofera tinctoria*). La biodiversité malgache en plantes tinctoriales est riche mais est très faiblement exploitée. Les espèces tincoriales qui poussent à l'état sauvage sont découpées ou défrichées pour faire place à des infrastructures ou à d'autres espèces qui ne sont pas généralement propice pour l'environnement écologique de la zone ce qui entraine la disparition de certaines espèces. D'autres espèces sont mal identifiées car elles sont seulement reconnues par leurs noms vernaculaires auprès de la population locale et ne permettent pas d'identifier précisément l'espèce. Les noms vernaculaires définis par la population locale rassemblent en général une classe entière de plantes et limitent ainsi leur reproduction par rapport aux choix des semences. Il serait donc important de faire un recoupement par zone des noms vernaculaires et noms scientifiques afin de définir précisément les espèces utilisées par la population locale pour qu'elle puisse faire le choix lors des plantations que ce soit à un niveau artisanal ou une éventuelle production à grande échelle. Actuellement, de nombreux colorants d'origine naturelle qui répondent à la législation actuelle sont déjà disponibles sur le marché. Toutefois, ces sources de pigments sont limitées en raison du coût, de la disponibilité des matières premières à grande échelle, de leur stabilité et surtout du manque de données scientifiques par rapport à leurs différentes propriétés. La biodiversité malgache, si elle est exploitée durablement, peut répondre à ce besoin des industriels et des consommateurs.

- **De par leurs propriétés technologiques prometteuses, ces extraits de pigments se placent en tant que matières premières d'intérêt pour différents domaines industriels.**

Seulement moins de la moitité des plantes tinctoriales inventoriées dans cette étude sont encore utilisées par la population locale à Madagascar en tant que sources naturelles de colorants. Les huit plantes choisies dans ce travail ont déjà démontré leurs intérêts pour la teinture de fibre naturelle comme le raphia, la soie ou le coton. Dans la présente étude, après avoir extrait les pigments des écorces, racines et feuilles de plantes tinctoriales, leurs propriétés technologiques ont été étudiées. Différents essais d'extraction basés sur les procédés artisanaux utilisés par les artisans teinturiers ont été menés dont : une extraction conventionnelle par décoction à chaud, et une extraction solide-liquide sous pression. Ce dernier procédé, qui est plus écologique car il consomme moins de temps, d'énergie et de solvants s'est révélé particulièrement intéressant. Il a donné de meilleurs rendements d'extraction pour la plupart des espèces. Nous avons également étudié la stabilité des pigments en fonction du pH (de 3 à 11) et de sa résistance à haute température (100°, 150°, 200° et 300°C) en les comparant à deux colorants naturels qui sont actuellement très utilisés dans les industries dont les extraits de garance et le carmin de cochenille. En examinant les données colorimétriques dans le système CIELab, nous avons démontré que les pigments caractérisés dans cette étude présentent de meilleures stabilités par rapport à l'extrait de garance et sont autant stables que le carmin de cochenille. Les pigments commencent à se dégrader à partir de 200°C et perdent leur pouvoir tinctorial à 300°C. Peu de domaines de l'industrie utilisent des températures élevées de l'ordre de 200 et 300°C dans leurs procédés de fabrication. Les domaines du cosmétique et de la pharmacologie montent rarement à plus de 100°C tandis que le domaine agroalimentaire peut utiliser des procédés de plus de 135°C comme pour la stérilisation. Les pigments présentement étudiés sont stables à ces températures très élevées et constituent une alternative intéressante pour ces industries, d'autant plus que les variations de leurs teintes ne sont pas considérables, tant en environnement acide qu'en environnement alcalin (pH <9). Il est important de préciser que certains de ces pigments, à l'exemple des extraits de *W. fruticosa* ou d'*A. excelsus*, peuvent être très stables à haute température de l'ordre de 150°C et ne se dégradent qu'à partir de 200°C ce qui en fait des alternatives prometteuses pour être utilisées dans la fabrication des bio-composites et même pour les bioplastiques.

- **Les extraits de pigments sont composés de molécules diverses ayant des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes soulignant leurs potentialités à des fins d'usage comme colorants « bioactifs ».**

Les principes actifs colorants de ces plantes tinctoriales sont des pigments contenus dans les racines, les feuilles et les écorces. Ces pigments peuvent être constitués de polyphénols, tannins, caroténoïdes, quinonoïdes, flavonoïdes, indigoïdes, etc. Parmi les plantes que nous avons étudiées, cinq espèces dont l'*A. excelsus*, le *C. tagal*, le *R. mucronata*, le *W. fruticosa* et le *X. granatum* sont

particulièrement riches en polyphénols dont principalement des tannins. Le *T. grandis* et le *H. madagascariensis* sont aussi largement utilisés par les artisans locaux de la région Boeny. D'après les données de la littérature, la couleur donnée par les extraits de feuilles de *T. grandis* provient de différentes molécules à l'exemple des flavonoides, anthraquinones et tannins tandis que pour les extraits d'écorce de *H. madagascariensis*, la couleur provient principalement des polyphénols et des xanthonoides. Ces deux dernières espèces sont aussi très largement utilisés par les artisans de la région Boeny. En outre, nous nous sommes particulièrement intéressés aux extraits de racines adventives de *Paracarphalea kirondron* dont les extraits bruts ont donné une palette de couleur qui vire du jaune vif à un orange très intense. Les propriétés colorantes des racines adventives de cette plante endémique de Madagascar sont méconnues de la communauté scientifique internationale bine qu'elle soit souvent utilisée par les artisans locaux pour la teinture de fibre naturelle. Ainsi, dans cette étude, nous avons effectués une caractérisation chimique plus poussée des extraits par chromatographie liquide HPLC-DAD-CAD-MS. Les résultats obtenus avec les spectres UV-VIS et spectres de masse ont fait référence à des profils anthraquinoniques pour la plupart des composés majoritaires colorés. Trois composés majoritaires respectivement soluble dans la phase hexanique, acétate d'ethylique et hydroalcoholique nous ont particulièrement attirés de par leurs masses et profils DAD qui se distinguent de ceux rencontrés dans les bases de données des anthraquinones contenues dans les plantes. Nous devrons tout de même faire des analyses chimiques fines complémentaires (RMN) afin de les identifier correctement. Ces données corroborent avec la famille botanique de cette plante car bon nombre de racines des espèces appartenant à cette famille des Rubiaceae sont aussi riches en composés anthraquinoniques.

- **Une approche toxicologique nous a permis de définir un risque toxicologique mineur des pigments extraits de ces plantes tinctoriales.**

Une première analyse de toxicité aigüe, réalisée sur des souris de type albinos, a démontré que les extraits des plantes étudiées ne présentent aucune toxicité apparente, à l'exception de quelques rares cas de mortalité observés lors d'une administration d'extraits de *R. mucronata* et de *W. fruticosa* à plus de 4000 mg/kg. Pour compléter ces données toxicologiques, des expériences sur des embryons de poissons de type « zebrafish » ont été conduites et les résultats ont confirmé les données précédéntes. Ainsi, la plupart des extraits caractérisés dans cette étude apparaissent donc moins toxiques que les colorants artificiels existant sur le marché, ce qui en fait des alternatives plus saines et plus écologiques. Au final, les extraits de *R. mucronata* et de *W. fruticosa* sont les seuls extraits déconseillés pour des applications alimentaires.

- **Quelques essais d'application mis en oeuvre ont montré des résultats prometteurs par rapport à leurs propriétés colorantes.**

Divers essais d'application ont été réalisés : coloration de produits alimentaires (sucettes fabriquées à une température comprise entre 135 et 150°C) (Figure 43), coloration de gélatine (Figure 44) et coloration de savonnettes en glycérine végétale (Figure 45-46). Les résultats de ces tests corroborent avec ceux observés dans le Chapitre III et confirment la stabilité thermique de ces pigments végétaux pour des applications industrielles.

Figure 43 : Sucettes composées de cristaux de sucre colorés par des extraits de plantes (en rouge par des extraits de *A excelsus* et en Jaune par des extraits de *H. madagascariensis*)

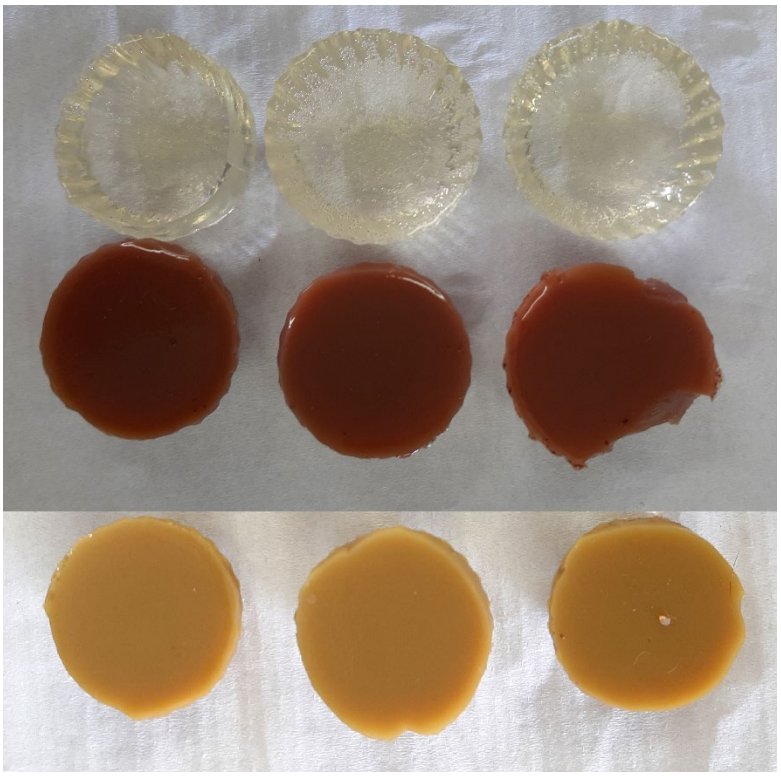


Figure 44 : Gélatines végétales colorées par des extraits de plantes
(en rouge par des extraits de *A excelsus* et en Jaune par des extraits de *H. madagascariensis*)

Figure 45 : Savonnettes en glycérine végétale colorées par différents extraits de plantes
(de gauche à droite, échantillon test, *H. madagascariensis*, *A. excelsus*, *P. kirondron*, *T. grandis* et *R. mucronata*)

Figure 46 : Savonnettes en glycérine végétale colorées par des extraits de *P. kirondron* à différentes concentrations

- **Existe-t-il un avenir pour les plantes tinctoriales de Madagascar et de l'Océan Indien ?**

Les plantes tinctoriales de Madagascar et de l'Océan Indien, encore peu exploitées à ce jour, représentent donc une piste prometteuse pour répondre à ce besoin de sources alternatives de colorants plus écologiques et plus sains. A travers les caractéristiques technologique, physico-chimique, biologique et toxicologique de huit plantes endémiques / indigènes de Madagascar, nous avons pu démontrer que les pigments issus des plantes tinctoriales présentent un intérêt plus que considérable pour les industries. En outre, à Madagascar, les plantes tinctoriales sont généralement utilisées dans des endroits situés loin des grandes villes où les sources de revenus sont très limitées. La région de l'Océan Indien dispose encore de très vastes étendues géographiques où il est possible de créer des plantations et d'avoir les mains d'œuvres nécessaires. Si les plantes tinctoriales continuent d'être étudiées et exploitées, ce domaine constitue un levier important du développement tant pour la population locale, les acteurs locaux que internationaux. C'est dans cette perspective que le Projet PLANTIN (Plantes Tinctoriales de la Réunion), qui s'est vu attribué un financement FEDER (AMI 2018), a été monté.

Les résultats obtenus à partir de ces travaux de thèse permettent d'envisager différentes perspectives opérationnelles qui sont axées sur cinq points :

- **L'isolement de pigments purs et l'étude des propriétés technologiques et toxicologiques par rapport à l'extrait brut.**

L'étude d'extraits bruts nous suggère d'autres hypothèses car la synergie entre les molécules colorantes et les autres métabolites primaires ou secondaires peuvent influer sur les propriétés colorantes et biologiques des extraits (contribution à leur stabilité, etc.). D'autres études seront nécessaires afin d'optimiser l'exploitation de chaque espèce, par l'usage des extraits bruts ou par la mise en œuvre de techniques de fractionnement pour l'obtention de pigments purs.

- **Analyse de toxicité sub-chronique et chronique**

Les tests de toxicité aigüe seuls ne permettent pas de définir intégralement la toxicité d'un produit. Ces tests ne sont pas suffisants pour sortir un produit sur le marché, surtout dans les domaines que nous ciblons dont l'agroalimentaire, la cosmétique et la pharmacologie. Selon les applications cibles, des tests complémentaires de toxicité sub-chroniques et chroniques seront nécessaires avant de passer à l'exploitation industrielle de ces nouvelles ressources à Madagascar.

- **Etude du potentiel agronomique de ces sources naturelles de pigments**

Les travaux réalisés dans cette thèse ont mis en œuvre des plantes qui poussent généralement à l'état sauvage ou dans des écosystèmes protégés à Madagascar. Toutefois, une exploitation industrielle à grande échelle implique le besoin d'une grande quantité de matières premières. Certaines de ces espèces ont déjà démontré des facilités de culture (dans le cas des plantes des mangroves) et d'autres sont largement répandues mais n'ont jamais vraiment été cultivées à grande échelle (*A. excelsus*, *P. kirondron*). L'étude du potentiel agronomique, c'est-à-dire le potentiel de culture et de multiplication de la plante, ainsi que l'optimisation des procédés d'extraction des pigments à partir de ces ressources végétales sont également des étapes clés à maîtriser car elles peuvent permettre de répondre aux problèmes de coût des colorants naturels.

- **Recherche de sources d'autres palettes de couleurs**

Le rouge et le jaune sont les couleurs les plus prisées par les industriels. La majorité des recherches effectuées sur les colorants naturels dans le monde concerne la couleur rouge. La biodiversité en plantes tinctoriales peut permettre l'obtention de pigments présentant des couleurs variées. Par exemple, les sources naturelles de bleus sont rares, alors qu'une décoction de graine de *Ravenala madagascariensis*, plante endémique et emblématique de la région Est de ce pays peut donner une couleur bleu intense. Les sources stables de verts sont aussi très recherchées car la chlorophylle n'est pas stable et le vert utilisé dans les industries provient généralement d'un mélange de pigments bleus et

jaunes. Par ailleurs, la biodiversité végétale malgache peut également offrir une source de colorants verts, à l'image du *Psiadia altissima* des hautes terres centrales.

❖ **Valorisation des plantes tinctoriales de La Réunion (Projet PLANTIN La Réunion)**

Enfin, dans cette perspective d'étendre cette étude au niveau de la région Océan Indien, ces résultats portant sur la biodiversité malgache nous ont permis d'élaborer un projet de valorisation des plantes tinctoriales de La Réunion intitulé projet PLANTIN (« Plantes Tinctoriales de La Réunion »). Le projet PLANTIN, porté par le laboratoire CHEMBIOPRO en collaboration avec différentes équipes universitaires, s'est vu attribué un financement par le FEDER et la Région Réunion pendant 2 ans (fin 2020- fin 2022). Il ambitionne d'inventorier les plantes tinctoriales de La Réunion, un potentiel jusqu'ici inexploité, et de sélectionner un nombre d'espèces pour évaluer les potentialités tinctoriales, biotechnologiques en coloration industrielle et les activités pharmaco-toxicologiques des pigments extraits de ces plantes.

VI- Partie expérimentale

6-1 Criblage de la biodiversité 174

6-1-1 Echantillonages et collecte de la matière végétale 174

6-1-2 Préparation de la matière végétale en vue de l'extraction 174

6-2 Détermination des propriétés physiques 174

6-2-1 Produits et Matériels 174

6-2-2 Extractions des pigments 175

6-2-3 Propriétés colorantes 177

6-2-4 Stabilité par rapport au pH 178

6-2-5 Stabilité par rapport à la température : 179

6-3 Détermination des propriétés chimiques 180

6-3-1 Produits et Matériels 180

6-3-2 TFA ou teneur totale en flavonoïdes : 180

6-3-3 TPC ou composés phénoliques totaux : 181

6-3-4 TCT ou teneur total en tannins condensés : 181

6-3-5 TMA ou teneur total en monomère d'anthocyane : 181

6-3-6 Analyses chromatographiques 181

6-4 Détermination des activités biologiques 183

6-4-1 Activités antioxydantes 183

6-4-2 Activités antimicrobiennes 185

6-5 Propriétés toxicologiques 185

6-5-1 Test de toxicité aigüe sur modèle « souris albinos » (OF 1) 185

6-5-2 Test de toxicité sur modèle « zebrafish » 186

6-6 Essais d'application sur gélatine et savonnette 188

6-7 Analyses statistiques 188

6-1 Criblage de la biodiversité

6-1-1 Echantillonages et collecte de la matière végétale

Les prélèvements ont été effectués dans le cadre d'une autorisation spécifique de recherche N° 027/18-MEEF/SG/DGF/DSAP/SCB/2018. Pour chaque échantillonnage, un mélange de matières végétales a été collecté sur trois différents individus présents dans une même zone géographique ayant les mêmes caractères pédo-climatiques. Sur chaque individu sélectionné, 150 grammes de matières végétales ont été prélevées afin d'obtenir une quantité finale d'échantillon de 450 grammes (3 individus prélevés).

Les écorces ont été gratées sur le tronc pour l'*A. excelsus*, le *C. tagal*, le *H. madagascariensis*, le *R. mucronata*, et le *X. granatum*. Les jeunes feuilles de couleur rouge ont été découpées pour le *T. grandis*. Les racines adventives ont été découpées pour le *P. kirondron* et le *W. fruticosa*. Cet échantillonge a été répété trois fois pour chaque espèce afin d'avoir trois différents échantillons de matières végétales pour chaque espèce étudiée.

Les parties de la plante collectées ont ensuite été découpées en petits morceaux, puis mises au frais dans une glacière pour le transport, avant mise au congélateur après 24h à 48h de transport.

L'identification des noms des espèces a été réalisée au niveau du département Flore du Parc botanique et zoologique d'Antananarivo (PBZT) et du département TEF du FOFIFA.

6-1-2 Préparation de la matière végétale en vue de l'extraction

Détermination du taux de matières sèches : Le taux de matières sèches a été déterminé en mettant un échantillon dans une étuve à 130°C pendant 48 heures. La matière sèche a été mise dans un dessicateur jusqu'à refroidissement avant le pesage.

Lyophilisation : Les plantes préalablement découpés en morceaux ont été placées dans un congélateur à -80°C pendant 48 heures, puis lyophilisées pendant 48 à 72 heures (T°: -51°C, Pression: 0.13 bar) sur un lyophilisateur de paillasse Labconco.

6-2 Détermination des propriétés colorantes

6-2-1 Produits et matériels

Le tableau suivant liste les principaux produits et équipements utilisés pour l'étude des propriétés physiques des extraits végétaux.

Tableau 33. Principaux produits et équipements pour la détermination des propriétés physiques

Manipulations	**Produits nécessaire**	**Matériels utilisés**
Extraction conventionnelle	Ethanol, eau distillée	Chauffe ballon, ballon, refrigerant, unite de filtration, évaporotateur, lyophilisateur
Extraction sous pression	Ethanol, eau distillée	Extracteur ASE 300 (Dionex), cellule extraction, évaporotateur, lyophilisateur
Colorimétrie	Ethanol, eau distillée	Colorimetre, cuve (10 ml)
Stabilité pH	HCl, NaOH, Ethanol, eau distillée	pH mètre, colorimètre, spectrophotomètre
Stabilité temperature	Ethanol, eau distillée	Bain Marie, étuve

6-2-2 Extractions des pigments

Deux procédés d'extraction ont été mis en œuvre. Le premier procédé est une décoction à chaud effectuée sur de la matière fraîche et sur de la matière sèche (obtenue après lyophilisation). La méthode utilisée est basée sur celle décrite par Mabika et al. (2013) et Toussirot et al. (2014) pour lesquelles des modifications mineures ont été apportées en tenant compte des expertises des teinturiers malgaches. La deuxième méthode est une extraction solide-liquide accélérée par solvant sous pression (ASE). Une solution hydro-alcoolique à 70% (classée comme solvant vert) a été utilisée pour toutes les extractions. Ce solvant a été choisi dans la perspective d'un transfert de technologie à une échelle supérieure, car elle peut être obtenue aisément par fermentation alcoolique et par distillation. Les pigments peuvent être aussi bien polaires que apolaires ce qui fait de ce malange eau-ethanol un des meilleurs solvants pour l'extraction de pigments bruts (Figure 47).

Figure 47 : Exemples de poudres de pigments obtenues après extraction

<u>Extraction conventionelle : Decoction à chaud</u>

La méthode choisie est une décoction à chaud réalisée à une température de 65°C et avec un ratio solide/liquide de 1 :5 (m/m) (matières premières / solvants), suivie d'une filtration sous vide (papier filtre Whatman n °13) suivant la méthode utilisée par Ju et Howard (2003) avec quelques modifications mineures. Une agitation manuelle a été effectuée toutes les 30 minutes pour éviter que la poudre d'extrait

se colmate au fond du ballon et afin d'homogénéiser l'extraction. Le filtrat a été ensuite évaporé dans un rotavapor C 3900 et les extraits liquides ont enfin été lyophilisés. Les extraits en poudre ont été stockés dans un réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.

Figure 48 : Photographie de décoction à chaud

<u>Eco-extraction : Extraction solide-liquide par solvant accéléré sous pression (ASE)</u>

La deuxième procédure d'extraction, à savoir l'extraction solide-liquide par solvant accéléré sous pression (ASE), a été réalisée en utilisant un extracteur ASE 300 de Dionex (Accelerated solvent extraction) à une température de 85 °C, avec une durée de 6 minutes de préchauffage, cinq cycles successifs de 5 minutes d'extraction (temps statique) à une pression de 100 bars.

Equation 1 :

$$Rendement\ d'extraction\ (\%) = \frac{Masse\ d'extrait\ brut\ en\ poudre\ (g)}{Masse\ de\ la\ matière\ végétale\ sèche(g)}\ x\ 100$$

Figure 49 : Photographie d'un extracteur ASE ou extracteur solide-liquide sous pression

6-2-3 Analyse colorimétrique

L'extrait coloré (en poudre) a été dissous dans la même solution hydroalcoolique qui a été utilisée pour l'extraction (éthanol aqueux à 70% v/v) à différentes concentrations : 1, 2, 4, 8, 16 et 32 mg / mL. Un spectrocolorimètre Minolta CM-3500d muni d'une cuve de 10 mL a été utilisé afin de réaliser l'analyse colorimétrique dans le système international CIELab des extraits (figure 50). La valeur L * représente la luminosité (de zéro (0) ou absence de lumière à 100 qui est la valeur d'une réflexion diffuse parfaite). Les coordonnées a* et b* caractérisent la couleur : +a* indique le rouge et -a* le vert, +b * le jaune et -b* le bleu. Les valeurs C* et h* sont calculées à partir des coordonnées a* et b*. La chrominance (C *) indique la saturation ou l'intensité des couleurs, tandis que l'angle de teinte (H *) exprime la couleur observée. Un spectrophotomètre modèle Evolution 60S (Thermo Scientific) a été utilisé pour mesurer l'absorbance.

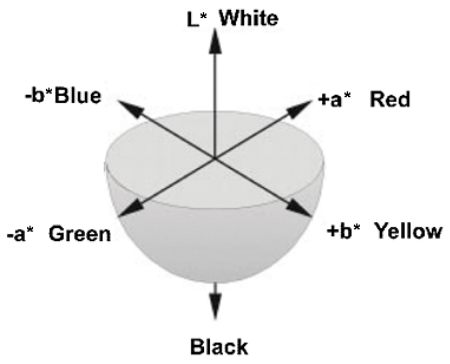


Figure 50 : Système de caractérisation de la couleur CieL*a*b* (source : Balcarce, 2001)

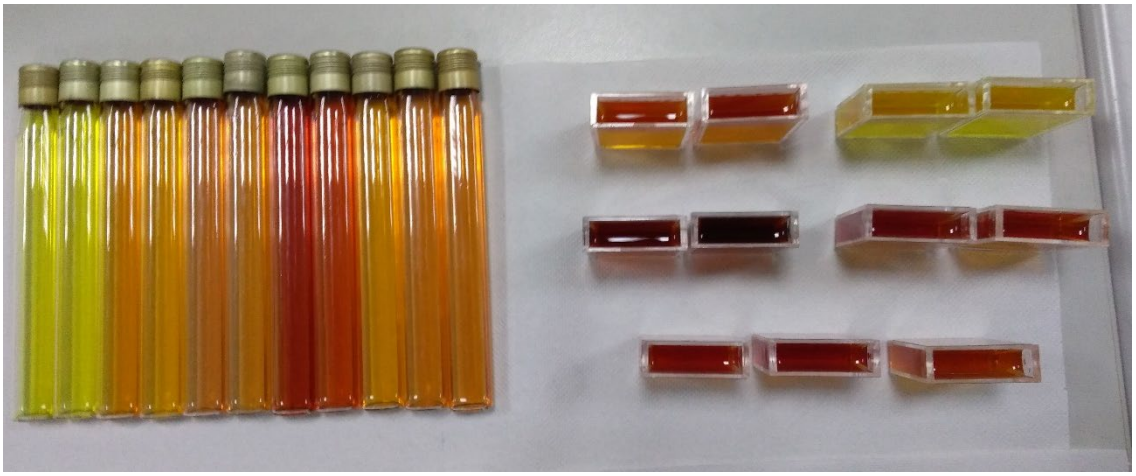


Figure 51 : Exemples d'échantillons colorés obtenus par dissolution à différentes concentrations

6-2-4 Test de stabilité par rapport au pH

La stabilité des pigments par rapport au pH a été étudiée selon la méthode développée par Torskangerpoll et Andersen (2005), à laquelle des modifications mineures ont été apportées. Des solutions hydroalcooliques à différents pH 3, 5, 9 et 11 ont été préparées dans des flacons de 25 mL et de l'extrait en poudre a ensuite été ajouté (concentration finale de 4 mg/ml).

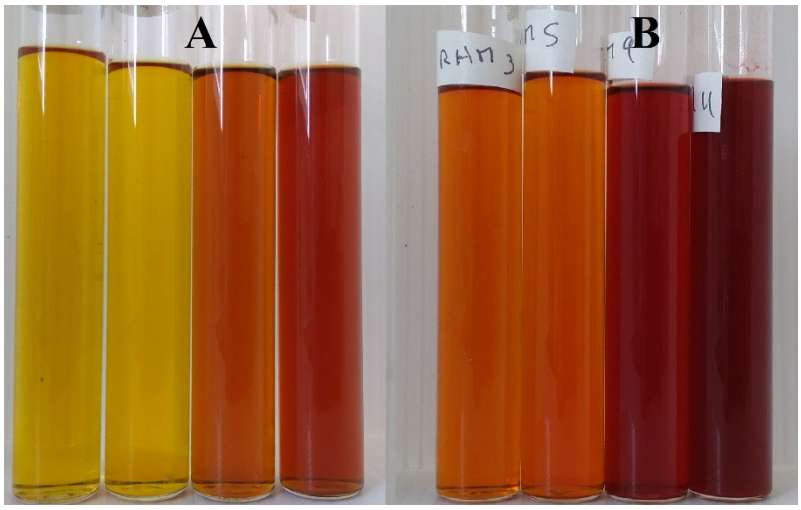


Figure 52 : Aspects des extraits liquides de *H. madagascariensis (A)* et de *R. mucronata (B)* à différents pH (pH 3, pH 5, pH 9 et pH 11, de gauche à droite)

6-2-5 Test de stabilité à la température

Trois différentes méthodes ont été utilisées pour vérifier la stabilité thermique des extraits.

1- Premièrement, les solutions colorées (pH neutre) ont été placées dans un bain marie à 90°C pendant 3 heures. Les variations de couleur sont observées après 1h, 2h et 3h de traitement à la chaleur.
2- Deuxièmement, les solutions colorées à différents pH (acide et basique) ont été incubées à des températures jusqu'à 90 °C.
3- Troisièmement, les tests ont été effectués sur des extraits colorés sous forme de poudre et soumises à des températures plus élevées (jusqu'à 300 °C) dans un four à moufle pendant 30 minutes.

L'effet du traitement thermique peut ainsi être mesuré par la variation totale de couleur (ΔE) dans le système CIELab et/ou la variation de l'absorbance dans le visible. La variation totale de couleur (ΔE) est calculée selon l'équation suivante (Toussirot *et al.*, 2014 ; Marzec *et al.*, 2019) à partir des coordonnées L, a* et b* initiales et finales :

Equation 2 :

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

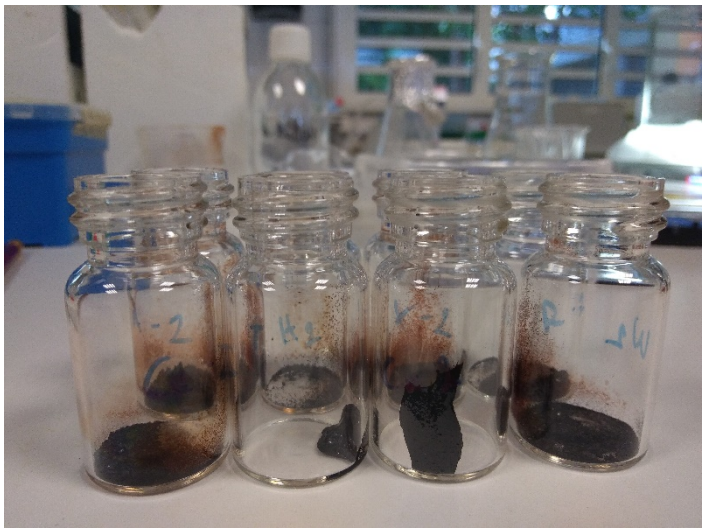


Figure 53 : Exemples d'extrait coloré après traitement à haute température

6-3 Détermination des propriétés physico-chimiques

6-3-1 Produits et matériels

Le tableau suivant liste les principaux produits et équipements utilisés pour l'étude des propriétés physico-chimiques des extraits végétaux.

Tableau 34. Principaux produits et équipements pour la détermination des propriétés physico-chimiques

Manipulations	Produits nécessaire et réactifs	Matériels utilisés
TPC	ethanol, eau distillée, réactifs Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3, méthanol , acide gallique	Tube à essai, spectrophotomètre à 765 nm
TFA	NaNO, Al_2Cl_3, NaOH, ethanol, eau distillée, méthanol, quercetine	Tube à essai, spectrophotomètre à 510 nm
TCT	Vanilline, ethanol, eau distillée, méthanol, H_2SO_4, épigallocatéchine	Tube à essai, spectrophotomètre à 500 nm
TMA	HCl, méthanol, ethanol, eau distillée, cyanidine-3-glucoside	Tube à essai, spectrophotomètre à 520 nm et 720 nm

6-3-2 Teneur totale en flavonoïdes (TFA) :

250 µL d'extrait et 500 µl de $NaNO_2$ à 5% ont été mélangés, puis placés 6 minutes à l'obscurité. Après cela, 500 µl d'Al_2Cl_3 à 10%, 5 ml de NaOH (1 N) et une solution à 70% d'éthanol ont été ajoutés afin d'obtenir un volume final de 12,5 ml. La solution finale a été conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 min, selon la méthode utilisée par Sun et al (2011) et Ksibi et al (2015). L'absorption a été prise à 510 nm et la quercétine a été utilisée comme référence.

6-3-3 Composés phénoliques totaux (TPC) :

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée par la méthode utilisée par Boo et al (2012) et Singleton et al (1999) : 3 mL d'eau distillée, 1 mL d'échantillon et 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu ont été mélangés dans un tube à essai. Après 5 minutes, 1 mL de Na_2CO_3 à 7% a été ajouté et le tube a été rempli avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 25 mL. Le mélange a été placé dans l'obscurité pendant 2 heures. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. La même manipulation a été effectuée avec de l'acide gallique (référence) à différentes concentrations afin d'obtenir la courbe étalon.

6-3-4 Teneur total en tannins condensés (TCT) :

100 µl d'échantillon liquide ont été mélangés avec 6 ml d'une solution de vanilline à 4% dans du méthanol, puis 3 ml de H_2SO_4 concentré (0,5 N) ont été rajoutés au mélange. Le mélange a été conservé à l'abri de la lumière pendant 5 minutes à 30 °C selon la méthode décrite par *Sun et al* (2011). L'épigallocatéchine a été utilisée comme référence pour l'obtention de la courbe étalon à 500 nm.

6-3-5 Teneur total en monomère d'anthocyane (TMA) :

Cette méthode est basée sur la réduction de l'anthocyane dans un environnement acide selon la méthode décrite par Lee *et al*. (2005). Deux solutions ont ainsi été préparées. La première solution à pH 1,0 et la seconde à pH 4,5. Une aliquote concentrée de chaque extrait a été ajoutée à chaque solution et l'absorbance a été mesurée à 520 nm et à 700 nm. La teneur totale en monomère d'anthocyane a été calculée en utilisant les équations ci-dessous. La TMA est exprimée en équivalent de cyanidine-3-glucoside qui est l'anthocyanine la plus couramment rencontrée chez les espèces végétales.

Equation 3 :

$$TMA = A * \frac{MW * DF * 1000}{\varepsilon * 1}$$

Equation 4:

$$A=(A_{520nm}-A_{700nm})\ pH1.0-(A_{700nm}-A_{520nm})\ pH4.$$

6-3-6 Analyses chromatographiques

Chromatographie liquide sur colonne ouverte

La première séparation des extraits bruts a été effectuée par chromatographie sur colonne ouverte. Elle a été réalisée sur une colonne de verre de 25 cm de longueur remplie de Silicagel 30. L'élution a été réalisée en utilisant quatre solvants de polarité différente : hexane (p = 0,009), acétate d'éthyle (p = 0,228), chloroforme (p = 0,259) et EtOH 70% (p> 0,700). Chaque fraction obtenue, après évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur sous vide, a ensuite été dissoute dans du méthanol.

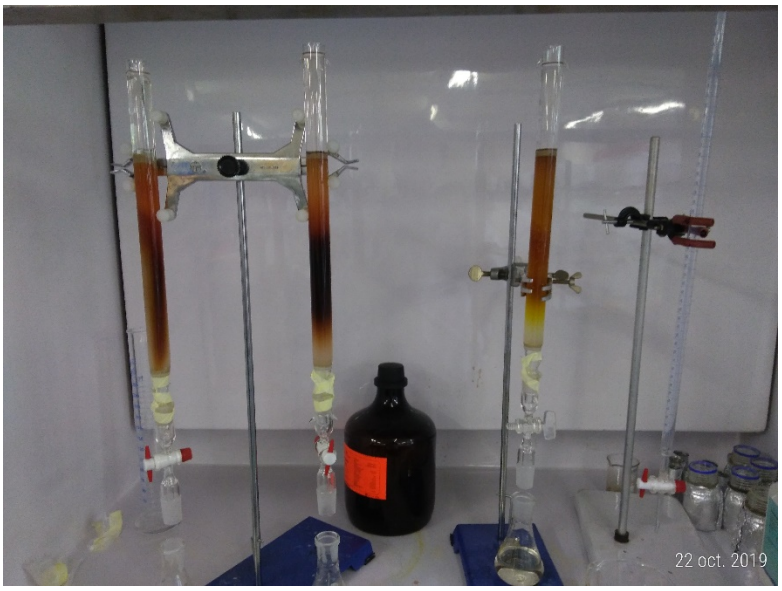


Figure 54 : Photographie de la chromatographie sur colonne ouverte

Chromatographie liquide semi-préparative et analyse HPLC-DAD-MS

Une chromatographie liquide semi-préparative a été mise en œuvre pour obtenir des composés purs (UHPLC ThermoScientific Ultimate 3000, couplé à un détecteur à barrettes de diodes et à un collecteur de fractions pour la purification ; colonne Synergi Hydro-RP 4 µm 80 Å / LC 250 * 10 mm). Une analyse par chromatographie liquide HPLC-DAD-MS (UHPLC-MS Vanquish ThermoScientific ; colonne Phenomenex Synergi Hydro-RP 4 µm 80 Å / LC, 250*4,6 mm) a également été réalisée sur certaines fractions et/ou sur certains composés purs pour permettre leur identification. Le programme de gradient chromatographique de chaque expérimentation est décrit dans le tableau 35 suivant et les échantillons ont été filtrés sur un filtre seringue Sartorius de 0,25 µm avant l'injection.

Table 35. Programmes d'analyse HPLC-DAD-MS

	Débit ($ml.min^{-1}$)	**Methodes (A: H_2O + 0,1 % formic acid/B : Acetonitrile)**					
- HPLC Analytique (HPLC-DAD-MS) :							
HPLC/DAD/CAD/MS	0,8	Temps	- 20	0	8	30	55
		%B	10	10	10	45	95
- HPLC semi-préparative :							
Fraction hexanique	4.5	Temps	-20	0	15		
		%B	66	66	66		
Fraction acetate d'éthyl	4.5	Temps	-20	0	8	45	55
		%B	25	25	25	80	95
Fraction EtOH 70%	4.5	Temps	-20	0	16	45	55
		%B	25	25	25	77	95

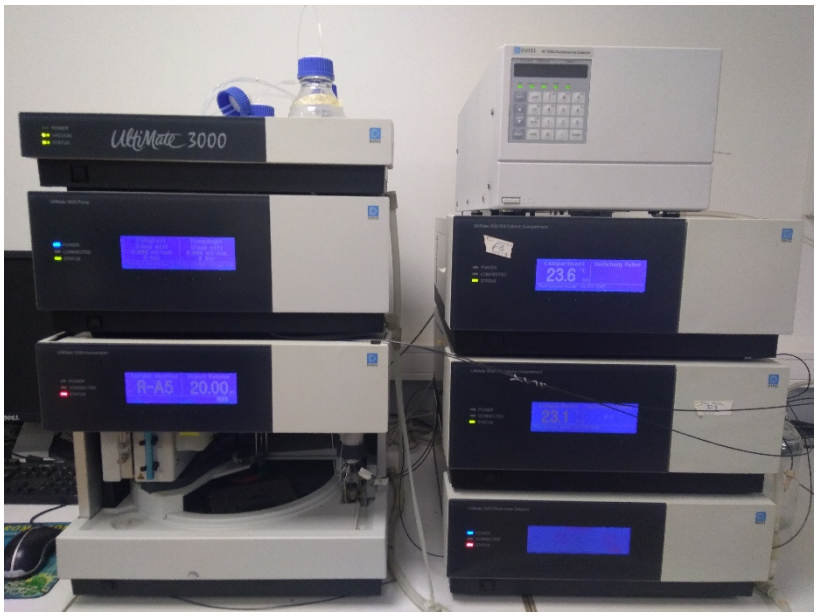


Figure 55 : Photographie du système UHPLC ThermoScientific Ultimate 3000

6-4 Détermination des activités biologiques

6-5-1 Activités antioxydantes

L'activité antioxidante a été déterminée par deux méthodes différentes : DPPH et FRAP.

Réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) :

La première méthode est basée sur la capacité d'élimination des radicaux *2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)* selon la méthode décrite par Singleton (1999) et Yeo (2019), ainsi par la méthode mise en œuvre par le département Chimie de la Tshwane University of Technology (Pretoria-Afrique du Sud) en tenant compte de l'effet des pigments sur l'absorbance à 515 nm. L'acide ascorbique et le butylhydroxyanisol (Bha) ont été utilisés comme références. La solution de DPPH a été préparée en dissolvant 0,394g de DPPH dans 1000 mL de methanol, puis la solution a été conservée à l'abri de la lumière dans du papier aluminium et agitée pendant 15 minutes. Dans une microplaque ELISA de 96 puits, il faut ensuite verser 35 µL de chaque échantillon et ajouter 315 µL de la solution de DPPH, puis conserver à l'abri de la lumière pendant 1 heure. Les absorbances sont mesurées à 515 nm. Finalement, la concentration EC_{50} requise pour réduire l'absorbance initiale du DPPH de 50% est calculée à partir de la courbe étalon.

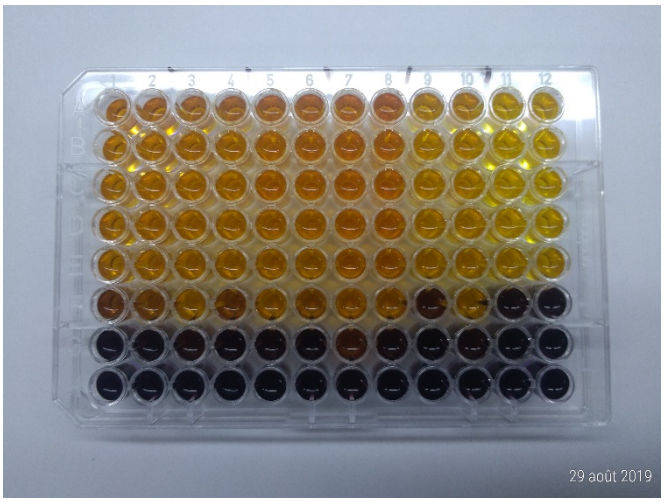


Figure 56 : Exemple de méthode par réduction du DPPH
(la partie claire démontre une activité oxydante élevée et la partie foncée une activité plus faible)

« Ferric reducing antioxidant power (FRAP) »:

La deuxième méthode repose sur la réduction du complexe ion ferrique-2,4,6-Tripyridyl-5-triazine (TPTZ) par les antioxydants ou le « *Ferric reducing antioxidant power* (FRAP) » selon la méthode décrite par Benzie et al (1996) et Thatoi et al (2014). La solution FRAP est préparée à partir d'acétate de sodium, de TPTZ et de FeCl3. Dans des microplaques 96 puits, 285 µl de la solution FRAP sont ajoutés à 15 µl de l'échantillon et l'absorbance est mesurée à 593 nm après 4 min d'incubation à 37°C. Le Trolox et le sulfate de fer sont utilisés comme étalons.

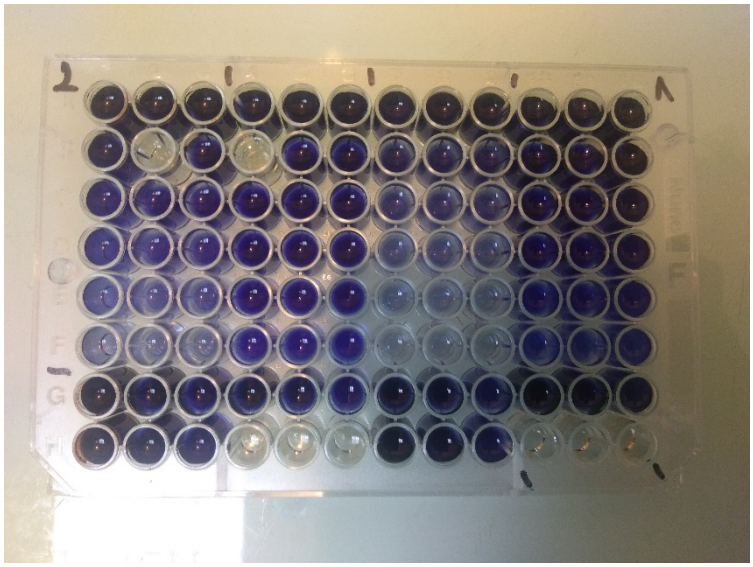


Figure 57 : Exemple de méthode par réduction du FRAP
(la partie foncée démontre une activité oxydante élevée et la partie claire une activité plus faible)

6-5-2 Activités antimicrobiennes

Le criblage des activités antimicrobiennes a été effectué en utilisant la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier filtre stérile imprégné de différentes concentrations des extraits de plantes. La méthode utilisée est celle décrite par Siva (2011). L'agar nutritif est placé dans l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes, puis coulé dans les boîtes de Pétri de façon à obtenir une même épaisseur pour constituer un milieu nutritif sur lequel les microorganismes pourront se développer. L'agar nutritif est composé de 1,0 g/l d'extrait de viande, 5,0 g/l de peptone, 2,0 g/l de levure, 8,0 g/l de chlorure de sodium et de 15,0 g/l d'agar. Ensuite, des microorganismes lyophilisés sont remis en culture dans un bouillon nutritif composé de 10,0 g/l de peptone de caséine, 5,0 g/l d'extrait de levure et de 10.0 g/l de chlorure de sodium.

Par ailleurs, les extraits bruts colorés sont dissous dans de l'eau distillée contenant 2,5% de DMSO. Un aliquot de 10 µL d'extrait est déposé sur des disques de 5 mm, puis séché à l'étuve à basse température. Deux concentrations de 5 mg/ml et de 10 mg/ml sont respectivement déposées sur les disques pour chaque boîte de Pétri. Un troisième disque imprégné d'eau distillée à 2,5% de DMSO est utilisé en tant que témoin négatif, tandis que l'ampicilline est utilisée en tant que témoin positif. Enfin, les boîtes de Pétri contenant le milieu nutritif, les microorganismes et les disques sont incubés à 35°C durant une nuit et la zone d'inhibition est ensuite mesurée.

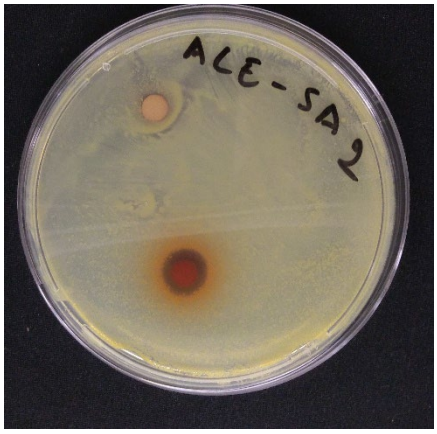


Figure 58 : Exemple de méthode de diffusion sur disque
(la partie vide autour du disque colorée en rouge démontre une activité microbienne)

6-5 Propriétés toxicologiques

6-6-1 Test de toxicité aigüe sur modèle « *souris albinos* » (OF 1)

Les tests de toxicité aigüe sur modèle « *souris albinos* » ont été menés suivant le guide de l'OCDE No 426 (2001) et repris par plusieurs auteurs pour l'analyse des extraits de plantes [18,19]. Elle consiste à administrer par voie orale différentes doses du produit dissous dans une solution aqueuse afin de déterminer le taux de mortalité et la dose létale 50 (DL_{50}) des individus.

Des souris albinos femelles d'un poids de 30 à 35 grammes ont été divisées en plusieurs groupes de 5 souris par cage. Les souris sont mises à jeûn 24 heures avant l'administration par voie orale du produit. Les extraits de pigments sont ensuite solubilisés dans de l'eau distillée à l'aide d'un agitateur et d'un bain à ultrason pour obtenir trois différentes concentrations : 1000, 2000 et 4000 mg/kg de masse corporelle. Après administration, des observations visuelles sont réalisées après 15 min, 30 min, 1 heure, 3 heures, 6 heures puis toutes les 24 heures pendant une semaine. Toutes différences de comportement avec le groupe témoin sont notées et seule la mort d'un individu est comptabilisée pour le calcul de la dose létale DL 50.

Figure 59 : Exemple de souris albinos (OF1)

6-5-2 Test de toxicité sur modèle « zebrafish »

Le deuxième test de toxicité a été réalisé sur les embryons de poissons de type « zebrafish » en se basant sur la méthode décrite par le guide de l'OCDE No 236 (2013), ainsi que par les travaux de Abe (2017) sur la toxicité aigüe de colorants artificiels et naturels, et les travaux de Jiang *et al* (2020) sur la toxicité des colorants azoiques. Ce test de toxicité sur modèle « zebrafish » consiste à exposer les œufs de « zebrafish » nouvellement fécondés à différentes concentrations d'extrait de plante pendant une période de 96 heures post-fertilisation (hpf). Toutes les 24 heures post-fertilisation (24hpf, 48hpf, 72hpf et 96hpf), des observations sont effectuées à l'aide d'un microscope équipé d'une caméra Olympus S30. À la fin de la période d'exposition, la toxicité aiguë est déterminée par calcul de la dose létale DL_{50}. Les échantillons sont dilués dans une solution reconstituée contenant 1.75 % de DMSO. Cette concentration est en-dessous de la concentration maximale tolérée par les embryons de « zebrafish » et n'a donc pas d'influence sur le développement des embryons. Deux différentes phases ont été réalisées avec respectivement des solutions mères de 20 mg/mL et de 8 mg/mL. Sur une microplaque de 24 puits, 125 µL de chaque solution sont ajoutés à 875 µL de la solution reconstituée pour chaque puit afin d'obtenir une concentration finale de 2500 µg/mL pour la première phase et de

1000 µg/mL pour la deuxième phase. Deux gammes de dilutions successives ont été effectuées pour obtenir des concentrations de l'ordre de 1250, 625, 313 µg/ml obtenues à partir de la solution mère à 2500 µg/ml, et des concentrations de l'ordre de 500, 250, 125, 63, 31 et 16 µg/ml obtenues à partir de la solution mère à 1000 µg/ml.

Trois différents témoins ont été mis en place afin d'être en accord avec le protocole de l'OCDE. Le premier contrôle négatif est constitué de la solution reconstituée, le deuxième contrôle négatif est constitué de la solution reconstituée contenant 1,75% de DMSO et enfin le contrôle positif utilisé est une solution à 4 µg/ml de 3,4-dichloroaniline. La dose létale 50 (DL_{50}) et la dose sans effet nocif observable (NOAEL) sont calculées à partir de la courbe de régression linéaire de mortalité en fonction de la concentration.

La solution reconstituée a été préparée comme suit : dans une fiole de 2 litres, il faut mélanger 1920 ml d'eau ultrapure (millipore), 20 mL de solution de KCl à 0,05 g/L, 20mL de solution de $CaCl_2 2H_2O$ à 29,4 g/mL, 20 mL d'une solution de $MgSO_4 7H_2O$ à 12.33g/L et 20 mL d'une solution de $NaHCO_3$ à 6.3 µg/mL. Le mélange est scellé à l'aide d'un papier parafilm puis mis sous agitation magnétique et oxygéné au moins une nuit avant son utilisation. Le pH doit rester entre 7.7 et 7.8 en réajustant avec du NaOH ou du HCl si besoin.

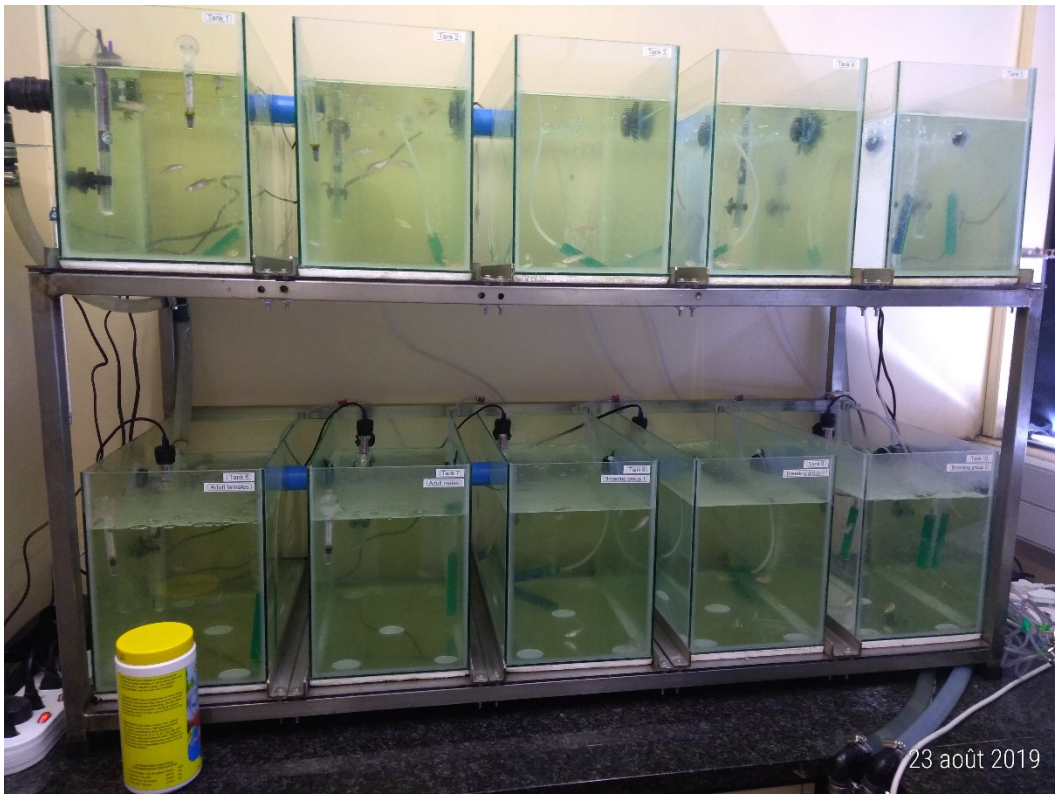


Figure 60 : Dispositif d'aquarium pour zebrafish (*Danio rerio*)

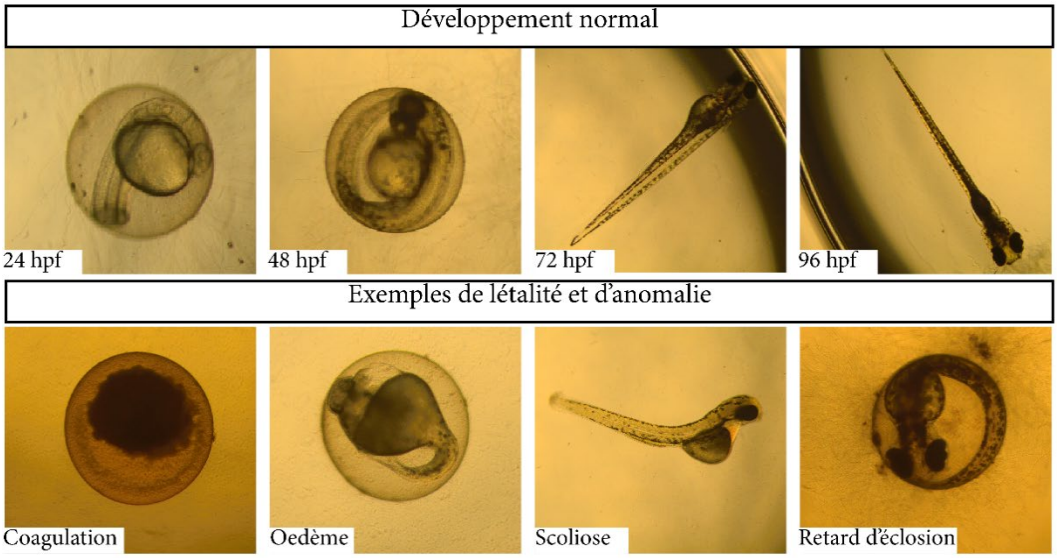


Figure 61 : Développement des embryons de zebrafish

6-6 Essais d'application sur gélatine et savonnette

Fabrication de la gélatine : la poudre de gélatine a été dissoute dans de l'eau chaude à 90°C. L'extrait liquide de pigments dissout dans une solution hydroalcoolique a été ensuite ajouté afin de créer une précipitation et par la suite après refroidissement avoir un corps gélatineux opaque coloré (Figure 44).

Fabrication de savonnettes : Des pastilles de savon ont été soumises au micro-onde pendant 30 secondes puis un extrait liquide de pigment a été ajouté dans le savon liquide pour obtenir une coloration donnée en fonction de la concentration. Le mélange a été ensuite moulé puis refroidi à 4°C afin d'obtenir des savonnettes solides (Figure 44-45).

6-7 Analyses statistiques

Pour chaque étape des travaux, de la collecte de la matière végétale à chaque analyse, en passant par les extractions, trois répétitions ont été effectuées pour chaque étape. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) et exprimée en moyenne ± écart-type des trois répétitions. L'acceptabilité a été vérifiée par le test de Duncan pour déterminer la signification statistique ($p < 0,05$).

Tables des matières

Avant-Propos i

Remerciements v

Sommaire vii

Liste des figures ix

Liste des tableaux xii

Liste des abréviations xiv

Introduction Générale 1

Chapitre I : 10

Les plantes tinctoriales de Madagascar : une source prometteuse de nouveaux colorants naturels avec de potentielles applications 10

Présentation générale du chapitre : 11

Highlights 12

Abstract 13

Keywords 13

1-1-Introduction 13

1-2 History and ethnobotanical survey of indigenous knowledge on dye plants used by the traditional dyers of the western region of Madagascar 15

1-3 Endemic, native and introduced dye plants traditionally used in Madagascar 18

1-3-1 Endemic dye plant species 18

1-3-2 Native dye plants species 22

1-3-3 Introduced dye plants 26

1-4 Dye plants uses: supporting literature review and new findings 30

1-5 Chemical composition of the natural dyestuffs in relation to their biological activities 34

1-5-1 Indigoid dyes 37

1-5-2 Quinonoid dyes 38

1-5-3 Flavonoid dyes 39

1-5-4 Tannin-based dyes 40

1-5-5 Carotenoid dyes 41

1-5-6 Others plant dyes (curcuminoid, betalains…) 41

1-6 Conclusion and future prospects 42

Acknowledgements 45

Conflict of interest 45

Funding Sources 46

Author Contribution Statement 46

References 46

Conclusions générales sur le chapitre I 54

Chapitre II : 56

Etudes ethnobotaniques, études préliminaires et choix des espèces 56

Présentation générale du chapitre : 57

Résumé 59

Mots-clés 59

2-1 Introduction 60

2-2 Critères de sélection des plantes tinctoriales cibles pour la suite de l'étude 61

2-2-1 La zone d'étude 61

2-2-2 La plage de couleur 62

2-3 Les plantes retenues dans notre étude 66

2-3-1 Caractéristiques botaniques de *Acridocarpus excelsus* A. Juss 66

2-3-2 Caractéristiques botaniques de *Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob 68

2-3-3 Caractéristiques botaniques de *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir 69

2-3-4 Caractéristiques botaniques de *Paracarphalea kirondron* (Baill.) Razafim., Ferm, B. Bremer & Kårehed 71

2-3-5 Caractéristiques botaniques de *Rhizophora mucronata* Lam 72

2-3-6 Caractéristiques botaniques de *Tectona grandis* L. f. 74

2-3-7 Caractéristiques botaniques de *Woodfordia fruticosa* L. Kurz 75

2-3-8 Caractéristiques botaniques de *Xylocarpus granatum* J. König 77

Conclusion 78

Références 79

Chapitre III : **81**

Propriétés physico-chimiques et technologiques (couleur, stabilité, propriétés antioxydantes, etc.) de pigments rouges extraits de plantes endémiques et indigènes de Madagascar. **81**

Présentation générale du chapitre : **82**

Highlights **83**

Abstract **84**

3-1 Introduction **85**

3-2 Materials and methods **88**

3-2-1 Plant materials 88

3-2-2 Chemicals 90

3-2-3 Extractions 90

3-2-4 Determination of main phenolic compounds 91

3-2-5 Coloring properties 92

3-2-6 Physico-chemical stability tests 93

3-2-7 Antioxidant activity 94

3-2-8 Statistical analysis 94

3-3 Results **94**

3-3-1 Pigment extraction yield and coloring properties of the crude plant extracts 94

2-3-2 Main chemical groups of coloring compounds 99

2-3-3 pH and thermal stabilities 101

2-3-4 Antioxidant activities 106

3-4 Discussion **107**

3-4-1 Exploitations as crops for new sources of plant pigments 107

2-4-2 Range of potent applications in the industries 110

3-5 Conclusions **111**

Acknowledgements **112**

Funding **112**

Appendix A. Supplementary data **112**

Conflict of interest **112**

References **112**

Conclusions partielles sur le chapitre III **127**

Chapitre IV : **129**

Activités biologiques et propriétés toxicologiques de quelques plantes tinctoriales de Madagascar. **129**

Présentation générale du chapitre : **130**

Highlights **131**

Abstract **132**

4-1 Introduction **132**

4-2 Materials and methods **133**

4-2-1 Plant materials and extracts 133

4-2-2 Chemicals and reagents 134

4-2-3 Albino mice 134

4-2-4 Zebrafish embryos 134

4-2-5 Microorganisms 135

4-2-6 Acute toxicity tests 135

4-2-7 Screening for the antimicrobial activity 137

4-3 Results and discussions **137**

4-3-1 Acute oral toxicity on albino mice 137

4-3-2 Acute toxicity on zebrafish embryos 138

4-3-3 Antimicrobial activities 142

4-4 Conclusions **143**

Conflict of interest **144**

Acknowledgments **144**

References **144**

Conclusions partielles sur le chapitre IV **146**

Chapitre V : **148**

***Paracarphalea kirondron :* une plante endémique de Madagascar, source potentielle de nouveaux pigments anthraquinoniques.** **148**

Présentation générale du chapitre : **149**

Highlights **150**

Abstract **151**

Keywords **151**

5-1 Introduction **151**

5-2 Materials and methods **153**

5-2-1 Plant materials 153

5-2-2 Extraction of pigments 153

5-2-3 Chemical analysis 154

5-2-4 Toxicity tests 154

5-3 Results and discussion **155**

5-3-1 Extraction yields and range of color 155

5-3-2 Chemical compounds 156

5-3-3 Toxicological properties 159

5-4 Conclusions and prospects **160**

Acknowledgements **161**

Conflict of interest **161**

References **161**

Conclusions générales et perspectives **164**

VI- Partie expérimentale **173**

6-1 Criblage de la biodiversité **174**

6-1-1 Echantillonages et collecte de la matière végétale 174

6-1-2 Préparation de la matière végétale en vue de l'extraction 174

6-2 Détermination des propriétés colorantes **174**

6-2-1 Produits et matériels 174

6-2-2 Extractions des pigments 175

6-2-3 Analyse colorimétrique 177

6-2-4 Test de stabilité par rapport au pH 178

6-2-5 Test de stabilité à la température 179

6-3 Détermination des propriétés physico-chimiques **180**

6-3-1 Produits et matériels..... 180

6-3-2 Teneur totale en flavonoïdes (TFA) :..... 180

6-3-3 Composés phénoliques totaux (TPC) : 181

6-3-4 Teneur total en tannins condensés (TCT) :..... 181

6-3-5 Teneur total en monomère d'anthocyane (TMA) :..... 181

6-3-6 Analyses chromatographiques 181

6-4 Détermination des activités biologiques 183

6-5-1 Activités antioxydantes..... 183

6-5-2 Activités antimicrobiennes 185

6-5 Propriétés toxicologiques..... 185

6-6-1 Test de toxicité aigüe sur modèle « *souris albinos* » (OF 1) 185

6-5-2 Test de toxicité sur modèle « zebrafish »..... 186

6-6 Essais d'application sur gélatine et savonnette 188

6-7 Analyses statistiques 188

Tables des matières 189

POLE RECHERCHE

Ecoles **D**octorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné **Mahery ANDRIAMANANTENA**, en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Antananarivo le 30/08/2020

Signature :

ANDRIAMANANTENA
Mahery

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.
Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

Valorisation de la biodiversité et études ethnobotanique, phyto-chimique et toxicologique des plantes tinctoriales de Madagascar : Applications dans le domaine des colorants naturels

Résumé :
La tendance actuelle des consommateurs s'orientant vers des produits de consommation plus sains et plus respectueux de l'environnement pousse les industriels à trouver des solutions alternatives naturelles. L'industrie des colorants de synthèse qui est parmi l'une des plus polluantes de la planète est directement concernée. La biodiversité de Madagascar, liée à une tradition d'utilisation des plantes pour teindre des fibres naturelles, représente une source renouvelable de pigments végétaux, jusqu'alors inexploitée. Les substances extraites de ces plantes pourraient donner lieu à des colorants naturels exploitables dans les industries sous réserve de lever les principaux verrous scientifiques liés au manque de connaissances sur ces plantes. Trois approches complémentaires ont été réalisées lors de ce travail. Une première approche ethnobotanique a consisté à cribler la biodiversité en plantes tinctoriales à Madagascar. Ainsi 128 espèces, dont 34 endémiques, ont été recensées et décrites. Une deuxième approche phyto-chimique a permis de mettre au point l'extraction des colorants par un procédé éco-responsable avec des solvants écologiques et de caractériser les propriétés physico-chimique et technologique des extraits obtenus. Les résultats en termes de pouvoir colorant, de stabilité (effet pH et température) et de propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des pigments (anthocyanes, proanthocyanidines) extraits de quelques espèces de plantes selectionnées, dont *Acridocarpus excelsus* et *Woodfordia fruticosa,* soulignent leurs potentialités comme colorants naturels bioactifs. L'analyse chromatographique HPLC-DAD-CAD-MS des pigments extraits de *Paracarphalea kirondron* a révélé pour la première fois des métabolites secondaires responsables des propriétés tinctoriales et biologiques. Enfin, la troisième approche toxicologique, réalisée à partir du modèle *zebrafish* et du modèle animal *albinos mice*, a permis de caractériser les profils d'activité biologique et de toxicité de ces extraits végétaux. Ces premiers résultats ouvrent des perspectives directement applicables de valorisation industrielle de ces ressources biologiques et des savoir-faire malgaches qui peuvent représenter les solutions alternatives naturelles recherchées. Cependant des mesures d'accompagnement devront être mises en place pour assurer une exploitation durable de cette biodiversité.

Mots clés : Plantes tinctoriales, biodiversité, Madagascar, colorant naturel, stabilité, phytochimie, toxicité, zebrafish, *Paracarphalea kirondron. Acridocarpus exelsus, Woodfordia fruticosa.*

Valorization of the biodiversity, ethnobotanical, physico-chemical and toxicological studies of dye plant species from Madagascar: Application in the field of natural dyestuffs

Abstract:
Consumers trends are now moving towards healthier and more environmentally friendly products. It is pushing manufacturers to find natural alternatives to substitute the artificial products. The synthetic dyes industry, one of the most polluting industries in the world, is directly affected. Madagascar's biodiversity, linked to a tradition of using plant species to dye natural fibers, represents an adequate source of renewable source of pigments, remains weakly exploited. Substances extracted from these plants could result in natural dyes that can be used in industries subject to overcome the main scientific challenges related to the lack of knowledge about these plants. Three complementary approaches were carried out during this study. A first ethnobotanical approach consisted in the screening of the dye plant biodiversity of Madagascar. 128 plant species, including 34 endemic species, have been identified and described. A second phytochemical approach has allowed the extraction of pigments by an eco-responsible process with green non-harmful solvent. The results in terms of coloring properties, stability (pH, temperature), antioxidant and antimicrobial properties of pigments (anthocyanins, proanthocyanidins, etc) extracted from a few species, including *Acridocarpus excelsus* and *Woodfordia fruticosa* highlight their potential as natural bioactive colorants. HPLC-DAD-CAD-MS chromatography analysis of the roots extracts of *Paracarphalea kirondron* display for the first time the secondary metabolites responsible of the dyeing and biological properties in this plant species. Finally, a third toxicological approach conducted on zebrafish and albino mice model permitted to characterize the activity / toxicity profiles of these plant extracts. These early results lead to great opportunities across the industrials valorization of these natural ressources and traditionnal malagasy knowledge. However, appropriate measures should be taken to ensure the sustainable exploitation of this biodiversity.

Keywords: Dye plants, biodiversity, Madagascar, natural dyestuffs, stability, phytochemistry, toxicity, zebrafish, *Paracarphalea kirondron. Acridocarpus exelsus, Woodfordia fruticosa.*